

Opinnäytetyö (AMK)

Prosessi- ja materiaalitekniikka

2019

Anna-Karoliina Mäkinen

LOPPUTUOTTEILLE TEHTÄVÄN STERIILISYYSTESTIN VALIDOINTI



OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Prosessi- ja materiaalitekniikka

2019 | 61 sivua, 4 liitesivua

Anna-Karoliina Mäkinen

LOPPUTUOTTEILLE TEHTÄVÄN STERIILISYYSTESTIN VALIDOINTI

Opinnäytetyön toimeksiantaja Oy Finnsusp Ab on silmälasilinssejä, piilolinssinesteitä sekä silmänhoitotuotteita valmistava yritys. Opinnäytetyön aiheena on toimeksiantajan valmistamien tuotteiden loppulaadunvalvonnassa suoritettavan steriilisyystestin uudelleen validointi.

Validointi tehdään standardissa SFS-EN ISO 11737-1 esitetyn kalvosuodatusmenetelmän mukaisesti. Validointiin käytetään lisäksi Euroopan farmakopeaa sekä sen määäämiä mikrobeja. Validoinnilla halutaan todentaa tämänhetkisen menetelmän kyky havaita mikrobiologinen kasvu kahdesta eri tuoteryhmästä Euroopan farmakopean määäämillä mikrobeilla.

Opinnäytetyön tavoitteena on suunnitella ja toteuttaa suodatusmenetelmän uudelleen validointi sekä osoittaa, että menetelmällä saadaan monitoroitua tuotteiden mikrobiologinen kasvu.

Uudelleen validointi suoritettiin toimeksiantajan laadunvarmistuslaboratorion tiloissa kevään 2019 aikana.

ASIASANAT:

mikrobiologia, validointi, kalvosuodatusmenetelmä

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical and Materials Engineering

2019 | 61 pages, 4 pages in appendices

Anna-Karoliina Mäkinen

VALIDATION OF STERILITY TEST FOR FINAL PRODUCTS

Oy Finnsusp Ab manufactures lenses for eyeglasses, contact lens care products and eye care products. This thesis set out to revalidate a sterility test for the company's final products as a final quality control analysis.

Validation is performed according to the membrane filtration method presented in the standard SFS-EN ISO 11737-1. The European pharmacopoeia (Ph. Eur.) is used for the planning of the validation and microbes determined in the Ph. Eur. are used in the validation. The purpose of the validation is to show that the method used at the moment can detect microbial growth on the products of two different product lines.

The objective of the thesis was to plan and perform the revalidation of the membrane filtration method, as well as to demonstrate that the growth of the microbes can be detected by the method.

The revalidation was performed during spring 2019 in a quality control laboratory at the company facility.

KEYWORDS:

microbiology, validation, membrane filtration method

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	8
1 JOHDANTO	9
2 EUROOPAN FARMAKOPEA SEKÄ STANDARDIT	10
2.1 Euroopan farmakopea	11
2.2 Standardit SFS-EN ISO 11737-1 ja -2	11
3 VALIDOINTI	13
3.1 Milloin validoidaan?	13
3.2 Validointisuunnitelma	14
3.3 Validoinnin parametreja	15
3.3.1 Selektiivisyys	15
3.3.2 Spesifisyys	16
3.3.3 Saanto	16
3.3.4 Toistettavuus	16
3.3.5 Uusittavuus	17
3.4 Validoinnin dokumentointi sekä raportointi	17
3.5 Menetelmän käyttöönotto ja laadunvarmistus	18
4 MIKROBITURVALLISUUS	20
4.1 Työskentely mikrobiologian laboratoriossa	20
4.2 Työssä käytetyt mikrobit	21
4.2.1 <i>Aspergillus brasiliensis</i>	22
4.2.2 <i>Bacillus subtilis</i>	22
4.2.3 <i>Candida albicans</i>	23
4.2.4 <i>Clostridium sporogenes</i>	23
4.2.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
4.2.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	24
5 MENETELMÄT, LAITTEET JA VÄLINEET	25
5.1 Menetelmät	25
5.1.1 Kalvosuodatusmenetelmä	25
5.1.2 Liuosvalmistus	26
5.1.3 Elatusaineiden valmistus	26

5.1.4 Ympin valmistus	28
5.2 Laitteet	29
5.2.1 Kalvosuodatuslaitteisto	29
5.2.2 Luokan 2 biologinen suojakaappi	30
5.2.3 Autoklaavi	30
5.2.4 Tarkkuus- ja analyysivaaka	32
5.2.5 Sentrifugi	32
5.2.6 Koeputkiravistelijä	33
5.2.7 Vesihaude	33
5.2.8 Lämpökaappi	33
5.2.9 Automaattipipetit	34
5.3 Välineitä	34
6 VALIDOINNIN SUORITUS	35
6.1 Validointisuunnitelma ja sen muutokset	35
6.1.1 Alkuperäinen validointisuunnitelma	36
6.1.2 Validointisuunnitelman päivitetty versio 2.0	39
6.2 Validoinnin testikierrosten esivalmistelut	41
6.3 Validoinnin testikierroksen kulku	42
7 ONGELMAT JA NIIDEN RATKAISUT	46
7.1 Autoklavoitavat jätemäärät sekä laboratorion siivous	46
7.2 Inokuloitavat näytemäärät	47
7.3 <i>Clostridium sporogenesin</i> poistaminen validoinnista	47
7.4 Piilolinssien hoitonesteiden kasvamattomuus	48
7.5 <i>Bacillus subtiliksen</i> aiheuttamat vaikeudet	48
8 TULOKSET	50
8.1 Silmänhoitotuotetulokset	50
8.2 Piilolinssien hoitonesteiden tulokset	55
9 YHTEENVETO	58
10 LÄHTEET	60

LIITTEET

- Liite 1. DPBST-liuoksen valmistus
- Liite 2. TSB-liuoksen valmistus
- Liite 3. 0,9 % NaCl-liuoksen valmistus
- Liite 4. Kasvualustojen valmistus

KAAVAT

Kaava 1 Saantoprosentti	16
Kaava 2 Keskiarvo	17
Kaava 3 Keskihajonta	17
Kaava 4 Suhteellinen keskihajonta	17

KUVAT

Kuva 1 Mittaustulosten laatua kuvaavien peruskäsitteiden yhteys toisiinsa (Hägg, 2016, p. 16.)	18
Kuva 2 Piilolinssien hoitonesteidien koonti	40
Kuva 3 Silmänhoitotuotteenäytteiden koonti	40
Kuva 4 Silmänhoitotuotteen testauspäivä	42
Kuva 5 Piilolinssien hoitonesteen testauspäivä	45
Kuva 6 <i>Bacillus subtiliksen</i> muodostama biofilmi maljalla	49

KUVIOT

Kuvio 1 Ympin valmistus	28
-------------------------	----

TAULUKOT

Taulukko 1 Eri mikrobien lämpökestävyydet ennen tuhoutumista (Sojakka & Välimäki, 2011, p. 36.)	31
Taulukko 2 Silmänhoitotuotetulokset <i>S. aureus</i> . Tulokset ovat kolmen rinnakkaisen maljan keskiarvo laimennoksella 10^{-6} .	51
Taulukko 3 Silmänhoitotuote-erien väliset keskiarvot <i>S. aureuksella</i> , tulokset ovat kolmen rinnakkaisen maljan keskiarvo laimennoksella 10^{-6} .	52
Taulukko 4 Silmänhoitotuotekierrosten loput tulokset tuote-erittäin, tulokset ovat keskiarvo kolmelta rinnakkaiselta maljalta laimennoksella 10^{-6} . <i>A. brasiliensiksella</i> laimennos 10^{-5} .	53

Taulukko 5 Silmänhoitotuotekierrosten negatiiviset kontrollit	54
Taulukko 6 Piilolinssien hoitonestetulokset, tulokset ovat keskiarvo kolmelta rinnakkaiselta maljalta laimennoksella 10^{-6} .	56
Taulukko 7 Piilolinssien hoitonestekierrosten negatiiviset kontrollit	57

KÄYTETYT LYHENTEET

CEN	Eurooppalainen standardoimisjärjestö. (Suomen Standardisoimisliitto SFS ry, ei pvm.)
DPBST	Dulbecco's phosphate buffered saline with tween 20, fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos (DPBS), jossa on mukana polysorbaattia. (Merck, ei pvm.)
EN	Eurooppalaisen standardoimisjärjestön tunnustaman standardin tunnus. (Suomen Standardisoimisliitto SFS ry, ei pvm.)
FTA	Fluid thioglycollate agar, thioglykollaattiliemi, johon on lisätty agaria. (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2014.)
FTM	Fluid thioglycollate medium, mikrobiologiassa käytetty thioglykollaattielatusliemi. (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2014.)
HEPA	High Efficiency particulate Air filter, HEPA-suodatin. (Whyte, 2010.)
ISO	Kansainvälinen standardoimisjärjestö. (Suomen Standardisoimisliitto SFS ry, ei pvm.)
NaCl	Natriumkloridi (Sojakka & Välimäki, 2011.)
pmy	Pesäkkeitä muodostava yksikkö eli colony forming unit (cfu). (Sojakka & Välimäki, 2011.)
rcf	Relative centrifugal force, G-arvo. (Hänninen, et al., 2012.)
rpm	Revolutions per minute, kierrosta minuutissa.. (Hänninen, et al., 2012.)
SFS	Suomen standardoimisliitto. (Suomen Standardisoimisliitto SFS ry, ei pvm)
TSA	Tryptic soy agar, mikrobiologiassa yleisesti käytetty kiinteä elatusaine. (Sojakka & Välimäki, 2011.)
TSB	Tryptic soy broth, mikrobiologiassa yleisesti käytetty elatusliemi. (Sojakka & Välimäki, 2011.)

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön aiheena on toimeksiantajan valmistamien tuotteiden laadunvarmistuksessa suoritettavan steriilisyystestin uudelleen validointi. Toimeksiantaja on Oy Finnsusp Ab, Piilokset, joka on vuonna 1978 perustettu silmälasilinssejä, piilolinssinesteitä sekä silmänhoitotuotteita valmistava perheyritys. Piilokset-tuotteet ovat pitkän tutkimus- ja tuotekehitystyön tulos ja ne ovat valmistettu kansainvälisten direktiivien, lakien sekä standardien mukaisesti. Toimeksiantajan valmistavat tuotteet ovat lähes kaikki luokiteltu lääkinnällisiksi laitteiksi (Medical Device, MD).

Laadunvarmistuksen steriilisyystesti perustuu standardin SFS-EN ISO 11737-1 mukaiseen kalvosuodatusmenetelmään. Toimeksiantaja on validoinut laadunvarmistuksessa suoritettavan steriilisyystestin ennen. Heillä on kuitenkin tarve steriilisyystestin uudelleen validoinnille laajemmalla mikrobikirjolla. Lopputuotteen laadunvarmistuksen steriilisyystesti validoidaan Euroopan farmakopean mukaan. Validointisuunnitelman tekemiseen on käytetty farmakopeaa sekä standardeja SFS-EN ISO 11737-1 sekä 11737-2.

Steriilisyystestimenetelmän validoinnilla halutaan osoittaa, että menetelmällä voidaan havaita mikrobiologinen kasvu kahdessa tuoteryhmässä, kuudella farmakopeassa luetellulla mikrobilla luotettavasti, tarkasti ja toistettavasti. Farmakopean mukaiset mikrobit ovat *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, sekä *Staphylococcus aureus*. Näistä neljä ovat bakteereita, yksi on hiiva ja yksi home.

Opinnäytetyön tavoitteena on suunnitella ja toteuttaa menetelmän validointi sekä osoittaa, että menetelmällä saadaan osoitettua tuotteen mikrobiologinen kasvu. Opinnäytetyössä käydään ensin läpi Euroopan farmakopeaa ja standardeja sekä validointia yleisesti. Tämän jälkeen käydään läpi mikrobiturvallisuuutta. Teorian jälkeen päästään kokeelliseen osaan, jossa käydään läpi laitteet, välineet ja menetelmät, validoinnin suoritus sekä ongelmia, joita validoinnin aikana kohdattiin ratkaisuihin. Lopuksi käydään läpi tulokset sekä yhteenveto.

2 EUROOPAN FARMAKOPEA SEKÄ STANDARDIT

Standardisoinnilla laaditaan yhteisiä toimintatapoja. Standardisoinnin tarkoituksena on helpottaa niin kuluttajien kuin viranomaistenkin elämää, elinkeinoelämää unohtamatta. Näin pyritään varmistamaan tuotteiden sekä järjestelmien yhteensopivuus ja toimivuus. Standardit ovat toisin sanoen yhteinen ratkaisu yleiseen ongelmaan, jolla ohjataan tuotteiden turvallisuutta, suojellaan kuluttajaa sekä helpotetaan kauppaa koti- ja ulkomailla. Tuote, joka on valmistettu standardin mukaan, hyväksytään markkinoille. (Suomen Standardisoimisliitto SFS ry, ei pvm.)

Kansainvälistä ICS-luokitusta (International Classification of Standards) käytetään standardien luokittelussa. Standardit julkaistaan helposti hankittavina ja käytettävänä asiakirjoina, mutta niiden hankkiminen on maksullista. Ne laaditaan usein eurooppalaisessa tai kansainvälisessä yhteistyössä ja vahvistetaan EN-, ISO- tai IEC-standardeiksi. Standardi, jonka tunnus on EN, on eurooppalaisen standardoimisjärjestö CEN:in vahvistama. Kansainvälisen standardoimisjärjestön ISO:n vahvistamien standardien tunnus on ISO. Tunnusyhdistelmä SFS-EN ISO tarkoittaa, että kyseinen standardi on myös Suomen Standardisoimisliiton, SFS, vahvistama ja käytössä Suomessa sen lisäksi, että se on vahvistettu ISO:ssa ja CEN:issä. (Suomen Standardisoimisliitto SFS ry, ei pvm.)

Lääkinnällisten laitteiden valmistajat noudattavat ISO-standardeja, jokaiselle valmistusprosessin osalle on oma standardinsa, esimerkiksi höyrysteriloinnille, aseptisille prosesseille, pakkausmerkinnöille sekä säilyvyystutkimuksille. Opinnäytetyön kirjoittamisessa sekä validoinnin suunnittelussa on käytetty ISO:n ja CEN:in vahvistamaa standardia sekä Euroopan neuvoston, Euroopan farmakopeaksi kutsuttua julkiasua.

Euroopan farmakopea on lääkkeiden laatuasioista vastaavan yksikön European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) toimittama julkaisu, joka sisältää laatuvaatimuksia lääkeaineille, apuaineille sekä lääkevalmisteille. Se on lääketeollisuuden, apteekkien sekä lääkevalvontaviranomaisten työssään käyttämä julkaisu. (Lääkealan turvallisuus ja kehittämiskeskus Fimea, ei pvm.)

2.1 Euroopan farmakopea

Validointisuunnitelman tekoon käytetään Euroopan farmakopean 8.0 painosta. Farmakopean kappaleesta 2.6.1. Sterility otetaan ohjeistuksia validointiin. Muun muassa käytettävien mikrobien ATCC-kannat, mikrobeille sopivat kasvualustat sekä kasvatusolosuhteet ovat Euroopan farmakopeasta. Farmakopea ohjeistaa suorittamaan, esimerkiksi positiivisen kasvukontrollin elatusaineille. Julkaisussa on määrätty myös elatusaineiden negatiivisen kasvukontrollin inkubaatioajan pituus. Farmakopea ohjeistaa myös inokulotavassa mikrobipitoisuudessa. Tuotteeseen inokulotettava mikrobipitoisuus ei saisi ylittää yli 100 pmy:tä (pesäkettä muodostava yksikkö). (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2014.) 100 pmy:n yläraja perustuu mikrobipesäkkeiden tilantarpeeseen sekä pesäkkeiden välisiin vuorovaikutuksiin. Standardien mukaan 47...50 mm halkaisijan omaavalta kalvosuodatusmembraanilta 100 pesäkettä (pieniä pesäkkeitä) on vielä luotettavasti laskettavissa. Pesäkkeiden laskun epävarmuus kasvaa pesäkkeiden lukumäärän laskiessa. Alle 10 pesäkkeen lukualueella laskettava tulos on korkeintaan semikvantitatiivinen. (Hägg, 2016, p. 42.)

Euroopan farmakopea määrittää myös negatiivisten näytekontrollien tarpeen, membraanin halkaisijan sekä sallitut huuhtelutilavuudet. Farmakopea antaa luvan myös membraanin aseptiselle puolittamiselle sekä puolikkaiden maljaamiselle kahdelle eri kasvualustalle. Julkaisussa on ohjeistettu näytteiden kokoaminen sekä suodatettavat näytemäärät kuin myös montako näytettä, minkäkin kokoisesta tuote-erästä tulee ottaa. (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2014.)

2.2 Standardit SFS-EN ISO 11737-1 ja -2

SFS-EN ISO 11737-1 Lääketieteellisten laitteiden sterilointi. Mikrobiologiset menetelmät. OSA 1: Mikro-organismipopulaatioiden määrittely tuotteissa -standardia käytetään validoinnin suunnittelussa. Standardissa määritellään käytettävä menetelmä, samoin kuin käytettävät elatusaineet sekä kasvatusolosuhteet. Siinä on päällekkäisyyksiä Euroopan farmakopean kanssa. Standardissa ohjataan valitsemaan oikea menetelmä steriilisyystestauksen suorittamiseen näytteen materiaalin sekä olomuodon perusteella. Standardissa määritetään käytettävät huuhteluliukset sekä huuhteluun käytettävä minimi- sekä maksimitilavuus. (International Organization for Standardization, ISO, 2006.)

SFS-EN ISO 11737-2 Lääketieteellisten laitteiden sterilointi. Mikrobiologiset menetelmät. OSA 2: Sterilointiprosessin määrittämisessä, validoinnissa sekä ylläpidossa tehtävä steriilisyystesti -standardissa käy ilmi samoja asioita kuin standardin osassa 1. Osaa 2 käytetään myös validoinnin suunnittelussa. Standardissa painotetaan esimerkiksi dokumentoinnin tärkeyttä. Standardi ohjeistaa myös näytteiden koonnissa. (International Organization for Standardization, ISO, 2009.)

Standardeissa ohjeistetaan näytteiden käsittely. Niissä ohjeistetaan, että näytteen sisäl- täessä säilöntäaineita tai muita mikrobien kasvua inhiboivia ainesosia, näyte tulee käsi- tellä niin, että ainesosat neutraloituvat, esimerkiksi maljaamalla membraani neutraloi- valle kasvatusalustalle. (International Organization for Standardization, ISO, 2009.) Standardit sekä Euroopan farmakopea antavat suhteellisen selvät raamit suoritettavalle validoinnille.

