

Anni Hyvönen

Living lab -tapaustutkimus antimikrobisista pinoista

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

11.12.2018

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Anni Hyvönen Living lab -tapaustutkimus antimikrobisista pinnoista 41 sivua + 3 liitettä 11.12.2018
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Tutkintovastaava & Lehtori Jarmo Palm Isku Interior Oy:n kehityspäällikkö Kari Soljamo
<p>Tämän opinnäytteen puitteissa tehtiin Living lab -tapaustutkimus alakoulussa tutkien antimikrobisten pintojen vaikutusta mikrobistoon keväällä 2018. Antimikrobisten pintojen avulla pyritään vähentämään ihmisille haitallisten mikrobien määrää pinnoilla ja näin myös pienentämään taudinmuodostumista. Tutkimus tehtiin toimeksiantona Isku Interior Oy:lle. Mikrobimäärityksiä tehtiin maaliskuuhun 2018 aikana kuutena eri kertana.</p> <p>Tutkimuksen aikana tutkittiin kvantitatiivisesti aerobisten kokonaisbakteerien määrä sekä kvalitatiivisesti gram-negatiivisia bakteereita MacConkey-agarilla, enterokokit sekä <i>Staphylococcus aureus</i> maljakasvatustulojen ja matriisiavusteisen laser-desorptio-ionisaatio-lentoaikamassaspektrometrian avulla. Lisäksi erillisellä virusnäytteenotolla tutkittiin löytyykö pinnoilta noro- ja adenovirusia. Tutkimuksen edetessä mukaan lisättiin myös ATP-mittarilla suoritettuja pintahygieniatestaukset. Antimikrobisten pintojen mahdollista vaikutusta lyhytaikaisiin sairastumisiin tutkittiin tilastollisesti käyttämällä hyväksi koululta saatua personoimatonta poissaolodataa puolen vuoden väliseltä ajalta.</p> <p>Maljakasvatusten tulokset sekä antimikrobisilta että vertailupinnoilta olivat hyvin alhaisia. Kvantitatiivisista tuloksista on visuaalisesti nähtävissä kuvaajista, että useimmissa antibakteerisissa kalusteissa oli vähemmän bakteereita kuin vertailukalusteissa. Pulpettien, tuolien, opettajan pöydän, oven kahvan sekä allaspöydän tuloksista saatiin sekä t-testillä että yksisuuntaisella varianssianalyysillä tulokseksi, että pintojen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla. Tuolinrunkojen osalta yksisuuntaisella varianssianalyysillä saatiin tulokseksi, että pintojen välillä on tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla. Kvalitatiivisten bakteeritutkimusten osalta ei löytynyt yhtään enterokokkeja tai <i>Staphylococcus aureus</i>. MacConkey-agareilta löytyi joitakin opportunistisia patogeeneja. Adenovirusta löytyi luokan oven kahvasta yhdellä näytteenotokerralla. ATP-mittauksen perusteella pinnat eivät olleet erityisen likaisia. ATP-mittauksilla ei löytynyt tilastollista riippuvuutta kvantitatiivisten mikrobitulosten kanssa. Tutkittaessa poissaolotietoja huomattiin, että oppilaiden poissaoloissa oli eroa eri luokkahuoneissa.</p>	
Avainsanat	antimikrobinen pinta, hopeafosfaatti, alakoulu

Author Title Number of Pages Date	Anni Hyvönen Living Lab Case Study on Antimicrobial Surfaces 41 pages + 3 appendices 11 December 2018
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Degree Programme in Laboratory Sciences
Instructors	Jarmo Palm, Head of Degree Programme & Lecturer Kari Soljamo, Development manager at Isku Interior Oy
<p>This living lab case study on antimicrobial surfaces was done at an elementary school during spring 2018. Antimicrobial surfaces can be used to minimize the amount of malign microbes thus reducing pathogens.</p> <p>This study was commissioned by Isku Interior Oy and microbial testings were made during March and April 2018. Samples were collected on six different times. The tests included total viable count, gram-negative bacteria on MacConkey agar, Enterobacteriaceae and Staphylococcus aureus tests on culture plates and verification with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Noro and adenoviruses were tested with separate sampling. Surface hygiene was tested with ATP measuring device. The effect of antimicrobial surfaces on short term sick leave was studied using un-personified absence data from the school from a period of six months.</p> <p>The quantitative results from the culture plates were low both on antimicrobial and comparison surfaces. Visually the quantitative results showed lower amount of microbes on antimicrobial surfaces. Studied desk, chair, teacher's chair, door handle and washbasin results show no statistical significance on confidence level 95 % between antimicrobial and comparison surfaces when t-test and one-way-ANOVA was run. The chair frame results showed that surfaces had statistical significance on confidence level 95 %. On qualitative analysis of bacteria, no Enterobacteriaceae or Staphylococcus aureus were found. Some strains of opportunistic pathogens was found on MacConkey agar. Adenovirus was found on door handle on one sample. ATP-measurements were also low and surfaces were not especially dirty. There were no statistical correlation between ATP and quantitative microbe results. When the absence data was studied, it showed that there was difference between class rooms.</p>	
Keywords	antimicrobial surface, silver phosphate, elementary school

Sisällys

1	Johdanto opinnäytetyöhön	1
2	Pintojen hygienia	2
3	Mikrobien siirtyminen ja antimikrobiset ratkaisut	4
3.1	Mikrobien leviäminen käsien välityksellä	4
3.2	Antimikrobiset materiaalit	5
3.3	Hopean vaikutus mikrobeihin	7
4	Tutkittavat mikrobit	9
4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	9
4.2	Enterokokit	10
4.3	Gram-negatiiviset sauvabakteerit	11
4.4	Norovirus	11
4.5	Adenovirus	12
5	Tutkimuksen suoritus ja käytetyt menetelmät	13
5.1	MacConkey-agar	13
5.2	CHROMagar™ Staph aureus	14
5.3	BBL™ Enterococcosel™ -agar	14
5.4	ATP:n määrittäminen luminometrillä	15
5.5	Identifiointi massaspektrometrillä	16
6	Tutkimuksen tulokset	17
6.1	Kvantitatiiviset tulokset	17
6.2	ATP-mittauksen tulokset ja vertailu pmy-lukuihin	26
6.3	Virustestien tulokset	28
6.4	Kvalitatiiviset tulokset	28
6.5	Oppilaiden poissaoloverailujen tulokset	31
7	Tulosten tulkinta ja luotettavuus	32
	Lähteet	35
	Liitteet	
	Liite 1. Opettajille annettu seurantalomake luokkahuoneen käytöstä	

Liite 2. Muunnettujen pesäkelukumäärien keskiarvojen Box & Whisker -kuvaajat

Liite 3. ATP-mittausten tulokset

1 Johdanto opinnäytetyöhön

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tutkia hopeapartikkeleita sisältävien antimikrobisten pintojen vaikutusta bakteerien määrään verrattuna vertailukalusteisiin. Tehtävänä oleva Living Lab -tyyppinen tutkimustyö on jatkoa syksyllä 2017 Metropolia ammattikorkeakoulun laboratorioanalytiikan Innovaatioprojektin tiimoilta aloitetuille pintatutkimuksille, ja opinnäytetyö tehdään toimeksiantona HygTech-allianssiin kuuluvalla Isku Interior Oy:lle. Isku on yksi kuudesta yrityksestä, jotka kuuluvat tähän suomalaiseen hygienian hallintaan liittyvien tuotteiden ja ratkaisujen kehittämiseen erikoistuneeseen allianssiin. Tutkimusta varten Isku on marraskuussa 2017 sisustanut Lounais-Suomessa olevaan peruskouluun kaksi luokkahuonetta kaksilla eri pintamateriaaleilla varustelluilla huonekaluilla. Luokkahuoneissa opiskelee kaksi alakoulun samalla vuositasolla olevaa luokkaa, joissa kummassakin on 23 oppilasta. Koulussa on koneellinen ilmastointi.

Mikrobimääritykset tehtiin maalis-huhtikuun 2018 aikana noutaen näytteet luokista siivoamattomilta pinnoilta ennen uuden koulupäivän alkamista. Suurin osa laboratoriotutkimuksista tehtiin Metropolia Ammattikorkeakoulun laboratorioanalytiikan tutkinto-ohjelman toimipisteen laboratoriossa. Alustavassa tutkimussuunnitelmassa tavoitteena oli tutkia kvantitatiivisesti aerobisten eli hapellisissa olosuhteissa kasvavien kokonaisbakteerien määrä sekä kvalitatiivisesti gram-negatiivisia bakteereita, enterokokit sekä *Staphylococcus aureus* maljakasvatusalustojen avulla. Lisäksi erillisellä virusnäytteenotolla tutkittaisiin löytyykö pinnoilta noro- ja adenovirusia. Tutkimuksen aikana mukaan lisättiin myös ATP-mittarilla suoritettavat pintahygieniatestaukset. Antimikrobisten pintojen mahdollista vaikutusta lyhytaikaisiin sairastumisiin tutkitaan tilastollisesti käyttämällä hyväksi koululta saatavaa personoimatonta poissaolodataa marraskuun 2017 ja huhtikuun 2018 väliseltä ajalta. Ennen tutkimuksien aloittamista, koululle toimitettiin vakioinnin helpottamiseksi ja muutosten huomioimiseksi kyselylomake (liite 1) sekä ohjeet jättää tutkimuksen kohdepinnat siivoamatta todellisten kosketuskontaminaatioiden esille saamiseksi.

2 Pintojen hygienia

Tulevaisuudessa huolenaiheena on, että infektioiden ehkäisyä sekä hoitoa uhkaa antimikrobinen resistenssi (AMR) eli mikrobien kehittämä resistenssi antibiootteja vastaan. Antimikrobinen resistenssi kasvaa, kun mikro-organismit muuntuvat geneettisesti ajan myötä joutuessaan kosketuksiin antimikrobisten lääkeaineiden kanssa. Antibioottien liiallinen määrääminen ja väärinkäyttö lisäävät resistenssin kasvua. Tällöin olemassa oleva lääkeaine muuttuu tehottomaksi ja tartunnan saatua sairaus saattaa pidentyä sekä joidenkin tautien osalta myös todennäköisemmin aiheuttaa invalideettia tai jopa kuoleman. Esimerkiksi *Escherichia colin* antibioottiresistenssin takia nykyisin saatavilla oleva fluorikinoniantibiootti toimii vain alle puoleen tapauksista monissa maissa. Myös *Staphylococcus aureuksen* metisilliinille resistenttien kantojen (MRSA) arvioidaan aiheuttavan kuoleman 64 % todennäköisemmin kuin ei-resistentin kannan sairastavalle. [1.] Euroopan tautien ehkäisy- ja -valvontakeskus (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) on jo vuonna 2015 arvioinut, että yhden vuoden aikana yli neljä miljoonaa ihmistä tulee saamaan terveydenhoitoon liittyvän tartunnan EU:n jäsenmaissa ja että niistä aiheutuu suoraan noin 37 tuhatta kuolemaa johtuen pääosin juuri moniresistenttisistä *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerikannoista. [2.] Normaaliarjessa mikrobit voivat tarttua joko ilman välityksellä, pisaratartuntana tai kosketuksen kautta joko suoraan tartunnan lähteestä tai kosketuspintavälitteisesti. Monien moniresistenttien mikrobien yleisin leviämistie on käsikosketus [3.]

Tyypillinen käsipari majoittaa yli 150 erilaista uniikkia bakteerilajia. Parhaimmillaan bakteeritiheys voi olla 10^7 solua per senttimetri. [4.] Coloradon yliopiston tutkimuksessa käsien mikrobistosta saatiin selville, että kämmenen pinnalta löytyi kolme kertaa enemmän mikrobeja kuin otsasta tai kynänpäästä ja saman verran tai jopa enemmän mikrobeja kuin suolistosta tai suusta. [5, s. 16.] Yhdessä Yhdysvaltalaisessa tutkimuksessa käytiin vuosina 1999-2003 läpi yli tuhat erilaista pintaa jokapäiväisessä ympäristössä, kuten toimistoissa, päiväkodeissa, ravintoloissa, lentokentillä sekä henkilökohtaisissa tavaroissa ja niistä tutkittiin fekaalisten sekä totaalisten koliformisten bakteerien esiintyvyyden lisäksi proteiini- ja biokemiallisia markkereita (kuten veri, virtsa ja muut ruumiinnesteet). Tutkimuksessa isoimmat kontaminaatiotasot biokemiallisista markkereista (46 % otetuista näytteistä) löytyi päiväkodista. Fluoresenssimerkkiaineen avulla on pystytty todistamaan, että yli 86 % kontaminaatiosta siirtyy pinnalta toiselle käsien välityksellä. [6, s. 225-234.]

Koska osa bakteerikannoista selviytyy pitkiäkin aikoja kuivilla pinnoilla, olisi toivottavaa, että pinnat tuhoaisivat mikrobeja. Esimerkiksi useimmat gram-positiiviset bakteerit kuten enterokokit, *Staphylococcus aureus* tai *Streptococcus pyogenes* ovat vielä tartuntakykyisiä useiden kuukausien jälkeen pinnoilla. Myös sairaalaperäiset sienipatogeenit pystyvät elämään pinnoilla jopa neljä kuukautta. Viruksien osalta tilanne on hieman parempi, sillä useimpien lajien selviäminen pinnoilla ilman isäntää vaihtelee noin muutamasta tunnista viikkoon, mutta joukosta löytyy suolistoon liittyviä viruksia kuten hepatiitti A, polio ja rotavirus, jotka selviävät pinnoilla parikin kuukautta. [7.]

Euroopan komissio on COST-yhteistyön kautta rahoittanut neljän vuoden ajan aloitetta luoda tuotekehitystä, säätelyä sekä uusien antimikrobisten pinnoitteiden toimijoiden sidosryhmiä terveydenhoidon kautta hankittujen tartuntojen estämiseen. [8.] Jo vuonna 1971 perustettu Eurooppalainen tutkijaverkosto COST (European Cooperation in Science and Technology) tukee tutkijoita innovaatioissa antimikrobisten pinnoitteiden (AntiMicrobial Coatings, AMC) luomisessa infektioiden ehkäisemiseksi. [9.] Edellä mainittu organisaatio on ollut avustamassa muun muassa väitöstutkimuksessa [10.] kuin myös Iskun antibakteeristen lisäaineiden toimittajan BioCote'n tutkimuksissa. Euroopan AMiCI (AntiMicrobial Coating Innovations) -verkostoon kuuluu yli 60 yliopistoa, tutkimusinstituuttia sekä yritystä, joiden tavoitteena on uusien terveysteknologiatuotteiden käytön kehittäminen ja kohdentaminen. [8.]

3 Mikrobien siirtyminen ja antimikrobiset ratkaisut

3.1 Mikrobien leviäminen käsien välityksellä

Kontaminoitujen pintojen kautta käsikosketuksella bakteerien leviämistä on tutkittu jo useiden vuosikymmenien ajan ja bakteereja on tutkitusti enemmän huokoisilla pinnoilla kosteissa olosuhteissa. Kuudessa alakoululuokassa Seattlessa Yhdysvalloissa tehdyssä tutkimuksessa selvitettiin, mitkä pinnat luokassa ovat eniten mikrobikontaminoituja. Tulokseksi saatiin, että bakteeri- ja viruskontaminaatioilla ei ollut korrelaatiota, joten korkeasta bakteeriluvusta ei voida päätellä viruspitoisuutta. Eniten bakteereita löytyi juomapisteen painonapista, käsikäyttöisen kynänteroittimen kahvasta, tietokoneen näppäimistöltä sekä pesualtaan hanasta. Näille kaikille on yhteistä se, että useat oppilaat käyttävät niitä päivän aikana. Pintoja joissa oli vähiten bakteereja, käytti vain yksi yksittäinen oppilas. Tutkittavista pinnoista vähiten bakteereja löytyi pulpeteilta, tuoleilta sekä kahvoista molemmiin puolin koko päivän auki olevasta ovesta. Tutkimuksella saatiin myös selville, että vaikka bakteerimääriä saatiin vähenemään pintojen puhdistamisella, eivät erot olleet tilastollista merkitystä. Pintojen puhdistamisella oli kuitenkin merkitystä poissaoloihin ja vertailuluokassa oli yli kaksi kertaa todennäköisempää sairastua kuin erikoispuhdistetuissa luokissa. [11.]

