



SAVONIA

■ OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

ALKOHOLIKÄSITTELYN JA SÄILYTYSAJAN VAIKUTUS AUTOKLAAVIPUSSISSA STERILOITUJEN TUOTTEIDEN STERIILINÄ PYSYMISEEN PUHDASTILOISSA

Opinnäytetyö

TEKIJÄT: Marjo Niskanen
Henna-Riikka Rajala
Minna-Mari Tervo

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijät Marjo Niskanen, Henna-Riikka Rajala, Minna-Mari Tervo	
Työn nimi Alkoholikäsittelyn ja säilytysajan vaikutus autoklaavipussissa steriloitujen tuotteiden steriilinä pysymiseen puhdastiloissa	
Päiväys 4.12.2016	Sivumäärä/Liitteet 48/2
Ohjaaja Leena Tikka, lehtori	
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani Sirkka Malmioja/Savon ammatti- ja aikuisopiston Puhdastilakoulutuskeskus	
Tiivistelmä <p>Puhdastila on ympäristö, jonka olosuhteet ovat kontrolloidut tarkasti hiukkasten määrän, ilman lämpötilan, kosteuden ja paineen osalta. Puhdastilassa käytettävät materiaalit, kuten autoklaavipusseihin pakatut materiaalit, viedään puhdastiloihin sulkutilan kautta. Ennen sulkutilaan vieniä materiaalien ja tuotteiden suoja- ja sterilointipakkausten ulkopinta suihkutetaan kauttaaltaan alkoholiliuoksella, jotta vältetään mikrobien siirtymiseltä puhdastiloihin ja siellä käytettäviin muihin materiaaleihin.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää mikrobiologisella viljelymenetelmällä autoklaavipusseissa steriloitujen tuotteiden steriilinä pysymistä alkoholikäsittelyn ja eripituisten säilytysaikojen jälkeen. Tavoitteena oli selvittää vaikuttaako alkoholikäsittely autoklaavipusseihin niin, että materiaalit autoklaavipussien sisällä kontaminoituvat säilytyksen aikana. Tavoitteena oli myös selvittää, kuinka kauan autoklaavipusseissa steriloidut välineet säilyvät steriileinä alkoholikäsittelyn jälkeen. Steriiliyttä tutkittiin ottamalla pintasivelynäytteitä tutkittavista materiaaleista eri säilytysaikojen jälkeen ja viljelemällä näytteet mikrobiologisille kasvatusalustoille. Viljelyt tehtiin materiaaleista välittömästi steriloinnin ja alkoholikäsittelyn jälkeen sekä yhden, kahden, kolmen ja viiden kuukauden säilytysajan jälkeen. Opinnäytetyön toimeksiantajana oli Savon ammatti- ja aikuisopiston Puhdastilakoulutuskeskus ja käytännön osuus toteutettiin Savonia-ammattikorkeakoulun terveysalan laboratoriotiloissa.</p> <p>Tutkittavien materiaalien pintanäytteiden mikrobiologisissa viljelyissä ei yhtä poikkeusta lukuun ottamatta havaittu mikrobikasvua. Poikkeava tulos johtui mahdollisesti kyseisen näytteen tai näytesuspension kontaminoitumisesta. Tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että autoklaavipusseissa steriloidut materiaalit säilyvät steriileinä alkoholikäsittelyn jälkeen ainakin viiden kuukauden ajan.</p>	
Avainsanat Puhdastila, autoklaavipussi, desinfektio, sterilointi, pintasivelynäyte, mikrobiologinen viljely	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Authors Marjo Niskanen, Henna-Riikka Rajala, Minna-Mari Tervo			
Title of Thesis The influence of alcohol treatment and storage time in clean rooms to materials sterilized in autoclave bags			
Date	4.12.2016	Pages/Appendices	48/2
Supervisor Leena Tikka, lecturer			
Client Organisation/Partners Sirkka Malmioja/Savo Vocational College Clean Room Training Center			
<p>Abstract</p> <p>Clean room is an environment, where the conditions are highly controlled by the particles, air temperature, humidity and pressure. Materials used in clean rooms such as materials packed in autoclave bags are brought to clean rooms through proliferation room. Before that all materials are sprayed throughoutly with alcohol solution in order to avoid transfer of microbes to clean room facilities and to other products used in clean rooms.</p> <p>The purpose of this study was to examine the influence of alcohol treatment and storage time of materials sterilized in autoclave bags. Sterility was studied by taking surface samples of the materials after different storage periods then samples were cultured to plates. The cultures were made immediately after sterilization and after one, two, three and five-month storage time period. The client of this thesis was Savo Vocational College Cleanroom Training Centre and the practical part was carried out in Savonia University of Applied Sciences laboratory facilities.</p> <p>No microbial growth was detected in the samples except in one case. The resulting deviation was obtained in only one sample and it is believed that the sample that attributed to a different result was because of the sample or sample suspension were contaminated at sampling. Results of this study suggests that materials sterilized in autoclave bags remain sterile after alcohol treatment for at least five months.</p>			
<p>Keywords</p> <p>Clean room, autoclave bag, disinfection, sterilization, surface sample, microbiological cultivation</p>			