3 VALIDOINTI

Tutkimusmenetelmän validoinnilla tarkoitetaan menetelmän todentamista. Validoinnilla osoitetaan menetelmän toimivuus suunnitelluissa käyttöolosuhteissa. Validoinnissa arvioidaan menetelmän soveltuvuutta ja suorituskykyä haluttuun mittaukseen. Menetelmien validoiminen on osa viranomaisvaatimuksia lääketieteeseen, farmakologian sekä elintarvikealan tutkimuksissa. Validointia suoritetaan usein osana menetelmän tai mittalaitteen kehitystyötä. Validointi on tarpeellista myös, kun menetelmä otetaan käyttöön toisessa laboratoriossa tai jos menetelmään tulee muutoksia. Laadunvarmistustoimenpiteiden osoittaessa validoinnin tarvetta, validointi tulee suorittaa pikimmiten. Laatuksikirjassa voidaan myös määrittää validoinneille uusinta validointien tarve tietyn ajanjakson jälkeen. (Hiltunen, et al., 2011, pp. 24-27.)

Validoinnille asetettavat vaatimukset on asetettava tapauskohtaisesti, sillä ne vaihtelevat menetelmän ja käyttötarkoituksen mukaan. Validoinnilla varmennetaan, että testitulokset ovat lain ja säännösten mukaisia. Myös testitulosten loogisuus, käyttötarkoitukseen sopevuus ja biologisen tai muun luokituksen mukaisuus varmennetaan validoinnilla. (Hägg, 2016, p. 7.)

Yleinen validoinnissa käytetty menetelmä on kahden mittausmenetelmän sekä niistä saatavien tulosten vertailu. Menetelmää validoitaessa tutkittavat parametrit ovat yleensä selektiivisyys ja spesifisyys, lineaarisuus, mittausalue, havaitsemis-/ilmaisuraja, määrittäysraja, harha, saanto, häiriönkestävyys/toimintavarmuus, toistettavuus sekä uusittavuus. Validoinnin tulokset tulee aina dokumentoida tarkasti. (Hiltunen, et al., 2011, pp. 24-27.)

3.1 Milloin validoidaan?

Menetelmä tulee validoida, kun on tarpeellista todentaa, että menetelmän suorituskyky sekä suorituskykyyn liittyvät parametrit ovat riittävät tietyn analyttisen ongelman ratkaisemiseen. Validointi tai uudelleen validointi on tarpeen myös uutta menetelmää kehitettäessä, käytössä olevaan menetelmään kohdistuvien uudistusten vuoksi tai menetelmän käyttötarkoituksen laajentamisen kohdalla. Jos laboratorion laadunvarmistustoimenpi-

teet osoittavat käytetyssä menetelmässä tapahtuneen muutosta tai, jos menetelmä siirretään käyttöön toiseen laboratorioon, myös silloin tarvitsee suorittaa uudelleen validointi. (Hiltunen, et al., 2011, pp. 24-27.)

Validoinnin laajuus riippuu siitä, millaisia muutoksia menetelmään on tehty käyttötarkoituksen, laitteiston, henkilökunnan tai olosuhteiden johdosta. Standardisoidut menetelmät ovat usein validoituja jonkin yhteistoiminnallisen tutkimuksen avulla. Siitä huolimatta tarvitaan käyttölaboratorion oma validointi, tai osoitus menetelmän käyttökelpoisuudesta laboratorion olosuhteissa, omilla näytteillä sekä oman henkilökunnan suorittamana. (Hiltunen, et al., 2011, pp. 24-27.)

3.2 Validointisuunnitelma

Validointisuunnitelma tulee olla dokumentoituna ja hyväksyttynä ennen työn aloittamista. Suunnitelmasta saa poiketa, jos validointityön edetessä tarve muutoksiin tai lisätesteihin ilmenee. Muutokset tulee kuitenkin dokumentoida tarkasti. Validointisuunnitelma alkaa validoinnin kohteena olevan menetelmän tai laitteen kuvailulla. Soveltamisala sekä käytettävät matriisit tulee kuvailla. (Hägg, 2016, p. 9.)

Validoinnin suunnittelu vaiheessa selvitetään lainsäädännön vaatimuksia, esimerkiksi näytteen esikäsittely- ja analyysimenetelmän, herkkyiden tai määritysrajojen suhteen. Valitun menetelmän pitää täyttää asetetut vaatimukset. Joskus käytettävä menetelmä määrätään lainsäädännöllä eikä menetelmään voi vaikuttaa. (Hägg, 2016, pp. 9-10.)

Validoinnin tavoite määritetään validointisuunnitelmassa tarkasti. Tavoitteet voivat olla viranomaisilta tai asiakkailta tulevia tavoitteita tai laboratorion asettamia omia tavoitteita. Tavoitteen lisäksi myös näyteaineisto kuvataan suunnitelmaan. Näyteaineisto sisältää kuvaukset käytettävistä näytteistä, niiden käsittelystä sekä säilytyksestä kuin myös mahdollisesti häiriötä aiheuttavista tekijöistä. Käytettävä näytemateriaali eli matriisi valitaan sen mukaan, mille matriiseille ja mikrobeille tai analyyteille menetelmää ollaan validoimassa. (Hägg, 2016, pp. 10-11.)

Validointisuunnitelmasta pitää käydä ilmi validointiin osallistuvat henkilöt sekä heidän vastuualueet, esimerkiksi suunnitelman tekijä, validoinnin suorittajan ja suunnitelman sekä raportin hyväksyjät. Validoinnin ollessa laaja, voidaan eritellä myös eri osa-alueiden vastuuhenkilöt sekä varahenkilöt. (Hägg, 2016, pp. 10-11.)

Suunnitelmaan kirjataan myös tavoiteaikataulu, käytettävät laitteet ja käytettävät tilat sekä tilojen erikoisvaatimukset. Käytettävät laitteet pitää olla toimintakunnossa ja kalibroituina. Tila- ja laiteratkaisulla suojellaan näytettä työntekijältä tai vaihtoehtoisesti, työntekijää näytteeltä. Validoinnin laajuus päätetään suunnitteluvaiheessa tarpeen mukaan, samoin kuin validoinnissa määritettävät parametrit. Suunnitelman ollessa hyvä, yhdellä koejärjestelyllä saadaan määritettyä useampi validointiparametri. Yhteen koesuoritukseen voidaan yhdistää oikeellisuus, uusittavuus, toistettavuus, spesifisyys, lineaarisuus ja määrittäjäraja, kun on kyse kvantitatiivisesta menetelmästä. Esimerkiksi mikrobiologiassa, luennan toistettavuutta voidaan mitata rinnakkaisluennoilla, näin saadaan kerättyä myös mittausepävarmuuden määrittämiseen tarvittavaa aineistoa. Kvalitatiivisessa menetelmässä yhteen koejärjestelyyn voidaan yhdistää parametrit: oikeellisuus, virhepositiivisuus, virhenegatiivisuus, toteamisraja, uusittavuus sekä spesifisyys ja herkkyys. Validointi on kuitenkin voimassa vain testatulla pitoisuustasolla, matriiseilla sekä validoidulla laiteyksiköllä. (Hägg, 2016, pp. 10-14.)

Validointisuunnitelmaan annetaan kaikille parametreille tulosvaatimukset, joiden pitää täytyä. Vaatimusten lisäksi validointisuunnitelmassa pitää kertoa, miten tulokset laskeaan, sekä miten tuloksia tarkastellaan. Kun validointisuunnitelma on valmis ja hyväksytty, validointiin voidaan ryhtyä suunnitelman mukaisesti. (Hägg, 2016, p. 14.)

3.3 Validoinnin parametreja

Validointia suunnitellessa mietitään, mitä parametreja validoinnissa halutaan määrittää. Määritettäviä ja merkittäviä parametreja on useita. Parametrit valitaan suoritettavan validoinnin mukaan. Validoinnin luonteesta riippuen, joitain parametreja ei voi välttämättä edes määrittää. Tässä kappaleessa käydään läpi muutama opinnäytetyössä tehdyn validoinnin kannalta merkittävä parametri.

3.3.1 Selektiivisyys

Selektiivisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä määrittää tietty analysoitava aine monikomponenttisesta seoksesta. Muut komponentit eivät saa häiritä määrittäystä. (Hiltunen, et al., 2011, pp. 10-11.) Menetelmän ollessa selektiivinen, se tuottaa vasteen usealle analyyttille. Määritettävä analyytti pitää pystyä erottamaan yksiselitteisesti. Laimennosarjan antaman vasteen sekä laimennoksen suhteen pitää olla lineaarinen. Erilaisten

taustatekijöiden aiheuttamaa systemaattista virhettä pyritään selvittämään selektiivisyyskokeilla. Huolellisesti suunnitellulla kokeella voidaan määrittää selektiivisyyden lisäksi tarkkuutta, sillä tarkkuuden määrittäminen liittyy usein selektiivisyyskokeisiin. (Hägg, 2016, p. 29.)

3.3.2 Spesifisyys

Mikäli menetelmä tuottaa vasteen vain tutkittavalle komponentille, se on spesifinen. Esimerkiksi mikrobiologisen menetelmän havaitessa tutkittavat mikrobit, menetelmä on spesifinen. Eri tekniikat omaavat erilaisia spesifisyysongelmia, joten käytetyn menetelmän tuntemus on yksi oleellinen tekijä kokeiden suunnittelussa ja suorittamisessa. Harva menetelmä on kuitenkaan täysin spesifinen, tällöin on tyydyttävä jonkunlaiseen selektiivisyyteen. Kuitenkin jos selektiivisyys täyttää asetetut tavoitteet ja on riittävä aiottuun käyttötarkoitukseen, validointi prosessi saa jatkaa. (Hägg, 2016, pp. 30-31.)

3.3.3 Saanto

Saanto kuvaa näytteeseen lisätyn yhdisteen takaisinsaantoa. Saantokokeessa lisäys tehdään yleensä nollanäytteeseen tai reagenssinollaan. Saantoprosentti lasketaan kaavalla 1.

$$\text{Saanto (\%)} = \frac{\text{määritetty pitoisuus}}{\text{lisätty pitoisuus}} \times 100 \%$$

Kaava 1 Saantoprosentti

Alemman määritysrajan ja tarkkuuden ollessa hyväksyttävällä tasolla saantoprosenttia ei välttämättä tarvitse määrittää. (Hägg, 2016, p. 29.)

3.3.4 Toistettavuus

”Toistettavuus on tulosten välinen yhtäpitävyys, kun määritykset tehdään samoissa olosuhteissa, samasta näytteestä, samalla menetelmällä, saman tekijän toimesta, samalla laitteella samassa laboratorioissa, lyhyen aikavälin sisällä” (Hägg, 2016, p. 31). Useita

rinnakkaismäärittämiä tekemällä testataan myös toistettavuutta. Näytteistä lasketaan pi-toisuuksien keskiarvo (kaava 2), keskihajonta (kaava 3) sekä suhteellinen keskihajonta (kaava 4).

$$\bar{x} = \frac{x_1 + \dots + x_n}{n}$$

Kaava 2 Keskiarvo

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Kaava 3 Keskihajonta

$$CV(\%) = \frac{\bar{x}}{s} \times 100 \%$$

Kaava 4 Suhteellinen keskihajonta

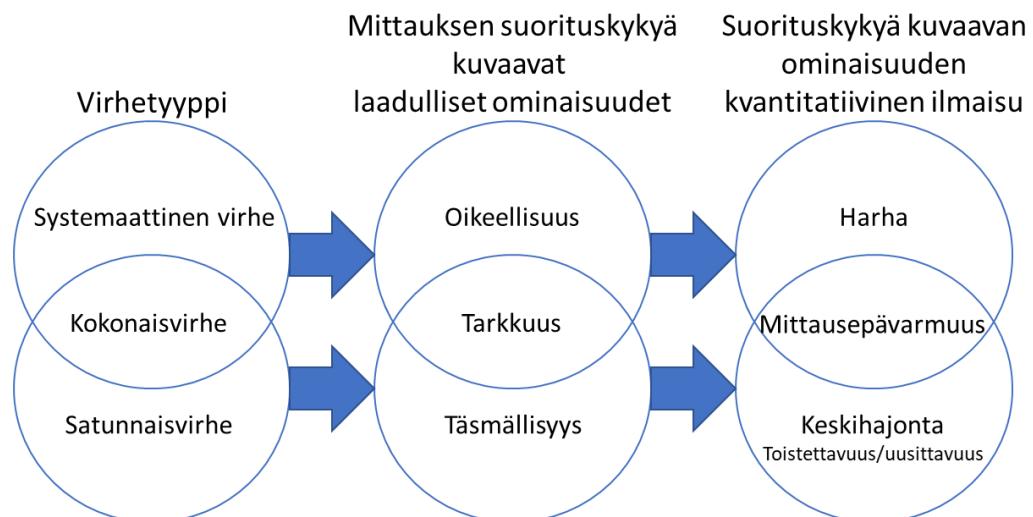
3.3.5 Uusittavuus

Uusittavuudella tarkoitetaan tulosten välistä yhtäpitävyyttä, samaa menetelmää käytettäessä, mutta muuttaen yhtä tai useampaa tekijää, kuten mittauslaitetta, suorituspaikkaa tai muuta oleellista tekijää. Menetelmän uusittavuutta voidaan kuvata suhteellisella keskihajonnalla. (Hägg, 2016, p. 32.)

3.4 Validoinnin dokumentointi sekä raportointi

Validoinnin edetessä tuloksia arvioidaan kriittisesti, myös lisätestauksia suoritetaan tarvittaessa. Alkuperäinen hyväksytty validointisuunnitelma arkistoidaan. Jos suunnitelmasta poiketaan validoinnin aikana, muutokset dokumentoidaan. Validoinnin valmistuessa tulokset lasketaan asetetuilla tilastollisilla menetelmillä ja niitä verrataan tavoitteisiin. Yhteenvetoraportissa viitataan aiemmin kirjoitettuun validointisuunnitelmaan ja käydään läpi validoinnin toteutus. Validointiraporttiin kirjataan myös poikkeamat ja suunnitelmattomat jatkotestaukset, jos niitä on tehty. (Hägg, 2016, pp. 15-16.)

Tulosten käsittelyssä käytetään suunniteltuja tilastollisia menetelmiä ja käytetyt kaavat kirjataan raporttiin, kaikki asetetut validointiparametrit käydään läpi. Dataa käsiteltäessä outlierit (harha-arvot) voidaan tunnistaa tilastollisilla menetelmillä. Tulosten perusteella arvioidaan menetelmän kokonaismittausepävarmuutta, jota verrataan sallittuun kokonaisvirheeseen. Kuvassa 1 kuvataan eri parametrien suhdetta eri virhetyyppihin ja mit-tausepävarmuuteen. (Hägg, 2016, pp. 15-16.)



Kuva 1 Mittaustulosten laatua kuvaavien peruskäsitteiden yhteys toisiinsa (Hägg, 2016, p. 16.)

Validointiraportti sisältää myös johtopäätökset, sekä päätöksen menetelmän käyttöön-otosta tai hylkäämisestä. Validointiraportti sekä muut validoinnista tulleet dokumentit tulee säilyttää ja arkistoida asianmukaisesti. (Hägg, 2016, pp. 15-19.)

3.5 Menetelmän käyttöönotto ja laadunvarmistus

Menetelmää käyttöönotettaessa pitää määritellä henkilöt, joilla on pätevyys menetelmän suorittamiseen. Validointiprosessiin osallistuneet henkilöt ovat yleensä pätevytyneet menetelmän suorittamiseen. Validoinnit eivät ole kertaluontoisia vaan ne tulee uusia tiet-tyin väliajoin. Laboratorion johtamisjärjestelmässä täytyy olla kuvattuna uudelleenvali-doinnin periaatteet. Validoinnin paikkansapitävyys sekä uudelleenvälidoinnin tarve tar-kastetaan tietyn väliajoin. Menetelmän toimivuutta seurataan sisäisellä laadunohjauk-sella sekä ulkoisella laadunarvioinnilla. Kun menetelmää käytetään rutiinomaisesti,

saadaan tietoa sen toimivuudesta sekä suorituskyvystä. Validoinnin uusimistarve voi johtua monesta syystä, esimerkiksi käytetyn standardin uudesta versiosta, uuden laitteen hankinnasta, testin uudesta versiosta tai toistuvasta poikkeavasta tuloksesta menetelmää käytettäessä. (Hägg, 2016, pp. 17-18.)

4 MIKROBITURVALLISUUS

Biologisista vaaratekijöistä on annettu EU-direktiivi 90/679/ETY. Suomessa se on voimassa valtioneuvoston päätöksellä 1155/93. Direktiiviin on tullut lisäyksiä, mutta voimassa oleva mikrobien luokittelu vaarakategorioihin löytyy Sosiaali- ja terveysministeriön säädöksestä No 299 (299/1998). Kyseisessä säädöksessä jaetaan biologiset tekijät neljään ryhmään niiden aiheuttaman vaaran mukaan. Ryhmään I kuuluva biologinen tekijä ei todennäköisesti aiheuta sairautta. Ryhmän II tekijä voi aiheuttaa sairauden sekä olla vaarallinen työntekijöille, mutta sairaus ei kuitenkaan todennäköisesti leviä ympäristöön. Ryhmään III kuuluva biologinen tekijä voi aiheuttaa vakavan sairauden ja myös vakavan vaaran työntekijöille. Biologinen tekijä voi myös levitä väestöön, mutta sen torjuntaan on käytettävissä yleensä tehokas ehkäisykeino tai hoito. Ryhmän IV kuuluvat biologiset tekijät voivat aiheuttaa vaaran työntekijälle sekä levitä väestöön, eikä biologisen tekijän ehkäisemiseksi ole tehokasta keinoa tai hoitoa. Viljellyn mikrobin ei tarvitse aina olla tautia aiheuttava, sillä mikrobit voivat aiheuttaa voimakkaan reaktion työntekijässä biologisesta vaaraluokastaan huolimatta. (Sosiaali- ja terveysministeriö, 2004.) (Sojakka & Välimäki, 2011, pp. 12-13.)

4.1 Työskentely mikrobiologian laboratoriossa

Mikrobiologiset työtavat vaikuttavat tutkimuksen luotettavaan laatuun sekä tutkimuksen tekijöiden ja samassa rakennuksessa työskentelevien turvallisuuteen. Laiminlyödessä hyviä työtapoja laboratoriossa, voi pilata muiden työn sekä aiheuttaa itselle ja muille terveysvaaraa. Laboratorion huoneilma, pöytä- sekä muut pinnat ja tutkimusvälineet tulee pitää mikrobiologisesti puhtaina, jotta laboratorio olisi turvallinen työntekijöille. Luotettavien tutkimustulosten edellytys ovat puhtaat laboratoriotilat. (Salkinoja-Salonen, 2002, pp. 692-697.)