Myös toisessa Yhdysvaltojen pennsylvanialaisessa alakoulussa tehdyssä tutkimuksessa selvitettiin käsihygienian parantamisen ja poissaolojen yhteyttä kolmen kuukauden ajanjaksolta ja tulokseksi saatiin, että testiryhmissä oli puolet vähemmän sairaspöissaoloja kuin kontrolliryhmissä. [12.] Yhdysvalloissa Ohiossa tehdyssä kvasikokeellisessa tutkimuksessa oli hypoteesina, että lisäohjeistamalla käsienpesussa sekä opettamalla hygienian tärkeydestä käyttämällä tieteellistä ongelmanratkaisulähtökohtaista opetusmetodia saataisiin alakoulun viidesluokkalaisten käsistä petrimaljakasvatuksissa pienempiä bakteerimääriä. Tulokseksi saatiin, että 41 prosentilla tutkittavista oppilaiden käsistä saatujen bakteerien määrä vähentyi tutkimusmaljoilla. Lisäksi oppilaat kertoivat, että visuaalisen petrimaljakasvatusopetuksen jälkeen oli helpompi ymmärtää käsienpesun ja bakteerien vähentämisen yhteys ja merkitys. [13.]

Käsienpesuun liittyvien tutkimustulosten meta-analysointi vuosina 1960–2007 saatiin tulokseksi, että käsienpesu vähensi hengitystiesairauksia 20 %:lla sekä mahaan ja suolistoon liittyviä gastrointestinaalisia tauteja 31 %:lla. [14 s. 1376.]

3.2 Antimikrobiset materiaalit

Antibakteeriseksi pinnaksi voidaan sanoa pintaa, johon mikrobit eivät tartu tai jolta vaihtoehtoisesti pinnan ominaisuudet tuhoavat mikrobeja. Kemiallisia antimikrobisia pinnoitemateriaaleja ovat esimerkiksi kuparioksidi, titaanioksidi sekä hopea. [15.] Yksi vaihtoehto pintojen antimikrobisiksi strategioiksi on kosketusaktiiviset pinnat, jotka eivät luovuta biosidiainesosia vaan esimerkiksi pintaan kiinnitetyt polymeeriketjut yltyvät bakteerisolun solukalvolle puhkaisten sen tai vaihtoehtoisesti pinnalla olevat positiivisesti varautuneet kvaternaariset ammoniumkationit voivat irrottaa solukalvon fosfolipideitä ja näin tappaa bakteerin. Erityisesti jälkimmäisen pintarakenteen huomattiin olevan bioaktiivinen pintavaruksen tiheyden vuoksi sekä gram-negatiiviselle *E. colille* että gram-positiiviselle *Bacillus subtilikselle*, vaikka itse polymeeriketju oli liian lyhyt lävistämään solukalvon. [8.]

Bakteerit kiinnittyvät pintoihin kahdessa vaiheessa. Ensimmäinen kiinnittyminen tapahtuu nopeasti minuuteissa ja on reversiibeliä kiinnittymistä, missä kiinnipitävät voimat sekä bakteerin ja pinnan välillä kasvaa hydrodynaamisten ja elektrostaattisten vuorovaikutusten voimasta. Tämän oletetaan johtuvan rajapinnan nesteen häviämisestä, bakteerin pintamolekyylien rakennemuutoksista sekä soluvartalon asennonmuutoksesta pinta-alan maksimoimiseksi. Toinen irreversiibeli vaihe pintaan kiinnittymisessä kestää useampia tunteja ja siinä soluseinämän hydrofobiset alueet ovat van der Waalsin vuorovaikutuksessa pinnan kanssa. Riippuen bakteerista pintaan kiinnittymisestä palautuvasta reversiibelistä palautumattomaan irreversiibeliin liittyy lisäksi useita proteiineja. [16.]

Yhtenä vaihtoehtona ehkäistä bakteerin proteiinien kiinnittyminen pintaan on luoda pinnasta superhydrofobinen. Esimerkkeinä superhydrofobisista pinnoista ovat hierarkkiset nanorakenteet ja kahtaisioniset polymeerit, joissa molekyyliarakenteessa on sekä anionisen ryhmän negatiivinen varaus että kationisen ryhmän positiivinen varaus, jotka molemmat tekevät pinnoista tarttumattomia bakteereille. Superhydrofobiset pinnat perustuvat yli 150 asteen vesikontaktikulmaan, joka syntyy esimerkiksi lootuskukan

lehdellä mikro- ja nanorakenteiden yhteistyönä. Tarttumattomat pinnat estävät siis bakteerin tarttumista pintaan, mutta ne eivät varsinaisesti tapaa mikrobeja. [8.]

Monilla bakteereilla on piluksia sekä fimbrioita eli eräänlaisia solun ulokkeita, joiden avulla ne tarttuvat muihin soluihin tai ympäristöönsä. [17.] Monet bakteerit kiinnittyvät pintaan alkavat tuottamaan sokeri- ja proteiiniyhdisteitä, jotka muodostavat suojaavan kerroksen solujen ympärille. Tätä bakteerien tuottamaan orgaanista ainetta kutsutaan biofilmiksi. Biofilmi lisää huomattavasti bakteerisolujen kestävyttä ulkoisia stressitekijöitä kuten kuumuutta, happamuutta, desinfektioaineita ja mekaanista rasitusta vastaan. Mitä vanhemmasta biofilmistä on kyse, sitä paremmin se kestää mekaanista rasitusta, joten säännöllinen pintojen puhdistus on tärkeää bakteerien eliminoimiseksi. [18, s.370.]

Ruotsin ja Suomen yhteistyössä tekemässä tutkimuksessa kartoitettiin yleisimmin sairaalainfektioita aiheuttavaa *Acinetobacter baumannii* -bakteerin rakennetta sekä sen biofilmin muodostumista. Tutkimuksessa käytettiin röntgenkristallografiaa, jossa sironneiden röntgensäteiden avulla muodostettiin molekyylin kolmiulotteinen rakenne. Röntgenkristallografian perusteella pystyttiin saamaan selville, että *A. baumannilla* on sormien omaiset Cs₂-pilukset, joiden avulla se pystyy löytämään alustalta hydrofobisia koloja sekä tarttumaan niillä elottomille pinnoille. Joka suuntaan harottavat sormia jäljittelevät kiemurat toimivat paremmin erilaisille pinnoille tarttumiseen kuin perinteinen pili, joka vaatii täydellisesti yhteen sopivan tarttumiskuopan. Sama ominaisuus löytyy todennäköisesti kaikilta bakteereilla, joilla on geenistössään vastaava kiinnittämistä koodaava domeeni. Sormien kärkiin kiinnittyvät vasta-aineet estävät bakteeria muodostamasta biofilmiä, jolloin bakteerin leviämistä voidaan estää. Yksi mahdollinen keino vastaavien bakteerien leviämisen estämiseksi on vaihtaa hydrofobiset materiaalit hydrofiiliseksi. [19.]

Uusimmilla tutkimuksilla on saatu lisätietoa kemiallisista vaihtoehtoisista antimikrobisista materiaaleista kuten puusta. DI Tiina Vainio-Kailan väitöstutkimuksessa saatiin selville, että tutkitut puupinnat olivat antibakteerisia verrattuna lasipintaan. Puupinnan antibakteerisuus on useamman osatekijän summa ja antibakteeriset ominaisuudet eri puulajien välillä vaihtelivat suuresti. Puun komponenteista ligniinillä (fenyyliiryhmistä muodostuneesta aromaattisesta molekyylistä) sekä uuteaineilla (puusta vedellä, metanolilla tai asetonilla liukenevilla aineilla) ja puusta haihtuvilla orgaanisilla yhdisteillä (pääosin terpeeneillä, limoneeneilla sekä aldehydeillä) on antibakteerisia ominaisuuksia.

Tutkimuksessa tutkittiin muun muassa MRSA, VRE (Vankomysiini-resistentti enterokokki) sekä *E. coli* -bakteereita ja riippuen bakteerista sekä tutkittavasti puun komponentista antibakteerisuus oli huomattavaa. [10.]

Koska terve ihminen itse sisältää mikrobistoa ja siirtää sitä pintakosketuksella paikasta toiseen, on sängen epärealistista ja tarpeetonta luoda täysin steriiliä ympäristöä. Yksi tulevaisuuden mahdollisuuksista on luoda ihmiselle harmittomia bakteerikantoja, jotka kykenisivät omalla kasvullaan syrjäyttämään patogeeniset kannat pinnoilta. [5, s. 15.]

3.3 Hopean vaikutus mikrobeihin

Hopea on kiiltävä ja pehmeä metallimainen alkuaine ja usein sitä käytetään tavallisimmin seoksina kuten sterling-hopeana. Sen kemiallinen merkki on Ag ja hopea tummenee hitaasti ilmassa olevan rikin vaikutuksesta muuttuen mustaksi hopeasulfidiksi. [20.] Metallimuodossa oleva hopea sekä epäorgaaniset hopeayhdisteet ionisoituvat veden, ruumiin nesteiden ja solun tulehduseritteiden kanssa. Ionimuodossaan hopea on helposti vuorovaikutuksessa proteiinien, aminohappojen jäänteiden sekä soluseinien reseptoreiden kanssa niin nisäkkäillä kuin eukaryooteilla. Positiivinen hopeaioni tarttuu elektronien luovuttajaryhmiin jolloin se sitoutuu reseptoreihin vierekkäisillä solupinnoilla. Kun hopea on sitoutunut elektronin luovuttavaan reseptoriin se sulautuu solun sisälle endosytoosilla sekä fagosytoosilla. Pienissä pitoisuuksissa hopea on myrkyllistä vain sille herkistyneille henkilöille. [21.] Mikäli hopeaa otetaan esimerkiksi suun kautta runsaasti, se leviää kaikkialle elimistöön, myös aivoihin. Ihmisessä hopean puoliintumisaika on noin 50 vuorokautta mikä tarkoittaa, että se poistuu hitaasti elimistöstä. Liiallinen hopean nauttiminen johtaa argyriaan, jossa myrkyllinen määrä hopeaa muuttaa ihon siniharmaaksi. [22.] Mikäli nanohopeaa joutuu jätevesiin kasaantuen, tällöin kohonneet hopeapitoisuudet voivat johtaa ongelmiin jätevesien puhdistuslaitoksien mikrobistoissa sekä vesieliöstössä ympäristöön levitessään. [23.]

Hopea on pienissäkin määrissä myrkyllistä erityisesti bakteereille, sillä se näyttää yhdistyvän helposti tioliryhmien kanssa (-SH), joita on runsaasti bakteerien entsyymeissä. Tämä johtaa vioittuneeseen soluhengitykseen sekä RNA:n ja DNA:n replikaation estymiseen. [21.] Hopean liittyessä ribosomeihin estyy proteiinisynteesi ja alkaa plasmakalvon rappeutuminen. Lisäksi hopea tarttuu DNA:n emäspareihin ja estää DNA:n jakautumista. Kuollessaan bakteerisolut ikään kuin hörppäävät lisää hopeaa

sisäänsä. [24; 25.] Normaaliin hopeaioniin verrattuna hopeafosfaatti-nanopartikkelien antimikrobiset ominaisuudet näyttävät toimivan paremmin. Partikkelin pienestä koosta johtuen sillä on erityislaatuisia fysiokemiallisia ominaisuuksia kuten laajemmasta pinta-alasta johtuva korkea kyky katalysoida sekä luoda reaktiivisia happiradikaaleja, mitkä ovat bakteereille myrkyllisempiä. [26.] Hopea on yleisimmin käytetty nanoteknologinen metalli kuluttaja- ja sairaalatuotteissa. [23.]

Tutkittavana olevissa antimikrobisissa huonekaluissa on käytetty BioCote®-teknologiaan perustuvaa hopeafosfaattilasialasia, jossa hopeaionit on kiinnitettyinä fosfaattilasimatriisiin. [27.] Antimikrobisilla hopeaioneilla varustettujen kalusteiden vaikutusta pinnoilla on tutkittu aiemminkin. Isossa Britanniassa tehdyssä tutkimuksessa tutkittiin hoitokodissa yli kahtakymmentä erilaista pintaa niin oven kahvasta käsienpesualtaaseen kuin sairaalavuoteisiin. Antimikrobisten ja vertailutuotteiden pesäkelukumääristä lasketun perusteella oli antimikrobisesti käsitellyissä tuotteissa keskimäärin 94,8 % vähemmän bakteereita kuin vertailutuotteissa. [28.]

Toisin kuin voisi kuvitella, bakteerit voivat kehittyä hopealle immuuneiksi. Uppsalassa Ruotsissa tehdyn väitöstutkimuksen mukaan sairaaloissa on syntynyt hopealle vastustuskykyisiä sairaalabakteerikantoja. Eräillä bakteerisuvuilla kuten *Enterobacter* ja *Klebsiella*, näyttää resistenssi olevan olemassa jo ilman altistusta hopealle. Muille esimerkiksi *E. colille* vastustuskyky voi siirtyä kromosomin ja plasmidin horisontaalisella ja vertikaalisella geenien siirtymisellä. Hopearesistenttisyysominaisuus liittyy geenin osaan, joka koodaa bakteerin vastetta muuttuneeseen tilaan ympäristössä. Geeni silS koodaa sensorikinaasientsyymiä, joka aktivoi vastesäätelijää silR. Geenimuunnos luo solun pinnalle silCFBA-ulosvirtauspumppukompleksin, joka pumppaa solun sisään kerääntyvää hopeaa ulos solusta. Lisäksi bakteerien on havaittu vähentävän pintasolukon poriinikanavien määrää, jolloin hopeaa valuu sisään soluun vähemmän sekä lisäävän periplasmisen hopeansitoojaproteiinin tuotantoa. [29.] Yhtenä uhkakuvana nähdään, että bakteerit voivat lisätä biofilmituotantoaan sekä antimikrobisten aineiden hajottamista entsyymaattisesti vähemmän haitallisiksi, jolloin niiden vastustuskyky ko. aineeseen kasvaa entisestään. [23.]

4 Tutkittavat mikrobit

Mikrobit kuten bakteerit, hiivat, homeet ja virukset ovat läsnä kaikkialla. Pelkästään esimerkiksi ilmassa on noin 100 bakteeria cm^3 :ssa ja ihmisen hiuspohjassa on noin 1,5 miljoonaa mikrobia cm^2 :ssa. Luontaisesti ihmisessä olevat bakteerit tuottavat vitamiineja elimistön tarpeiksi sekä suojaavat haitallisilta bakteereilta tuhoamalla niitä. Mikrobeja, joista enin osa on bakteereja, on laskettu olevan yhteensä 1,5 kg aikuisessa ihmisessä. Elääkseen ja lisääntyäkseen mikrobit tarvitsevat kosteutta, ravintoa, sopivan lämpötilan ja happamuuden sekä mahdollisesti myös happea. [30, s. 12-25.]

Päivittäin ihminen altistuu vieraille mikrobeille, jotka eivät aiheuta terveille henkilöille sairautta elimistön oman vastustuskyvyn ja immuniteetin takia. [3.] Lisääntyessään haitalliset mikrobit kuluttavat ihmisessä ravinteita ja aiheuttavat lisääntymispaikassaan erilaisia haittoja eli infektio-oireita. [31, s. 202.] Infektioon johtaviin tartuntoihin vaikuttaa saatavien mikrobien määrä, yksilön elimistön vastustuskyky sekä virulenssi eli mikrobin taudinaiheuttamiskyky. [3.] Esimerkiksi enterohemorraagisen *Escherichia coli* eli EHEC-bakteerin joidenkin kantojen infektioannos on vain 10 solua. [18, s. 66.] Bakteerit ovat alkeistumallisia eli prokaryootteja, jotka pystyvät lisääntymään ilman isäntää. Bakteerien soluseinämät sisältävät peptidoglykaania, mikä on ominaista vain alkeistumallisille. [31, s. 202-203.] Virukset sen sijaan tarvitsevat lisääntyäkseen isäntäsolun, joka kykenee tuottamaan viruksen komponentteja. [31, s. 203.]

4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus esiintyy yleisesti ympäristössä sekä ihmisissä, joissa sitä esiintyy suussa, nenässä sekä iholla. Se on tavallinen märkäbakteeri, joka aiheuttaa infektioita sekä vastustuskyvyltään heikentyneille että perusterveille henkilöille. [32, s. 83.] Yleisyydestä kertoo, että bakteeria kantaa noin puolet ihmisistä luontaisesti. [33.] *S. aureus* on gram-positiivinen pallomainen kokki, joka tuottaa stafylokokkienteroksiineja kasvuvaiheen aikana ympäristöönsä. Nämä toksiinit aiheuttavat ruokamyrkytysoireita, joita ovat vatsanseudun kipu, pahoinvointi, ripuli ja oksentelu. [18, s. 62-64.] *S. aureuksen* soluseinä sisältää peptidoglykaania sekä teikkohappoja. Sekä peptidoglykaaniin sitoutuneet seinämäproteiinit että teikkohapot aiheuttavat elimistössä luonnollisen immuniteetin heräämisen ja tulehdusreaktion. [32, s. 84.] *S. aureus* saa energiaa orgaanisista yhdisteistä, se kasvaa sekä hapellisissa että

hapettomissa olosuhteissa, kestää hyvin suuria suolapitoisuuksia ja säilyy hyvin kuivissa olosuhteissa. [18, s. 62-64.] Se kasvaa tavallisilla elatusaineilla helposti ja voidaan erotella muista stafylokokkiryhmän bakteereista agglutinaatiotestillä, sillä *S. aureus* hyydyttää plasman ollen näin koagulaasipositiivinen stafylokokki. [32, s. 83.] *S. aureus* aiheuttaa ongelmia varsinkin sairaaloissa, sillä useimmat sen kannoista ovat kehittyneet mikrobilääkkeille resistentiksi. Infektioita on hoidettu penisilliinillä, mutta osa *S. aureus* kannoista tuottaa penisillinaasia, joka hajottaa penisilliiniä. Näitä kantoja kutsutaan yleisesti nimellä metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* eli MRSA. [32, s. 89-90.]