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	5
2	PUHDASTILA.....	6
2.1	Puhdastilaluokat	6
2.2	Puhtaustestit	8
2.3	Perustoteutusratkaisut puhdastiloissa	8
2.4	Puhtausasteen monitorointi ja kontaminaatiolähteet.....	10
2.5	Laminaarivirtauskaapit	12
3	ASEPTIIKKA, DESINFEKTIO, STERILOINTI JA STERILOINTIPAKKAUKSET.....	13
3.1	Alkoholit.....	14
3.2	Autoklaavaus eli höyrysterilointi	15
3.3	Sterilointipakkaukset	16
3.4	Paperi-laminaattipussien sulkeminen	18
3.5	Paperi-laminaattipussien varastointi ja säilytys.....	18
4	PARTIKKELIT JA MIKROBIT	20
4.1	Bakteerit	20
4.2	Sienet	21
4.3	Mikrobien osoittaminen	21
5	TUTKIMUKSELLINEN OPINNÄYTETYÖ	24
6	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET.....	25
7	OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	26
7.1	Työssä käytettävät kasvatusalustat, näytteenotto- ja viljelymenetelmät.....	26
7.2	Käytännön prosessi	27
7.3	Huomioitavat virhelähteet.....	33
8	TULOKSET JA TULOSTEN ARVIOINTI	34
9	POHDINTA.....	36
9.1	Eettiset kysymykset	38
9.2	Opinnäytetyön merkitys.....	40
	LÄHTEET	41
	LIITE 1. NÄYTTEENOTTO-OHJE	46
	LIITE 2. KÄYTETYT LAITTEET JA VÄLINEET.....	48

1 JOHDANTO

Puhdastila on ympäristö, jossa olosuhteet ovat kontrolloidut tarkasti hiukkasten määrän, ilman lämpötilan, kosteuden ja ilmanpaineen osalta. Puhdastilassa käytettävät materiaalit valikoidaan niin, etteivät ne aiheuta kontaminaatioita puhdastiloihin. Materiaalien kuljetus puhdastiloihin tapahtuu sulkutilojen kautta, jolloin tarkoitus on estää ilmapirtauksien pääsy likaisista tiloista puhdastiloihin. Puhdastilatyöskentelyssä käytettävät välineet ovat steriilejä tai tehdaspuhtaita. Puhdastilaan vietävät materiaalit desinfioidaan suihkuttamalla niiden suoja- tai sterilointipakkaus kauttaaltaan alkoholiliuoksella ennen sulkutilaan vientiä. (Rajala 2007, 9.)

Puhdastiloihin tuotuja materiaaleja, joiden pakkaus on alkoholikäsitelty, säilytetään yleensä GMP (Good Manufacturing Practice) – luokituksen mukaisissa D-luokan tiloissa. Autoklavoitujen materiaalien on arveltu pysyvän steriilinä pakkauksessaan yhdestä kuukaudesta yhteen vuoteen pakkausmateriaalista riippuen. (Lax ja Mikkola 2007, 80.) Tuon ajan jälkeen tuote on poistettava pakkauksestaan ja autoklavoitava uudestaan uudessa pakkauksessa, jotta se voidaan ottaa käyttöön puhdastiloissa.

Tutkimuksellisen opinnäytetyön toimeksiantajana oli Savon ammatti- ja aikuisopiston Puhdastilakoulutuskeskus ja tutkimus tehtiin Savonia-ammattikorkeakoulun laboratoriotiloissa. Opinnäytetyömme tarkoituksena oli selvittää mikrobiologisella viljelymenetelmällä autoklaavipusseissa steriloitujen tuotteiden steriilinä pysymistä alkoholikäsitteilyn ja eripituisten säilytysaikojen jälkeen. Tavoitteenamme oli autoklaavipusseissa steriloitujen tuotteiden steriiliyttä tutkimalla selvittää vaikuttaako alkoholikäsitteily autoklaavipusseihin niin, että materiaalit autoklaavipussien sisällä kontaminoituvat säilytyksen aikana. Tavoitteenamme oli myös selvittää, kuinka kauan autoklaavipusseissa steriloidut välineet säilyvät steriileinä alkoholikäsitteilyn jälkeen. Omana henkilökohtaisena tavoitteenamme oli toteuttaa opinnäytetyö, jolla olisi uutuusarvoa, ja jonka avulla kasvattaisimme omaa tietämystämme ja ammattitaitoamme. Opinnäytetyöstämme saadut tulokset menevät toimeksiantajallemme opetuskäyttöön oheismateriaaliksi.

2 PUHDASTILA

Puhdastila on kontrolloitu ympäristö, jossa ilman partikkelien konsentraatiolle on määritetty spesifiset rajat (McFadden 2014). Partikkeli tai hiukkanen on kiinteä tai nestemäinen kohde, joka on kooltaan 1 nm:stä 100 µm:iin. Partikkelit voivat olla eläviä tai elinkyvyttömiä. (Cleanrooms and associated controlled environments 2015; Puhdastilat ja puhtaat alueet 2008.) Puhdastiloja käytetään tyypillisesti herkkien hieno-elektroniikkaosien ja analyyttorien valmistuksessa, lääketuotannossa sekä mikrobiologisissa ja molekyylibiologisissa määrityksissä (Friman ja Kivisalmi 2015, 64).