Aerosolien muodostumista on vältettävä, sillä ihmisen puolustuskyvyttömyydeltään heikoin kohta on keuhkot. Tästä syystä myös biologisen vaaraluokan I mikrobit, jotka eivät ole patogeeneja, eli tautia aiheuttavia, saattavat aerosoleina vahingoittaa terveyttä. Aerosolin muodossa mikrobit voivat kulkeutua ilmastoinnin mukana muuallekin. Mikrobiaerosolit voivat pilata aseptisen työskentelyn mahdollisuudet laboratoriossa kontami-

noidessaan pintoja. Kontaminaatio tarkoittaa mikrobin lyhytaikaista läsnäoloa, ei toivottu paikassa kuten pöytäpinnalla tai käsissä. (Salkinoja-Salonen, 2002, pp. 692-697.) (Sojakka & Välimäki, 2011, pp. 12-16.)

Mikrobiologisessa laboratoriossa käytetään suojarusteita. Takilla ehkäistään mikrobin leviäminen paikkoihin, joihin niitä ei haluta. Takki puetaan päälle mikrobilaboratoriossa ja se jätetään laboratorioon sieltä lähdettäessä, näin mahdolliset aerosolit, roiskeet ja muut kontaminantit jäävät laboratorioon. Tämän lisäksi käytetään kertakäyttöistä suojarahinettä sekä kumihanskoja. Laboratoriosta lähdettäessä pestään sekä desinfioidaan kädet. (Salkinoja-Salonen, 2002, pp. 692-697.)

Kaatonut tai roiskunut mikrobiviljelmä peitetään desinfiointiaineella ennen siivoamista. Siirrostus toimenpiteet tehdään luokan 2 biologisessa suojakaapissa (5.2.2). Suojakaapin alapinta sekä seinät pyyhitään 70 % etanolilla työn jälkeen. Kontaminoituneet kertakäyttöiset työvälineet, kuten siirrostussilmukat ja pipetinkärjet, laitetaan käytön jälkeen suoraan autoklavoitavaan pussiin. Kun tehdään laimennossarjoja jotka vaativat viljelmien pipetoimista, pipetin kärki tulee asettaa nestepinnan tai astian seinän lähelle syvälle putkeen aerosolien muodostumisen välttämiseksi. Kun putkia sekoitetaan mekaanisesti, esimerkiksi sentrifugoimalla (5.2.5), putkien tulee olla tiiviisti kiinni. Mekaanisessa sekoituksessa muodostuu aerosoleja, tämän vuoksi putken tulisi olla kiinni jonkin aikaa sekoituksen jälkeenkin. Mikrobiologisen laboratorion roska-astia tulee tyhjentää ja putsata 70 % etanolilla aina töiden päätteeksi, sillä sinne muodostuu jo pienessä ajassa bakteerikasvustoa. (Salkinoja-Salonen, 2002, pp. 692-697.)

4.2 Työssä käytetyt mikrobit

Validoinnin suorituksessa käytetään Euroopan farmakopean mukaisia mikrobeja: *Aspergillus brasiliensis* (ent. *niger*), *Bacillus subtilis* (ent. *spizizenii*), *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, sekä *Staphylococcus aureus*. Niistä *B. subtilis*, *C. sporogenes*, *P. aeruginosa* sekä *S. aureus* ovat bakteereita. *A. brasiliensis* on home ja *C. albicans* on hiiva.

4.2.1 *Aspergillus brasiliensis*

Validoinnissa käytetään *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 -kantaa. *A. brasiliensis* on home eli se kuuluu sienien ryhmään. Sienet ovat eukaryootteja ja ne luokitellaan yleensä neljään ryhmään: *Ascomycetes* (kotelosienet), *Zygomycetes* (pallohomeet), *Basidiomycetes* (kantasienet) sekä *Deuteromycetes* (vaillinaissienet). *A. brasiliensis* kuuluu kotelosienten pääjaksoon. Luokittelu on kuitenkin vajaa, sillä sieniä luokitellaan paitsi genetiikan ja rakenteen, myös niiden lisääntymisen mukaan. (Sojakka & Välimäki, 2011, pp. 209-217.)

Homeiden tavallisin lisääntymiskeino on suvuttomat itiöt eli konidiot. Homerihmassa on lisääntymiseen erikoistuneita rakenteita. Homeitiöt ovat usein värillisiä, *A. brasiliensis* kasvaa mustana rihmastona ja sen itiöt ovat mustia. Kun itiöt laskeutuvat sopivalle kasvualustalle sekä saavat tarpeeksi kosteutta ja happea, ne alkavat kasvaa rihmaksi. Homeitiöt kestävät kuivuutta, mutta eivät kuumuutta. Sienisolua ympäröi soluseinä, *Aspergillus*-suvun homeilla soluseinä on kitiiniä. (Sojakka & Välimäki, 2011, pp. 90-92, 209-217.) *A. brasiliensis* on vaikea laboratorio-olosuhteissa, sillä se pölyyää melko vahvasti huoneilmassa ja se kasvaa myös huoneenlämmössä löytäessään sopivan kasvualustan. *A. brasiliensis* muodostaa ensin mustia pesäkkeitä, mutta jo viikossa pesäkkeet muodostavat koko maljan peittävän kasvuston.

Aspergillus brasiliensis luokitellaan mikrobiologisen vaaran luokkaan I. Euroopan farmakopea suosittelee kyseisen mikrobin kasvattamista TSA-maljalla.

4.2.2 *Bacillus subtilis*

Validoinnissa käytettävä *Bacillus subtilis* kanta on ATCC 6633. *B. subtilis* on sauvamainen bakteeri. Bakteerit ovat prokaryootteja eli esitumallisia mikrobeja. Prokaryooteilta puuttuu varsinainen tuma sekä kalvon ympäröimät soluelimet. Niiden solukalvo on fosfolipideistä muodostuva kaksoiskalvo. Prokaryooteihin kuuluvilla bakteereilla on soluseinä, joka pitää sen kasassa ja antaa sille muodon. Gram-väryyksellä voidaan selvittää bakteerien soluseinän rakenne. Bakteerin soluseinän ollessa paksumpi ja sisältäessä runsaasti peptidoglykaania eli mureiinia, bakteeri on gram-positiivinen. Gram-negatiivi-

silla bakteereilla on peptidoglykaanikerroksen päällä vielä lipoproteiineista ja lipopoly-sakkarideista muodostuva kerros. Gram-värjäyksessä negatiiviset värjäytyvät vaaleanpunaisiksi ja positiiviset violeteiksi. (Sojakka & Välimäki, 2011, pp. 190-193.)

Bacillus subtilis on solunsisäisiä itiöitä, endosporeja, muodostava gram-positiivinen bakteeri. Koska *B. subtilis* on itiöivä, se kontaminoi helposti laboratoriotiloissa. Sen itiöitä on vaikea tuhota, sillä ne kestävät korkeita lämpötiloja, kuivuutta sekä UV- ja gammasäteilyä. *B. subtilis* on monipuolinen bakteeri, sitä esiintyy niin maaperässä kuin vesistöissäkin. *B. subtilis* on yleisesti käytetty malliorganismi solujakautumista, proteiinin eritystä sekä solun liikkuvuutta tutkittaessa. *B. subtilis* muodostaa usein myös biofilmejä. (Ákos T., 2019.)

B. subtilis luokitellaan mikrobiologisen vaaran luokkaan I ja Euroopan farmakopea suosittelee sille elatusalustaksi TSA-maljaa.

4.2.3 *Candida albicans*

Käytettävä *Candida albicans* kanta on ATCC 10231. *C. albicans* on hiiva. Se luokitellaan kotelosienien pääjaksoon. Luonnossa hiivat esiintyvät eläinten iholla, limakalvoilla sekä suolistossa, mutta myös kasvien pinnoilla. Ne ovat fakultatiivisesti anaerobeja, eli ne voivat kasvaa hapellisissa ja hapettomissa oloissa. *C. albicans* löytyy noin puolelta ihmisistä. Se voi aiheuttaa ihotulehduksia, mutta myös limakalvo- ja suolistotulehduksia. Vaikka *C. albicans* kasvaa yleensä yksisoluisena kasvustona, se voi muuttua rihmaiseksi olosuhteiden muuttuessa. (Sojakka & Välimäki, 2011, pp. 209-217.) *C. albicans* kasvaa maljalla valkoisina, pyöreinä ja kiiltävinä pesäkkeinä.

C. albicans luokitellaan biologiseen vaaraluokkaan II. Euroopan farmakopea suosittelee *C. albicansin* kasvatettavaksi TSA-maljalle.

4.2.4 *Clostridium sporogenes*

Validointiin määrätty *Clostridium sporogenes* on ATCC 19404 -kanta. *Clostridium*-suvun bakteerit ovat gram-positiivisia, sauvamaisia bakteereita, jotka tuottavat itiöitä. Ne ovat obligatorisia anaerobeja, eli ne eivät voi elää hapellisissa oloissa. Kuitenkin niiden itiöt kestävät hapelliset olosuhteet kuin myös kuivuuden, pakastamisen sekä korkeita lämpötiloja. *Clostridium*-suvun bakteerit ovat maaperän bakteereita. (Salkinoja-Salonen, 2002,

pp 102.) Ne ovat myös suolistobakteereita ja niiden haitallisiin ominaisuuksiin kuuluu myrkyllisten aineiden eli toksiinien tuottaminen. (Sojakka & Välimäki, 2011, pp. 102-103.)

Euroopan farmakopeassa *C. sporogenes* neuvotaan kasvatettavaksi FTA-maljalle ja se kuuluu vaaraluokkaan I.

4.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 –kanta käytetään validoinnissa. *P. aeruginosa* on gram-negatiivinen sauvamainen suolistobakteeri. *P. aeruginosa* esiintyy maaperässä, vesistöissä sekä ihmisen normaalifloorassa. (Azam & Khan, 2019.) Se kasvaa maljalla yksittäisinä pesäkkeinä.

Validointityön aikana *P. aeruginosa* kasvatetaan FTA-maljalla. Se on luokiteltu biologiseen vaaraluokkaan II.

4.2.6 *Staphylococcus aureus*

Validoinnissa käytettävä *Staphylococcus aureus* on ATCC 6538 -kanta. *S. aureus* on yleisesti käytetty laadunvarmistusbakteeri. Se on kokkimuotoinen ja gram-positiivinen bakteeri. *S. aureus* on mesofiilinen, eli se ei lisäänty alle + 7 °C:ssa. Se kasvaa yksittäisinä kullan keltaisina pesäkkeinä. *S. aureus* aiheuttaa niin infektioita, kuin ruokamyrkytyksiäkin. *S. aureus* löytyy ihmisen normaalifloorasta. Se vapauttaa myrkyjä solun ulkopuolelle eli tuottaa niin kutsuttuja eksotoksiineja. (Salkinoja-Salonen, 2002, p. 106.) (Sojakka & Välimäki, 2011, pp. 167-168.)

S. aureus on luokiteltu biologiseen vaaraluokkaan II ja Euroopan farmakopean mukaan validoinnissa maljataan FTA-maljoille.

5 MENETELMÄT, LAITTEET JA VÄLINEET

Tässä kappaleessa esitellään validoinnissa käytettyjä työskentelymenetelmiä sekä laboratoriolaitteita ja -välineitä. Validointi suoritetaan toimeksiantajan mikrobilaboratoriossa, missä on käytettävänä tavanomaisia laboratoriolaitteita ja -välineitä.

5.1 Menetelmät

Validoinnissa käytetään kalvosuodatusmenetelmää. Kappaleessa esitetään myös liuos- ja elatusainevalmistus sekä ympin valmistusmenetelmä.

5.1.1 Kalvosuodatusmenetelmä

Työssä käytetty kalvosuodatusmenetelmä perustuu standardissa SFS-EN ISO 11737-1 ja -2 esitettyyn kalvosuodatusmenetelmään. Käytettävät näyte- sekä huuhtelutilavuudet tulevat standardista. Toimeksiantajan sisäinen työohje menetelmälle on kirjoitettu standardista saadun yleislinjauksen perusteella. Kalvosuodatus suoritetaan, joka testikierroksella työohjeen mukaan luokan 2 biologisessa suojakaapissa (5.2.2).

Kalvosuodatusmenetelmällä pyritään havaitsemaan nestemäisestä tuotteesta merkkejä mikrobikontaminaatiosta. Validoinnissa kontaminaatio on itseaiheutettu ja suodatusmenetelmällä halutaan osoittaa, että kontaminaatio pystytään havaitsemaan. Menetelmää käytetään lopputuotteiden laadunvarmistuksessa, jolloin tuotteessa ei haluta olevan kontaminaatiota. Kontaminaatio pitää pystyä osoittamaan, jotta jos sellainen on, se saadaan kiinni ennen erän hyväksyntää.

Suodatusmenetelmässä kalvolle eli membraanille muodostetaan ensin kaikille mikrobeille suotuisa kasvualusta suodattamalla kalvon läpi TSB-liuosta. Tämän jälkeen membraanin läpi suodatetaan näyte. Jos näytteessä on mikrobeja, ne pysähtyvät kalvolle, sillä ne eivät mahdu kalvon huokosten läpi (Sojakka & Välimäki, 2011, p. 281). Tämän jälkeen ylimääräinen tuote sekä mahdolliset tuotteen sisältämät, mikrobien kasvua inhiboivat tekijät, huuhdellaan kalvolta 0,9 % NaCl-liuoksella ja kalvo siirretään pinsettien avulla sopivalle kasvualustalle eli kalvo maljataan. Maljat siirretään lämpökaappiin (5.2.8), jossa niitä kasvatetaan määrätty aika. Kaikista kalvolle jääneistä mikrobeista

muodostuu pesäkkeitä, jolloin ne voidaan laskea. Pesäkemäärän perusteella voidaan määrittää näytteen mikrobipitoisuus.

5.1.2 Liuosvalmistus

Liuosvalmistus suoritetaan toimeksiantajan työohjeiden mukaan. Validointia varten luodaan myös erilliset liuosvalmistusohjeet toimeksiantajan työohjeiden pohjalta. Liuosvalmistusohjeet mahdollistavat liuoskirjanpidon eli vaaditun dokumentoinnin. Aina liuoserää valmistettaessa liuosvalmistusohjeeseen merkataan vaa'an toiminnantarkastus, liuokseen käytettävät reagenssit ja niiden lot-numerot, autoklavoinnin lämpötila ja aika, sekä ohjelma samoin, kun autoklaavin indikaattorin värinmuutos. Valmistusohjeeseen merkitään myös valmistuspäivämäärä sekä valmiin liuoksen viimeinen käyttöpäivämäärä. Liuosvalmistusohjeet löytyvät liitteistä 1-3.

Kaikki liuokset valmistetaan säilöpulloihin. Säilöpulloon punnitaan analyysi- tai tarkkuusvaa'alla haluttua reagenssia määrätty määrä, jonka jälkeen pulloon mitataan mittalasilla haluttu määrä ionivaihdettua laboratoriovettä. Liuoksina validoinnissa käytetään TSB-liuosta, joka on mikrobiologiassa yleisesti käytetty elatusliuos. Lisäksi käytetään 0,9 % NaCl-liuosta eli fysiologista suolaliuosta huuhteluliuksena. Kolmas validointia varten valmistettava liuos on DPBS-liuos, eli Dulbecco:n fosfaattipuskuroitu suolaliuos. DPBS-liuokseen lisätään autoklavoinnin jälkeen, ennen liuoksen käyttöä, aseptisesti polysorbaattia. Polysorbaatin lisäämisen jälkeen liuoksen lyhenne on DPBST. DPBST-liuosta käytetään ympin valmistuksessa sekä kontrollina kalvosuodatusmenetelmässä näytteiden rinnalla.

5.1.3 Elatusaineiden valmistus

Elatusaineet valmistetaan myös toimeksiantajan työohjeen mukaan. Kuitenkin samoin kuin liuoksille, elatusaineiden valmistusta varten tehdään oma valmistusohje, joka mahdollistaa vaadittavan dokumentoinnin. Elatusainevalmistusohjeeseen, merkataan vaa'an toiminnantarkastus, käytettyjen elatusjauheiden lot-numerot, elatusaineen valmistustilavuus, autoklavointi lämpötila, aika sekä ohjelma ja indikaattorin värin muutos. Tämän lisäksi valmistusohjeeseen merkitään erän valmistuspäivämäärä sekä viimeinen käyttö-

päivä. Valmistusohjeesta käy myös ilmi, että erästä tehdään positiivinen, sekä negatiivinen kasvukontrolli ja että kontrolli menee hyväksytysti läpi. Valmistusohje löytyy liitteestä 4.

Kontrolleissa jokaisen eri elatusaineen, jokaisesta maljaerästä otetaan kaksi maljaa positiivisen sekä negatiivisen kasvukontrollin tekoa varten. Positiivisessa kontrollissa maljalle siirrostetaan mikrobia ja kasvu tarkastetaan seuraavana päivänä. Positiivisen kontrollin täytyy kasvaa, näin varmistetaan, että malja toimii. Negatiivisessa kontrollissa puhdas malja laitetaan lämpökaappiin kasvamaan määrätyksi ajaksi. Maljan tulee olla puhdas vielä määrärajan jälkeenkin, jotta maljaerä voidaan hyväksyä käyttöön.

Elatusaineiden valmistusohjeeseen merkataan myös erän hyväksymispäivämäärä. Jokaisesta valmistetusta erästä on täytetty samanlainen valmistusohje, joten elatusaineiden eräkirjanpito pysyy ajan tasalla. Maljaeristä on myös täytetty toimeksiantajan sisäinen toimivuuden testauslomake, jossa on merkattuna positiivisessa kontrollissa käytetty mikrobi sekä negatiivisen kontrollin pysyminen negatiivisena.

Puhtaiden elatusalustojen valmistus

Mikrobien kasvatukseen voidaan käyttää kiinteää, puolikiinteää tai nestemäistä kasvualustaa. Kiinteät kasvualustat sisältävät usein agaria, myös nestemäisestä kasvuliemestä saa kiinteän lisäämällä siihen, esimerkiksi 2 % agaria. Agar on polysakkaridi, joka on peräisin merilevästä. Agar on hyvä käyttää hyydytysaineena, sillä harva mikrobi pystyy käyttämään sitä ravintona. Koska agar ei sovi mikrobeille ravinnoksi, ne eivät voi hajottaa kasvualustaa. Agar sisältävät kasvualustat pitää keittää, jotta niistä saadaan tasaisesti hyytyviä liuoksia. (Sojakka & Välimäki, 2011, pp. 19-20.) Validointityössä käytetään valmiita elatusainejauheita, joista autoklavoimalla saadaan valmiita kasvualustoja, ilman että liuosten pH:ta tarvitsee säätää. Validoinnin suorituksessa FTM-jauheeseen lisätään 2 % agaria, jotta alustasta saadaan kiinteä. Käytetty agar on mikrobiologista laatua. Elatusjauheet punnitaan ensin säilöpulloihin tarkkuusvaa'alla. Pulloihin lisätään punnitsemisen jälkeen ionivaihdetta laboratoriovettä haluttu tilavuus. Tilavuuden mittauksessa käytetään mittalasia. Pulloja ravistellaan, jonka jälkeen ne autoklavoidaan.