4.2 Enterokokit

Enterokokki on normaaliin mikrobistoon tasalämpöisten eläinten suolessa kuuluva bakteeri. [34.] Enterokokkien esiintyminen viittaa ulosteperäiseen saastumiseen ja niistä käytetään usein ilmaisua fekaalinen tai suolistoperäinen enterokokki. Enterokokit säilyvät ympäristössä pitkään ja se on yksi merkittävimmistä sairaalapatogeeneista. [35, s. 4425.] Vaikkakin näillä suolistossa yleisesti esiintyvillä enterokokeilla on vain vähäinen taudinaiheuttamiskyky, niiden antimikrobisten aineiden vastustuskykyiset lajit aiheuttavat huolta. Enterokokit ovat erittäin muuntautumiskykyisiä ja hankkivat sekä vaihtavat geenejä saaden resistenssiä antimikrobisille aineille, kuten kefalosporiinille, aminoglykosideille ja jopa vankomysiinille. Pelkona onkin, että nämä harmittomat enterokokit levittävät resistanssimarkkerinsa muille patogeenisille lajeille. [36, s. 251-252.] Enterokokkilajeista tavallisimmat ovat *Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus faecium*. [37.] Enterokokki aiheuttaa tavallisimmin virtsatietulehduksia. Potilaille jotka ovat sairaalahoidossa, se voi aiheuttaa myös haavainfektion tai vakavan yleisinfektion. [38.] Enterokokkien kantoja voidaan käyttää säiliörehussa ja probiootteina elintarvikkeissa. Opportunistinen mikrobi ei ole normaalisti taudinaiheuttaja ellei isäntäeliön immuunijärjestelmä ole heikentynyt. [18, s. 427.] Enterokokit ovat fakultatiivisesti anaerobeja, eli ne pystyvät kasvamaan sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa ja ne kestävät hyvin suolaisia ympäristöjä. Ne kykenevät hajottamaan eskuliinia, sietävät sappisuoloja sekä kasvavat laajalla lämpötila-alueella (10–45 °C) ja korkeassa pH:ssa. [32, s. 126.]

4.3 Gram-negatiiviset sauvabakteerit

Gram-negatiiviset bakteerit ovat bakteereja, joiden peptidoglykaania sisältävä soluseinä ei värjäydy kristalliviolettivärjäyksessä violetiksi. *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvat bakteerit ovat gram-negatiivisia kokki- tai sauvabakteereita, jotka eivät muodosta itiöitä, ovat fakultatiivisia anaerobeja, glukoosia fermentoivia ja oksidaasinegatiivisia. [36, s. 308.] Heimoon kuuluu laaja kirjo bakteereja kuten *Shigella*, *Salmonella* ja *Escherichia*-sukujen bakteereja, joiden solurakenne muistuttaa toisiaan ja niitä esiintyy niin suolistossa kuin jätevesissäkin. Ihmisissä yleisimmin esiintyvien normaalimikrobistoon kuuluvien bakteerien erotteluun suolistopatogeeneistä käytetään bakteerien laktoosin fermentointikykyä. Näitä laktoosipositiivisia bakteereja, mukaan lukien *E. coli*, kutsutaan usein nimellä koliformit. [32, s. 177.] Laktoosipositiivisia opportunistisia patogeeneja ovat *E. coli* lisäksi esimerkiksi *Klebsiella*-, *Enterobacter*- ja *Citrobacter*-suvut. [36, s. 307.] *E. colista* on useita eri kantoja, joista osa on kantajalleen hyödyllisiä, sillä ne pystyvät tuottamaan K-vitamiinia sekä estämään patogeenisempiä lajeja lisääntymästä ja valtaamasta alaa. Mikäli *E. coli* pääsee leviämään suolistosta virtsaputkea ylös, se voi aiheuttaa virtsatieinfektion virtsarakkoon tai jopa munuaiseen. Osa *E. coli* -kannoista voivat aiheuttaa suolistoinfektioita. Esimerkiksi enterohemorraginen *E. coli*, lyhyesti EHEC, aiheuttaa pahimmillaan veriripulia. [32, s. 178-180.] EHEC:istä johtuvan paksusuolen tulehduksen jälkitautina voi kehittyä munuaisten toiminnan häiriö (HUS), anemiaa tai tajunnan häiriöitä. [39.]

4.4 Norovirus

Norovirus kuuluu kalikivivirusiin ja se on yleisin vatsatauteja aiheuttava virus, jonka taudin oireisiin kuuluvat vatsakipu, pahoinvointi, oksentelu sekä ripulointi. [40.] Norovirukset tarttuvat helposti ja vain 10-100 viruspartikkelia voi riittää yksilön tartuttamiseen. [41.] Ripuliulostegrammassa esiintyy miljardeja viruksia, joten ne aiheuttavat helposti vatsatautiepidemioita. Viruksen aiheuttamaan tautiin ei ole lääkehoitoa ja taudista parantunut potilas erittää virusta vielä useita päiviä parantumisen jälkeen, joten riittävä käsihygieniä ja pintojen huolellinen siivous ovat paras tapa ehkäistä tartuntoja. [42.] Norovirus on vaipaton ja sen perimä on positiivijusteista yksisäikeistä RNA:ta. Norovirus sietää kuumennusta 65 °C:seen 30 minuuttia, vapaata klooria lähes 1 mg/l ja Ph:n vaihtelua välillä 2,5–9,5 tuhoutumatta, joten viruksen infektiivisyyttä on vaikea saada poistettua [32, s.599.] Norovirusta ei pystytä kasvattamaan soluviljelyllä,

joten yleisin tunnistamiseen käytetty keino on käänteiskopioointigeenimonistus. [36, s. 826.]

4.5 Adenovirus

Adenovirukset kuuluvat *Adenoviridae*-heimoon ja niitä löytyy joka puolelta ympäristöstä. Virus on kestävä ja pysyy elinkelpoisena viikkoja vaihtelevissa lämpötiloissa niin pinoilla kuin liuoksissa. [36, s. 821.] Adenovirukset ovat vaipattomia, lineaarisia kaksisäikeisiä DNA-juosteisia viruksia. [32, s.603.] Enteeriset kannat, jotka esiintyvät luonnollisesti suolistossa voivat aiheuttaa ripulia varsinkin lapsille. [43.] Tavallisimmin adenovirus aiheuttaa hengitysteiden infektiota, mutta se voi johtaa myös korva- ja nielurisatulehdukseen sekä keuhkokuumeeseen. Myöskään adenovirusinfektioon ei ole lääkitystä. [44.] Adenovirusinfektioita esiintyy läpi vuoden ja oireettomia kaikista virusinfektioista on noin puolet. Infektoituneet solut syntetisoivat virusproteiineja ja täydellisen infektiocyklin jälkeen solun hajotessa voi vapautua 50 000 - 100 000 uutta viruspartikkelia. [32, s. 501-502.] Adenovirus voidaan tunnistaa soluviljelyn tai nukleiinihappomonistustestin eli polymeraasiketjureaktion avulla. [36, s. 822.]

5 Tutkimuksen suoritus ja käytetyt menetelmät

Näytteenottoja suoritettiin 13.3.–24.4.2018 yhteensä kuutena kertana. Näytteitä otettiin yhdestä luokkahuoneesta, jossa on normaaleilla pintamateriaaleilla varustetut huonekalut sekä vastaavasta luokkahuoneesta, johon oli toimitettu Iskulta antibakteerisella aineella käsitellyt pulpetit, tuolit ja opettajan pöytä sekä Abloylta oven kahva. Kahvasta näytteitä kerättiin vasta kolmannella testinotokerralla asennuksen myöhästymisen vuoksi.

Näytteenotot suoritettiin käyttäen 10 x 10 cm:n sapluunaa, steriiliä näytteenottopuikkoa sekä testiputkessa olevaa neutralisoivaa 5 ml:n viskoosiliuosta (Deltalab Neutralizing viscose swab, #200399). Myös ATP-mittauksessa käytettiin 10 x 10 cm:n sapluunaa ja lisäksi 3M™ Clean-Trace™ Test -näytteenottopuikkoja sekä Biotrace UNI-LITE NG2 -luminometriä tuloksien analysoimiseen. Viruksien osalta analyysit suoritettiin Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellinen tiedekunnan Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osastolla. Bakteeritutkimukset suoritettiin Metropolia Ammattikorkeakoulun laboratorioanalytiikan tutkinto-ohjelman laboratoriossa. Tutkimuksen kvalitatiivista tunnistusta varten tehtiin esikasvatus rikastamalla 1 ml näytettä 9 ml:n tryptonisoijaliemeen ja kasvattamalla bakteereita 3 vrk:n ajan 37 °C:ssa. Rikastuksen jälkeen sekä CHROMagar™ Staph aureus-, BBL Enterococcosel- että Mac Conkey-agarille levitettiin 100 µl näytettä pintalevityksenä. Rinnakkaisnäytteitä kasvatettiin 37 °C:ssa yhden vuorokauden ajan, jonka jälkeen niistä tutkittiin tulokset visuaalisesti. Positiivisen tuloksen antaneista maljoista tehtiin yhden vuorokauden jatkoviljely veriagarilla 37 °C:ssa ja kasvaneista viljelyistä valittiin useita selkeitä pesäkkeitä mitattavaksi matriisiavusteisella laser-desorptio-ionisaatio-lentoaikamassaspektrometrillä, Maldi-Tof Ms (Vitek MS).

5.1 MacConkey-agar

Maljakasvatusalusta MacConkey-agar (MAC) on selektiivinen agar gram-negatiivisten bakteerien eristämiseen sekä tunnistamiseen näytteestä. MacConkey-agarissa olevien sappihappojen suolat sekä kristallivioletti inhiboivat suurelta osin gram-positiivista mikrobikasvustoa, jolloin alustalla kukoistavat gram-negatiiviset bakteerit. [45.] Eri lajien tunnistamiseen käytetään laktoosisokerin käymisestä johtuvaa pH:n muutosta. Tämän pH-muutoksen havaitsemiseen käytetään indikaattorina neutraalin punaista. [46.]

Laktoosinegatiiviset bakteerit, kuten salmonella ja shigella, eivät käytä laktoosia energian tuottamiseen. Ne käyttävät sen sijaan peptonia, jolloin muodostuu pH:ta nostavaa ammoniakkia. Tämä johtaa värittömien ja läpikuultavien pesäkkeiden muodostumiseen. Laktoosia käyttävät bakteerit, kuten *Escherichia coli*, *Enterobacter* ja *Klebsiella* hajottavat laktoosia, jolloin muodostuvat hapot reagoivat sappihapposuolojen kanssa laskien agarin pH:ta. Näin pesäkkeiden ympärille muodostuu joko vaaleanpunaisia ja punaisia pesäkkeitä tai pesäkkeitä joilla on vaaleanpunainen halo. [47.]

5.2 CHROMagar™ Staph aureus

CHROMagar™ Staph aureus -agaria käytetään erottamaan näytteistä *Staphylococcus aureus*. Agarilla *S. aureus* muodostaa vaaleanpunaisia tai lilaan vivahtavia pesäkkeitä. [48.] CHROMagar™ Staph aureus -kasvatusalustalla olevat selektiiviset ainesosat estävät gram-negatiivisten mikrobien, hiivojen sekä joidenkin gram-positiivisten kokkibakteereiden kasvua. Kromogeeniseos sisältää keinotekoisia substraatteja (chromogen), jotka hydrolysoituessaan entsyymien kanssa vapauttavat liukenematonta väriyhdistettä. *S. aureus* muodostaa malvan värisiä pesäkkeitä. Siniset, vihreän-siniset sekä värittömät pesäkkeet ovat muiden bakteerien aiheuttamia. Kaikki positiiviset tulokset tulee jatkotutkia mahdollisten muiden stafylokokkikantojen poissulkemiseksi. [49.] Esimerkiksi on todettu, että jotkut *Micrococcus luteus*-kannat muodostavan malvan värisiä pesäkkeitä. CHROMagar™ Staph aureus -agar on silti herkempi ja antaa vähemmän virhepositiivisia tuloksia kuin kasvatus perinteisillä HBA (5% horse blood agar) tai mannitolisuola-agar maljoilla. [50; 51.]

5.3 BBL™ Enterococcosel™ -agar

Maljakasvatusalusta BBL™ Enterococcosel™ -agar on selektiivinen kasvualusta enterokokkien erotteluun sekä laskemiseen. Agarissa oleva natriumatsidi estää gram-negatiivisten mikro-organismien kasvun ja lisäksi sillä käytetään härän sappea ehkäisemään muita gram-positiivisia bakteereita. Enterokokkibakteerit pystyvät hajottamaan eskuliinia, jota muut streptokokit eivät pysty. Enterokokit hydrolysoivat glykosidin ja eskuliinin eskuletiiniksi ja glukookiksi. Eskuletiini reagoi rautasuolojen,

rauta-ammoniumsitraatin kanssa muodostaen tumman ruskeita tai mustia yhdistelmiä. *Enterococcus faecalis* muodostaa tällä eskuliinisappiagarilla tummia pesäkkeitä. [52.]

5.4 ATP:n määrittäminen luminometrillä

ATP eli adenosinitrifosfaatti on energian siirtoon käytetty yhdiste soluissa. [53, s. 5.] Kaikki solut, niin eläin- kuin kasvisolut, vapauttavat ympäristöönsä ATP:tä. [18, s. 148.] Mikrobit käyttävät ravinnonlähteenä soluja sekä niiden hajoamistuotteita. Lisäksi bakteerit muodostavat pinnalle asetettuaan näistä solujen osasista suojaavan biofilmin ympärilleen. ATP-mittauksessa käytetään hyväksi ATP:n kykyä muodostaa lusiferiinista valoa reagoidessaan yhdessä hapen, magnesiumin sekä lusiferaasientsyymin kanssa. [53, s. 5-7.] Sekä lusiferiini että lusiferaasi on eristetty tulikärpäsestä, jolla bioluminenssia esiintyy luonnossa. Näiden edellä mainittujen molekyylien kemiallisessa reaktiossa syntyvä valo mitataan luminometrillä, joka antaa tulokset suhteellisina valoyksikköinä (RLU, relative light unit). [18, s. 148.] Vaikka menetelmä ei mittaa mikrobien määrää, saadaan sillä selville testatuilla pinoilla olevat kaikki eloperäiset ainekset, kuten ihokontaktin tuomat epäpuhtaudet, ruoka-ainejäämät sekä mikrobit. [53, s. 7.]

Luminometrillä saatavat tulokset vaihtelevat näytteenottolaitteittain ja laitetoimittajan sivustolla on annettu hyväksyttävän puhtauden raja-arvoksi sairaalaolosuhteisiin 250 RLU. [54.] Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin (HUS) Sairaalahuolto ja laitoshygieneiapalvelut HUS-Desiko on jaotellut ATP mittauksien tulokset seuraavasti: Alle 300 RLU:n tuloksella pinnalla on jonkin verran eloperäistä likaa. Kun RLU on 300-3000, on pinnalla runsaasti eloperäistä likaa. Yli 3000 RLU:ta kertoo jo erittäin runsaasti eloperäistä likaa olevasta pinnasta. [55, s. 11.] The Worldwide Cleaning Industry Association ISSA määrittelee puhtaudenmittausstandardissaan, että pulpettien siivouksen katsotaan olevan tehokasta kun mittaukseen käytetyllä laitteella 3M (Uni-Lite NG) saadut RLU-arvot ovat alle 109. Siivousta tulee parantaa kun arvot ovat 110 ja 250 välillä ja siivous todetaan tehottomaksi yli 251 RLU-arvoilla. [56, s. 14.] Tehokkaalla siivouksella voidaan vähentää pintojen biologista lastia, jolloin myös RLU-arvot pienenevät. Tämän siivouksesta tulevan ATP-tasojen laskun on todistettu olevan yhteydessä myös viljeltävien bakteerien määrän vähenemiseen. [57, s. 343-345.]