Ilmassa esiintyvät partikkelit kontaminoivat puhdastiloja ja erilaisia partikkeleita tulee puhdastilan ilmaan tilassa olevista ihmisistä, prosessin suorituksesta sekä työtiloissa käytettävistä työvälineistä ja laitteista. Ilman puhtauden säilymiseksi on näitä kontaminanteja poistettava jatkuvasti. Standardeissa on määritetty, mille tasolle nämä partikkelit on vaadittu poistettavan. (McFadden 2014.) Ainoa keino estää kontaminaatioita on kontrolloida koko ympäristö. Ilman puhtauteen voidaan vaikuttaa käyttämällä erikoisfilttereitä, kuten HEPA-suodattimia, sekä kontrolloimalla ilmavirtausta ja sen suuntaa, ilmanvaihtoa, ilmanpainetta, lämpötilaa ja kosteutta. Lisäksi kaikki puhdastilan puhtautta uhkaavat kontaminaatiolähteet eliminoidaan, jos vain mahdollista. (Friman ja Kivisalmi 2015, 64; McFadden 2014.)

Puhdastilojen puhtautta voidaan luokitella kahdella eri standardilla: EN ISO 14644-1-standardilla ja GMP-luokituksella. Tässä työssä käsittelemme vain GMP-luokitusta, koska toimeksiantajamme Savon ammatti- ja aikuisopiston Puhdastilakoulutuskeskuksen puhdastilat ovat GMP-luokituksen mukaan standardoitu.

2.1 Puhdastilaluokat

Puhdastilat on luokiteltu niiden puhtausvaatimusten mukaan eri luokkiin. GMP, eli Guidelines to Good Manufacturing Practice, ohjaa lääkkeiden valmistukseen liittyvää puhdastilaluokitusta. GMP:n mukaan puhdastilat jaetaan neljään eri luokkaan, jotka ovat A, B, C ja D. (Friman ja Kivisalmi 2015, 64; Manufacture of sterile medicinal products 2008.)

A-luokka on puhtain, joten siinä on korkeimmat vaatimukset ilmassa olevien partikkelien määrälle. A-luokan tilassa työskentely tapahtuu yleensä laminaarivirtauskaapissa, joka suojaa työntekijän ja työkohteen ristikontaminaatiolta. B-luokan tiloja käytetään yleensä aseptisten työtehtävien valmisteluun. C- ja D-luokan tiloja käytetään erilaisissa teknisissä tehtävissä, kuten välinehuollossa. (Friman ja Kivisalmi 2015, 64, 65, 70; Manufacture of sterile medicinal products 2008.)

TAULUKKO 1. GMP-luokituksen mukaisten puhdastilojen partikkelirajat. (Manufacture of sterile medicinal products 2008.)

Grade	Maximum permitted number of particles per m ³ equal to or greater than the tabulated size			
	At rest		In operation	
	0.5 µm	5.0µm	0.5 µm	5.0µm
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	Not defined	Not defined

Taulukko 1 kuvaa GMP-luokituksen mukaisten puhdastilojen partikkelirajoja. Luvut kuvaavat ilmassa leijuvien partikkelien suurinta sallittua määrää kuutiometrissä huoneilmaa. Taulukkoon on eritelty enintään 0,5 µm ja 5 µm suuruisten partikkelien rajat. Levossa ja käytössä oleville puhdastiloille on asetettu myös omat rajansa. (Manufacture of sterile medicinal products 2008.)

GMP:n puhtausluokitukset on tehty EN ISO 14644-1 standardissa määriteltyjen puhtausvaatimusten mukaisesti. A-luokan ilman partikkelien luokitus on verrannollinen ISO 4.8 luokkaan, joka rajoittaa partikkelien koon $\geq 5,0$ µm. B-luokan tiloissa, kun tilaa ei käytetä, partikkelien luokitus on verrannollinen ISO 5 luokkaan molempien partikkelikokojen kohdalla. C-luokan tilojen ilman partikkelimäärät ovat verrannollisia ISO 7 ja 8 luokkiin silloin, kun tila ei ole käytössä tai silloin, kun siellä työskennellään. D-luokan partikkelien määrän luokitus silloin, kun tila ei ole käytössä, on verrannollinen ISO 8 luokkaan. (Manufacture of sterile medicinal products 2008.)

2.2 Puhtaustestit

GMP:n mukaisten puhdastilojen mikrobiologista puhtautta tulee säännöllisesti tarkkailla erilaisin puhtaustestein, koska puhdastiloissa tehdään aseptisia menetelmiä vaativia työtehtäviä. Puhtautta testataan yleensä mikrobiologisin menetelmin pinoilta, ilmasta ja puhdastilan työntekijöistä. Pintoja ja ihmisiä voidaan testata kontaktimaljoilla tai pintasivelynäytteitä viljelemällä. Ilman puhtautta voidaan tutkia laskeumamaljoilla tai impaktorilla. (Manufacture of sterile medicinal products 2008.)

TAULUKKO 2. Mikrobikontaminaatorajat eri GMP -puhdastilaluokissa. (Manufacture on sterile medicinal products 2008.)