Autoklavoinnin jälkeen säilöpullot temperoidaan 50 °C asteisiksi vesihauteessa (5.2.7), 50 °C asteessa elatusaineet ovat vielä juoksevia. Maljat valetaan aseptisesti puhdistilan

laminaarivirtauskaapissa steriileihin petrimaljoihin. Maljojen kanteen kirjoitetaan elatusaineen lyhenne sekä maljaerän numero. Maljat järjestetään pinoihin pohja alaspäin. Temperoitu elatusainepullo otetaan vesihauteesta, pullo kuivataan ja puhdistetaan pinnalta 70 % etanolilla. Tämän jälkeen maljapinot valetaan aseptisesti. Maljat levitetään laminaarikaapin pohjalle ja kannet avataan raolleen, jotta maljat jäähtyvät ja elatusaine jähmettyy. Kun maljat ovat jähmettyneet, ne pinotaan ja pinot suljetaan steriileihin pusseihin. Maljoista tehdään kontrollit ja ne säilytetään jääkaapissa. Jos maljat laitetaan liian lämpiminä jääkaappiin, ne keräävät kondensoituvan vesihöyryn kansiinsa (Sojakka & Välimäki, 2011, p. 21).

5.1.4 Ympin valmistus

Ymppi valmistetaan toimeksiantajan työohjeen mukaisesti. Ymppi ja sen laimennossarja tehdään 15 ml Falcon-putkiin DPBST-liuokseen. Laimentamiseen käytettävän liuoksen tulisi olla isotoninen neste, ettei se vaikuta mikrobien osmoottiseen paineeseen (Sojakka & Välimäki, 2011, p. 67). Liuosta pipetoidaan putkiin niin, että yhteen putkeen tulee ymppi ja muihin putkiin laimennokset -2 laimennoksesta -7 laimennokseen. -2 laimennos tarkoittaa 10^{-2} laimennosta ja -7 laimennos vastaavasti 10^{-7} laimennosta. Laimennossarja etenee siis kymmenpotensseissa. Ensimmäisessä vaiheessa laimennossuhteena on 1:100. Laimennossuhteen ei tulisi olla enempää kuin 1:100, sillä muuten näytteiden sekoittuminen laimentimeen voisi vaarantua (Sojakka & Välimäki, 2011, p. 67). Muissa laimennossarjan vaiheissa suhde on 1:10. Laimentaminen mahdollistaa laskettavan tuloksen, sillä ilman laimentamista mikrobimäärä näytteessä olisi liian suuri laskettavaksi.



Kuvio 1 Ympin valmistus

Ensimmäiseen putkeen, eli ymppi-putkeen, siirrostetaan maljalta haluttua mikrobia siirrostussilmukalla. Tämän jälkeen putkea ravistellaan koeputkiravistelijassa (5.2.6), jonka jälkeen putki laitetaan sentrifugiin (5.2.5). Putkea sentrifugoidaan määrätty aika. Sentrifugin valmistuttua DPBST-liuokseen sekoittunut solumassa on sedimentoitunut, eli pelletoitunut, putken pohjalle. Supernatantti, eli putkessa solupelletin päällä oleva neste, kaadetaan jäteastiaan laminaarikaapissa. Supernatantin tilalle pipetoidaan uusi annos

DPBST-liuosta, Falcon-putkea sekoitetaan koeputkiravistelijassa ja sentrifugointi toistetaan, näin solumassa saadaan niin sanotusti pestyä. Toisen sentrifugoinnin jälkeen supernatantti kaadetaan jälleen pois ja putkeen pipetoidaan uusi DPBST-liuos, putki sekoitetaan ravistelijalla vielä kertaalleen ja sen jälkeen ympäri on valmis laimennettavaksi. Ympäri laimennetaan kuvion 1 mukaan -7 laimennokseen saakka.

Ympäristä tehdään kontrolliviljelmä maljaamalla. Kontrolli tehdään laimennoksista -6 ja -7. Molemmista laimennoksista tehdään kolme rinnakkaista maljaa. Laimennoksia pipetoidaan kolmelle tyhjälle maljalle, jonka jälkeen ohjeenmukainen temperoitu elatusaine valjetaan pipetoidun laimennoksen päälle. Maljoja pyöritellään tasoa vasten ja kansia raotetaan vähän, jotta maljat jäähtyvät ja elatusaine jähmettyy. Tämän jälkeen maljoja kasvatetaan lämpökaapissa. Maljalle kasvavat pesäkkeet voidaan laskea kasvatuksen jälkeen. Kun tiedetään laimennos sekä pesäkkeiden määrä, voidaan laskea suurpiirteinen pitoisuus ympäri. Pitoisuudesta voidaan päätellä myös, paljonko mikrobipesäkkeitä on inokuloitu testauspäivänä DPBST-liuokseen sekä näytteisiin.

5.2 Laitteet

Validoinnin suorituksessa käytetään laajasti erilaisia laboratoriolaitteita. Tässä kappalessa on esiteltynä käytettävät laitteet sekä niiden toimintaperiaatteet.

5.2.1 Kalvosuodatuslaitteisto

Validoinnissa käytetään Millipore:n yksikanavaista ruostumattomasta teräksestä valmistettua suodatuslaitteistoa, sekä laitteistoon sopivia sintterikiviä. Suodatuslaitteisto koostuu yksikanavaisesta suodattimesta, jonka varressa on venttiili. Venttiilistä suodattimen kanavan voi avata ja sulkea. Suodattimeen kiinnitetään jätesäiliöön johtava letku. Jätesäiliöstä menee letku myös pumpun imevään suulakkeeseen. Pumpulla (VWR vakuumipumppu) imetään jätesäiliöön alipaine. Kun suodattimen venttiili avataan, jätesäiliön alipaine saa nesteen virtaamaan suodattimen läpi jätesäiliöön paine-erojen tasoittuessa. Suodatusta varten suodatuslaitteiston päälle asetetaan huokoinen sintterikivi, jonka päälle asetetaan membraani. Membraanin päälle asetetaan kertakäyttöinen suodatin-suppilo, johon suodatettavat nesteet voidaan mitata. Suppilo pitää myös membraanin paikallaan suodatuksen ajan.

5.2.2 Luokan 2 biologinen suojakaappi

Validoinnissa käytettävä laminaarikaappi on Kojair:in luokan 2 biologinen suojakaappi. Luokan 2 biologinen suojakaappi suojelee tuotetta, käyttäjää sekä ympäristöä. Laminaarikaapissa ilma virtaa tasaisesti ja yhdensuuntaisesti pystysuunnassa. Ilma virtaa ylhäältä alaspäin HEPA-suodattimen läpi. Laminaarikaapin tarkoituksena on luoda steriili työtila kaapin sisälle. Työssä käytettävän laminaarikaapin sisätila vastaa puhtaudeltaan ISO 5 luokan puhdastilaa.

Laminaarikaapin suojaus perustuu siihen, että noin neljännes ilmamäärästä poistuu kaapista HEPA-suodattimen läpi. Korvausilma tulee laminaarikaapin edessä olevasta työskentelyaukosta, se imeytyy laminaarin tason etuosassa olevan ritilöinnin läpi tason alle ja kiertää sieltä HEPA-suodattimelle. Työaukkoon muodostuu laminaarivirtauksen ansiosta ilmaverho, jolloin laminaarikaapissa oleva ilma ei pääse virtaamaan ulos kaapista. (Sojakka & Välimäki, 2011, p. 64.)

Laminaarikaapissa tulee työskennellä rauhallisesti ja käsien liikkeiden tulee olla tarkoituksen mukaisia. Liike aiheuttaa laminaarivirtaan pyörteisyyttä, eikä virta enää suojaa tuotetta kontaminaatiolta. Laminaarikaapista poistuva ilma voidaan johtaa takaisin huoneilmaan tai poistoilmakanavaan. Kaappi puhdistetaan aina ennen käyttöä, sekä käytön jälkeen. (Sojakka & Välimäki, 2011, pp. 64-65.)

5.2.3 Autoklaavi

Autoklavointi on yleisin kosteaan kuumuuteen perustuva sterilointimenetelmä. Autoklaavi on paineastia, jossa on yksi tai useampi paineentunnistussensori. Validoinnissa käytettävä autoklaavi on puoliautomaattinen. Autoklaaviin muodostetaan kyllästetty korkean lämpötilan omaava vesihöyry. Yleisin sterilointilämpötila on 121 °C, joka pidetään 15 minuutin ajan. Kuitenkin, esimerkiksi mikrobiologinen jäte saattaa vaatia pidemmän ajan. (Sojakka & Välimäki, 2011, pp. 32-37.)

Validoinnissa käytetyn autoklaavin kammion pohjalla on lämpövastukset, jotka peittyvät vedellä. Lämpövastusten päällä on pohjaritilä. Steriloitavat välineet lasketaan metallikorisissa autoklaavin sisään. Autoklaaviin mahtuu kaksi koria päällisin. Steriloitaessa liuoksia tai elatusaineita, jotka ovat säilöpulloissa, pullojen korkkeja ei saa kiertää kiinni asti. Jos pullojen korkit ovat kiinni, pulloihin muodostuu painetta ja ne rikkoutuvat. Liuospulloissa

on autoklavointiteipit, joista käy ilmi pullojen sisältö. Autoklavoitavat instrumentit ovat autoklavointipusseissa. Autoklavointipussit ovat paperista sekä kosteutta läpäisevästä muovista valmistettuja pusseja, joissa on saumassa indikaattorit. Koriin laitetaan mukaan indikaattoriliuska, joka indikoi steriloinnin onnistumista, samoin kuin autoklavointiteippi sekä autoklavointipussin indikaattorit. Autoklaavin kansi suljetaan, autoklaaviin asetetaan haluttu sterilointilämpötila sekä -aika. Laite esilämittää itsensä, nostaa haluttuun lämpötilaan ja pitää sen niin kauan kuin on asetettu. Tämän jälkeen autoklaavi alkaa jäähtymään. Kun autoklaavi on jäähtynyt, sen voi avata. Validoinnissa käytetyllä autoklaavilla steriloidaan liukset sekä elatusaineet, mutta myös dekontaminoidaan mikrobiologista jätettä. Mikrobiologista jätettä autoklavoitaessa ohjelman aika on pidempi, kuin nesteitä autoklavoitaessa. Taulukosta 1 näkee, kuinka erilaiset mikrobit kestävät erilaisia lämpötiloja ennen kuin tuhoutuvat (Sojakka & Välimäki, 2011, p. 36). Minuutit lasketaan vasta koko näytteen lämpötilan noustua määrättyyn lämpötilaan. Tästä syystä näytteen määrä vaikuttaa sen sterilointiaikaan. Jäteautoklavoinnin jälkeen autoklaavi tyhjenetään vedestä sekä putsataan.

Taulukko 1 Eri mikrobien lämpökestävyydet ennen tuhoutumista (Sojakka & Välimäki, 2011, p. 36.)

ORGANISMI	VEGETATIIVISET ELI KASVULLISET SOLUT	ITIÖT
Hiivat	5 min 50–60 °C	5 min 70–80 °C
Homeet	30 min 62 °C	30 min 80 °C
Bakteerit (mesofiilit)	10 min 50–60 °C	2-800 min 100 °C
		0,5-12 min 121 °C

Steriloinnin onnistumista mitataan erilaisin tavoin. Fysikaaliset indikaattorit oikean ajan ja lämpötilan toteutumisesta ovat kello sekä lämpö- ja painemittari. Kemiaalisia indikaattoreita ovat taas autoklavointiteippi, indikaattoriliuska sekä autoklavointipussin indikaattorit. Niiden väri muuttuu autoklaavissa. Värimuutos johtuu siitä, että niissä on käytetty kidevedellistä suolaa, jonka väri on eri kuin kidevedettömän muodon. (Sojakka & Välimäki, 2011, p. 40.)

5.2.4 Tarkkuus- ja analyysivaaka

Sopiva vaaka valitaan sen mukaan, kuinka suuria massoja punnitaan ja millä tarkkuudella. Vaa'at jaotellaan niiden erotuskyvyn eli lukematarkkuuden perusteella neljään eri kategoriaan: raaka-ainevaaka, tarkkuusvaaka, analyysivaaka sekä mikrovaaka. (Hänninen, et al., 2012, p. 80.) Validointityössä käytetään sekä tarkkuus- että analyysivaakaa. Tarkkuusvaakana on Mettler Toledon BasBal 3000 ja analyysivaaka on RAD-WAG AS310.R2.

Vaa'an toiminnan seurannalla osoitetaan vaa'an tarkkuus sekä toistotarkkuus. Vaikka vaaka antaisi toistettavasti samoissa olosuhteissa saman tuloksen, tulos voi olla silti kaukana oikeasta tuloksesta. Vaa'alla tulisi punnita aina ennen käyttöä punnus, jonka massa tunnetaan tarkasti. Näin voidaan todentaa, että vaaka antaa oikean tuloksen. Yleispätevä sääntö vaa'an valinnassa on se, että vaa'an luotettavuuden tulee olla kymmenyksen tarkempi kuin haluttu punnitustarkkuus. Vaa'an luotettavan mitta-alueen määrittelee aina mittausepävarmuus, joka muodostuu laskennallisesti vaa'an lineaarisuudesta, toistettavuudesta, kulmakuormasta sekä hystereesistä. Lineaarisuus kuvaa sitä, kuinka varmasti vaaka antaa oikean tuloksen sekä painavilla että kevyillä kuormilla eli vaa'an koko punnitus alueella. Kulmakuorma kertoo punnitustulosten eron, kun punnittava esine sijaitsee vaakakupin eri osissa. Hystereesi tarkoittaa mittaustarkkuuden eroa, vaakaa kuormitettaessa pienen massan jälkeen suuremmalla sekä päinvastoin. (Hänninen, et al., 2012, pp. 82-87.)

Vaa'at, jotka on tarkoitettu suurempien massojen punnitsemiseen antavat epätarkempia lukemia kuin pienille massoille tarkoitetut vaa'at. Työssä käytettävä tarkkuusvaaka antaa lukeman 0,01 g tarkkuudella, kun taas analyysivaaka antaa lukeman 0,00001 g eli 0,01 mg tarkkuudella.

5.2.5 Sentrifugi

Validoinnissa käytetään sentrifugia (Centrifuge B5, B. Braun Biotech International) ympin valmistuksessa. Sentrifugointia käytettiin erotusmenetelmänä, jotta solut saadaan pesytyä ja sedimentoitua erilleen DPBST-liuoksesta.

Sentrifugointi perustuu hiukkasten erottamiseen niiden koon sekä tiheyden perusteella. Neste laitetaan sentrifugiputkiin ja putket asetetaan pyörivään roottoriin. Putkia asetellessa tulee ottaa huomioon, että roottori pysyy tasapainossa. Sentrifugoinnissa roottori kiihdytetään sopivaan pyörimisnopeuteen moottorin avulla. Tällöin suuret ja tiheimät hiukkaset painuvat putken pohjalle. Tavallisten sentrifugien pyörimisnopeudet ovat 1800–4000 kierrosta minuutissa (rpm, revolutions per minute). Roottorin koko vaikuttaa pyörimisnopeuden lisäksi hiukkasten erottumisen tehokkuuteen siten, että suuremmalla roottorilla saadaan tehokkaampi erotus. Laitteen tehokkuutta voidaan kuvata myös G-arvolla (rcf, relative centrifugal force). G-arvo kertoo, kuinka moninkertainen nesteen kiihtyvyyden on maan vetovoiman aiheuttamaan kiihtyvyyteen verrattuna. G-arvo mahdollistaa laitteiden tehokkuuksien vertailun. (Hänninen, et al., 2012, p. 101.)

5.2.6 Koeputkiravistelijä

Validoinnissa käytettävän koeputkiravistelijan valmistaja on VWR International. Koeputkiravistelijaa käytetään ympin valmistuksen yhteydessä sekoittamaan Falcon-putkien sisältämä mikrobisuspensio. Koeputkiravistelijaan asetetaan haluttu kierrosnopeus, jonka jälkeen, kun putken painaa ravistelijan päätä vasten, se tärisyttää putkea. Kierrosnopeudesta johtuva värinä aiheuttaa putkeen vorteksin ja neste putkessa sekoittuu.

5.2.7 Vesihaude

Grant'in JB Nova vesihaudetta käytetään elatusainepullojen temperoinnissa. Vesihau-teeseen laitetaan laboratorion ionivaihdettua vettä ja se asetetaan haluttuun lämpötilaan. Lämpötilan saa säädettyä tarkasti, sillä hauteessa on lämpötila anturi. Asetettu lämpötila vallitsee koko hauteessa, sillä hauteen päälle asetettava kansi pitää veden lämmittämän ilmatilan lämpimänä. Hauteen toimivuus tarkistetaan hauteen ollessa päällä, manuaalisella lasilämpömittarilla.

5.2.8 Lämpökaappi

Instrulab'in lämpökaappia käytetään inkubointikaappina validoinnin aikana. Kaappi asetetaan tiettyyn lämpötilaan (32 ± 2 °C) ja lämpötilaa seurataan, esimerkiksi digitaalisella

lämpömittarilla. Kaapin lämpötila kirjataan ylös päivittäin. Päivittäinen lämpötilan seuranta osoittaa kaapin toimivuuden.

5.2.9 Automaattipipetit

Validoinnissa käytetään säädettävän tilavuuden omaavia mekaanisia automaattipipettejä. Pipettien tilavuudet ovat 500–1000 µl sekä 1-10 ml. Pipetit ovat Thermo Scientific:in valmistamia Finnpipette F2 pipettejä.

Säädettäviä pipettejä saa käyttää vain niiden ilmoittamalla tilavuusalueella, alueen ulkopuolella pipetti ei ole enää tarkka. Pipetoitaessa automaattipipetillä, voidaan käyttää suoraa tai käänteistä pipetointia. (Hänninen, et al., 2012, pp. 66-67.) Validoinnissa käytettiin ainoastaan suoraa pipetointia, sillä pipetoitavat tilavuudet olivat melko suuria.

Suorassa pipetoinnissa pipetin kärkeen imetään tarkasti haluttu määrä mitattavaa liuosta. Liuos annostellaan tyhjentämällä kärki kokonaan. Ennen varsinaista pipetointia pipetin kärkeä huuhdellaan mitattavalla liuoksella. Pipetti pidetään pystyssä tai vähän kallistettuna pipetoinnin aikana. Automaattipipettien tarkkuus perustuu siihen, että niitä käytetään oikein. Väärin käytettynä mikään mittalaite ei ole tarkka. Samoin kuin muitakin mittalaitteita, myös pipettejä kalibroidaan, huolletaan sekä viritetään, jotta ne pysyvät toimintakuntoisina. (Hänninen, et al., 2012, pp. 66-67.)