5.5 Identifiointi massaspektrometrillä

Matriisiavusteinen laser-desorptio-ionisaatio-lentoaikamassaspektrometrian toimintaperiaate perustuu partikkeleiden erotteluun massan, varauksen sekä matka-ajan perusteella. Laitteen kolme pääkomponenttia ovat ionilähde, massa-analysaattori sekä detektori. Näyte sekoitetaan matriisiaineeseen kuten kanelihappoon (CHCA), joka absorboi voimakkaasti lasersäteen aaltopituutta. Matriisi-näyttyhdistelmän vuorovaikutus varmistaa sen, että itse näytteen valon absorbointiominaisuuksilla ei ole väliä. Ionilähde, esimerkiksi tyypilaserpulssi höyrystää matriisi-näytteen, jolloin molekyylit samanaikaisesti ionisoituvat kun varaukset siirtyvät analyyttimolekyylien ja matriisiaineen välillä. Suuressa alipaineessa ionisointikammiossa pulssitettu näyte-matriksi siirtyy massa-analysaattoriin sähkökentän kiihdyttämänä, jolloin ionit erottautuvat nopeuden mukaisesti; nopeuden joka perustuu ionin massaan ja varaukseen. Tyhjiössä ionit eivät törmäile toisiinsa, jolloin magneettikentän tyhjiössä lentävät ionit erotellaan nopeusjärjestyksessään ja lasketaan saaden selville jokaisen signaalin muodostaman massa-varaus luku (m/z), joka on verrannollinen läsnäolevien ionien määrään. [58, s. 41- 49.] Saaduista signaaleista muodostetaan kuvaaja eli massaspektri. [59.] Mikrobin identifiointissa massaspektrien vaihteluväli on 2 000–20 000 m/z . [60.] Koska matriisiavusteinen laser-desorptio-ionisaatio-lentoaikamassaspektrometri pystyy käsittelemään hyvin pieniä pitoisuuksia eli esim. proteiininen pikomolaarisia pitoisuuksia sekä analysoimaan monimutkaisia seoksia, voidaan sen avulla karakterisoida bakteereja. Jotta bakteereista saataisiin luotua mahdollisimman luotettava sormenjälkipetri, käytetään tunnistamiseen ribosomaalisia proteiineja, joiden osuus solun massasta on noin 3 %. [58 s. 51-54.]

6 Tutkimuksen tulokset

6.1 Kvantitatiiviset tulokset

Tutkimuksen antimikrobisella aineella päällystettyjä kalusteita ovat pulpetit, tuolit, tuolin rungot, opettajan pöytä sekä oven kahva. Tutkimuksella haluttiin myös selvittää, siirtyvätkö antimikrobiset ominaisuudet muille pinnoille käsikosketuksella ja näin ollen näytteitä otettiin myös luokkahuoneissa olleista allastasoista, joiden pinnat olivat tismalleen samanlaiset. Jokaisesta otetusta näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista viljelymaljaa, joiden pesäkkeiden lukumäärien keskiarvosta on laskettu pesäkettä muodostavien yksiköiden (pmy) määrä sataa neliösenttimetriä kohden.

Mikäli siirrostetuilla maljoilla ei kasva mitään ja tulos on nolla, voidaan tämä tulos ilmaista joko vähemmän kuin 5 pmy/100cm² tai vaihtoehtoisesti todeta, että organismeja ei ole havaittavissa ja tulos on 0. [61, s. 30.] Visuaalisen selvyuden vuoksi kaikki maljojen tulokset on ilmoitettu taulukossa numeerisessa muodossa. Johtuen otoskoon vähyydestä sekä saatujen tulosten pienuudesta on tilastollisten analyysien tuottaminen aineistosta haastavaa. Esimerkiksi laskettaessa uskottavuusepämääräindeksiä, jolla voidaan määrittää tuloksen epävarmuus, ei epävarmuutta saada laskettua ollenkaan tuloksille 0 pmy/100cm².

Tilastollisten menetelmien, kuten varianssi- ja t-testien, vaatimuksena on että aineisto on normaalijakautunutta. [62.] Tutkittaessa aineistoa histogrammista silmämääräisesti voidaan todeta, etteivät mitkään saaduista tuloksista ole normaalijakautuneita. Jotta mikrobiologiasta johtuvaa vaihtelua saadaan hieman pienennettyä ja keskihajontaa paremmin arvioitua, voidaan tuloksia muuntaa ottamalla niistä luonnollinen logaritmi. [63, s.25.] Tutkimuksen alkuperäisille pesäkelukumäärätuloksille tehtiin muunnos: $\mu = \ln(\text{alkuperäinen tulos} + 1)$ eli tuloksiin on lisätty vakio +1 sekä otettu luonnollinen logaritmi. Tilastollisiksi testeiksi saaduista muunnelluista tuloksista on tehty sekä yksisuuntainen varianssianalyysi (ANOVA) että t-testi. Muunnetuista tuloksista on käänteismuuntamalla saatu uudet suureet keskiarvoiksi sekä luottamusväleiksi.

Yksittäisen mittausarvon 95 %:n luottamusvälin ylä- ja alarajat on laskettu käyttäen standardin SFS-EN ISO 8199 mukaisia laskukaavoja:

$$CI_{Z \geq 20} = \frac{Z \pm \sqrt{Z}}{V_{tot}} \times V_s \quad (1)$$

sekä

$$CI_{Z < 20} = \frac{Z + 2 \pm \sqrt{Z + 1}}{V_{tot}} \times V_s \quad (2)$$

joissa Z =pesäkkeiden yhteenlaskettu määrä, V_{tot} = alkuperäisen näytteen kokonaistilavuus & V_s =standarditilavuus. [61, s. 26.]

Tämän jälkeen luottamusväleistä on laskettu suhteellinen epävarmuus u_y kaavalla:

$$u_y = \frac{\ln(x_y) - \ln(x_a)}{4} \quad (3)$$

jossa x_y =yläraja ja x_a =alaraja. [63, s.34.]

Kaikkien tutkittujen pintojen pesäkelukumäärien muunnettujen suureiden käänteismuunnatut keskiarvot sekä suhteelliset epävarmuudet on lueteltu alla olevassa taulukossa (Taulukko 1). Taulukossa on myös ilmoitettu otosmäärä.

Taulukko 1. Muunnettujen suureiden avulla lasketut pesäkelukumäärien keskiarvot ja suhteelliset epävarmuudet sekä näytemäärät.

Tutkittava huonekalu	Keskiarvo (pmy/100cm ²)	Suhteellinen epävarmuus (% / u_y)	Näytemäärä (kpl)
Antimikrobiset pulpetit	8	61%	12
Vertailupulpetit	11	62%	12
Antimikrobiset tuolit	9	45%	12
Vertailutuolit	19	49%	12
Antimikrobinen opettajan pöytä	9	95%	6
Vertailuopettajan pöytä	25	56%	6
Antimikrobiset tuolin rungot	22	73%	5
Vertailutuolin rungot	100	43%	5
Antimikrobinen oven kahva	14	33%	4
Vertailuoven kahva	6	133%	6
Antimikrobisen luokan allaspöytä	29	48%	6
Vertailuluokan allaspöytä	12	112%	6

Antimikrobisia kalusteita sisältävän luokan muuntamattomat tulokset on alla (Taulukko 2). Saadut tulokset vaihtelevat 0–178 pmy/100cm². Epävarmuudet on ilmaistu prosentiosuuksina saadun pesäkelukumäärän jäljessä ja nollatulosten osalta epävarmuus on ilmoitettu pesäkelukumääränä (<5 pmy/100cm²).

Taulukko 2. Antimikrobisia kalusteita sisältävän luokahuoneen pesäkelukumäärien alkuperäiset tulokset (pmy/100cm²) sekä epävarmuus % tai pmy-estimaatti.

Päivämäärä	Pulpetit	Tuolit	Opettajan pöytä	Tuolin runko	Oven kahva	Allaspöytä (ei antim.)
13.3.2018	0 (<5 Est.)	3 (u _y =42%)	0 (<5 Est.)			5 (u _y =42%)
13.3.2018	0 (<5 Est.)	3 (u _y =42%)				
21.3.2018	13 (u _y =21%)	33 (u _y =12%)	13 (u _y =21%)	35 (u _y =12%)		48 (u _y =10%)
21.3.2018	20 (u _y =16%)	10 (u _y =24%)				
27.3.2018	10 (u _y =24%)	45 (u _y =10%)	20 (u _y =16%)	104 (u _y =7%)	9 (u _y =23%)	30 (u _y =19%)
27.3.2018	30 (u _y =13%)	0 (<5 Est.)				
10.4.2018	3 (u _y =42%)	48 (u _y =10%)	15 (u _y =19%)	12 (u _y =22%)	23 (u _y =15%)	20 (u _y =16%)
10.4.2018	178 (u _y =5%)	5 (u _y =30%)				
17.4.2018	40 (u _y =16%)	3 (u _y =42%)	75 (u _y =8%)	6 (u _y =28%)	12 (u _y =22%)	60 (u _y =10%)
17.4.2018	30 (u _y =13%)	45 (u _y =10%)				
24.4.2018	0 (<5 Est.)	8 (u _y =24%)	3 (u _y =42%)	29 (u _y =13%)	15 (u _y =19%)	58 (u _y =10%)
24.4.2018	5 (u _y =30%)	8 (u _y =24%)				

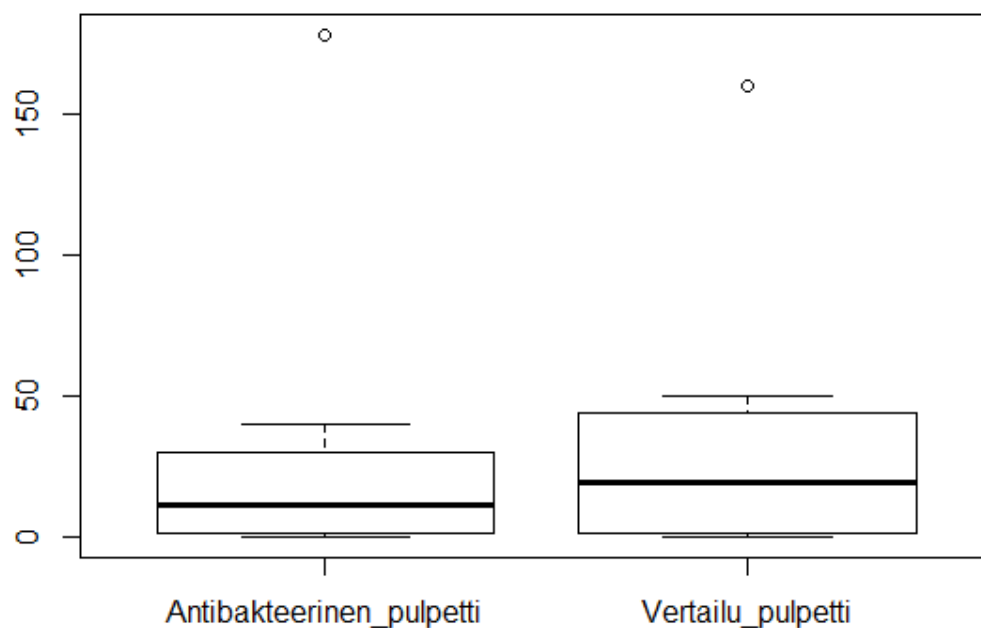
Vertailuluokan kalusteiden muuntamattomien pesäkelukumäärien tulokset on esitetty taulukossa 3. Saadut tulokset vaihtelevat 0–453 pmy/100cm².

Taulukko 3. Vertailukalusteita sisältävän luokkahuoneen pesäkelukumäärien alkuperäiset tulokset (PMY/100cm²) sekä epävarmuus % tai pmy-estimaatti.

Päivämäärä	Pulpetit	Tuolit	Opettajan pöytä	Tuolin runko	Oven kahva	Allaspöytä
13.3.2018	0 (<5 Est.)	60 (u _y =9%)	5 (u _y =30%)		0 (<5 Est.)	0 (<5 Est.)
13.3.2018	0 (<5 Est.)	0 (<5 Est.)				
21.3.2018	50 (u _y =10%)	85 (u _y =11%)	50 (u _y =10%)	191 (u _y =5%)	0 (<5 Est.)	15 (u _y =19%)
21.3.2018	160 (u _y =9%)	185 (u _y =5%)				
27.3.2018	38 (u _y =12%)	25 (u _y =14%)	30 (u _y =13%)	162 (u _y =5%)	6 (u _y =28%)	3 (u _y =42%)
27.3.2018	3 (u _y =42%)	5 (u _y =30%)				
10.4.2018	13 (u _y =21%)	5 (u _y =30%)	15 (u _y =19%)	145 (u _y =6%)	453 (u _y =33%)	178 (u _y =5%)
10.4.2018	0 (<5 Est.)	13 (u _y =20%)				
17.4.2018	50 (u _y =10%)	13 (u _y =20%)	18 (u _y =17%)	58 (u _y =9%)	0 (<5 Est.)	35 (u _y =12%)
17.4.2018	20 (u _y =16%)	10 (u _y =24%)				
24.4.2018	18 (u _y =17%)	23 (u _y =15%)	110 (u _y =7%)	41 (u _y =11%)	44 (u _y =11%)	13 (u _y =20%)
24.4.2018	35 (u _y =12%)	85 (u _y =8%)				

Saatuja tuloksia voidaan visuaalisesti vertailla Box & Whiskers -kuvaajien avulla. Box & Whiskers -kuvaajaa, jota myös laatikko ja jana tai box plot -kuvaajaksi kutsutaan, on erittäin hyvä jakaumien kuvaamiseen. Ns. "laatikon" sisään sijoittuu 50 % havaintopisteistä. Laatikon sisällä oleva viiva kuvaa mediaania eli otoksen keskimmaisintä arvoa. Laatikoista lähtevien viiksien päät ovat maksimissaan 1,5-kertaisen laatikon paksuuden päässä olevia aineiston havaintopisteitä. Rasti laatikon sisällä on kaikista havainnoista laskettu keskiarvo. [64.] Mikäli aineistossa on havaintoja, joiden arvo poikkeaa 1,5-kertaisesti laatikon ylä- ja alareunan välisistä arvoista, ne piirretään kuvaajaan palloina. Näitä laatikon ulkopuolella olevia tuloksia kutsutaan poikkeaviksi arvoiksi. [65.]

Pulpettien pesäkelukumäärien kuvaajasta (kuva 1) voidaan nähdä, että pinnoissa on vain vähän eroa.

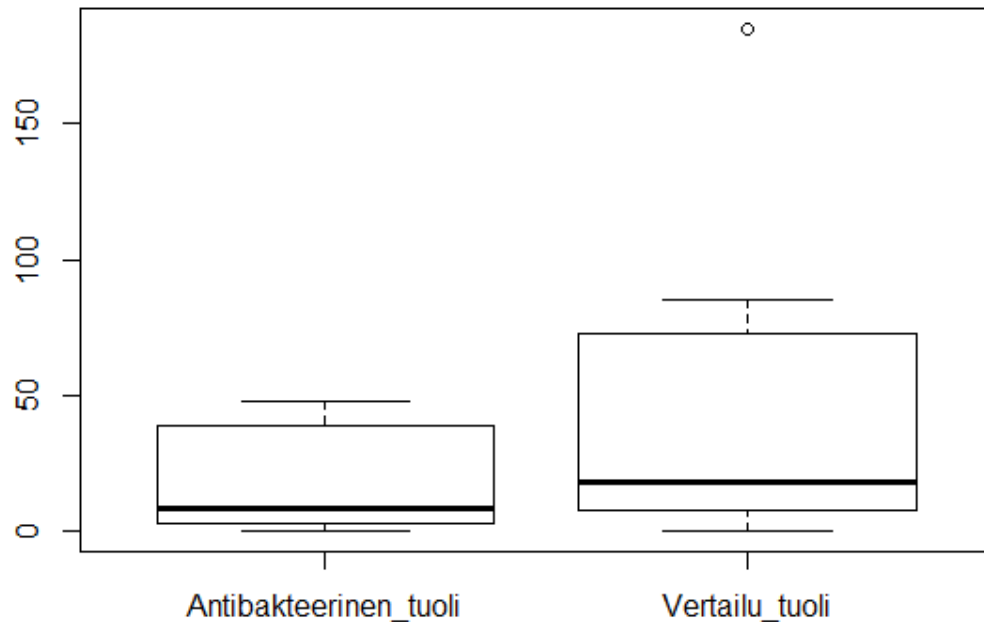


Kuva 1. Box & Whiskers-kuvaaja pulpettien pesäkelukumääristä (tulokset pmy/100cm²)

R-ohjelmalla tehdystä kuvaajasta on nähtävissä, että molempien pintojen tuloksissa on korkealla laatikon yläpuolella olevia poikkeavia arvoja, jotka ovat silti todellisia saatuja arvoja. Eli kyseisenä näytteenottohetkenä kohteena olevan pinnan mikrobipitoisuudessa on ollut selkeää lisäystä muihin näytteenottohetkiin verrattuna. Sekä t-testillä että yksisuuntaisella varianssianalyysillä saadaan tulokseksi, että pintojen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla ($p = 0,7122$). Muunnettujen suureiden käänteismuunnettujen keskiarvojen ero antimikrobisten ja vertailupulpettien välillä on vain 3 pmy/100cm², joten ero on hyvin pientä. Kaikki muunnettujen suureiden kuvaajat ovat liitteessä 2.