Grade	Recommended limits for microbial contamination (a)			
	air sample cfu/m ³	settle plates (diameter 90 mm) cfu/4 hours (b)	contact plates (diameter 55 mm) cfu/plate	glove print 5 fingers cfu/glove
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Taulukossa 2 on suositellut rajat mikrobikontaminaatioille eri GMP -puhdastilaluokissa. Puhtautta testataan ilmanäytteillä, laskeumamaljoilla, kontaktimaljoilla ja käsi-neistä otettavilla kosketusnäytteillä. Cfu (colony forming unit) tarkoittaa pesäkkeitä muodostavaa yksikköä. (Manufacture of sterile medicinal products 2008.)

2.3 Perustoteutusratkaisut puhdastiloissa

Puhdastila on eristetty täysin muusta ympäristöstä ja sinne on luotu jatkuva ylipaine, jotta ympäröivien tilojen ilman virtaaminen puhdastilaan ja tätä kautta tapahtuva ilman kontaminaatio saadaan estetyksi. Poikkeuksena on kuitenkin sytostaattien valmistukseen käytettävät puhdastilat, jolloin sytostaattien ei haluta virtaavan puhdastiloista muualle ympäristöön. (Friman ja Kivisalmi 2015, 65.)

Puhdastilailman partikkelimäärä pidetään matalana kuljettamalla partikkelit tilasta pois liikuttamalla hienosuodatettua ja lopuksi HEPA-suodatettua ilmaa suurina tilavuuksina. Puhdastiloissa voidaan käyttää joko turbulenttivirtausta tai laminaarivirtausta. Turbulenttivirtauksessa tilan tulo- ja poistoilmaa liikutetaan niin, että syntyy

turbulentteja virtauksia eli pyörteitä. Tämä estää tehokkaasti katvekohtien muodostumisen. Laminaarivirtauksella puhdas tuloilma johdetaan katosta alaspäin virtavii-
vaisesti ja ilma poistuu lattian rajasta. (Friman ja Kivisalmi 2015, 65 - 66.)

Puhdastilan ilman laatuun vaikuttavat ilman puhtaus, kosteus ja lämpötila sekä painetaso. Myös puhdastiloissa käsiteltävät materiaalit, pinnat ja työntekijät vaikuttavat osaltaan ilman puhtauteen, minkä vuoksi joissain puhdastiloissa on voitu rajoittaa samaan aikaan työskentelevien henkilöiden lukumäärää. Kalusteiden järjestys suunnitellaan aina niin, etteivät ne muodosta ilmavirtaukseen esteitä ja katvekohtia. Puhdastiloihin vietävän materiaalin määrä ja laatu ovat myös tarkoin suunniteltua. (Friman ja Kivisalmi 2015; 65.)

Kuvassa 1 on esimerkkinä Savon ammatti- ja aikuisopiston Puhdastilakeskuksen puhdastilojen tilaratkaisu. Tilaan kuljetaan ja sieltä poistutaan luokittelemattoman F-tilan kautta.



KUVA 1. Esimerkki puhdastilojen tilaratkaisusta. Puhdastiloihin mennään luokittelemattoman huoneen (F-tilan) kautta, jonka kautta myös poistutaan puhdastiloista. (Puhdastilakoulutuskeskus 2015.)

2.4 Puhtausasteen monitorointi ja kontaminaatiolähteet

Puhdastilojen puhtautta monitoroidaan mittaamalla ilmassa esiintyvien partikkelien konsentraatiota, sillä puhdastilan kontaminaatiot johtuvat yleisimmin ilman partikkelilaskeumista. Partikkeleita syntyy puhdastiloihin siellä työskentelevistä ihmisistä, laitteista, kemiallisista prosesseista, kuten esimerkiksi syöpymisestä tai pintojen hiertymisestä. Toiminnan laatuun vaikuttaa henkilöiden lukumäärä, vaatetus ja toiminnan järjestely sekä kurinalaisuus, puhdistusjärjestelmä ja sen toiminta sekä partikkelien koko. Kaikkialla ilmassa on kontaminanteja, joita ihmiset ja liikuteltavat pinnat ja materiaalit voivat levittää. Nämä partikkelit voivat kantaa mukanaan myös mikrobeja. Puhdastilan käyttötarkoitus määrittää sallitun laskeumapartikkelien määrän, joten partikkelien määrää monitoroidaan tästäkin syystä tarkasti. Pienin kriittinen partikke-

likoko on määritetty puhdastiloissa käsiteltävän tuotteen funktion ja rakenteen mukaisesti. Partikkelit voivat siirtyä kontaminoituneilta pinnoilta tuotteen pinnalle tai laskeumina ilmasta. (Agricola 2014, 6 - 7.)

ISO 14644-1 standardi määrittää ehdot tuotteiden kontaminaatoriskin ja ilmanlaadun kontrolloinnille (Agricola 2014, 7; Cleanrooms and associated controlled environments 2015). Ilman puhtautta voidaan kontrolloida käyttämällä partikkelilaskureita, jotka mittaavat ilman partikkelien konsentraatiota. Sellaisissa puhdastiloissa, joissa ihmiset työskentelevät, on pinnoilta löydetty 10–500 µm:n suuruisia partikkeleita. Näistä partikkeleista varsinkaan suurimpia ei ole havaittu partikkelimittareilla. Syynä voi olla partikkeleiden matala konsentraatio tai sijainti näyteputkissa puhdastiloihin tuotaessa. Pintojen puhtaudesta on säädetty ISO 14644-9 standardissa. (Agricola 2014, 7; Cleanrooms and associated controlled environments 2013.)