5.3 Välineitä

Validoinnin suorituksessa käytetään laitteiden lisäksi monia tavanomaisia laboratoriovälineitä, kuten petrialjoja, suodatussuppiloita, Pasteur-pipettejä, pipetinkärkiä ja siirrostussilmukoita. Suodatuksessa käytettävät membraanit ovat huokoisia selluloosaestereistä valmistettuja, ruudutettuja kalvoja. Ne ovat steriilejä, yksittäispakattuja, halkaisijaltaan 47 mm kokoisia ja niiden huokoskoko on 0,45 µm (Microfil EZ-pak). Lisäksi käytetään tavanomaisia laboratorion lasitavaroita kuten, säilöpulloja, dekantterilaseja sekä mittalaseja.

6 VALIDOINNIN SUORITUS

Validointi suoritetaan kevään 2019 aikana. Se suoritetaan toimeksiantajan määräämällä kahdella tuotteella. Tuotteet edustavat eri tuoteryhmiä: silmänhoitotuotteita sekä piilolinssien hoitonestettä. Tuotteista silmänhoitotuote on säilöntäaineeton, kun taas piilolinssien hoitoneste sisältää mikrobien kasvua inhiboivaa säilöntäainetta. Standardeista sekä Euroopan farmakopeasta tulevien määräysten mukaan säilöntäainetta sisältävät tuotteet täytyy maljata neutraloivalle agarille, jolloin tuotteessa olevien, tai validoinnin tapauksessa, tuotteeseen inokuloitujen mikrobien on mahdollista elpyä. Euroopan farmakopeasta tulevan ohjeistuksen mukaan silmänhoitotuotteet maljataan TSA- sekä FTA-maljoille ja piilolinssien hoitonestet TSA- sekä neutralointiagarille, mikrobista riippuen myös FTA-maljalle.

Tässä luvussa esitetään validointisuunnitelma sekä siihen tehdyt muutokset ennen validoinnin suorituksen aloitusta. Tämän jälkeen käydään läpi validoinnin suoritus, jossa kerrotaan yleisesti, kuinka kierrokset esivalmisteltiin. Esivalmistelujen jälkeen kuvaillaan testauskerran kulku kummallakin tuotteella.

6.1 Validointisuunnitelma ja sen muutokset

Alkuperäinen validointisuunnitelma on kirjoitettu ja hyväksytty ennen validoinnin suorittamista. Validointisuunnitelmassa eriteltiin luvun 3.2 mukaisesti kaikki tarpeellinen tieto validoinnin kannalta. Alkuperäiseen validointisuunnitelmaan tehtiin kuitenkin joitakin muutoksia, jonka vuoksi validointisuunnitelmasta tehtiin päivitetty versio 2.0.

Tässä kappaleessa esitellään alkuperäinen validointisuunnitelma. Sen jälkeen käydään läpi päivitetty versio validointisuunnitelmasta ja sen osista, joihin muutoksia tehtiin.

6.1.1 Alkuperäinen validointisuunnitelma

Validoinnin tausta ja tarkoitus

Kalvosuodatuslaitteistoa sekä kalvosuodatusmenetelmää käytetään toimeksiantajan lopputuotteiden steriilisyystestauksissa silmänhoitotuotteille sekä piilolinssien hoitonesteille. Menetelmä on validoitu käyttöön aikaisemmin, silloin hyväksyttiin neutralointialustan käyttö piilolinssien hoitonestetuotteiden testauksessa sekä NaCl-liuoksen käyttö huuhteluliuksena. Menetelmä verifioitiin sekä uudelleen validoitiin uuden tuoteperheen myötä. Menetelmän todettiin havaitsevan mikrobiologinen kasvu tuotteissa luotettavasti, spesifisesti sekä toistettavasti.

Tässä opinnäytetyössä tehtävän uudelleen validoinnin tarkoituksena on osoittaa, että menetelmällä kyetään havaitsemaan mikrobiologinen kasvu luotettavasti, spesifisesti sekä toistettavasti kuudella Euroopan farmakopean mukaisella mikrobilla, mikrobit ovat esitetty Euroopan farmakopean kappaleessa 2.6.1 Sterility. Validointiin käytettävä menetelmä perustuu standardissa EN ISO 11737–1:2006 esitettyyn kalvosuodatusmenetelmään.

Testattavat näytteet

Steriilisyystestauksen validointi suoritetaan silmänhoitotuotteelle sekä piilolinssien hoitonesteille. Molemmista tuoteperheistä valitaan kaksi tuotetta, silmänhoitotuotteet A ja B sekä piilolinssien hoitonesteet C ja D. Silmänhoitotuotteista A edustaa kahta eri tuotetta, joilla on samanlainen koostumus. B edustaa tuotetta samasta tuoteryhmästä kuin A, tuote kuitenkin sisältää erilaisen aineosan. B valitaan validointiin, jotta voidaan osoittaa, ettei tuotteen sisältämä ainesosa vaikuta steriilisyiden testaamiseen. Tuotteet C ja D ovat koostumukseltaan suhteellisen samanlaiset, mutta ne sisältävät eri säilöntäaineita. Testattavat näytteet otetaan kunkin tuotteen kolmesta eri tuotanto erästä.

Määrät perustuvat tarvittaviin näytemääriin validoinnin suorittamiseksi kuudella mikrobilla. Näytteet kootaan seuraavasti: tuotteita C ja D kootaan 6 pulloa yhteen jokaisesta erästä, tämän jälkeen koonti jaetaan kuuteen lopulliseen näytteeseen (6 näytettä/erä). Tuotetta A kootaan siten, että kustakin erästä tehdään kuusi 33 pullon koontia, jokainen

koonti jaetaan sen jälkeen kahdeksi lopulliseksi näytteeksi. Tuote B kootaan samoin kuin tuote A, mutta koonnit tehdään pienemmästä pullo määrästä.

Inokulaatit

Testissä käytettävät mikrobit käsitellään toimeksiantajan sisäisen työohjeen mukaan. Mikrobeille, joille ei löydy ohjetta suoritetaan käsittely testauksia ennen validointia. Inokuloitavien mikrobisuspensioiden pitoisuus määritetään toimeksiantajan työohjeen mukaan maljausmenetelmällä. Mikrobit *S. a*, *P. a*, *B. s* sekä *C. s* kasvatetaan TSA-maljoilla, kun taas mikrobit *C. a* ja *A. b* kasvatetaan sabouraud dextrose agarilla (SDA).

Jotta voidaan olla varmoja, että inokuloitavien mikrobien kasvu voidaan havaita käytettävällä menetelmällä, mikrobeja inokuloidaan myös DBPST-liuokseen. Kontaminoitu DBPST-liuos suodatetaan toimeksiantajan työohjeen mukaisesti. Mikrobimäärä jokaisessa suodatettavassa näytteessä tulee olla alle 100 pmy. Kahta eri mikrobipitoisuutta käytetään suodatusmenetelmässä. Jokaisesta näytteestä suodatetaan kuusi rinnakkaista näytettä, kolme niistä maljataan TSA-maljalle ja kolme neutralointiagarille. *C. a* ja *A. b* mikrobeista maljataan kolme rinnakkaista näytettä TSA- sekä neutralointiagarin lisäksi myös SDA-maljoille. DBPST-liuosta käyttämällä osoitetaan, että kaikki mikrobit kasvavat kaikilla alustoilla samanveroisesti ja, että testattavien tuotteiden tuloksiin verrattaessa, tuotteiden sisältämällä ainesosilla ei ole vaikutusta mikrobien kasvuun.

Tuotteesta tehtävät näytteet inokuloidaan ja suodatetaan samoin kuin DPBST-liuoksesta tehdyt näytteet. Silmänhoitotuotteet suodatetaan toimeksiantajan työohjeen mukaisesti samoin piilolinssien hoitonesteet. Silmänhoitotuotteille käytetty kasvatusalusta on TSA, kun taas piilolinssien hoitonesteille neutralointiagar. Jokaisesta tuote erästä tehdään negatiivinen kontrolli toimeksiantajan työohjeen mukaisesti.

Aseptisuutta monitoroidaan kontaktimalja- sekä laskeumamaljanäytteillä. Laskeumamaljanäytteet kerätään TSA-maljoille laboratorion pöydältä sekä laminaarikaapista. Kontaktimaljanäytteet otetaan TSA-kontaktimaljalle työntekijän hanskoista ennen ja jälkeen hanskojen desinfioinnin sekä laminaarikaapin työtasolta testausta aloitettaessa.

Silmänhoitotuotemaljoja inkuboidaan lämpökaapissa 32 ± 2 °C, 17 vuorokautta. Pesäkkeet lasketaan maljoilta työohjeen mukaisesti useamman kerran inkuboinnin aikana. Piilolinssien hoitonestemaljoja inkuboidaan samassa lämpötilassa 14 vuorokautta.

Pesäketuloksista lasketaan toistettavuus, suhteellisen keskihajonnan kaavalla (kaava 4). Lisäksi lasketaan kaksi eri saantoprosenttia, molemmat aiemmin esitetyllä saantoprosentin laskukaavalla (kaava 1). Ensimmäisellä saantoprosentilla kuvataan maljausmenetelmällä saatua mikrobipitoisuutta, kalvosuodatusmenetelmällä saatuun mikrobipitoisuuteen. Toisessa saantolaskussa kalvosuodatusmenetelmällä saatua tulosta DPBST-liuoksesta verrataan tuotteista saatuihin tuloksiin samalla menetelmällä.

Tulokset sekä hyväksymiskriteerit

Aseptisuus hyväksytään seuraavilla kriteereillä. TSA-kontaktimaljat laminaarikaapin sisältä saavat kasvaa keskiarvolta vain alle 1 pmy/malja. Hanskojen kontaktimaljat saavat sisältää ennen desinfiointia keskimäärin ≤ 1 pmy/malja ja jälkeen desinfiointin < 1 pmy/malja. Laskeumamaljat laminaarikaapin sisältä saavat sisältää keskimäärin ≤ 1 pmy/malja, kun taas laskeumamaljat laboratorion pöydältä saavat sisältää keskimääräisesti < 25 pmy/malja. Yhtäkään väärää positiivista tulosta ei saa tulla tuotenäytteistä eikä DPBST-näytteistä.

Toistettavuutta ja luotettavuutta mitattaessa ensimmäinen saantoprosentti tulee olla kaikilla mikrobeilla 95 % ja 105 % välillä. Suhteellisen keskihajonnan tuloksista < 2 % on erinomainen, < 5 % on hyvä ja < 10 % on hyväksyttävä tulos. Spesifisyyttä kuvaava toinen saantoprosentti pitää olla kaikilla mikrobeilla 95 % ja 105 % välillä. Mikrobipitoisuuden tulee olla < 100 pmy per suodatettu näytetilavuus. Elatusaineiden toimivuutta osoitettaessa menetelmän tulee osoittaa, että neutralointiagar neutraloi tuotteiden C ja D sisältämät säilöntäaineet ja etteivät silmänhoitotuotteet A ja B vaikuta mitenkään mikrobien kasvuun.

Negatiivisten kontrollien tulee kaikkien olla 0 pmy sekä elatusainekontrolleilla, että tuotenäytteiden kontrolleilla ja positiivisten kasvukontrollien tulee olla positiivisia kaikilla mikrobeilla.

Validointisuunnitelman muutokset, validoinnin hyväksyntä sekä uudelleen validointi

Validointisuunnitelmaan tulevat muutokset kirjataan validointiraporttiin validoinnin valmistuttua. Validointi hyväksytään, kun se on suoritettu validointisuunnitelman mukaisesti.

Tulosten tulee olla validointisuunnitelman asettamissa rajoissa, jotta suoritus voidaan hyväksyä. Validointisuunnitelma on laadittu toimeksiantajan validointi- sekä dokumentointipolitiikan mukaisesti.

Validoinnille suoritetaan uudelleen validointi, jos muutoksia menetelmään, laitteistoon tai reagensseihin tulee. Uusintavalidointi tai verifointi on aiheellista myös, jos menetelmää käytetään uudella tuotteella, jonka ainesosat tai fyysiset ominaisuudet poikkeavat testatuista tuotteista.

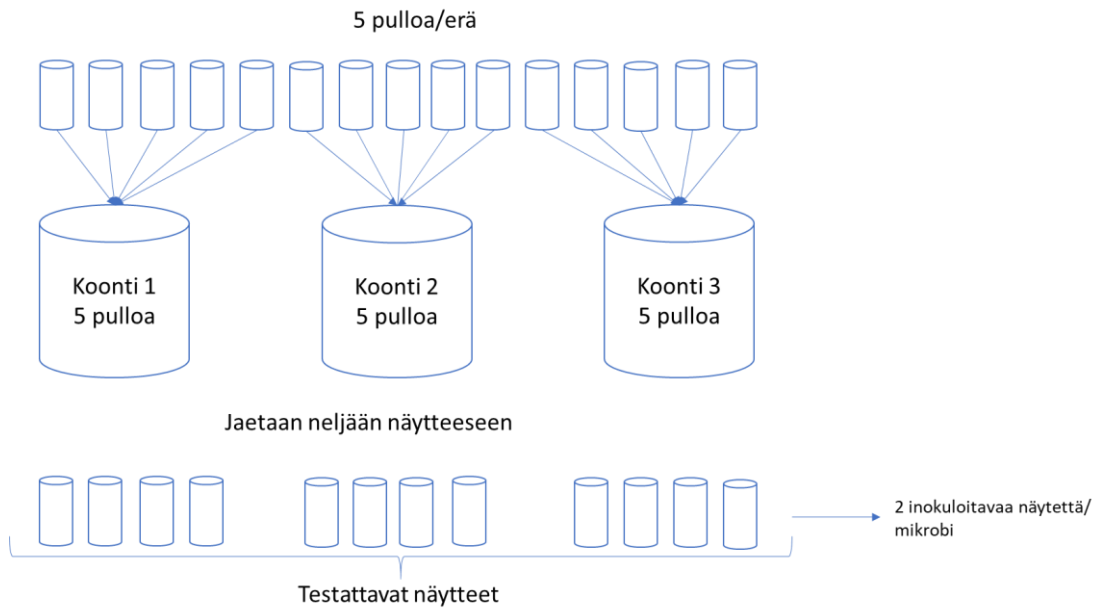
6.1.2 Validointisuunnitelman päivitetty versio 2.0

Ensimmäiseen validointisuunnitelmaan tehtiin joitakin muutoksia. Alkuperäinen validointisuunnitelma oli kirjoitettu Euroopan farmakopean vanhan painoksen mukaan. Validointisuunnitelmaan tehtiin päivityksiä ja validointisuunnitelman versio 2.0 kirjoitettiin. Validointisuunnitelmaan muutettiin seuraavat kohdat.

Testattavat näytteet

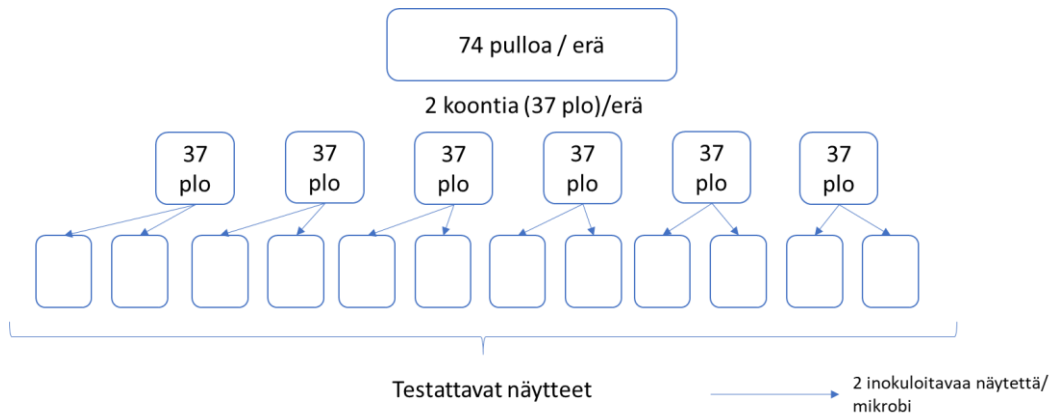
Testattavia tuotteita valittiin vain kaksi, eli yksi tuote kummastakin tuoteperheestä. Piilolinssien hoitonesteestä validointi suoritettiin kolmella tuote-erällä. Silmänhoitotuotteista ei ollut saatavilla kuin kaksi tuote-erää, joten testi suoritettiin kahdella erällä, josta toisen erän näytteitä käytettiin kaksinkertainen määrä. Toisen erän kaksinkertainen näytemäärä mahdollisti kuitenkin sen, että tuotteesta pystyttiin tekemään määritys kolmella "erällä". Saman erän kaksi eri näytemäärää käsiteltiin alusta asti omina näyteyksikköinä. Tuote-erien tasalaatuisuus tiedetään pitkän valmistushistorian vuoksi, tasalaatuisuus on todettu muun muassa tuotevalidoinnissa. Joten se, että onko näytteet kahdesta vai kolmesta erästä ei vaikuta validoinnin lopputulokseen.

Tuotteiden koontiin tuli myös muutoksia. Piilolinssien hoitonestettä koottiin siten, että jokaisesta erästä koottiin 5 pulloa yhteen, koonti jaettiin sitten neljään varsinaiseen näytteeseen, kuvan 2 mukaisesti.



Kuva 2 Piilolinssien hoitonesteidien koonti

Näytteet koottiin kolmena eri kertana aina kahdeksi viikoksi eteenpäin. Samoin silmänhoitotuotteet, joista koottiin kustakin "erästä" 2 x 37 pulloa yhteen, tämän jälkeen kukin 37 pullon koonti jaettiin kahteen annokseen, kuvan 3 mukaisesti.



Kuva 3 Silmänhoitotuotteenäytteiden koonti

Inokulaatit

Mikrobeihin tuli muutoksia. *Clostridium sporogenes* jätettiin validoinnista ulos. Syitä *Clostridiumin* pois jättämiseen on käsitelty opinnäytteen kappaleessa 7.3.

Myös elatusalustat vaihtuivat, sillä alkuperäinen validointisuunnitelma tehtiin vanhan Euroopan farmakopea -painoksen mukaan. Kaikilla mikrobeilla silmänhoitotuotenäytteet maljattiin sekä TSA- että thioglykollaattimaljoille (FTA), pelkän TSA-maljan sijaan. Näytteiden vähäisyyden vuoksi päätettiin, että membraani leikataan aseptisesti puoliksi ja maljaamaan kukin puolikas omalle alustalleen (TSA ja FTA).

Tulokset sekä hyväksymiskriteerit

Aseptisuuden mittauksista päätettiin, että kontaktimaljanäyte hanskoista otetaan vain esivalmistelujen jälkeen ennen varsinaisen työn aloitusta. Hanskoista kontaktimaljalla saatu tulos kuvaisi tarpeeksi hyvin hanskojen puhtautta työntekijän laittaessa kädet laminaarikaappiin, koska työntekijä desinfioi hanskat joka kerta samoin.