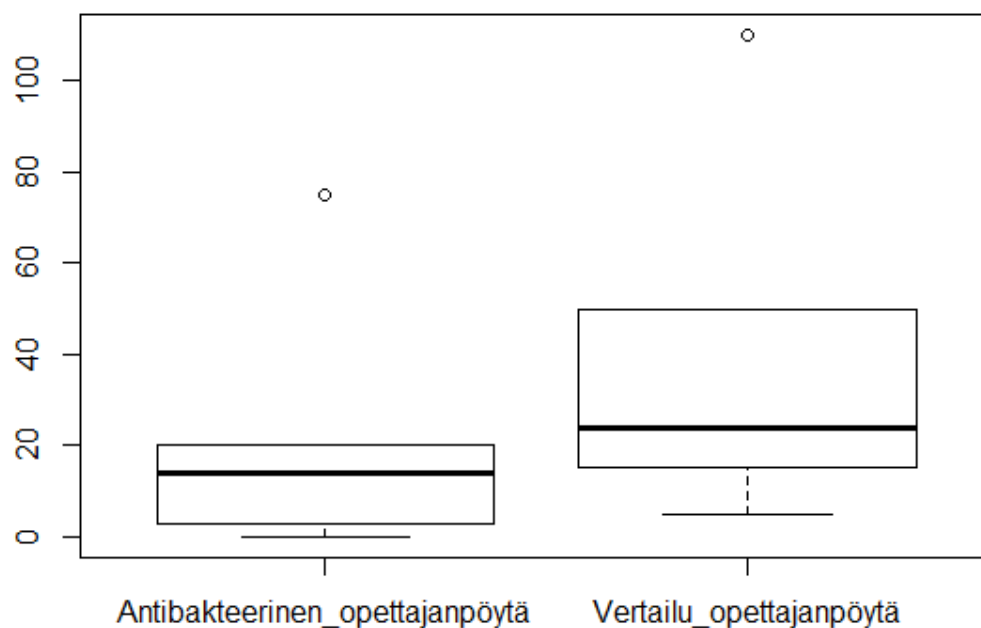
Tuolien osalta (kuva 2) voidaan nähdä, että eri pintojen välillä on havaittavissa eroa, vaikkakin pesäkepitoisuudet ovat todella pienet. Tästä kuvasta voi hyvin havainnoida sen, että tulokset eivät ole normaalijakautuneita, sillä mediaani ei ole laatikon keskivaiheilla ja viikset ovat hyvin eripituiset laatikon molemmin puolin. Ero antimikrobisten ja vertailutuolien muunnettujen suureiden kautta lasketuilla käänteismuunnetuilla keskiarvoilla on yli 50 % luokkaa. Sekä t-testillä että

yksisuuntaisella varianssianalyysillä saadaan tulokseksi, että pintojen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla ($p=0,2114$).



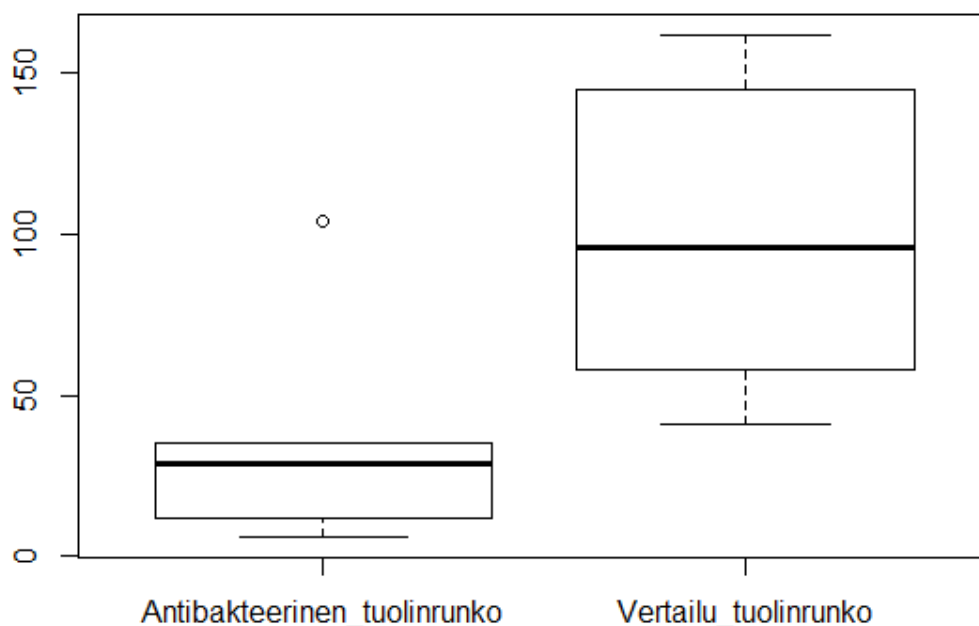
Kuva 2. Box & Whiskers-kuvaaja tuolien muuntelemattomista pesäkelukumääristä (tulokset pmy/100cm²)

Opettajan pöytien pesäkelukumäärissä (kuva 3) on visuaalisessa tarkastelussa nähtävissä, että pintojen bakteeripitoisuuksissa on eroa. Tosin otoskoko pienenee ($n=6$), mikä pienentää myös tuloksen luotettavuutta. Sekä t-testillä että yksisuuntaisella varianssianalyysillä saadaan tulokseksi, että pintojen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla ($p=0,2399$). Ero antimikrobisten ja vertailutuolien muunnettujen suureiden kautta lasketuilla keskiarvoilla on yli 60 % luokkaa.



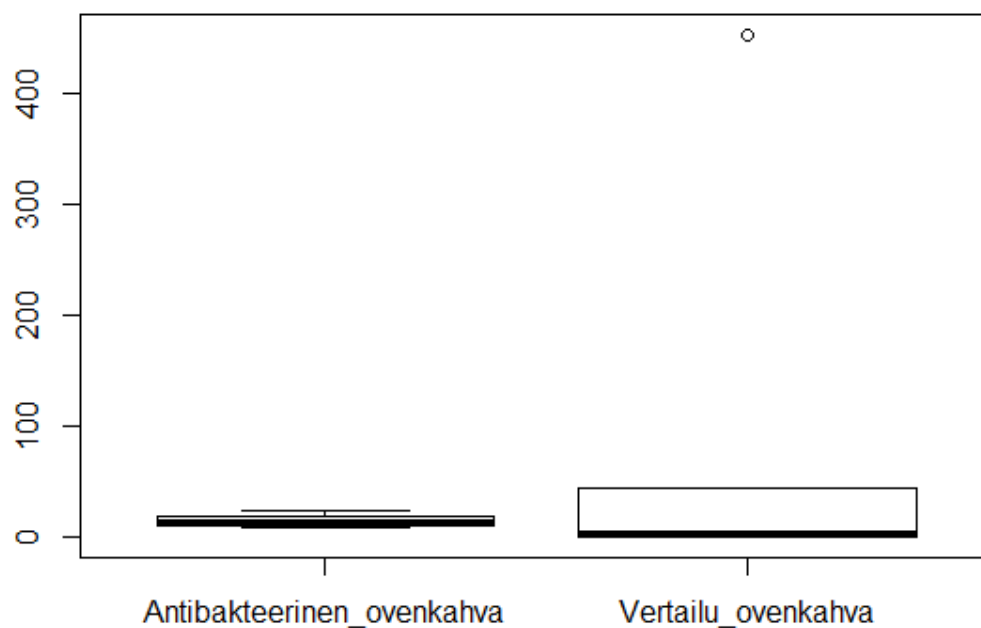
Kuva 3. Box & Whiskers-kuvaaja opettajan pöytien muuntelemattomista pesäkelukumääristä (tulokset pmy/100cm²)

Tuolinrunkojen pesäkelukumäärien osalta (kuva 4) voitaneen mainita, että vertailuluokan rungoista saatu keskiarvo 100 pmy/100cm² on koko tutkimuksen suurin keskiarvo. Otokoko pienenee jälleen (n=5), mutta eri pintojen välillä on silti selkeä ero. Antimikrobisilla pinnoilla on vähemmän bakteereja kuin vertailupinnoilla. Yksisuuntaisella varianssianalyysillä saadaan tulokseksi, että pintojen välillä on tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla (p=0,036) ja t-testillä että pintojen välinen ero on tilastollisesti melkein merkitsevä eikä pintojen bakteeripitoisuuksien vaihtelu ole selitettävissä yksinomaan mittausepävarmuudesta johtuvalla vaihtelulla. Ero antimikrobisten ja vertailutuolien muunnettujen suureiden avulla lasketuilla keskiarvoilla on yli 70 %:a.



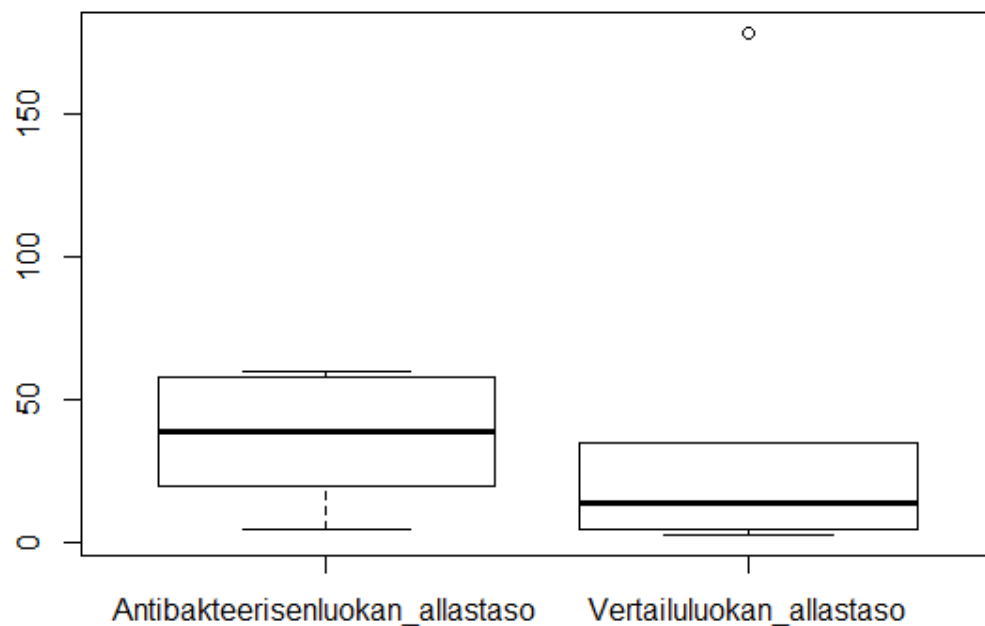
Kuva 4. Box & Whiskers-kuvaaja tuolin runkojen muuntelemattomista pesäkelukumääristä (tulokset pmy/100cm²)

Oven kahvoissa pesäkelukumäärien ero on visuaalisesti huomattava (kuva 5). Harmillisesti kahvojen osalta otosmäärät jäivät muita kalusteita pienemmiksi, mutta bakteri- ja mikrobimäärät ovat silti selkeästi suuremmat vertailukahvassa. Muuntelemattomia pesäkelukumäärien keskiarvoja tutkittaessa voidaan todeta, että vertailukahvassa on yli viisi kertaa enemmän bakteereita kuin antimikrobisessa kahvassa. Tämä ero häviää kun tehdään muunneltu= $\ln(\text{alkuperäinen}+1)$ muunnos ja lasketaan keskiarvot. Ero antimikrobisten ja vertailutuolien muunnettujen suureiden käänteismuunnettujen keskiarvojen kautta lasketuilla keskiarvoilla on yli kaksinkertainen, joskin saadun tuloksen mukaan antibakteerisessa kahvassa on enemmän bakteereja kuin vertailutuotteessa. Erot tuloksissa selittyvät vertailukahvasta saatujen pesäkelukumäärien suuresta hajonnasta (0–453 pmy/100cm²), jota muunnos pienentää jolloin myös keskiarvo pienenee. Suuri hajonta aiheuttaa myös suuren suhteellisen epävarmuuden, joka on vertailukahvan osalta jo yli sata prosenttia. Sekä t-testillä että yksisuuntaisella varianssianalyysillä saadaan tulokseksi, että pintojen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla ($p= 0,5995$).



Kuva 5. Box & Whiskers-kuvaaja oven kahvojen muuntelemattomista pesäkelukumääristä (tulokset pmy/100cm²)

Allastasoissa (kuva 6), jotka olivat molemmat erikoispinnoittamattomia, näyttäisi visuaalisesti olevan vain vähän eroa pesäkelukumäärissä. Sekä t-testillä että yksisuuntaisella varianssianalyysillä saadaan tulokseksi, että pintojen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla ($P=0,3391$). Ero antimikrobisten ja vertailutuolien muunnettujen suureiden kautta lasketuilla käänteismuunnetuilla keskiarvoilla on melkein 60 % vertailuluokan hyväksi. Myöskin tässä vertailuluokan allaspöydän suhteellinen epävarmuus on yli sata prosenttia.



Kuva 6. Box & Whiskers-kuvaaja allastasojen muuntelemattomista pesäkelukumääristä (tulokset pmy/100cm²)

Näytteitä ottaessa huomio kiinnittyi siihen, että vertailuluokassa allastaso näytti usein siistimmältä kuin antibakteerisessa luokassa ja epäily opettajan tapaan siistiä luokkaa ennen kotiin lähtöä tuntui todennäköiseltä. Tämän vuoksi allastason osalta voidaan sanoa, että tulokset eivät ole kovin luotettavat ja tuloksien avulla ei voida sanoa, että antibakteeristen ominaisuuksien siirtymistä olisi havaittavissa.

6.2 ATP-mittauksen tulokset ja vertailu pmy-lukuihin

ATP-mittauksen tulokset ovat liitteessä 3. Taulukossa 3 sekä 4 on laskettuna keskiarvot ja tulosten minimi- sekä maksimiarvot.

Taulukko 4. Antimikrobisten kalusteiden ATP-mittauksen tulokset suhteellisina valoyksikköinä

Saatujen tulosten keskiarvo (RLU)		Min - Max (RLU)
Pulpetti (n=6)	2100	170 – 4040
Tuoli (n=6)	1020	260 – 2900
Opettajan pöytä (n=5)	1180	260 – 3140
Oven kahva (n=2)	3120	1450 – 4800
Tuolin runko (n=2)	2710	1630 – 3790
Antimikrobisen luokan allastaso (n=4)	1760	320 – 3880

Tuloksista voidaan nähdä, että pinnat ovat osin todella puhtaita, vaikka niitä ei ole siivottu ennen näytteenottoa.

Taulukko 5. Vertailukalusteiden ATP-mittauksen tulokset suhteellisina valoyksikköinä

Saatujen tulosten keskiarvo (RLU)		Min - Max (RLU)
Pulpetti (n=6)	870	260 – 2140
Tuoli (n=6)	2510	290 – 9000
Opettajan pöytä (n=5)	520	210 – 1190
Oven kahva (n=2)	2950	1160 – 4740
Tuolin runko (n=2)	1770	1730 – 1820
Vertailuluokan allastaso (n=4)	3370	30 - 11 270

Vain alle 20 %:ia tuloksista saavat yli 3000 RLU:n arvoja joka HUS:in ohjeistuksen mukaisesti viittaa todella runsaaseen eloperäisen aineeseen. Kun katsotaan vertailuluokan allastason vaihteluväliä, niin parhaimpina päivinä päästään sairaalatasoiseen hygieniaan ja yhtenä tutkimuspäivänä saadaan koko otannan suurimmat lukemat. ATP-mittauksella ei suoranaisesti saada tietää mikrobien määrää, mutta voisiko RLU-arvojen kasvusta saada viitteitä mikrobiston määrän kasvusta? Laskettaessa RLU ja pmy arvoista Spearmanin järjestyskorrelaatiokerroin kaavalla

$$\rho = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}} \quad (4)$$

saadaan tulokseksi -0,049. Tuloksen mukaan RLU- ja pmy-lukemilla ei ole keskinäistä riippuvuutta tai se on todella heikkoa. Laskettaessa Spearmanin rho vain vertailuluokan tai antimikrobisen luokan tuloksista saadaan tulokseksi sama; riippuvuus on todella

heikkoa. Riippuvuutta ei siis näyttäisi tämän tutkimuksen mukaan löytyvän likaisuuden ja mikrobiston määrän suhteen.