Partikkelit voivat kiinnittyä puhdastilojen pinnoille monilla eri mekanismeilla. Yleisin mekanismi on painovoima. Muita mekanismeja ovat elektrostaattinen vetovoima, diffuusio ja lämpöforeesivaikutus. 5 µm:ä pienemmät partikkelit sekoittuvat puhdastilan ilmaan ja poistuvat poistoilman mukana. 25 µm:ä suuremmat partikkelit voidaan poistaa ainoastaan puhdistamalla puhdastilojen pintoja, sillä painovoiman vaikutuksesta ne kerääntyvät horisontaalisille pinnoille. (Agricola 2014, 7.)

Ihmisten ja laitteiden toiminnan vaikutus on tärkeää huomioida puhdastilan partikkelimittauksissa. Laitteiden ollessa päällä ne levittävät partikkeleita ympäristöön. Ihmiset levittävät partikkeleita ihostaan sekä suojavaatetuksestaan. Ihmisen aktiivisuus sekä vaatteiden okklussiivisuus eli tukkeutuminen vaikuttavat merkittävästi partikkelien leviämiseen, ja se määrittää hyvin pitkälti partikkelien laskeumamäärän useimmissa puhdastiloissa. Puhdastilan ollessa poissa käytöstä, kun puhdastilassa ei ole työskenteleviä ihmisiä ja käynnissä olevia koneita, tippuu yli 5 µm suuruisten partikkelien määrä nopeasti lähelle nollaa eikä laskeumapartikkelienkaan määrä ole merkittävä. Täten vain käytössä olevan puhdastilan partikkelimittaus ja tarkkailu ovat suositeltavia toteuttaa. (Agricola 2014, 8.)

2.5 Laminaarivirtauskaapit

Laminaarivirtauskaappia eli luokan II biologista suojakaappia käytetään, kun työntekijä sekä käsiteltävä materiaali halutaan suojata ja välttää ristikontaminaatioiden syntyminen (Smith 2012; Friman ja Kivisalmi 2015, 70). Laminaarivirtauskaappia käytetään erityisesti silloin, kun materiaali vaatii steriilin tai partikkelivapaan ympäristön (Smith 2012). Laminaarivirtauskaapeissa käytetään HEPA-suodattimia (High-efficiency particulate air filters) ilman steriloinnissa ja partikkelien poistossa (Smith 2012; Friman ja Kivisalmi 2015, 71). Laminaarikaapin ilmasta noin neljäsosa poistuu HEPA-suodattimien kautta, jonka tilalle se ottaa kiertoan korvausilmaa työtason eturitulän kautta suojakaapin alapohjaan. Sieltä ilma päätyy edelleen kiertoan muun ilman kanssa. Tällä tavoin laminaarikaapin työaukkoon muodostuu ilmaverho, joka estää kaapissa olevan ilman ulospääsyn. HEPA-suodatettu ilma johtuu kaapin työskentelytilaan kaapin yläosasta. Tällöin kaapin sisäinen ilmavirta on suoraan ylhäältä alaspäin. Laminaarikaapin työskentelytasolla olevan ritilän päällä ei saa säilyttää tavaroita. (Friman ja Kivisalmi 2015, 71.)

3 ASEPTIIKKA, DESINFEKTIO, STERILOINTI JA STERILOINTIPAKKAUKSET

Aseptiikalla tarkoitetaan sellaisia toimia, joilla pyritään ehkäisemään mikrobien leviäminen ja infektioiden syntyminen. Aseptisella työjärjestyksellä tarkoitetaan sitä, että kaikki työtoiminta suunnitellaan huolellisesti ja järjestelmällisesti toteutettavaksi niin, että työsuunta menee aina puhtaimmasta työvaiheesta likaisempaan työvaiheeseen. (Friman & Kivisalmi 2015, 168.) Aseptiikkaan kuuluu myös aseptinen omatunto, joka tarkoittaa sitoutumista aseptisiin työtapoihin riippumatta muiden työntekijöiden valvonnasta (Karhumäki, Jonsson ja Saros 2016, 64).

Desinfektiolla on tarkoitus tappaa tai poistaa patogeeniset mikrobit tai vähentää niiden kykyä aiheuttaa tauteja. Desinfektio voidaan kohdistaa esineisiin, ihoon tai limakalvoon. Desinfektio ei kuitenkaan tuhoa kaikkien bakteerien itiöitä. (Lax & Mikkola 2007, 45.) Mikrobien herkkyys desinfektiomenetelmille vaihtelee paljon. Desinfektiomenetelmiä ovat fysikaaliset ja kemialliset menetelmät. Fysikaalisia menetelmiä ovat lämpö eri muodoissa, suodatus, mikroaallot, säteily tai UV-valo. (Ratia, Vuento & Laitinen 2010a, 522 – 529.) Kemiallisia menetelmiä käytetään, kun materiaali ei kestä suurta lämpötilaa tai kosteuspitoisuutta (Friman ja Kivisalmi 2015, 323, 356). Kemiallisia menetelmiä ovat muun muassa aldehydit, alkoholit ja halogeenit. Desinfektiomenetelmien kyky tuhota mikrobeita riippuu lämpötilasta, vaikutusajasta tai kemiallisen aineen laadusta. (Ratia, Vuento & Laitinen 2010b, 510 – 511; Ratia ym. 2010a 522 - 529.)