Alkuperäisen validointisuunnitelman hyväksymisrajoja muutettiin, sillä niiden todettiin olevan turhan tiukat mikrobiologiseen analyysiin. CV-prosentin hyväksymisrajaa nostettiin siten että $\leq 35\%$ tulos olisi hyvä ja saantojen tuli olla 50–200 %. Rajat otettiin Drug Regulations:in julkaisemasta Validation of Microbiological Methods tiedostosta.

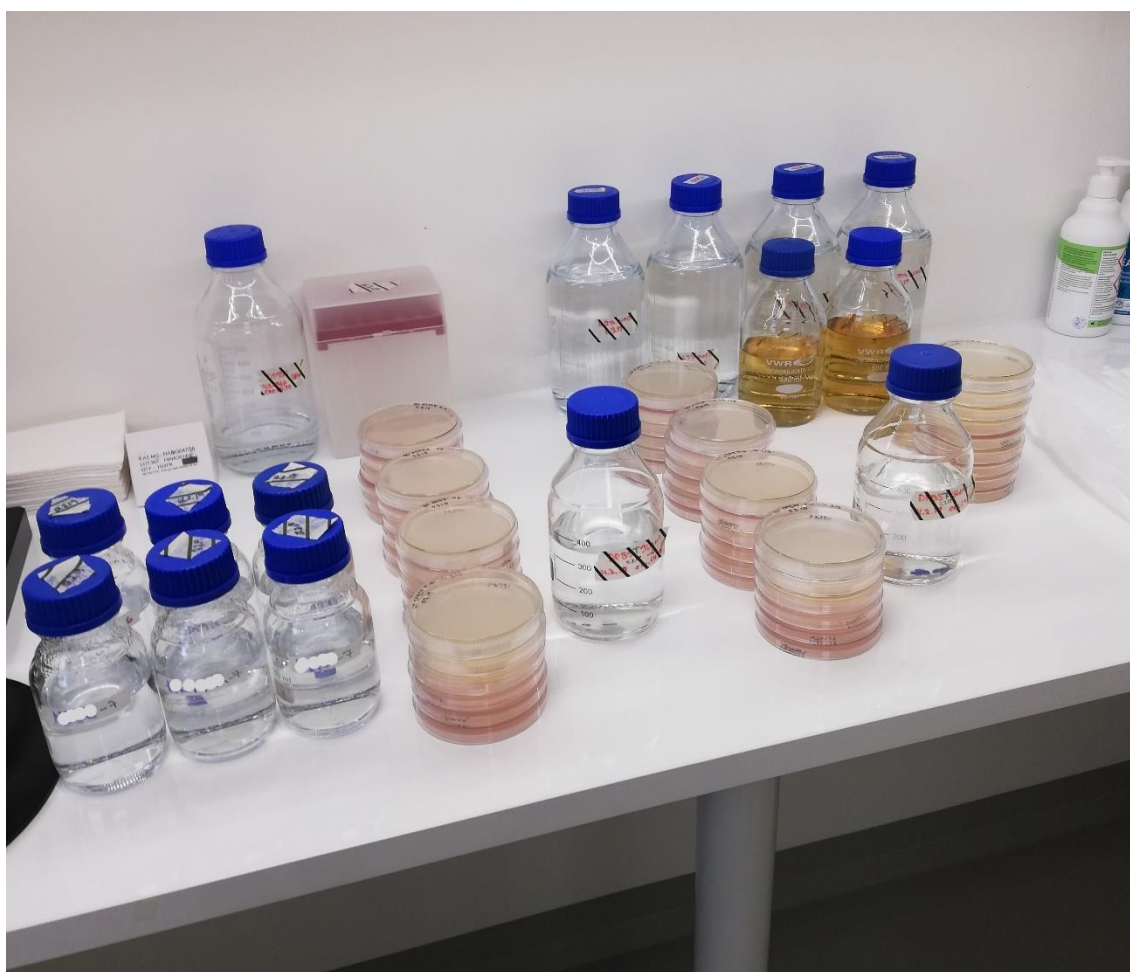
6.2 Validoinnin testikierrosten esivalmistelut

Validointisuunnitelman valmistuttua ja tilattujen tuotteiden tultua validointi aloitettiin. Validoinnin ensimmäiselle testauskierrokselle mikrobiksi valikoitui *Staphylococcus aureus*. Ennen varsinaista steriilisyystestausta koottiin silmänhoitotuote- sekä piilolinssien hoitostenäytteet, tämä lisäksi myös ensimmäiset elatusmaljaerät valettiin. Näytteitä koottiin validointisuunnitelman päivitetyn version mukaisesti kahden kierroksen tarpeisiin, samoin elatusmaljoja tehtiin kahden viikon tarpeisiin. Näytteet koottiin luokan 2 biologisessa suojakaapissa, aseptisesti, steriloituihin säilöpulloihin. Näytepullot säilytettiin koamisen jälkeen jääkaapissa.

Lisäksi valmistettiin tarvittavia liuoksia, kuten DPBS, TSB sekä 0,9 % NaCl. Liuokset valmistettiin kappaleen 5.1.2 mukaisesti. Elatusmaljat valmistettiin kappaleen 5.1.3 mukaisesti. Liuoksia valmistettiin molempien tuotteiden testipäivien tarpeisiin eli viikon tarpeisiin. *S. aureus* herätettiin pakastimessa olleesta helmiputkesta FTA-maljalle.

6.3 Validoinnin testikierroksen kulku

Ensimmäisellä testikierroksella, ensimmäisenä testipäivänä, testi suoritettiin silmänhoitotuotteella. Testikierros aloitettiin valmistamalla *S. aureus* -ymppi. Ymppi valmistettiin kappaleessa 5.1.4 esitetyn menetelmän mukaisesti. Ympin valmistuksen yhteydessä koottiin kaikki tarvittavat liuokset, näytteet sekä valmiiksi kirjoitetut maljat ja muut välineet laminaarikaapin lähelle valmiiksi, kuvassa 4 näkyy lähtötilanne silmänhoitotuotteen testauspäivänä.



Kuva 4 Silmänhoitotuotteen testauspäivä

Ympin laimennossarjan valmistuttua aloitettiin steriilisyystestin suoritus kalvosuodatusmenetelmällä. Laminaarin sisälle sekä laboratoriotilaan avattiin TSA-maljat laskeumamaljoiksi koko työn suorituksen ajaksi. Laminaarikaapin pohjalta sekä kumihanskoista otettiin kontaktimaljanäytteet osoittamaan työntekijän sekä työympäristön aseptisyys työn aloitushetkellä. Suodatuslaitteiston pumppu laitettiin päälle. Suodatuslaitteiston

kärki sekä pinsetit liekitettiin etanolilla, EtaxA. Tämän jälkeen suodatuslaitteiston kärkeen laitettiin membraani sekä kertakäyttöinen suodatussuppilo. Ensin suodatuslaitteiston läpi suodatettiin pelkästään TSB-liuosta sekä huuhteluun käytettävää 0,9 % NaCl-liuosta. Suodatuksen ja huuhtelun jälkeen suppilo otettiin irti ja membraani nostettiin pinseteillä TSA-maljalle. Malja toimi TSB-liuoksen sekä suolaliuoksen negatiivisena kontrollina, jolla pyrittiin osoittamaan, että liuokset eivät olleet kontaminoituneet ennen käyttöä, eivätkä näin ollen aiheuta vääriä positiivisia tuloksia testissä. Jokainen suodatus aloitettiin suodatuslaitteiston kärjen, sekä instrumenttien liekityksellä. Tämän jälkeen suodatettiin näyte, joka huuhdeltiin 0,9 % NaCl-liuoksella. Huuhtelun jälkeen membraani siirrettiin pinseteillä elatusmaljalle.

Ensimmäisenä suodatettiin negatiiviset kontrollit, eli TSB ja 0,9 % NaCl -kontrolli, kontrollit kahdesta DPBST-liuospullostasta, sekä kontrollit jokaisen erän kahdesta näytteestä. Tämän jälkeen alettiin suodattaa kontaminoituja liuoksia. Ensin -7 laimennoksesta inokuloitiin toiseen DPBST-liuospulloon validointisuunnitelman mukainen määrä, jolla kontaminoitiin liuos. Tämän jälkeen tuotteesta suodatettiin kolme rinnakkaista näytettä TSA-maljalle sekä kolme rinnakkaista näytettä FTA-maljalle. DPBST-liuosnäytteiden suodatuksen jälkeen suodatettiin -7 laimennoksella inokuloidut erien näytepullot. Näytepulloon pipetoitiin -7 laimennosta suunnitelman mukainen määrä, jonka jälkeen näytepullosta suodatettiin kolme rinnakkaista näytettä. Jokaisen suodatetun näytteen membraani leikattiin steriileillä saksilla puoliksi ja puolikkaat maljattiin, toinen TSA-maljalle ja toinen FTA-maljalle.

-7 laimennoksen jälkeen toistettiin sama -6 laimennoksella. Laimennosta -6 inokuloitiin DPBST-pulloon ja pullosta suodatettiin kolme rinnakkaista näytettä TSA-maljalle ja kolme rinnakkaista FTA-maljalle. Tämän jälkeen laimennosta inokuloitiin tuote-erien näytepulloihin ja suodatettiin rinnakkaiset näytteet. Membraanit leikattiin jälleen kahtia. Jokaisen suodatusvaiheiden jälkeen maljat teipattiin yhteen ja siirrettiin lämpökaappiin inkuboitumaan.

Kun näytteet oli suodatettu, otettiin laminaarikaapissa ollut laskeumamalja sekä laboratorion tilalaskueumamalja ja siirrettiin ne inkuboitumaan lämpökaappiin. Laitteiston läpi suodatettiin etanolia. Etanolia käytettiin laitteiston karkeaan puhdistamiseen. Ympin laimennoksista -6 ja -7 maljattiin ympin kontrollit toimeksiantajan sisäisen työohjeen mukaan. Ympin kontrollin pesäkkeet sekä testikierroksen maljojen pesäkkeet laskettiin ohjeenmukaisina päivinä.

Suodatuksessa syntynyt mikrobiologinen jäte tyhjennettiin kerran suodatusten välillä sekä päivän loppuksi viiden litran muovikanistereihin ja inaktivoitiin lisäämällä kanistereihin natriumhypokloriittia. Suodatusjäteastia puhdistettiin etanolilla. Kertakäyttöinen siirrostussilmukka, pipettien kärjet sekä membraanien kääreet kerättiin työnaikana erilliseen autoklavointipussiin, joka siirrettiin laminaarikaapista suljettuna isompaan autoklavoitavien jätteiden astiaan. Samoin käytetyt suodatussuppilot siirrettiin autoklavoitavien jätteiden astiaan.

Suodatuslaitteisto, käytetyt instrumentit, kontaminoituneet DPBST-pullot sekä näytepulot steriloiitiin autoklaavissa testipäivien välillä. Suodatuslaitteisto autoklavoiitiin aina niin, että sen venttiili oli auki, jotta steriloiiva höyry pääsee kulkemaan kanavan läpi. Natriumhypokloriitilla inaktivoitu mikrobiologinen jäte hävitettiin natriumhypokloriitin vaikutettua liuoksessa yli 24 tuntia. Toista testipäivää edeltävänä päivänä, uudet testimaljat kirjoitettiin valmiiksi testausta varten. Lisäksi suodatuslaitteistoon vaihdettiin aina puhdas sintterikivi testauksen alkaessa.

Toisena testipäivänä testattavana tuotteena oli piilolinssien hoitoneste. Testaus aloitettiin samoin, kun ensimmäisenäkin testipäivänä. Valmistettiin *S. aureus* -ymppi, valmistettiin laminaarikaappi ja haettiin tarvittavat liukokset, maljat sekä näytteet työpisteelle. Otettiin kontaktimalja näytteet tekijän sormista sekä laminaarin tasolta. Lisäksi avattiin laskeumamaljat laboratoriotilaan sekä laminaarikaappiin. Kuvassa 5 näkyy testauspäivän lähtötilanne. Ympistä tehtiin laimennossarja, jonka jälkeen alettiin suodattaa negatiivisia kontroleja, ensin TSB:stä sekä suolaliuoksesta, sitten molemmista DPBST-pulloista ja lopuksi kolmen erän molemmista näytteistä. Tuotenäytteet suodatettiin siten, että haluttu määrä mikrobilaimennosta inokuloitiin suoraan suodatussuppiloon tuotenäytteen annostelun jälkeen.



Kuva 5 Piilolinssien hoitonesteen testauspäivä

Tuotenäytteet pyrittiin suodattamaan mahdollisimman nopeasti ilman taukoja, sillä kontaminoitu tuote sisälsi säilöntäainetta, joka alkaa tuhoamaan bakteereita nopeasti. Säilöntäaineen vuoksi, näytteiden membraanit siirrettiin neutraloivalle kasvualustalle.

Testipäivän jälkeen jätteet käsiteltiin samoin, kun edellisellä kerralla. Suodatuslaitteisto, instrumentit, kontaminoituneet säilöpullot sekä syntynyt autoklavoitava jäte steriloitiin testauspäivän jälkeen autoklaavissa. Ympin kontrollin pesäkkeet laskettiin suunnitelman mukaan.

Kaikki testikierrokset suoritettiin samalla menetelmällä ja näytteet käsiteltiin samassa järjestyksessä. Tulokset käsiteltiin niiden valmistuessa ja testikierroksia toistettiin tarpeen vaatiessa.

7 ONGELMAT JA NIIDEN RATKAISUT

Validointityötä suunniteltaessa sekä suoritettaessa tuli vastaan useampi ongelma, esimerkiksi jätemäärien dekontaminoinnin, tilojen siivouksen sekä bakteerien kasvattamisen kanssa. Tässä kappaleessa käydään läpi kohdattuja ongelmia sekä niiden ratkaisuja.

7.1 Autoklavoitavat jätemäärät sekä laboratorion siivous

Validoinnin aikana yhdeltä testikierrokselta syntyy paljon mikrobeja sisältävää liuosta autoklavoitavaksi. Nestemäärien dekontaminointi on vaikeaa sekä aikaa vievää autoklavoimalla. Tämän vuoksi otettiin selvää aineista, joilla mikrobiologinen jäte voidaan inaktivoida kemiallisesti. Mikrobiologinen jäte päädyttiin inaktivoimaan natriumhypokloriittiliuoksella.

Natriumhypokloriitti on vahva itiöitä tuhoava aine sen pH:n ollessa noin 7. Se sisältää aktiivista klooria, joka tuhoaa bakteeri-itiöitä jo pienenä pitoisuutena 200 ppm (parts per million). Natriumhypokloriitin toiminta perustuu sen kykyyn hajottaa itiön kuori, jolloin itiö tuhoutuu. (Rank & Riley, 1998, p. 18.) *Bacillus subtilis* -itiöt ovat vastustuskykyisempiä natriumhypokloriitin vaikutukselle kuin *Clostridium*-suvun itiöt, jotka ovat herkempiä (Russel, 1990, p. 103). pH:n 7 omaava natriumhypokloriittiliuos, joka sisältää 500 ppm aktiivista klooria tuhoaa 99,99 % *Bacillus subtilis* -itiöistä 30 minuutissa. Testattavan liuoksen bakteeripitoisuuden ollessa $1,6 - 2,2 \times 10^9$ pmy/ml. (Spotts Whitney, et al., 2003.) Mikrobiologisen jätteen inaktivointiin valittu kloriittiliuos Kloriitti-Forte (KiiltoClean Oy) sisältää 10 % aktiivista klooria (KiiltoClean Oy, ei pvm).

Päätettiin, että kloriittiliuosta lisätään 3 % inaktivoitavan liuoksen tilavuuteen. 3 % lisäys desinfektioainetta tarkoittaa, että inaktivoitava liuos sisältää 0,3 % eli 3000 ppm aktiivista klooria. Lisäys on enemmän kuin tarpeeksi jätteen inaktivoimiseen. Mikrobiologista jätettä sisältävien kanisterien annetaan seisoa aina yön yli, jotta jäte varmasti inaktivoituisi. Tämän jälkeen jäte kaadetaan runsaan veden kanssa viemäriin. Ennen ensimmäistä jätteiden hävitystä, inaktivoitavasta jäteliuoksesta siirrostettiin liuosta kolmelle TSA-maljalle ja maljat laitettiin inkuboitumaan. Mikrobiologista kasvua ei ollut havaittavissa 7 vuorokauden inkuboinnin jälkeen, joten natriumhypokloriittiliuos otettiin käyttöön.

Toinen ongelma jätteiden hävityksen lisäksi oli laboratorion siivoaminen. Laboratoriossa käytetään desinfiointiainetta, mutta sen tehosta *Bacillus* sekä *Clostridium* -itiöihin ei oltu varmoja. Laboratorioon päädyttiin hankkimaan toinen pesuaine käytettäväksi vanhan pesuaineen rinnalle. Uusi pesuaine Klercide Sporicide Active Chlorine (Ecolab) on natriumhypokloriittiliuos, joka sisältää 5000 ppm aktiivista klooria (Ecolab Ltd, ei pvm). Pesuainetta käytettiin laboratorion siivoamiseen aina, kun käsiteltiin itiöitä muodostavia mikrobeita.

7.2 Inokuloitavat näytemäärät

Validoinnin ensimmäisellä kierroksella näytteisiin inokuloituihin mikrobeihin ei saatu vastetta. Tämän seurauksena ensimmäisen kierroksen jälkeen, ympin kontrollien perusteella, inokulointilavuus nostettiin kymmenkertaiseksi verrattuna alkuperäiseen inokuloitavan mikrobisuspension tilavuuteen. Tilavuuden nostosta huolimatta, inokuloitava mikrobipitoisuus pysyi alle 100 pmy ja vaste silmänhoitotuotteille saatiin. Myös inokuloidut DPBST-näytteet kasvoivat kaikilla alustoilla (TSA, FTA sekä neutralointiagar). Inokuloidut tuote-erät piilolinssien hoitonesteillä eivät kasvaneet lainkaan inokulointilavuuden nostosta huolimatta, vaikka ne maljattiin neutralointialustalle.

Päätettiin, että silmänhoitotuotetestaus pidetään nykyisällään. Piilolinssien hoitonesteen kanssa päädyttiin ratkaisuun, että laimennos inokuloidaan näytepullon sijasta, suoraan suodatuslaitteistoon kiinnitettyyn suppiloon. Näyte annosteltiin suppiloon ensin, jonka jälkeen laimennos inokuloitiin suppiloon. Näyte suodatettiin ja huuhdeltiin heti. Näin suljettiin ulos se, että piilolinssien hoitonesteen säilöntäaineet kerkeäisivät tuhoamaan inokuloidut mikrobit. Aiemmin tuote kerkesi vaikuttamaan pidempään, koska kontaminoidusta pullosta suodatettiin kaikki kolme rinnakkaista näytettä.