6.3 Virustestien tulokset

Kahtena otoskertana huhtikuussa 2018 otettiin virusnäytteet pulpetista, tuolista, kahvasta ja opettajan pöydästä molemmista luokista. Varsinaiset analyysit suoritti tutkija Helsingin yliopiston Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osastolla Viikissä. Viruskontaminaation havaitsemiseksi tehtiin näytteille reaaliaikainen polymeerasiketjureaktiotestaus (qPCR), jossa käytettiin alukkeet ja leimatut koettimet sisältävää TaqMan® menetelmää. [66.]

TaqMan® -menetelmä perustuu 5'-nukleaasikemiaan, jossa PCR-tuotteen akkumulaatio voidaan havaita fluoresoivan leiman sisältävän koettimen avulla. DNA:n replikaatiossa DNA monistuu polymeerasiketjureaktion avulla. Kun reaktioon lisätään haluttu koetin ja siihen liitetty fluoresoiva merkkiaine, DNA-polymeerasin kohdatessa koettimen se irrottaa fluoresoivan leiman templaattista, mikä johtaa havaittavaan signaaliin. Mitä enemmän haluttua DNA-templaattia monistuu, sitä enemmän signaaleja voidaan havaita. [67] Adenoviruksen osalta DNA on suoraan oikeassa muodossa PCR:n suorittamiseen. Noroviruksen perimä on RNA-muodossa, joten näytteelle tehtiin one-step RT-PCR -testi. Tämä edellä mainittu testi toimii muutoin kuin normaali PCR, mutta käytettyyn kittiin on lisätty käänteiskopiointientsyymiä, joka kopioi RNA:n DNA:ksi. [66.]

Tulokseksi saatiin, että noroviruksen genomia ei löytynyt kummankaan otoskerran näytteistä. Adenovirusta löytyi jälkimmäisellä näytteenotokerralla antimikrobisen luokan oven kahvasta. Adenoviruksen genomia löytyi vain toisesta tehdystä rinnakkaisesta testistä ja löydös oli heikko, mutta silti positiivinen.

6.4 Kvalitatiiviset tulokset

Yhdelläkään gram-negatiivisten bakteerien tai enterokokkien maljoilla ei kasvanut mitään eli tulosta oli negatiivinen. CHROMagar™ Staph aureus -agareilta tuli positiivisia tuloksia ja positiiviset värimuutokset löydöspintojen mukaan on taulukoituna (taulukot 5 ja 6). Kaikista positiivisen tuloksen antaneista maljoista tehtiin identifiointi Vitek MS

matriisiavusteisella laser-desorptio-ionisaatio-lentoaikamassaspektrometrillä käyttäen In vitro-diagnostiikka (IVD) -tietokantaa.

Taulukko 6. Antimikrobisen koululuokan CHROMagar™ Staph aureus -agarin positiivisten maljojen jatkotutkimustulokset

Otospäivä	Kaluste	Tunnistus
21.3.	Opettajan pöytä	<i>Staphylococcus capitis</i>
27.3.	Tuoli	<i>Micrococcus luteus</i>
27.3.	Pulpetti	<i>Micrococcus luteus</i>
27.3.	Oven kahva	<i>Micrococcus luteus</i>
27.3.	Runko	<i>Micrococcus luteus</i>
10.4.	Pulpetti	<i>Staphylococcus warneri</i>
10.4.	Tuoli	<i>Micrococcus luteus</i>
10.4.	Opettajan pöytä	<i>Micrococcus luteus</i>
10.4.	Oven kahva	<i>Micrococcus luteus</i>
10.4.	Runko	<i>Micrococcus luteus</i>
17.4.	Pulpetti	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
17.4.	Tuoli	<i>Micrococcus luteus</i>
17.4.	Allastaso	<i>Staphylococcus warneri</i>
17.4.	Oven kahva	<i>Micrococcus luteus</i>
24.4.	Pulpetti	<i>Micrococcus luteus</i>
24.4.	Tuoli	<i>Staphylococcus warneri</i>
24.4.	Opettajan pöytä	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
24.4.	Allastaso	<i>Micrococcus luteus</i>
24.4.	Runko	<i>Micrococcus luteus</i>

Kuten huomataan, paljastuivat antimikrobisia kalusteita sisältävän luokan positiiviset tulokset virhepositiivisiksi tuloksiksi. Ennalta virhepositiivisia tuloksia antavaksi tiedetyn *Micrococcus luteus* -bakteerin lisäksi löytyi *Staphylococcus epidermidis*, *S. capitis* ja *S. warneri* -bakteereja. *Micrococcus*-suvun bakteerit ovat aerobisia gram-positiivisia kokkibakteereja, kuten stafylokokitkin ja *Micrococuksia* löytyy yleisesti elottomilta pinnoilta, pölypartikkeleista ja maaperästä, mutta sitä tavataan myös iholta. [68, s. 546-547.] *Staphylococcus epidermidis* on *S. aureuksen* kanssa tyypillisimmät ihmisen iholta, lähengitysteistä ja limakalvoilta löytyvät *Staphylococcus*-suvun bakteerit, jotka voivat olla potentiaalisia patogeenejä. [68, s. 989.] *S. capitis* ja *S. warneri* ovat molemmat ihon normaaliin mikrobistoon kuuluvia, useimmiten pään alueella esiintyviä bakteereja. [69.]

Taulukko 7. Vertailukoululuokan CHROMagar™ Staph aureus -agarin positiivisten maljojen jatkotutkimustulokset

Otospäivä	Kaluste	Tunnistus
13.3.	Tuoli	<i>Micrococcus luteus</i>
21.3.	Pulpetti	<i>Micrococcus luteus</i>
21.3.	Tuoli	<i>Micrococcus luteus</i>
27.3.	Opettajan pöytä	<i>Micrococcus luteus</i>
27.3.	Tuoli	<i>Micrococcus luteus</i>
27.3.	Oven kahva	<i>Micrococcus luteus</i>
27.3.	Runko	Ei tunnistusta
10.4.	Tuoli	<i>Micrococcus luteus</i>
10.4.	Runko	<i>Staphylococcus warneri</i>
17.4.	Pulpetti	<i>Micrococcus luteus</i>
17.4.	Tuoli	Ei tunnistusta
17.4.	Opettajan pöytä	<i>Micrococcus luteus</i>
17.4.	Allastaso	<i>Micrococcus luteus</i>
17.4.	Runko	<i>Micrococcus luteus</i>
24.4.	Tuoli	<i>Micrococcus luteus</i>
24.4.	Opettajan pöytä	<i>Micrococcus luteus</i>

Myöskään vertailuluokasta ei löytynyt *S. aureusta* vaan kaikki positiiviset maljat osoittautuvat virhepositiivisiksi. Muutamasta näytteestä ei IVD-tietokannasta löytynyt vastaavuutta, joten ne ovat todennäköisesti harvinaisempia bakteereja, joihin ei tällä hetkellä löydy tunnistamiseen bakteerispesifistä kuvaajaa eli spektriä IVD-tietokannasta.

Oletettujen positiivisten maljatulosten lisäksi CHROMagar™ Staph aureus- sekä BBL™ Enterococcosel™ -agarilla kasvaneista muun kuin positiivisen värisistä kasvustoista tutkittiin muutamia näytteitä. Näistä näytteistä edellä mainittujen lisäksi lajitasolla tunnistettiin *Staphylococcus lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *Virgibacillus pantothenicus* ja *Bacillus pumilus*. *Staphylococcus saprophyticus* on *E. coli*n tapaan potentiaalinen virtsatietulehduksia aiheuttava bakteeri. [68, s. 909.] *Staphylococcus lugdunensis* on iholla esiintyvä opportunistinen patogeeni, joka voi aiheuttaa ihoinfektioita. [70.] *Virgibacillus pantothenicus* on gram-positiivinen aerobinen eli hapellisissa oloissa kasvava bakteeri, joka voidaan eristää maaperänäytteistä ja joka kliinisenä opportunistisena patogeena voi aiheuttaa märkäpesäkkeen maksaan ja verenmyrkytyksen. [71.] *Bacillus pumilus* on gram-positiivinen, aerobinen sauvabakteeri,

jota esiintyy kaikkialla maaperässä, kasvistossa ja ympäristön pinnoilla. [72.] Se ei ole yleensä ihmiselle patogeeninen. [73.]

6.5 Oppilaiden poissaoloverailujen tulokset

Poissaolotiedot saatiin 1.11.2017- 30.4.2018 väliseltä ajalta, jolle kertyi yhteensä 113 koulupäivää. Molemmissa luokissa oli koko seurantajaksolla 23 oppilasta. Vertailuluokassa poissaoloja oli yhteensä 165 päivää ja antibakteerisessa luokassa 79 päivää puolen vuoden aikana. Keskimäärin vertailuluokasta poissa oli 1,5 oppilasta per koulupäivä ja poissaolojen virhemarginaali on 10 %. Antibakteerisessa luokassa oli keskimäärin poissa 0,7 oppilasta per koulupäivä ja poissaolojen virhemarginaali on 12 %. Antibakteerisessa luokassa oli 52 % vähemmän poissaoloja kuin vertailuluokassa.

7 Tulosten tulkinta ja luotettavuus

Tuloksiin vaikuttaa suuresti vakiointi niin itse näytteenoton suhteen kuin itse näytteenottoaikassa. Tuloksiin on voinut vaikuttaa siivous ja se, miten puhtautta ylläpidetään tutkimuksen koulutiloissa. Kohdekoulun siivouksesta vastaava kertoi, että luokkahuoneiden siivous tapahtuu päivittäin oppituntien jälkeen. Lattiapinnat mopataan samoin kuin pöytäpintatasot mopataan tasomopeilla pesuaineen kera. Mikroliinaa käytetään pyyhittäessä niitä pintoja, joita ei tasomopilla saada helposti siistittyä. Kerran viikossa tuolit käydään läpi mikroliinalla ja mahdolliset isommat vastaan tulleet tahrat poistetaan erillisellä tahrannoistoaaineella. Kaksi kertaa vuodessa tiloissa pidetään suursiivous, jonka aikana käydään kaikki pinnat, kuten ikkunat ja seinät läpi.

Siivouksen lisäksi vakiointiin vaikuttaa käsihygienia. Koululla käydyn epävirallisen keskustelun puitteissa mainittiin, että päiväkotipuolella on tapana pestä kädet pihalta sisään tullessa, mutta kouluun siirryttäessä ko. tapaa ei enää aktiivisesti pidetä yllä vaan se on jokaisen oppilaan oman valinnan mukainen toimintatapa. Näin ollen pintojen mikrobiston määrä ja laatu on voinut riippua myös siitä, onko yksittäisellä oppilaalla ollut tapana pestä kädet ennen luokkaan saapumista.

Hygieniatutkimuksissa on otettava huomioon se, että menetelmillä ei saada täydellistä kuvaa pinnoilla olevista bakteereista, sillä esim. vanutupon avulla suoritettulla pintapyyhintämenetelmällä saadaan poimittua vain 10-40 % bakteereista viljeltäväksi. Tutkittaessa ihmiseen kontaktoituvia mikrobeja tämä on kuitenkin riittävä määrä, sillä vanutupon avulla irtoava määrä bakteereita korreloi bakteerien määrää mikä tarttuisi todellisessa kosketuksessa. [74, s. 7.]

Koska maljakasvatuksen tulokset ovat olleet tutkittavan koulun näkökulmasta erittäin hyviä eli saadut pesäkemäärät ovat hyvin alhaisia, on niistä vaikea tehdä tilastollisesti pätevää analyysiä. Standardin mukaisesti mittaukset, joissa pesäkelukumäärät jäävät alle kymmenen kappaleeseen, ovat epätasmoisia ja niitä voi pitää vain puolikvantitatiivisina. [75, s.16.]

Mikrobiologisissa mittauksissa tulosten epävarmuus johtuu useista tekijöistä. Ensinnäkin näyte analysoidaan semmoiseen, jolloin se sisältää mikrobien lisäksi matriisia sekä mahdollisesti materiaalia, jolla mikrobi kasvaa. [76, s. 2.] Epävarmuuteen vaikuttaa myös siirrostilavuus, pesäkelukumäärän hiukkastilastollinen hajonta sekä tuloksien lukeminen.

Näitä epävarmuuksia voidaan arvioida tilastollisesti joko tekemällä valtavat määrät rinnakkaisia mittausarjoja, jolloin niistä voidaan laskea otoshajonta tai suoraan käyttämällä todennäköisyysjakaumia tai muuta tieteellistä tilastollista tietoa. [63, s. 14.] Johtuen saatujen tulosten mikrobiologisesta luonteesta eivät kvantitatiiviset tulokset ole normaalijakautuneita. Tästä syystä useimmat todennäköisyysfunktiot eivät ole suoraan käyttökelpoisia aineiston analysoimiseen ja tehdyt muutokset laskennallisuuden parantamiseksi antavat saaduille tuloksille omat epävarmuutensa vaihtelulle sekä normaalijakautuneisuudelle. [77.] Näin ollen saatuihin tilastollisiin tuloksiin tulee suhtautua varauksella, joskin ne antavat hyvät suuntaa antavat tulokset.

Kvantitatiivisista tuloksista on visuaalisesti nähtävissä kuvaajista, että useimmissa antibakteerisissa kalusteissa oli vähemmän bakteerikontaminaatiota kuin vertailukalusteissa. Tilastollista eroa ei kuitenkaan ollut kuin tuolinrunkojen pinnoilla, joissa bakteerien muunneltujen laskennallisten keskiarvojen ero oli yli nelinkertainen. Tuloksista voidaan päätellä, että hopealla pinnoitetuilla kalusteilla ei ole tilastollista eroa kuin tuolinrunkojen osalta.

Pulpettien kuvaajissa nähdyt niin sanotut poikkeavat arvot eivät ole epärealistisia, vaan kuuluvat mikrobiologisen tutkimuksen ominaispiirteisiin ja ne tulee ottaa huomioon laskelmissa. Mikäli esimerkiksi verrataan syksyllä tehtyyn Metropolian Ammattikorkeakoulun laboratorioanalytiikan Innovaatioprojektin tutkimukseen, jossa työterveyskeskuksesta otetuilta pinnoilta saatiin keskimäärin 300-1000 pmy/100cm² tuloksia, niin tässä tutkimuksessa saadut alkuperäiset 160:n ja 180:n välillä olevat pmy-arvot ovat hyvin alhaisia. [78.]

Kuvaajissa näkyvät mediaanit ovat kaikilla muilla pinnoilla paitsi allastasoissa antimikrobisissa tuotteissa pienemmät kuin vertailutuotteissa. Kun katsotaan muunneltuja kuvaajia, huomataan että allastason ja ovenkahvan osalta mediaanit siirtyvät vertailutuotteita korkeammalle, joten näiden mainittujen tuloksiin tulisi suhtautua varauksellisesti. Myös suhteelliset epävarmuudet olivat näiden kyseisten pintojen osalta suurimmat. Mikäli hopean siirtymistä pinnoitetulta pinnalta pinnoittamattomalle tullaan jatkotutkimaan, tulisi vakiointia parantaa.

Kvalitatiiviset tulokset olivat hyvin selkeitä ja löytymättömyydessään positiivisia. Koulussa oli toisen virusnäytteenottokerran aikana ollut oksennustautia liikkeellä ja yllättäen mikrobistosta positiivisen tuloksen antoi vain ja ainoastaan adenovirus. Myös

virhepositiivisten määrä Chromagarilla oli melko suurta, joten biokemialliset tai geenitekniset lisävarmistukset ovat jatkossakin ehdottoman suotavia, mikäli käytössä ei ole matriisiavusteista laser-desorptio-ionisaatio-lentoaikamassaspektrometriä.

ATP-mittauksella saatujen tuloksien yllättäjä oli allastaso, joka yhdellä näytteenottokerralla saattoi antaa leikkaussalipuhtautta ja seuraavalla kerralla koko otannan suurimmat lukemat ollen varsin likainen. Vaikka olisi voinut kuvitella, että RLU- sekä pmy-arvoilla olisi ollut korrelaatiota, ei sitä tällä otannalla saatu näkymään. ATP-mittaus soveltuu erityisen hyvin siivoustason arvioimiseen, sillä se kertoo yksinkertaisesti ja helposti orgaanisen lian määrän. Mikrobiston määrän tai laadun arvioimiseen ei tämän tutkimuksen mukaan ko. menetelmällä saada mitään lisäarvoa.