Sterilointia käytetään mikrobien poistamiseen tai tuhoamiseen. Steriilissä ympäristössä tai välineessä ei käytännössä ole lainkaan elinkykyisiä mikrobeja. SFS-EN 556 standardissa määritetään, että elinkykyisten mikrobien esiintymisen todennäköisyys saa olla korkeintaan yhden suhde miljoonaan eli 1:1 000 000, jotta steriloitujen tuotteiden vaatimukset täyttyvät ja tuotteen voi merkitä steriiliksi. (Friman ja Kivisalmi 2015, 322; Lax ja Mikkola 2007, 83.) Sterilointivaatimusten suunnittelussa on otettu huomioon kestävimpien mikrobien tuhoutuvuus (Lax ja Mikkola 2007, 83).

3.1 Alkoholit

Alkoholit ovat orgaanisia aineita. Niiden hiilivetyketjuun on kiinnittynyt yksi tai useampi hydroksyyli-ryhmä (-OH). Alkoholien nimen päätteenä on aina oli-pääte, esimerkiksi etanoli. (Saksala ja Somerharju 2015, 194.) Monilla alkoholeilla on antimikrobinen vaikutus. Alkoholit tappavat yleensä nopeasti eläviä bakteereita ja sieniä eli ne ovat mikrobisidisia. Alkoholit eivät kuitenkaan tapa itiöllisiä mikrobeja. (Ratia ym. 2010a, 528.)

Alkoholien teho perustuu siihen, että ne denaturoivat eli hajottavat nopeasti valkuaisaineita sekä liuottavat lipidejä. Alkoholi ei tee eroa valkuaisaineiden välillä, vaan se kiinnittyy kaikkeen ja denaturoi. Denaturointi on nopeampaa, jos liuoksessa on mukana myös vettä. Selityksenä lienee se, että alkoholi-vesiseos nopeuttaa membraanituhoa, proteiinien denaturaatiota sekä häiritsee solun metaboliaa. Tämän vuoksi 100-prosenttinen etanoli on heikompi tappamaan mikrobeja kuin 70-prosenttinen. Optimaalinen konsentraatio alkoholille desinfektioaineena on 60 - 90 painoprosenttia. Alle 50-prosenttissä seoksessa teho on merkittävästi heikentynyt. (Ratia ym. 2010a, 528.)

Alkoholin desinfektiotehokkuuteen vaikuttaa myös näytteessä mahdollisesti olevat proteiinit. Tämän vuoksi alkoholit sopivat parhaiten esipuhdistettujen pintojen, ruostumattomien pintojen tai ihon desinfiointiin, koska alkoholit tunkeutuvat huonosti lian läpi. (Ratia ym. 2010a, 528.) Alkoholit vaikuttavat haihtuessaan, joten niiden vaikutusaika on niiden kuivumisaika (Lankinen ja Pentti 2008, 162). Alkoholeihin voidaan lisätä myös pinta-aktiivisia aineita, joiden avulla alkoholi pystyy vaikuttamaan orgaanisen materiaalin läpi ja tappaa siten mikrobit. Näitä alkoholeja voidaan käyttää myös lievästi likaantuneiden pintojen puhdistamiseen tai eritetahroihin, jotka on ensin imeytetty paperiin. Alkoholeja voidaan lisätä myös muihin desinfektioaineisiin, jolloin ne lisäävät desinfektio-tehoa. (Ratia ym. 2010a, 528.)

Varsinaisina desinfektioaineina vain etanolilla ja isopropanolilla on käytännössä merkitystä. Etyylialkoholi eli etanoli vaikuttaa tehokkaasti bakteerien ja sienien lisäksi myös viruksiin, sillä se tappaa virukset jo minuutissa. Isopropanoli ei ole yhtä tehokas tappamaan viruksia, sillä se vaikuttaa vain lipidipitoisiin viruksiin. (Ratia ym. 2010a,

528.) Etanoli on myös hyvä liuotin, sillä se liukenee hyvin veteen sekä orgaanisiin liuottimiin (Saksala ym. 2015, 195).

3.2 Autoklaavaus eli höyrysterilointi

Autoklaavaus on fysikaalinen sterilointimenetelmä, jonka periaatteena on höyrysterilointi. Se on välinehuollossa paljon käytetty menetelmä, koska se on tehokas eikä siinä tarvita ympäristölle haitallisia kemikaaleja. Höyrysteriloinnissa varsinainen sterilointi tapahtuu ylipaineessa toisin kuin muissa sterilointimenetelmissä. (Friman ja Kivisalmi 2015, 323; Lax ja Mikkola 2007, 85.) SFS-EN 285 säättää erilaisia sterilointilaitteita koskevista normeista. Sen mukaan höyrysterilointilaitteen rakennemateriaalin on kestävä höyry ja lauhde, eivätkä ne saa heikentää höyryn laatua tai vapauttaa haitallisissa määrin myrkyllisiä aineita. (Lax ja Mikkola 2007, 85; Sterilization 2015.)

Autoklaavissa voidaan steriloida kiinteitä ja vesipitoisia nestemäisiä materiaaleja, jotka kestävät kosteutta, korkeita lämpötiloja sekä painenvaihtelua. Autoklaavaukseen sopii esimerkiksi metalliset, lasiset ja muoviset työvälineet, tekstiilit, elatusaineet sekä laimennusvedet. Epäsopivia aineita ovat rasvat, veteen liukenevat kiinteät aineet ja orgaaniset liuottimet. (Friman ja Kivisalmi 2015, 324; Lax ja Mikkola 2007, 83.)