7.3 *Clostridium sporogenes* poistaminen validoinnista

Clostridium sporogenes herätettiin KWIK-STIK:iltä ja saatiin kasvamaan FTM-liuoksessa, mutta bakteerin maljaus sekä maljakasvatus osoittautui liian vaikeaksi. Bakteeri ei kasvanut, vaikka anaerobiset olosuhteet luotiin Merck:in valmistamalla Anaerocult A -kaseteilla. Päätettiin, että bakteerin anaerobisuuden vuoksi se jätetään pois validoinninsuorituksesta.

Rutiininomaisessa steriilisyystestin suorituksessa maljat kasvatetaan aerobisissa olosuhteissa, joten joka tapauksessa validoitavaa menetelmää käytettäessä obligatorisia anaerobeja ei voi havaita. Lisäksi myös kuluttajat käyttävät tuotteita niin, että tuote on tekemisissä hapen kanssa, joten obligatoriset anaerobit eivät pääse lisääntymään tuotteissa.

7.4 Piilolinssien hoitonestenäytteiden kasvamattomuus

Piilolinssien hoitonestenäytteissä ei kasvanut pesäkkeitä, kun tuotteeseen inokuloitiin bakteereita. Tuote huuhdeltiin maksimimäärällä NaCl-liuosta, jonka jälkeen membraani maljattiin neutralointi maljalle. Kaikesta huolimatta vastetta ei saatu. *A. brasiliensis* sekä *C. albicans* kasvoivat kuitenkin näytteessä. Tultiin päätelmään, että tuotteen säilöntäaine tehoa voimakkaasti ja nopeasti bakteerien soluseinään. Hiivojen ja homeiden solurakenne on erilainen verrattuna bakteerien solurakenteeseen. Hiivojen ja homeiden soluseinä on vahvempi, joten niiden kyky kestää säilöntäaineita on parempi.

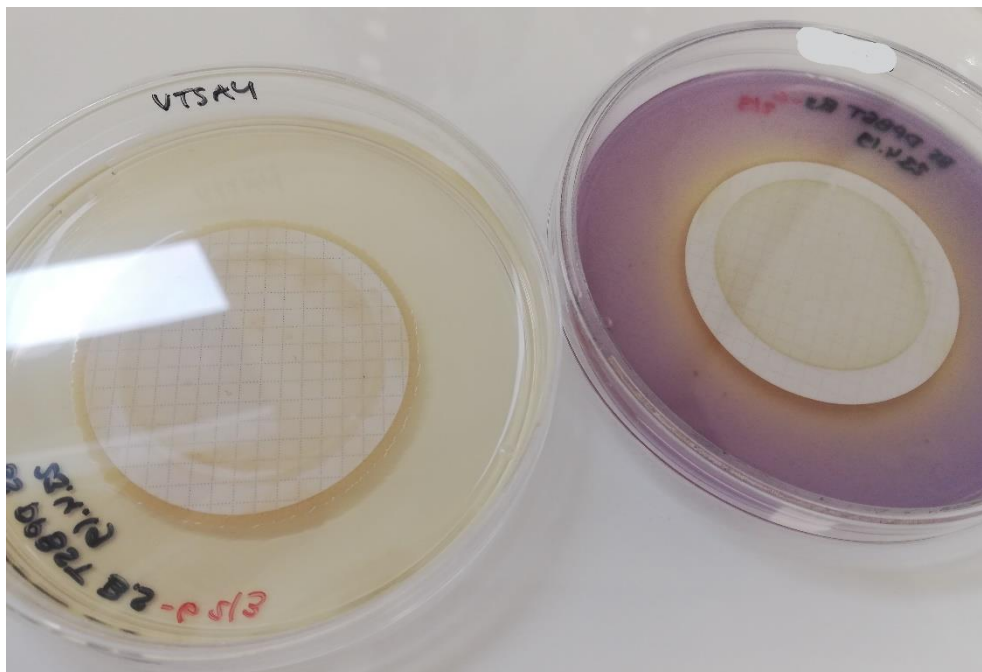
Ongelma ratkaistiin suorittamalla huuhtelutesti sekä bakteerilla (*S. aureus*) että hiivalla (*C. albicans*). Huuhtelutestillä oli tarkoitus osoittaa, että vaikka näytteen huuhtelutalvuuutta nostettaisiin yli nykyisen maksimimäärän, näytteen ylimääräisellä huuhtelulla ei olisi vaikutusta pesäkkeiden kasvuun. Huuhtelutestin tulos osoitti, ettei näytteen huuhtelumäärällä ole vaikutusta mikrobien kasvuun. Tuloksista voitiin päätellä, että tuotteen sisältämä säilöntäaine tuhoaa bakteerit tehokkaammin kuin homeet ja hiivat.

7.5 *Bacillus subtilis* aiheuttamat vaikeudet

Bacillus subtilis oli toimeksiantajalle tuntematon bakteeri. Toimeksiantajalla oli bakteerista solupankki, muttei työohjetta *B. subtilis* -ympin valmistamiseen. *B. subtilis* herätettiin pakkasesta Euroopan farmakopean ohjeistamalle kasvualustalle eli TSA maljalle. Bakteerista tehtiin erilaisia ymppejä, jotka kukin sisälsi eri pitoisuudet bakteeria. Ympit kasvoivat erittäin huonosti ja arvaamattomasti. *Bacillus*-pesäkkeet eivät tahtoneet liueta DBPST-liuokseen. Huonon liukenemisen vuoksi laimennossarjaan tehtiin -1 laimennos. Ylimääräisen laimennoksen toivottiin helpottavan laimentamista ja parantavan laimennoksen luotettavuutta. Kuitenkin ympeistä tehdyt kasvukontrollit eivät olleet hyviä, esimerkiksi laimennokset eivät korreloineet keskenään. Tämän vuoksi testauskiirroksia uusittiin useaan otteeseen.

Tekemällä erilaisia ymppejä huomattiin, että jos maljalla oleva kasvusto oli vanhempi kuin 2 vuorokautta, siirrostettu solumassa sekoittui DPBST-liuokseen paremmin. Kasvuston yli kahden vuorokauden ikä ei vaikuttanut bakteerilaimennosten kasvuun ja kasvun kontrollit korreloivat laimennosten suhteen. Toinen ongelma kuitenkin oli bakteerin luontainen kyky muodostaa biofilmejä, joka teki maljojen pesäkeluvusta vaikeaa. Kuvasta 6 voi nähdä kuinka *B. subtilis* kasvaa maljalla tasaisena kalvona. Pesäkkeitä ei voi erottaa luotettavasti.

Ongelma kuitenkin ratkaistiin *Bacilluksen* kohdalla niin, ettei pesäkkeitä lasketa. Pesäkelaskulomakkeisiin merkataan maljan kohdalle "+" mikäli kasvua on, ja "-" mikäli kasvua ei ole.



Kuva 6 *Bacillus subtilis*in muodostama biofilmi maljalla

8 TULOKSET

Validoinnin valmistuttua raakadata sekä tulokset käsiteltiin validointisuunnitelman mukaan Excelissä. Tässä kappaleessa esitellään mikrobikierrosten tulokset taulukoituna sekä kerrotaan tuloksista.

8.1 Silmänhoitotuotetulokset

Silmänhoitotuotteilla samoin kuin piilolinssien hoitonesteillä suoritettiin testit kahdella eri laimennoksella, jotta saataisiin laskettavat tulokset. Tulostaulukoissa esitetään kunkin mikrobin kohdalla 10^{-6} laimennoksella saadut tulokset. 10^{-6} laimennosten pesäkemäärät ovat suuremmat kuin 10^{-7} laimennosten, mutta kuitenkin alle standardin ja farmakopean määräämän 100 pmy. *S. aureus* –kierroksen tuloksissa DPBST-näytteiden suhteellinen keskihajonta rinnakkaisten näytteiden välillä on TSA-maljojen osalta sallituissa rajoissa, mutta FTA-maljojen osalta yli sallitun rajan. CV-prosenttien hyväksymisraja validointisuunnitelman mukaan oli $\leq 35\%$ ja saantoprosenttien 50-200 %. Tulosten korkeat CV-prosentit selittyvät näytteiden pienillä mikrobipitoisuuksilla. Kolmella rinnakkaisella maljalla, pienellä mikrobipitoisuudella pesäkkeiden keskiarvoksi tulee pieni arvo. Jos pesäkkeet jakautuvat epätasaisesti maljoille, laskettu keskihajonta on melkein yhtä suuri kuin keskiarvokin. Tämä aiheuttaa suuren tuloksen suhteellista keskihajontaa laskettaessa. Useammalla mikrobilla FTA-maljojen CV-prosentit ovat suurempia kuin TSA-maljojen. Todennäköisesti ravintoaine erot elatusaineilla vaikuttavat mikrobien kasvuun, FTA-mediumi sisältää hiivauutetta ja glukoosia, kun taas TSA-mediumiin on käytetty soijaa tryptonin lisäksi.

Mikrobiympin pitoisuuden saaminen samalle tasolle samaa mikrobia käytettäessä, jokaisella työskentelykerralla, ei ole kovin toistettavaa. Mikrobiympin pitoisuuteen vaikuttaa useita tekijöitä, muun muassa kaksi eri työntekijää siirrostaa työohjeista huolimatta todennäköisesti eri määrän mikrobikasvustoa. Myös siirrostettavien pesäkkeiden välillä on eroja. Toiset pesäkkeet ovat elinvoimaisempia kuin toiset, jolloin ympin pitoisuudesta tulee suurempi. Käytettävän mikrobikasvuston ikä voi vaikuttaa myös pitoisuuteen, samoin mikrobin säilytysolosuhteet sekä säilytysaika. Pidempään pakkasessa olleet mikrobit eivät ole niin elinvoimaisia, kuin tuoreet pakastetut mikrobipankit.

DPBST-näytteiden saantoprosentit (Y1) ovat raja-arvoissa kaikilla näytteillä paitsi *C. albicansilla* ja *S. aureuksella* arvot tulokset ylittävät raja-arvot. Bakterierrosten Y1-tulosten välillä on suurta heittoa. Kuten taulukosta 2 näkee, ympin kontrolli maljattuna on kaksinkertainen verrattuna mikrobien saantoon kalvosuodatusmenetelmällä. Kuitenkin tuotteesta suodattaen saatuja mikrobipitoisuuksia verrattaessa DPBST-näytteiden mikrobisaantoihin (Y2), saannot ovat hyvin rajoissa.

Y1-arvojen keskiarvo tuloksilla on 196 % ja saantoprosentti vaihtelee välillä 103–308 %. Y1-saantoihin vaikuttaa muun muassa se, että ympin kontrollia valettaessa mikrobisuspensio pipetoidaan suoraan maljalle ja siihen valetaan elatusaine päälle. Suodatusmenetelmällä sama määrä pipetoidaan suurempaan nestetilavuuteen, kuitenkin samassa suhteessa ympin kontrolliin. Suuremmasta nestetilavuudesta suodatetaan rinnakkaiset näytteet. Suodatettaessa rinnakkaisia näytteitä hävikkiä tapahtuu joka näytteen kohdalla. Mikrobit saattavat tarttua suppilon sekä säilöpullojen seinämiin. Lisäksi säilöpulloon jää kontaminoitua nestettä pohjalle, joka voi sisältää mikrobirykelmiä. Koska saantoa Y2 verrataan samalla menetelmällä saatuihin mikrobipitoisuuksiin, se vastaa paremmin menetelmällä saatua ympin takaisin saantoa. Tuotenäytteiden Y2-arvot ovat raja-arvojen sisällä kaikilla näytteillä.

Taulukko 2 Silmänhoitotuotetulokset *S. aureus*. Tulokset ovat kolmen rinnakkaisen maljan keskiarvo laimennoksella 10^{-6} .

Ympin laimennos 10^{-6}	<i>S. aureus</i>					
	TSA			FTA		
	DPBST			DPBST		
pmy/malja	12			9		
CV (%)	24			36		
Y1 (%)	213			285		
Silmänhoitotuote	Erä 1	Erä 2	Erä 3	Erä 1	Erä 2	Erä 3
pmy/malja	12	13	16	11	10	10
CV (%)	32	22	18	46	25	18
Y2 (%)	103	90	75	82	87	93

Taulukosta 3 näkee silmänhoitotuotteen eristä keskiarvona lasketut suhteellisen keskiarvon sekä saannon. Erä-näytteiden välillä on pientä vaihtelua, kuten taulukosta 2 näkee, mutta keskiarvolta tuote on raja-arvoissa CV-prosentin osalta sekä saannon puolesta.

Taulukko 3 Silmänhoitotuote-erien väliset keskiarvot *S. aureuksella*, tulokset ovat kolmen rinnakkaisen maljan keskiarvo laimennoksella 10^{-6} .

Ympin laimennos 10^{-6}	<i>S. aureus</i>	
	Tuote-erien välinen ka	
	TSA	FTA
pmy/malja	14	10
CV (%)	24	30
Y2 (%)	89	87

Taulukossa 4 on kuvattuna loput silmänhoitotuotekierrosten tuote-erittäin erotellut tulokset. Tuloksista nähdään, että tuotteiden Y2-prosentti on keskimääräisesti 107 % ja se vaihtelee 52–167 % välillä. Mitä pienempi ympin pitoisuus on, sitä pienempi pesäkemäärä on saatu ja sitä epävarmempi tulos on ollut. Pienellä pitoisuustasolla saadut tulokset vaihtelevat jonkin verran. *C. albicansin* ymppi kasvoi vain muutamia pesäkkeitä, kun taas *A. brasiliensis* kasvoi yli kymmeniä pesäkkeitä.

Taulukko 4 Silmänhoitotuotekierrosten loput tulokset tuote-erittäin, tulokset ovat keskiarvo kolmelta rinnakkaiselta maljalta laimennoksella 10^{-6} . A. brasiliensiksella laimennos 10^{-5} .

Ympin laimennos 10^{-6}	<i>P. aeruginosa</i>					
	TSA			FTA		
	DPBST			DPBST		
pmy/malja	9			10		
CV (%)	33			33		
Y1 (%)	201			181		
Silmänhoitotuote	Erä 1	Erä 2	Erä 3	Erä 1	Erä 2	Erä 3
pmy/malja	8	9	8	8	12	7
CV (%)	37	22	23	27	25	45
Y2 (%)	108	96	108	120	81	136
Ympin laimennos 10^{-6}	Erien välinen ka					
	TSA	FTA				
	pmy/malja	8	9			
CV (%)	27	32				
Y2 (%)	104	113				

Ympin laimennos 10^{-6}	<i>C. albicans</i>					
	TSA			FTA		
	DPBST			DPBST		
pmy/malja	2			1		
CV (%)	41			141		
Y1 (%)	103			308		
Silmänhoitotuote	Erä 1	Erä 2	Erä 3	Erä 1	Erä 2	Erä 3
pmy/malja	2	1	2	1	1	2
CV (%)	82	141	71	94	141	57
Y2 (%)	100	300	100	50	67	40
Ympin laimennos 10^{-6}	Erien välinen ka					
	TSA	FTA				
	pmy/malja	2	1			
CV (%)	98	97				
Y2 (%)	167	52				

Ympin laimennos 10^{-5}	<i>A. brasiliensis</i>					
	TSA			FTA		
	DPBST			DPBST		
pmy/malja	42			35		
CV (%)	14			14		
Y1 (%)	127			152		
Silmänhoitotuote	Erä 1	Erä 2	Erä 3	Erä 1	Erä 2	Erä 3
pmy/malja	34	36	38	25	28	30
CV (%)	6	10	9	14	13	22
Y2 (%)	121	116	110	139	124	114
Ympin laimennos 10^{-5}	Erien välinen ka					
	TSA	FTA				
	pmy/malja	36	28			
CV (%)	8	17				
Y2 (%)	116	126				

Ympin laimennos 10^{-6}	<i>B. subtilis</i>	
	TSA	FTA
	DPBST	DPBST
pmy/malja	biofilmi	biofilmi

Taulukossa 4 ei ole numeraalisia tuloksia *B. subtiliksesta*. Maljojen tulokset kirjattiin tuoslomakkeeseen kasvaa/ei kasva –tyylisesti, koska bakteeri kasvoi maljalla biofilminä. Tästä syytä myös CV-prosenttia tai saantoja ei voitu laskea. DPBST-maljat sekä tuotteen näytemaljat kasvoivat molemmilla laimennoksilla. Eli menetelmällä pystyy havaitsemaan myös *B. subtiliksen*.

Taulukkoon 5 on kirjattu negatiivisten kontrollien tulokset testikierroksilta. Taulukosta nähdään, että *P. aeruginosa* -kierroksella hanskoista otettava kontaktinäyte on kontaminoitunut. Tulos johtuu todennäköisesti hanskamateriaalista tai työntekijän inhimillisestä virheestä. Hanska, josta tntc-tulos on, on materiaaltaan lateksia. Muilla kierroksilla hanskat ovat neopreenia. Tntc (too numerous to count) tarkoittaa umpeen kasvanutta maljaa, jonka pesäkemäärää ei voi laskea. Lateksihanskat ovat olleet työntekijän kädessä jo pidemmän aikaa ja niitä on viinattu, ne haurastuvat ja mikrobit pääsevät kulkemaan hanskan läpi. Neopreeni kestää etanolia sekä hanskan yhtäjaksoista käyttöä pidempään. Muut *P. aeruginosa* –kierroksen negatiiviset kontrollimaljat ovat puhtaita ja kierrokselta saadut tulokset loogisia, joten on epätodennäköistä, että käsinekontaminaatio olisi vaikuttanut näytteiden tai validoinnin lopputulokseen. Tästä syystä poikkeama käsinäytteessä hyväksytään. Silmänhoitotuotteiden negatiiviset kontrollit ovat keskiarvoisesti kaikki raja-arvojen sisällä.

Taulukko 5 Silmänhoitotuotekierrosten negatiiviset kontrollit

Kontrolli	<i>P.a</i> (pmy)	<i>C.a</i> (pmy)	<i>S.a</i> (pmy)	<i>A.b</i> (pmy)	<i>B.s</i> (pmy)	KA (pmy)	hyväksymisraja (pmy)
Tuote-erät	0	0	0	0	0	0	0
TSB+ NaCl	0	0	0	0	0	0	0
DPBST -6	0	0	0	0	0	0	0
DPBST -7	0	0	0	0	0	0	0
Kont. Hanskat	tntc	0	1	0	1	0,50	< 1
Kont. Laminaari	0	0	0	0	0	0	≤ 1
Laskeum. Lamin.	0	0	0	0	0	0	≤ 1
Laskeum. Tila	2	0	2	5	7,5	3,30	< 25

8.2 Piilolinssien hoitonesteiden tulokset

Piilolinssien hoitotuotteiden tulokset löytyvät taulukosta 6. Kuten taulukosta 6 näkee, bakteerit eivät kasvaneet tuotteessa neutralointiagarista huolimatta, mutta *A. brasiliensis* sekä *C. albicans* kasvoivat.