Tutkittaessa poissaolotietoja saatiin vahvistettua, että oppilaiden poissaoloissa oli eroa. Verrattuna normaaliluokkaan olivat antimikrobisessa luokassa opiskelleet oppilaat selkeästi terveempiä tämän puolen vuoden otannan aikana. Saatu tulos on erittäin lupaava ja toivottavaa olisi, että jatkotutkimuksissa uusittavuutta parannettaisiin lisäämällä useampia kouluja sekä luokkia mukaan.

Mikäli jatkotutkimuksia samasta aiheesta tehdään, niin vakiointia pitäisi siivouksen sekä näytteiden oton suhteen vielä lisätä. Lisäksi otoskokoa tulisi nostaa vähintään 30 näytekertaan, mieluummin jopa sataan, jotta tilastollista luotettavuutta saadaan nostettua paremmaksi. Poissaolojen lisätutkimuksen kautta olisi mahdollista saada tietää, kuinka paljon lyhyistä sairaspöissaoloista johtuu suolistoon, hengitysteihin tai muihin sairauksista liittyviin syihin. Kyseessä olevassa tutkimuksessa tulee kuitenkin ottaa huomioon henkilöiden yksityisyyden suoja eli tarvittaessa käyttää tietojen analysointiin terveydenhuollon ammattilaisia.

Lopuksi tahdon kiittää Isku Interiorin kehityspäällikkö Kari Soljamaa tieteellisestä tuesta tutkimusta tehtäessä sekä erittäin hyvästä ja mielenkiintoisesta opinnäytetyöaiheesta. Lisäksi haluan kiittää opinnäytetyön ohjaajaa Jarmo Palmia tuesta ja joustosta laboratorioaikatauluhaasteiden taklaamisessa.

Lähteet

- [1] World Health Organisation. 2018. Fact sheet - Antimicrobial resistance. Verkkoaineisto <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>> Luettu 16.4.2018.
- [2] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2018. Antimicrobial Resistance and Healthcare-associated Infections Programme. Verkkoaineisto <<https://ecdc.europa.eu/en/about-us/who-we-are/disease-programmes/antimicrobial-resistance-and-healthcare-associated>> Luettu 16.4.2018.
- [3] Lumio, Jukka. 2017. Infektioiden tartunta, taudin synty ja leviäminen. Verkkoaineisto <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00569](http://www terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00569)> Luettu 16.4.2018.
- [4] Fierer, Noah; Hamady, Micah; Lauber, Christian & Knight, Rob. 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. Verkkoaineisto <<https://doi.org/10.1073/pnas.0807920105>> Luettu 3.6.2018.
- [5] Wahrman, Miryam Z. 2016. The Hand Book: Surviving in a Germ-Filled World. Lebanon, New Hampshire: ForeEdge.
- [6] Reynolds, Kelly; Watt, Pamela; Boone, Stephanie & Gerba Charles. 2007. Occurrence of bacteria and biochemical markers on public surfaces, International Journal of Environmental Health Research 15:3. Verkkoaineisto <DOI: 10.1080/09603120500115298> Luettu 18.4.2018.
- [7] Kramer, Axel; Schwebke, Ingeborg & Kampf, Günter. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BioMed Central. Verkkoaineisto <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1564025/>> Luettu 16.5.2018.
- [8] Adlharta, C.; Verranb J.; Azevedoc, N.; Olmezd, H.; Keinänen-Toivola, M.; Gouveiaf, I.; Meloc, L. & Crijnsf, F. 2018. Surface modifications for antimicrobial effects in the healthcare setting: a critical overview. Verkkoaineisto <<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.01.018>> Luettu 30.5.2018.
- [9] COST - European Cooperation in science & technology. 2017. About COST. Verkkoaineisto http://www.cost.eu/about_cost Luettu 20.4.2018.
- [10] Vainio-Kaila, Tiina. 2017. Väitöskirja: Antibacterial properties of Scots pine and Norway spruce Verkkoaineisto <<https://aaltodoc.aalto.fi/handle/123456789/28650>> Luettu 16.4.2018.
- [11] Bright, Kelly; Boone, Stephanie & Gerba, Charles. 2010. Occurrence of Bacteria and Viruses on Elementary Classroom Surfaces and the Potential Role of Classroom Hygiene in the Spread of Infectious Diseases. Verkkoaineisto <DOI:10.1177/1059840509354383> Luettu 5.4.2018.

- [12] Guinan, Maryellen; McGuckin, Maryanne & Ali, Yusef. 2002. The effect of a comprehensive handwashing program on absenteeism in elementary schools. Verkkoaineisto <<https://doi.org/10.1067/mic.2002.120366>> Luettu 30.5.2018.
- [13] Celik, Laurel & Pancoe, Diane. 2012. Healthy School Environment - Effectiveness of Hand Washing Instruction in an Elementary School Setting. Verkkoaineisto <DOI:10.1177/1942602X12444451> Luettu 10.6.2018.
- [14] Aiello, Allison; Coulborn, Rebecca; Perez, Vanessa & Larson, Elaine. 2008. Effect of Hand Hygiene on Infectious Disease Risk in the Community Setting: A Meta-Analysis. Yhdysvaltojen Kansanterveys yhdistyksen julkaisu American Journal of Public Health 98/2008.
- [15] Mäkelä, Jyrki. 2014. Pinta pelottaa bakteeria. Tampereen Teknillinen Yliopisto Tiedelehti Rajapinta 3/2014. Verkkoaineisto <<http://www.tut.fi/rajapinta/artikkelit/2014/3/pinta-pelottaa-bakteeria>> Luettu 16.4.2018.
- [16] Tuson, Hannah & Weibel, Douglas. 2013. Bacteria-surface interactions. Verkkoaineisto <<https://doi.org/10.1039/C3SM27705D>> Luettu 3.6.2018.
- [17] Solunetti. 2006. Bakteerien erityispiirteet Verkkoaineisto <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerien_erytispiirteet/2/> Luettu 10.5.2018.
- [18] Korkeala, Hannu. (toim.). 2007. Elintarvikehygieniä: ympäristöhygieniä, elintarvike- ja ympäristötoksikologia. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.
- [19] Pakharukovaa, Natalia; Tuittilaa, Minna; Paavilainena, Sari; Malmia, Henri; Parilovaa, Olena; Tenebergb, Susann; Knightc, Stefan & Zavalova, Anton. 2018. Structural basis for Acinetobacter baumannii biofilm formation. Verkkoaineisto <<https://doi.org/10.1073/pnas.1800961115>> Luettu 12.6.2018.
- [20] Royal Society of Chemistry. 2017. Periodic table - Silver. Verkkoaineisto <<http://www.rsc.org/periodic-table/element/47/silver>> Luettu 9.6.2018.
- [21] Lansdown, Alan. 2006. Silver in Health Care: Antimicrobial Effects and Safety in Use. Verkkoaineisto <<https://doi.org/10.1159/000093928>> Luettu 10.5.2018.
- [22] Terveystieteiden tutkimuskeskus. 2017. Tietotteet ja uutiset: Hopeavedessä piilee vaara. Verkkoaineisto <<https://thl.fi/fi/-/hopeavedessa-piilee-vaara-ei-kannata-kayttaa-sairauksien-hoidossa-eika-ravintolisana>> Luettu 9.6.2018.
- [23] Ahonen, Merja; Kahru, Anne; Ivask, Angela; Kasemets, Kaja; Kõljalg, Siiri; Mantecca, Paride; Vinković, Ivana; Keinänen-Toivola, Minna & Crijns, Francy. 2017. Proactive Approach for Safe Use of Antimicrobial Coatings in Healthcare Settings: Opinion of the COST Action Network AMiCI. Verkkojulkaisu <<https://doi.org/10.3390/ijerph14040366>> Luettu 14.6.2018.

- [24] Clement, Julia & Jarrett, Penelope. 1994. Antibacterial Silver. Verkkoaineisto <<https://10.1155/MBD.1994.467>> Luettu 10.5.2018.
- [25] Conover, Emily. 2015. Artikkel: Silver turns bacteria into deadly zombies. Science Magazine. Verkkoaineisto <[doi:10.1126/science.aac4543](https://doi.org/10.1126/science.aac4543)> Luettu 10.5.2018.
- [26] Adibhesami, Masood; Ahmadi, Malahat; Farshid, Amir; Sarrafzadeh-Rezaei, Farshid & Dalir-Naghadeh, Bahram. 2017. Effects of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus contaminated open wounds healing in mice: An experimental study. Verkkoaineisto <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28473893>> Luettu 13.6.2018.
- [27] Armstrong Medical. 2013. BioCote® Supprot Pack. Verkkoaineisto <http://www.armstrongmedical.net/images/uploads/user_guides/BioCote_Support_Pack_ENGLISH.pdf> Luettu 02.05.2018.
- [28] Phillips, Paul; Taylor, Lesley & Hastings, Richard. 2009. Silver ion antimicrobial technology: decontamination in a nursing home. Verkkoaineisto <<https://doi.org/10.12968/bjcn.2009.14.Sup3.85161>> Luettu 10.5.2018.
- [29] Sütterlin, Susanne. 2015. Dissertation: Aspects of Bacterial Resistance to Silver. Verkkojulkaisu <<http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-247472>> Luettu 13.6.2018.
- [30] Ijäs, Tuija & Välimäki, Maija-Liisa. 2009. Tunne Hygieniaosaaminen. Keuruu: Kustannusyhtiö Otava.
- [31] Hiltunen, Erkki; Holmberg, Peter; Kaikkonen, Matti; Lindblom-Yläne, Sari & Nienstedt Walter. 2003. Galenos IV Ihmiselimistö kohtaa ympäristön. Porvpp: WS Bookwell Oy.
- [32] Hedman, Klaus; Heikkinen, Terho; Huovinen, Pentti; Järvinen, Asko; Meri, Seppo & Vaara, Martti. 2010. Mikrobiologia; Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Jyväskylä: Kustannus Oy Duodecim.
- [33] Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2016. Staphylococcus aureus. Verkkoaineisto <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/staphylococcus-aureus> Luettu 22.8.2018.
- [34] Luonnonvarakeskus. 2015. Ravinteisiin ja ulostemikrobeihin liittyviä käsitteitä. Verkkoaineisto <[https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/www/Hankkeet/Jaloittelutarhat/Ympäristövaikutukset/Käsitteitä](https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/www/Hankkeet/Jaloittelutarhat/Ymparistovaikutukset/Kasitteita)> Luettu 22.5.2018.
- [35] Manero, Albert & Blanch, Anicet. 1999. Identification of Enterococcus spp. with a Biochemical Key. American Society for Microbiology. / Appl Environ Microbiol. 10/1999.

[36] Tille, Patricia. 2014. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. St. Louis: Elsevier Mosby.

[37] Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2018. Enterokokit. Verkkoaineisto <<https://www.evira.fi/elaimet/zoonosikeskus/mikrobilaakeresistenssi/indikaattoribakteerien-resistenssi/enterokokit/>> Luettu 16.5.2018.

[38] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2015. Infektiotaudit - VRE. Verkkoaineisto <<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/vre>> Luettu 16.5.2018.

[39] Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2016. Escherichia coli / EHEC (VTEC / STEC) ruokamyrkytysten aiheuttajana. Verkkoaineisto <<https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/escherichia-coli/>> Luettu 22.5.2018.

[40] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2016. Norovirus. Verkkoaineisto <<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/virustaudit/norovirus>> Luettu 11.5.2018.

[41] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2017. Facts about norovirus. Verkkoaineisto <<https://ecdc.europa.eu/en/norovirus-infection/facts>> Luettu 29.5.2018.

[42] Lumio, Jukka. 2017. Lääkärikirja Duodecim - Norovirus. Verkkoaineisto <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00738> Luettu 11.5.2018.

[43] Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2016. Ruokamyrkytyksiä aiheuttavia viruksia. Verkkoaineisto <<https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-virusia/>> Luettu 29.5.2018.

[44] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2013. Adenovirus. Verkkoaineisto <<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/virustaudit/adenovirus>> Luettu 11.5.2018.

[45] Thermo Fisher Scientific. 2010. Instructions For Use Remel MacConkey Agar. Verkkoaineisto <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU453801.pdf>> Luettu 11.4.2018.

[46] Merck KGaA. 2018. 105465- MacCONKEY agar - Merck Microbiology Manual 12th Edition. Verkkoaineisto <http://www.merckmillipore.com/FI/en/product/MacCONKEY-agar,MDA_CHEM-105465> Luettu 11.4.2018.

- [47] Teknova Inc. 2018 Bacterial Growth Media - MacConkey Agar (MAC) Product details & Technical Data Sheet. Verkkoaineisto <<https://www.teknova.com/category-s/504.htm>> Luettu 11.4.2018.
- [48] CHROMagar 4. 2015. Instructions For Use NT-EXT-005 Version 9. CHROMagar™ Staph aureus. Verkkoaineisto <http://www.chromagar.com/fichiers/1425915717NT_EXT_005_V9_TA.pdf?PHPSESSID=d9f5cc8fb1c702031f6f1977103d0a74> Luettu 22.4.2018.
- [49] Becton Dickinson GmbH. 2011. Instructions For Use BD BBL™ CHROMagar™ Staph aureus PA-257074.06. Verkkoaineisto <<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9015>> Luettu 22.4.2018.
- [50] Gaillot, Olivier; Wetsch, Muriel; Fortineau, Nicolas & Berche, Patrick. 2000. Evaluation of CHROMagar Staph. aureus, a New Chromogenic Medium, for Isolation and Presumptive Identification of Staphylococcus aureus from Human Clinical Specimens. Verkkojulkaisu <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747148>> Luettu 15.5.2018.
- [51] Merck KGaA. 2018. 146023 | Mannitol Salt Agar - LI. Technical Data Sheet Verkkoaineisto <http://www.merckmillipore.com/FI/en/product/Mannitol-Salt-Agar-LI-30ml,MDA_CHEM-146023#documentation> Luettu 11.8.2018.
- [52] Becton Dickinson GmbH. 2015. BBL™ Enterococcosel™ Agar Quality Control Procedures L007376 Verkkoaineisto <[http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007376\(09\).pdf](http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007376(09).pdf)> Luettu 22.4.2018.
- [53] Helsingin kaupungin Ympäristökeskuksen julkaisuja Pönkä, A., Lindström, P.-C., Pitkälä, A., Kalso, S., Rantti, P., Tarkkonen, T. 1999. Pintahygieniatutkimusmenetelmien soveltuvuus elintarvikehuoneistojen seurantaan. Helsinki: Helsingin kaupungin hankintakeskus Verkkoaineisto <<https://www.hel.fi/static/ymk/julkaisut/julkaisu-12-99.pdf>> Luettu 16.4.2018.
- [54] 3M™ Health Care 3M™ Clean-Trace™ system. 2013. Hygiene Management Guide for Environmental Surfaces. Verkkoaineisto <<https://multimedia.3m.com/mws/media/6869730/clean-trace-hygiene-management-guide.pdf>> Luettu 15.5.2018.
- [55] Alm, Jaana; Einimö, Carina; Kela, Eija; Koukkari, Katja & Yrjönsalo, Marja-Liisa. 2015. Riittääkö aistinvarainen puhtauden arviointi sairaalassa? Suomen Sairaalahygienialehti 01/2015, s. 9-15.
- [56] ISSA® — The Worldwide Cleaning Industry Association. 2013. ISSA CLEAN STANDARD 0714-2014 - Measuring the Cleanliness of K-12 Schools. Lincolnwood: issa.com.
- [57] Shaughnessy, Richard; Cole, Eugene; Moschandreas, Demetrios & Haverinen-Shaughnessy, Ulla. 2013. ATP as a Marker for Surface Contamination of Biological

Origin in Schools and as a Potential Approach to the Measurement of Cleaning Effectiveness. Online Journal of Occupational and Environmental Hygiene June 2013 <DOI: 10.1080/15459624.2013.784633> Luettu 26.5.2018.

[58] Wilkins, Charles & Lay, Jackson. 2006. Identification of Microorganisms by Mass Spectrometry New Jersey: John Wiley & Sons Inc.

[59] Opetushallitus. 2009. Massaspektrometria. Verkkoaineisto <http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_5-5_massaspektrometria.html> Luettu 16.5.2018.

[60] De Respinis, Sophie; Monnin, Valérie; Girard, Victoria; Welker, Martin; Arzac, Maud; Cellière, Béatrice; Durand, Géraldine; Bosshard, Philipp; Farina, Claudio; Passera, Marco; Van Belkum, Alex; Petrini, Orlando & Tonollaa, Mauro. 2014. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Using the Vitek MS System for Rapid and Accurate Identification of Dermatophytes on Solid Cultures. Verkkoaineisto < <https://dx.doi.org/10.1128%2FJCM.02199-14>> Luettu 14.6.2018.