Höyrysteriloinnin tehokkuus perustuu ylipaineeseen, kylläiseen ja kuumaan vesihöyryyn sekä niiden vaikutusaikaan, jotka saadaan aikaan sulkemalla kiehuva vesi tiiviiseen tilaan ja jatkamalla keittämistä. Veden kiehumisesta muodostuu vesihöyryä. Kaasumaisessa olomuodossa olevat vesimolekyylit eivät pääse karkaamaan ja törmäilevät toisiinsa, josta seuraa paineen sekä lämpötilan nousu. Lämpötila nousee sitä korkeammalle mitä voimakkaampaa hiukkasten liike on. Kyllästetty vesihöyry siirtää lämpönsä steriloitavan välineen pintaan, jolloin väline lämpenee kauttaaltaan. (Friman ja Kivisalmi 2015, 324; Lax ja Mikkola 2007, 85.)

Vedellä on suuri ominaishöyrystyslämpö. Se tarkoittaa energiamäärää, joka tarvitaan höyrystämään yksi mooli ainetta höyrystyslämpötilassa normaalipaineessa. Normaalipaine on 101300 Pascalia, joka on yhtä kuin 1,01300 baaria. Veden ominaishöyrystyslämpö on noin 2256 kJ/kg, kun esimerkiksi asetonilla se on 523 kJ/kg.

Energian häviämättömyyden lain mukaan energia ei koskaan häviä, mutta se voi muuttaa muotoaan. Muuttaessamme yhden kilogramman verran vettä kaasumaiseen olomuotoon, tarvitaan 2256 kJ energiaa. Vesihöyryn taas tiivistyessä nestemäiseen olomuotoon, vapauttaa se taas 2256 kJ energiaa. Tätä ilmiötä hyödynnetään steriloinnissa: kun vesihöyry tiivistyy steriloitavan välineen pinnalle, kohdistuu siihen suuri lämpövaikutus vesihöyryn lämpöenergian avulla. Kun mikrobien, vesimolekyylien ja lämpötilan kontaktaika on ollut riittävän pitkä, mikrobien biomolekyylit denaturoituvat ja menettävät toimintakykynsä lämpötilan vaikutuksesta. (Friman ja Kivisalmi 2015, 324 - 326.)

3.3 Sterilointipakkaukset

Erilaisten sterilointipakkausten tarkoituksena on suojata tuotteita kontaminoitumiselta ennen käyttöä. Steriloitavat välineet, joita säilytetään tai varastoidaan ennen käyttöä, pakataan aina ennen sterilointiprosessia omiin pakkauksiinsa. Pakkausmateriaaleja on sekä kerta- että kestäkäyttöisinä. Pakkausmateriaalin valintaan vaikuttavat muun muassa käytettävä sterilointimenetelmä, steriloitavat välineet sekä toivottu säilyvyysaika. (Töytäri ja Hirvonen 2008, 189.) Höyryautoklaavissa voidaan käyttää paperi-laminaattia, paperia, kontainereita eli sterilointisäiliöitä, joissa on suodatin tai erilaisia sterilointikääreitä, kuten kreppiä ja kuitukankaita. Olennainen ominaisuus pakkausmateriaalin soveltuvuudelle on ilman ja vesihöyryn läpäisevyys. (Lax ja Mikkola 2007, 73 - 74.)

SFS-EN ISO 11607-1 standardi määrittää pakkausmateriaaleja koskevat vaatimukset. Sen mukaan sterilointipakkauksen on sovelluttava pakattavalle tuotteelle ja valittuun sterilointimenetelmään sekä sen on taattava hyvä bakteerisuoja steriloidulle välineelle. Materiaalin on oltava kestävä sekä vettä ja kosteutta hylkivää, jottei se rikkoutu autoklaavauksen aikana. Materiaalin on oltava helposti käsiteltävää pakkausvaiheessa, siinä ei saa olla mikrobeikiä ja sen on auettava niin, että välineen aseptinen käyttöönotto on mahdollinen. Materiaali ei saa sisältää myrkkijä ja sen on oltava nukkaamatonta ja pölyämätöntä. Materiaalin on oltava taloudellista ja ympäristöystävällistä ja pakkaukset on merkittävä asianmukaisella tavalla. (Töytäri ja Hirvonen 2008, 189 - 190.)

Työssämme käytetyt sterilointipakkaukset ovat paperi-laminaattipusseja, joita käytetään yksittäisten ja pienten instrumenttien pakkaamiseen. Paperi-laminaattipusseille on eurooppalaiset standardit, jossa on määritelmät laatuvaatimuksista. EN 868-5 standardissa on vaatimuksia paperi-laminaattipussiin merkittävistä tiedoista. Näitä ovat eränumero, valmistajan nimi tai kaupp nimi, aukaisusuunta, kokokoodi, prosessi-indikaattori ja varoitus vahingoittuneen pakkauksen käyttämisestä. Pakkausmerkintöjen painoväri ei saa olla kontaktissa pakattavan materiaalin kanssa. Tästä syystä myös tarvittavat muut merkinnät on tehtävä pakkauksen ulkopuolelle. (Lax ja Mikkola 2007, 74; Pakattuina steriloitujen terveydenhuollon laitteiden ja tarvikkeiden pakkaukset 2009.) Paperi-laminaattipussit tulee olla saumatut yhteen kolmelta sivulta ja neljännellä sivulla voi olla alue, jonka kohdalta pussi suljetaan. Näiden saumojen pitää olla leveydeltään vähintään kuusi millimetriä. Valmistajan on myös toimitettava ohjeet suositeltavista saumaus- ja sulkemisolosuhteista. (Pakattuina steriloitujen terveydenhuollon laitteiden ja tarvikkeiden pakkaukset 2009.)