Samoin kuin silmänhoitotuotteilla, myös piilolinssien hoitotuotteilla CV-prosentit ovat vaihtelevia DPBST-näytteillä. Näytteiden CV-prosenteissa tulee ottaa huomioon, että rinnakkaisten maljojen näytteet ovat suodatettu tuotenäytteistä, joihin mikrobisuspensio on inokuloitu erikseen. CV-prosentit ovat suuremmat kuin normaalisti, koska mikrobisuspensiot inokuloidaan suoraan suppiloon näytepullon sijasta. *A. brasiliensiksella* tulokset ovat raja-arvoissa. *Brasiliensis* on toimeksiantajan eniten käyttämä mikrobi, jonka ympäristö tunnetaan hyvin. Tämän vuoksi siitä saa toistettavampia tuloksia kuin muista mikrobeista. *C. albicans* -tuloksissa vaihtelua on eniten, kuten silmänhoitotuotteillakin. *C. albicans* tulokset ovat kuitenkin suhteellisen hyvin raja-arvoissa, vaikka näytteissä kasvoi vain vähän pesäkkeitä.

Piilolinssien hoitotuotteilla DBPST-näytteiden saanto (Y1) on keskimäärin 116 % ja prosentti vaihtelee 55–227 % välillä. Kuitenkin neutralointiagarilla tulokset ovat raja-arvoissa kaikilla mikrobeilla.

Taulukko 6 Piilolinssien hoitonestetulokset, tulokset ovat keskiarvo kolmelta rinnakkaiselta maljalta laimennoksella 10^{-6} .

Ympin laimennos 10^{-6}	<i>S. aureus</i>		
	Neutr. agar	TSA	FTA
	DPBST	DPBST	DPBST
pmy/malja	3	2	2
CV (%)	28	20	28
Y1 (%)	113		
Y1 (%)	162		
Y1 (%)	227		
Piilolinssien hoitoneste	Erä 1	Erä 2	Erä 3
pmy/malja	0	0	0

Ympin laimennos 10^{-6}	<i>P. aeruginosa</i>		
	Neutr. agar	TSA	FTA
	DPBST	DPBST	DPBST
pmy/malja	31	41	32
CV (%)	2	49	24
Y1 (%)	111		
Y1 (%)	83		
Y1 (%)	107		
Piilolinssien hoitoneste	Erä 1	Erä 2	Erä 3
pmy/malja	0	0	0

Ympin laimennos 10^{-6}	<i>C. albicans</i>			
	Neutr. agar	TSA		
	DPBST	DPBST		
pmy/malja	3	4		
CV (%)	54	26		
Y1 (%)	74	55		
Piilolinssien hoitoneste	Erä 1	Erä 2	Erä 3	Erien välinen ka
pmy/malja	0,3	2	2	1
CV (%)	141	82	28	84
Y2 (%)	900	150	180	410

Ympin laimennos 10^{-6}	<i>A. brasiliensis</i>			
	Neutr. agar	TSA		
	DPBST	DPBST		
pmy/malja	19	20		
CV (%)	12	12		
Y1 (%)	117	107		
Piilolinssien hoitoneste	Erä 1	Erä 2	Erä 3	Erien välinen ka
pmy/malja	14	13	18	15
CV (%)	25	29	14	22
Y2 (%)	114	119	102	112

Ympin laimennos 10^{-6}	<i>B. subtilis</i>	
	Neutr. agar	TSA
	DPBST	DPBST
pmy/malja	biofilmi	biofilmi

Tuotenäytteet eivät kasvaneet bakteerien osalta, kuten taulukosta 6 nähdään. Tämän vuoksi bakteerien tuloksista ei voida laskea CV-prosenttia tai saantoa. *B. subtilis* kasvaa DPBST-näytteiden osalta biofilminä, joten siitäkään ei lasketa CV-prosenttia tai saantoa. Kaikki piilolinssien hoitonestekierrosten negatiivisten kontrollien tulokset löytyvät taulukosta 7. Taulukosta voidaan todeta, että kaikki tulokset ovat raja-arvojen sisällä.

Taulukko 7 Piilolinssien hoitonestekierrosten negatiiviset kontrollit

Kontrolli	<i>P.a</i> (pmy)	<i>C.a</i> (pmy)	<i>S.a</i> (pmy)	<i>A.b</i> (pmy)	<i>B.s</i> (pmy)	KA (pmy)	hyväksymisraja (pmy)
Tuote-erät	0	0	0	0	0	0	0
TSB+ NaCl	0	0	0	0	0	0	0
DPBST -6	0	0	0	0	0	0	0
DPBST -7	0	0	0	0	0	0	0
Kont.Hanskat	0	0	0	0	0	0	< 1
Kont. Laminaari	0	0	0	0	0	0	≤ 1
Laskeum. Lamin.	0	0	0	0	0	0	≤ 1
Laskeum. Tila	6,5	3	4	4	3	4,10	< 25

9 YHTEENVETO

Opinnäytetyön aiheena oli toimeksiantajan valmistamien tuotteiden loppulaadunvalvonnassa suoritettavan steriilisyystestin uudelleen validointi. Tavoitteena oli suunnitella ja toteuttaa kalvosuodatusmenetelmän uudelleen validointi sekä osoittaa, että menetelmällä saadaan havaittua tuotteiden mikrobiologinen kasvu luotettavasti, toistettavasti sekä tarkasti.

Validointi tehtiin standardissa SFS-EN ISO 11737-1 esitetyn kalvosuodatusmenetelmän mukaisesti. Validoinnin suunnitteluun käytettiin Euroopan farmakopeaa. Validoinnilla haluttiin todentaa tämänhetkisen menetelmän kyky havaita mikrobiologinen kasvu kahdesta eri tuoteryhmästä Euroopan farmakopean määräämillä mikrobeilla.

Validointi suoritettiin kevään 2019 aikana, suunnitellun aikataulun mukaan. Validointi onnistui hyvin. Menetelmällä pystyttiin havaitsemaan silmänhoitotuotteiden mikrobiologinen kasvu kaikilla viidellä testimikrobilla. Piilolinssien hoitotuotteiden mikrobiologinen kasvu pystyttiin havaitsemaan hiivan ja homeen osalta, muttei bakteerien osalta. Ylimääräisellä huuhtelutestillä pystyttiin kuitenkin osoittamaan, ettei näytteen huuhtelumäärällä ole vaikutusta mikrobien kasvuun. Huuhtelutestin tuloksista voitiin päätellä, että tuotteen sisältämä säilöntäaine tappaa bakteerit tehokkaammin kuin homeet ja hiivat.

Validoinnista saadut tulokset olivat hyviä, muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta. Ympin valmistamisen toistettavuus on epävarmuustekijä, joka on aina mukana mikrobiologisten menetelmien validoinnissa, etenkin kun standardien mukaan tulee käyttää pieniä mikrobipitoisuuksia. Mikrobien kasvua ja elinvoimaisuutta ei pystytä määrittämään visuaalisesti suoraan pesäkkeestä. Validoinnista saatujen tulosten pohjalta voidaan todeta, että tuotteista voidaan kyseisellä kalvosuodatusmenetelmällä ja käytetyillä kasvualustoilla todeta mikrobiologinen kasvu toistettavasti ja luotettavasti. Toistettavuus voitiin todeta siitä, että mikrobien saantoprosentit suolaliuosta ja tuotetta vertailtaessa (Y2) ovat hyväksymisrajoissa. Menetelmä osoittautui spesifiseksi, sillä tutkitut mikrobit tuottivat vasteen, eikä vääriä positiivisia tuloksia tullut. Validoinnin aikana ilmenneet ongelmat ratkaistiin ja tilanteisiin reagoitiin nopeasti. Testikierroksia uusittiin ja lisätestauksia tehtiin tilanteiden mukaan.

Kaikkien kasvukontrollimaljojen tulokset olivat positiivisia ja validointisuunnitelmassa määritetyt inkubaatioajat olivat riittäviä. Tuotteiden negatiivisilla kontrollimaljoilla ei havaittu pesäkemäärien kasvua kolmen vuorokauden jälkeen.

Validointi saatiin suoritettua opinnäytetyöhön varatun aikataulun puitteissa. Toimeksiantaja kirjoittaa validoinnista oman validointiraportin, jossa validointi hyväksytään. Validointiraportin hyväksynnän jälkeen suoritetaan siinä suositeltavat ohjemuutokset ennen menetelmän käyttöönottoa.

10 LÄHTEET

Ákos T., K., 2019. *Microbe of the Month Bacillus subtilis*, s.l.: Trends in Microbiology.

Azam, M. W. & Khan, A. U., 2019. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. Teoksessa: *Drug Discovery Today*. s.l.:Elsevier, pp. 350-359.

Ecolab Ltd, ei pvm *Klocide Sporidical Active Chlorine*. [Online]
Available at: <https://ecolablifesciences.com/products.php?id=1&cat=2&pro=21>
[Haettu 29 4 2019].

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2014. 2.6.1 Sterility.
Teoksessa: *European Pharmacopoeia 8.0*. s.l.:EDQM.

Hiltunen, E. ym., 2011. *Laadukkaan mittaamisen perusteet*. s.l.:Metrologian neuvottelukunta ja Mittatekniikan keskus (MIKES).

Hägg, M., 2016. *Validoinnin suunnittelun opas*. s.l.:Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy.

Hänninen, H., Ruismäki, M., Seikola, A. & Slöör, S., 2012. *Laboratoriotyön perusteet*. 1.-3. painos toim. s.l.:Edita Publishing Oy.

International Organization for Standardization, ISO, 2006. *SFS-EN ISO 11737-1*. s.l.:Suomen Standardoimisliitto, SFS.

International Organization for Standardization, ISO, 2009. *SFS-EN ISO 11737-2*. s.l.:Suomen Standardoimisliitto, SFS.

KiiltoClean Oy, ei pvm *F 261 Kloriitti-Forte*. [Online]
Available at: <https://www.kiilto.fi/fi/tuotteet/f-261-kloriitti-forte/>
[Haettu 29 4 2019].

Lääkealan turvallisuus ja kehittämiskeskus Fimea, ei pvm *European farmakopea*. [Online]
Available at: https://www.fimea.fi/valvonta/lait_ja_ohjeet/euroopan_farmakopea
[Haettu 10 4 2019].

Merck, ei pvm *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*. [Online]
Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8537?lang=fi®ion=FI&qclid=>

Cj0KCQjwnpXmBRDUARIsAEo71tQ2OwUaG9CKxwnk1LFOBbkeAnFMj424DLijqtQT
hgireFmKaSwAJkaAs6bEALw_wcB

[Haettu 28 4 2019].

Rank, F. & Riley, T. V., 1998. Bacterial spores and sporicidal agents. Teoksessa: *Australian Infection Control*. s.l.:Elsevier, pp. 16-21.

Russel, A. D., 1990. Bacterial Spores and Chemical Sporicidal Agents. Teoksessa: *Clinical Microbiology Reviews*. s.l.:American Society for Microbiology, pp. 99-119.

Salkinoja-Salonen, M. e. a., 2002. *Mikrobiologian perusteita*. s.l.:Helsinki: Helsingin Yliopisto.

Sojakka, K. & Välimäki, M.-L., 2011. *Ammatillinen Mikrobiologia*. s.l.:Opetushallitus.

Sosiaali- ja terveysministeriö, 2004. *Biologisten tekijöiden luokitus*. [Online] Available at: https://www.oulu.fi/sites/default/files/content/BCO_biologistentekijoidenluokitus.pdf
[Haettu 29 4 2019].

Spotts Whitney, E. A. ym., 2003. Inactivation of Bacillus anthracis Spores. Teoksessa: *Emerging Infectious Diseases*. s.l.:US National Library of Medicine, National Institutes of Health, pp. 623-627.

Suomen Standardisoimisliitto SFS ry, ei pvm *Standardi tutuksi*. [Online] Available at: https://www.sfs.fi/julkaisut_ja_palvelut/standardi_tutuksi
[Haettu 10 4 2019].

Whyte, W., 2010. *Cleanroom Technology Fundamental of Design, Testing and Operation*. 2. toim. s.l.:WILEY.

DPBS-suolaliuoksen valmistus

Raaka-aine	Määrä (g) annosta kohti		
	0,975 l	1,0 l	1,063 l
NaCl	7,8	8	8,5
KCl	0,195	0,2	0,21
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,81	2,886	3,07
KH ₂ PO ₄	0,195	0,2	0,21
polysorbaatti			

Vaa'an toiminnantarkastus ok []

- Suolat punnitaan taulukon mukaan annoksen koosta riippuen.
NaCl lot.: _____
KCl lot.: _____
Na₂HPO₄ x 12 H₂O lot.: _____
KH₂PO₄ lot.: _____
- Liutetaan oikeaan määrään laboratoriovettä.
- Litran annos jaetaan mittalasilla kahteen x ml annokseen, kahteen säilöpulloon ja loput liuksesta laitetaan kolmanteen säilöpulloon vielä ennen autoklavointia. Kaksi muuta annosta valmistetaan litran säilöpulloon.
- Pulloihin kiinnitetään teippi, johon kirjataan DPBS, valmistuspäivämäärä, liuoksen exp. sekä tilavuus, jauheen lot ja käyttökohde.
- Pullot autoklavoidaan. HUOM korkkeja ei saa vääntää kiinni, pullojen korkit väännetään kiinni välittömästi autoklavoinnin jälkeen. Lämpötila/aika/ohjelma: _____
Indikaattoriliuska ok []
- Ennen käyttöä lisätään polysorbaattia (=DPBST) Pullon kylkeen merkitään T ja päivämäärä lisäyksen merkiksi.
T ja päivämäärä lisätty []
Polysorbaatti lot.: _____
- Valmistettu suolaliuosmäärä käytettyjen raaka-aineiden eränumeroiden kanssa merkitään laboratorion agar- ja liuosvalmistusvihkoon. Suolapullon kyljessä oleva päivämäärä toimii erän jäljitettävyytstunnisteena.

Valmistettu suolaliuos säilytetään huoneenlämmössä ja se säilyy 4 viikkoa.

Valmistetun liuoksen määrä: _____

DPBST-liuoksen exp. _____ Tehnyt (pvm/nimikirjaimet): _____

TSB-liuoksen valmistus

Vaa'an toiminnantarkastus ok []

1. Punnitaan TSB-jauhetta x g, x ml säilöpulloon. TSB:n lot.: _____
2. Lisätään x ml laboratoriovettä mittalasilla ja sekoitetaan ravistaen hyvin.
3. Pulloon merkitään liuoksen nimi ja valmistuspäivämäärä.
4. Autoklavoidaan pullot. HUOM korkkeja ei saa vääntää kiinni, pullojen korkit väännetään kiinni välittömästi autoklavoinnin jälkeen. Lämpötila/aika/ohjelma: _____

Indikaattoriliuska ok []

5. Pullot jäähdytetään huoneenlämpöiseksi ja säilytetään jääkaapissa. Pulloihin ja valmistuspäiväkirjaan merkattu päivämäärä toimii jäljitettävyysetietona. Valmistetun erän säilyvyysaika on 4 viikkoa.

Valmistetun liuoksen määrä: _____

TSB-liuoksen exp: _____ Tehnyt (pvm/nimikirjaimet): _____

0,9 % NaCl -liuoksen valmistus

Vaa'an toiminnantarkastus ok []

1. Punnitaan x g NaCl litran säilöpulloon. NaCl lot: _____
2. Lisätään x ml laboratoriovettä.
3. Liuotetaan suola veteen.
4. Pulloihin merkataan liuoksen nimi ja valmistuspäivämäärä.
5. Autoklavoidaan pullo. HUOM korkkia ei saa kiertää täysin kiinni. Korkit kierretään kiinni välittömästi autoklavoinnin jälkeen. Lämpötila/aika/ohjelma: _____
Indikaattoriliuska ok []
6. Jäähdytetään huoneenlämpöiseksi ja säilytetään huoneenlämmössä.
7. Valmistuspäivämäärä, valmistajan nimikirjaimet, exp. päivä ja käytetyn jauheen eränumero ja valmistettu liuosmäärä merkitään elatusaineiden valmistuspäiväkirjaan.

Valmistettu erä säilytetään huoneenlämmössä ja säilyvyysaika on 4 viikkoa.

Valmistetun liuoksen määrä: _____

0,9 % NaCl -liuoksen exp: _____ Tehnyt (pvm/nimikirjaimet): _____

Kasvualustojen valmistus

Elatusaine	neutraloin- tiagar	TSA	SDA	PDA	FTA	
					FTA	AGAR
g / x ml	21,6	16	26	15,6	11,9	7,7

Vaa'an toiminnantarkastus ok

1. Elatusainejauhe punnitaan taulukon mukaan. Elatusaineita tehdään x ml annos, x ml säilöpulloon.

Elatusaine	lot.	määrä
neutr.agar		
TSA		
THIO (FTM)		
AGAR		

2. Mitataan mittalasilla x ml laboratoriovettä. Sekoitetaan ravistamalla.
3. Pulloihin merkataan valmistettu elatusaine ja pullot autoklavoidaan. HUOM korkkeja ei saa kiertää täysin kiinni. Korkit kierretään kiinni välittömästi autoklavoinnin jälkeen. Lämpötila/aika/ohjelma: _____
Indikaattoriliuska ok
4. Autoklavoi elatusaine jäädytetään vesihauteessa n. 50 °C, sekoitetaan hyvin ja vae-
taan maljat laboratorion puhdistilan laminaarikaapissa 9 cm petrimaljoille.
5. Maljoihin merkitään valmistuseränumero. Maljat pinotaan ylösalaisin pusseihin ja pus-
seihin merkataan elatusaine, eränumero sekä exp. päivämäärä. Maljat varastoidaan
jääkaappiin.
6. Valmistuspäivämäärä, maljojen exp, valmistetun elatusaineen tilavuus, käytetyn ela-
tusaineen eränumero sekä tekijän nimikirjaimet merkitään elatusaineiden valmistus-
päiväkirjaan.
7. Kustakin maljaerästä tehdään toimivuuden testaus.
Jokaiselle tehdyille elatusaine-erälle tehdään toimivuuden testaus työhöjeen x mukaan
8. Toimivuuden testaus tehty pvm: _____
9. Toimivuuden testaus lomake arkistoidaan laboratorion maljojen valmistuskansioon ne-
gatiivisen kontrollin valmistuttua. Toimivuuden testaus läpi pvm: _____

Elatusaine	Säilyvyys	Erä nro	Exp.
neutr.agar	6 vko		
TSA	8 vko	VTSA	
THIO (FTA)	4 vko	VTHIO	

Tehnyt (pvm/nimikirjaimet): _____