[61] Suomen ympäristökeskus. 2008. Standardi SFS-EN ISO 8199 Veden laatu. Yleinen ohje mikro-organismien lukumäärien määrittämiseksi viljelymenetelmällä. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS.

[62] Ghasemi, Asghar & Zahediasl, Saleh. 2012 Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. Verkkoaineisto <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843808>> Luettu 31.5.2018.

[63] Niemelä, Seppo. 2001. Mikrobiologian kvantitatiivisten viljelymääritysten mittausepävarmuus. Helsinki: Edita.

[64] Tilastokeskus. 2002. Usean jakauman vertaileminen. Verkkoaineisto <http://www.stat.fi/tup/tietoaika/tilaajat/ta_02_02_kuusela.html> Luettu 26.5.2018.

[65] Aki Taanila. 2016. Ruutu- ja janakaavio. Verkkoaineisto <<https://tilastoapu.wordpress.com/tag/boxplot/>> Luettu 26.5.2018.


[66] Maunula, Leena. 2018. Tutkija (HY, ELTDK, EHYT) Helsingin yliopisto - Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto. Sähköpostikirjeenvaihdanta 21.5.2018.

[67] Thermo Fisher Scientific. 2018. How TaqMan Assays Work. Verkkoaineisto <<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>> Luettu 28.5.2018.

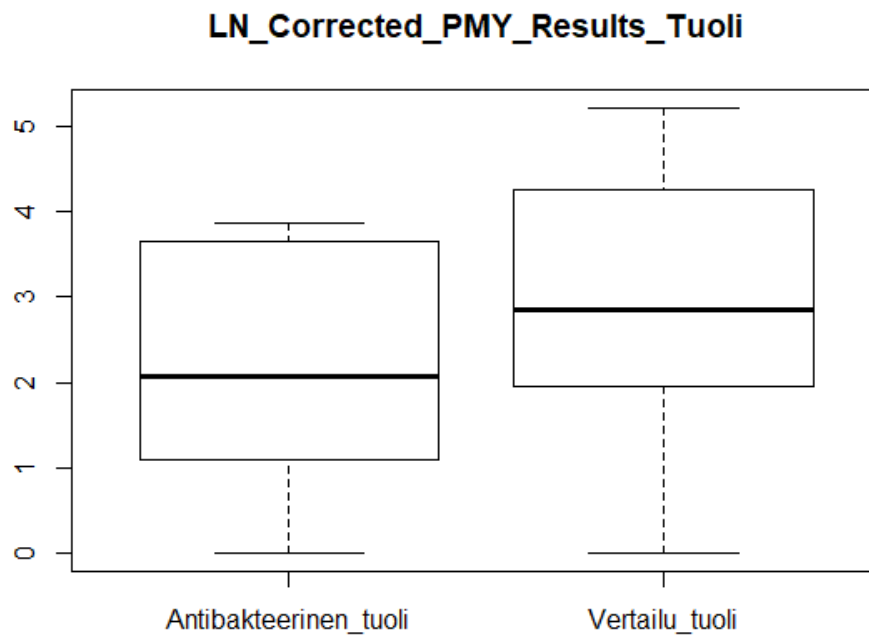
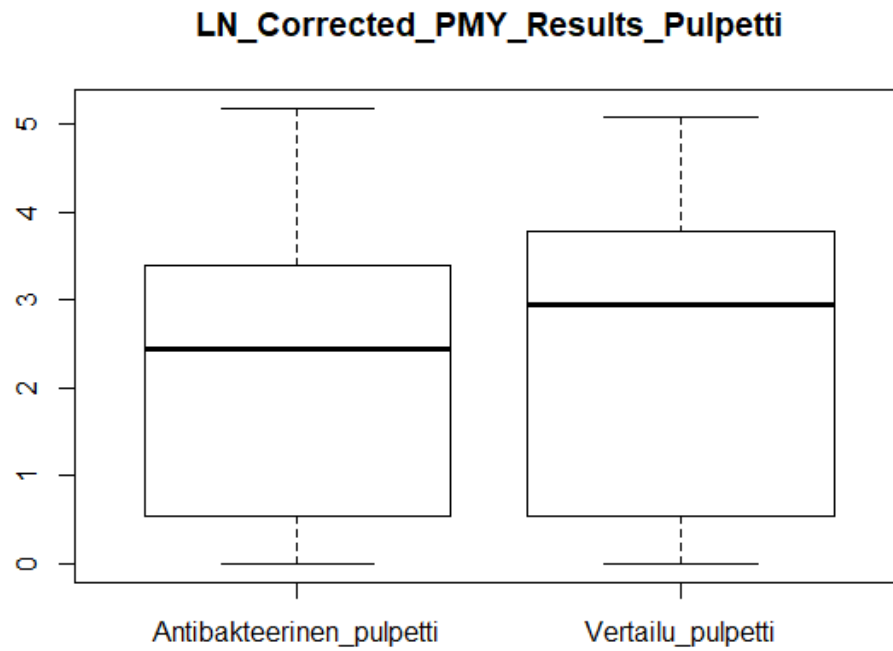
[68] Madigan, Michael; Martinko, John; Stahl, David & Clark, David. 2012. Brock Biology of Microorganisms, 13th Edition. San Francisco: Pearson Education Inc.

- [69] Kloos, Wesley & Schleifer, Karl. 1975. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin. Verkkoaineisto <doi:10.1099/00207713-25-1-62> Luettu 12.6.2018.
- [70] Brander, Minna; Aho, Riitta & Saarinen, Antti. 1995. Staphylococcus lugdunensiksen aiheuttama kuolemaan johtanut endokardiitti. Verkkoaineisto <<https://www.duodecimlehti.fi/lehti/1995/5/duo50115>> Luettu 10.5.2018.
- [71] Wang, Jie-ping; Liu, Bo; Liu, Guo-hong; Chen, De-ju; Zhu, Yu-jing; Chen, Zheng & Che, Jian-mei. 2105. Genome Sequence of *Virgibacillus pantothenicus* DSM 26T (ATCC 14576), a Mesophilic and Halotolerant Bacterium Isolated from Soil. Verkkoaineisto <doi:10.1128/genomeA.01064-15> Luettu 12.6.2018.
- [72] Baylor College of Medicine. 2017. *Bacillus pumilus* SAFR-032. Verkkoaineisto <<https://www.hgsc.bcm.edu/bacillus-pumilus-safr-032>> Luettu 12.6.2018.
- [73] National Center for Biotechnology Information. 2018. *Bacillus pumilus*. Verkkoaineisto <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Bacillus%20pumilus\[Organism\]&cmd=DetailsSearch](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Bacillus%20pumilus[Organism]&cmd=DetailsSearch)> Luettu 12.6.2018.
- [74] Rahkio, Marjatta; Virtalaine, Tuomas; Suontamo, Tuula; Teirmaa, Sanna; Wirtanen, Gun; Salo, Satu & Syyrakki, Sara. 2011. Pintahygieniaopas : opas suurtalouksien, elintarviketeollisuuden, terveydensuojelun ja elintarvikevalvonnan sekä alan opetuksen käyttöön. Vammala: Elintarvike ja Terveys -lehti.
- [75] Suomen ympäristökeskus. 2001. Standardi SFS-ENV ISO 13843 Veden laatu. Opas mikrobiologisten menetelmien validoinnista. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS.
- [76] Elintarvikevirasto. 1997. Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Helsinki: Elintarvikevirasto.
- [77] Feng, Changyong; Wang, Hongyue; Lu, Naiji; Chen, Tian; He, Hua; Lu, Ying & Tu, Xin. 2014. Log-transformation and its implications for data analysis. Verkkoaineisto <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092958>> Luettu 14.6.2018.
- [78] Ahovaara, Tiina; Jokinen, Camilla; Kantola, Roosa; Mikkola, Maija; Pulli, Senni & Turtiainen, Taru. 2017. Innovaatioprojekti - Antimikrobisten pintojen toimivuuden tutkiminen. Julkaisematon tutkimus: Metropolia AMK.

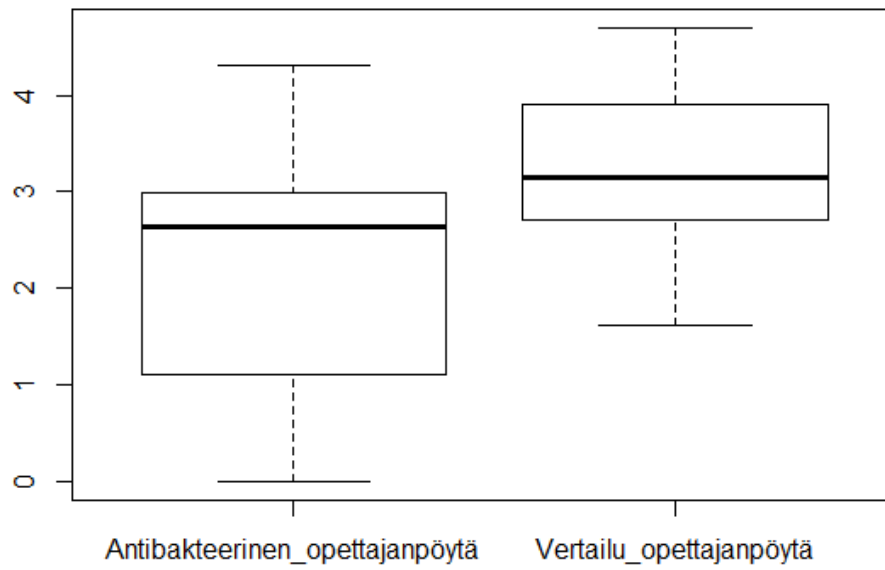
Opettajille annettu seurantalomake luokkahuoneen käytöstä

	
Antimikrobisten pintojen vaikutus bakteerien määrään koululuokassa Seurantalomake– Metropolia AMK / Isku Oy	
<h3>Seurantalomake luokkahuoneen käytöstä</h3>	
Seuranta-ajanjakso: (pvm)	
Luokkahuoneen numero:	
Oppilaiden lukumäärä	
Luokkahuoneessa on päivän aikana	<input type="checkbox"/> Kirjoitettu <input type="checkbox"/> Piirretty <input type="checkbox"/> Käytetty vahaliituja <input type="checkbox"/> Maalattu <input type="checkbox"/> Muovailtu vahaa <input type="checkbox"/> Pelattu:
Mahdollinen seurantajakson aikana ollut muu käyttö	<input type="checkbox"/> Syöty <input type="checkbox"/> Seisty pöydillä <input type="checkbox"/> Muu; mikä _____
Luokassa on päivätoiminnan lisäksi ollut iltapäivätoimintaa	<input type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/> Kyllä; käyttäjien lukumäärä: _____ hlöä
Mahdolliset muut huomiot	

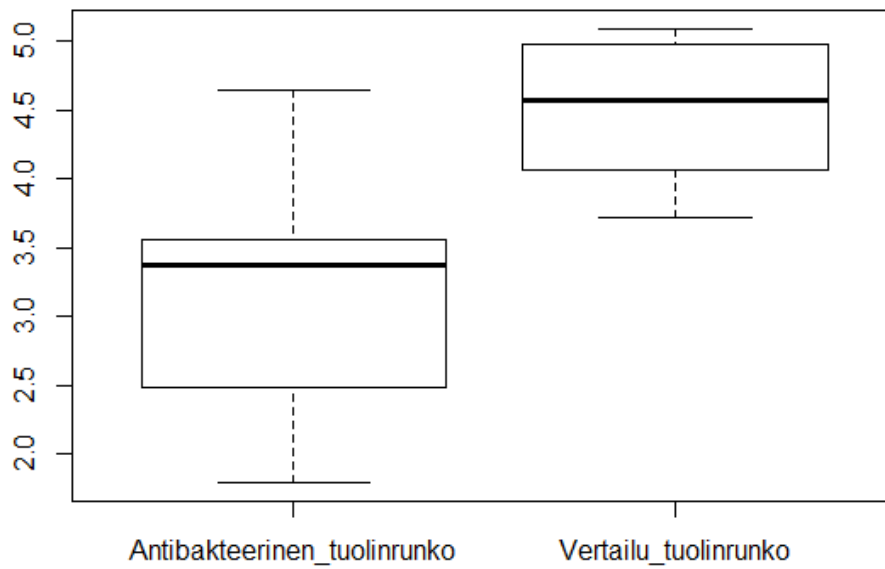
Muunnettujen pesäkelukumäärien keskiarvojen Box & Whisker -kuvaajat



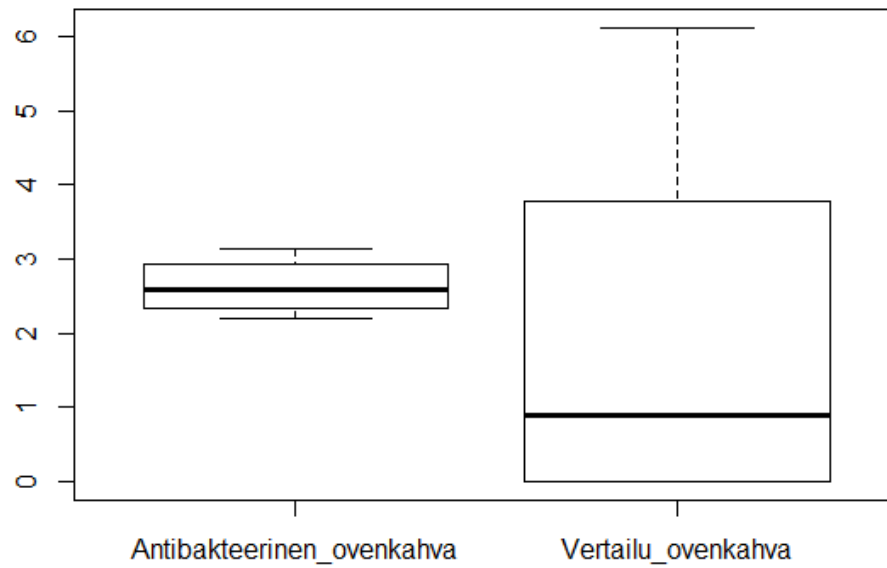
LN_Corrected_PMY_Results_Opettajän_pöytä



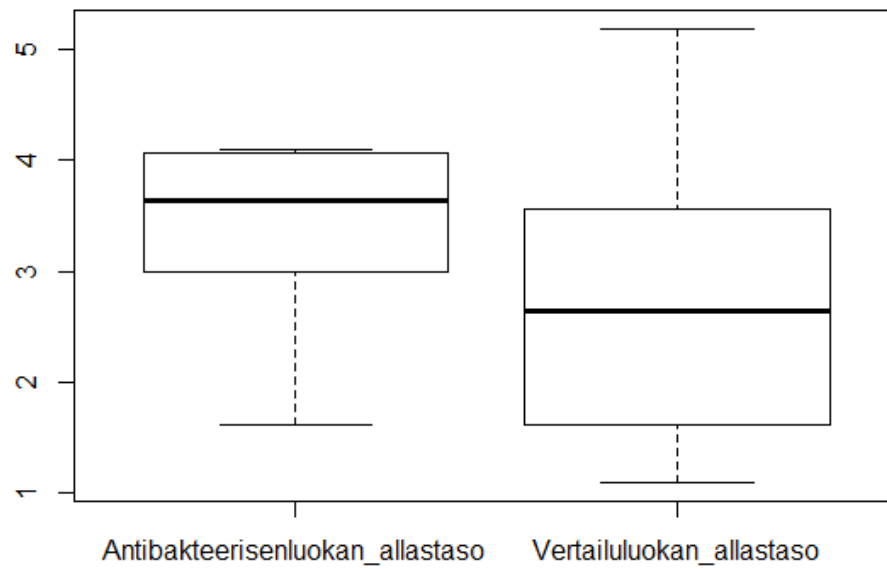
LN_Corrected_PMY_Results_Tuolinrunko



LN_Corrected_PMY_Results_Ovenkahva



LN_Corrected_PMY_Results_Allastaso



ATP -mittausten tuloksetAntimikrobisen luokan ATP tulokset RLU / 100 cm²

Päivämäärä	Pulpetit	Tuolit	Opettajan pöytä	Allaspöytä (ei antim.)	Oven kahva	Tuolin runko
27.3.	2279	256	492	320	1451	
10.4.	174	447	262	566		1625
17.4.	3713	465	271	2257		3787
24.4.	808	1156	3143	3881	4796	
24.4.	4039	885	1730			
24.4.	1603	2896				

Vertailuluokan ATP tulokset RLU / 100 cm²

Päivämäärä	Pulpetit	Tuolit	Opettajan pöytä	Allaspöytä (ei antim.)	Oven kahva	Tuolin runko
27.3.	547	289	208	35	1162	
10.4.	315	649	290	34		1730
17.4.	2135	425	375	11267		1817
24.4.	255	9001	1189	2133	4736	
24.4.	559	1731	521			
24.4.	1396	2976				