SFS-EN 868-5 standardi asettaa vaatimukset myös laminaatille. Laminaatin kerroksista puhutaan kalvoina, joita standardin mukaan tulee olla vähintään kaksi kerrosta ja niiden tulee pysyä kiinni toisissaan. (Lax ja Mikkola 2007, 74; Pakattuina steriloitujen terveydenhuollon laitteiden ja tarvikkeiden pakkaukset 2009.) Käytössä 5-kerroksinen laminaatti on suositelluinta, sillä se on kestävä ja ehkäisee täten hyvin mikrobeikien syntymistä, avautuu hyvin sekä on helppo saumata (Lax ja Mikkola 2007, 74). Laminaatti ei saa vaihtaa väriä sterilointiprosessin aikana, eikä siitä saa irrota haitallisia määriä myrkyllisiä aineita. Laminaatille voi tapahtua kiteytymistä esimerkiksi saumaamisen ja steriloinnin aikana. Mitä vähemmän tätä kiteytymistä tapahtuu, sitä vahvempaa ja elastisempaa laminaatti on ja näin ollen riski laminaatin repeytymiselle on pienempi. EN 868-3 standardissa on määritetty laatuvaatimukset paperille. Paperin tulee olla pitkäkuituista, happivalkaistua, konekiillotettua erikoislaatua ja suunniteltu lääketieteelliseen käyttöön. Paperin on oltava huokoista, jotta steriloiava aine pääsee pakkauksen sisään ja ilma poistuu pakkauksesta. Ilman läpäisevyydelle ja paperin puhtaudelle, lujuudelle ja vesitiiviydelle on tarkat määritelmät standardissa. (Lax ja Mikkola 2007, 74; Packaging for terminally sterilized medical devices 2009.)

3.4 Paperi-laminaattipussien sulkeminen

Paperi-laminaattipusseja on kahdella eri kiinnityksellä varustettuja. Tehdasvalmisteisissa sterilointipusseissa on saumat, avaussuuntamerkinnet sekä avausta helpottavat sormilovet. Sauman leveys ja mahdolliset urat, joita yleensä on kolme, vaikuttavat pakkauksen lujuuteen ja avautuvuuteen. Tehdasvalmisteisten sterilointipussien lisäksi on teippikiinnityksellä suljettavia pusseja. (Lax ja Mikkola 2007, 74 - 75.) Tehdasvalmisteisilla paperi-laminaattipusseilla on monia hyviä ominaisuuksia. Niitä on nopea valmistaa sekä helppo avata ja säilyttää. Steriloitavalle välineelle valitaan riittävän suuri sterilointipussi, tai sopivan kokoinen pala leikataan sterilointipussirullasta. Välineitä ei tule pakata liian suuriin, muttei liian pieniinkään pusseihin. Turhan pieni pussi voi rikkoutua herkemmin sterilointiprosessin aikana, kun taas liian isoon pussiin pakattua välinettä voi olla vaikea ottaa ulos pakkauksestaan aseptisesti. Steriloitavat välineet tulee pakata avaussuuntamerkin mukaisesti oikein päin. Ennen pussin sulkemista ilma poistetaan pakkauksen sisältä. Pakkausta ei saa taittaa, sillä se voi vaurioittaa paperi-laminaattipussia. Paperi-laminaattipussin ohjeellinen saumauslämpötila on 155 - 180 °C:ttä. Kuumasaumauksessa laminaatin ja paperipinnan kiinnittymiseen ja saumautumiseen vaikuttavat lämpötilan lisäksi paine sekä aika. Jokaisen pakkauksen sauma tulee aina tarkistaa. Pakkaus saumataan uudelleen, mikäli siinä ilmenee virheitä: sauma voi olla heikko, ryppyinen, siinä on aukkoja, laminaatissa näkyy kuplia tai sauman leveys ei ole oikea. Sauman laatua tulee seurata myös sterilointiprosessin jälkeen esimerkiksi koepussien avulla, joista tutkitaan sauman avautuvuus. Sauma on liian tiukka, jos saumaa avattaessa paperikuitu repeää tai kalvo repeää saumauksen reunasta alkaen. (Töytäri ja Hirvonen 2008, 198 - 199.)

3.5 Paperi-laminaattipussien varastointi ja säilytys

Aseptiikan huomioiminen paperi-laminaattipussien varastoinnissa on hyvin tärkeää. Tähän vaikuttavat tuotteiden varastointi ja käyttäminen käyttöikäjärjestyksessä sekä käyttäjien aseptinen työskentely. Paperi-laminaattipusseja ei saisi säilyttää suoran valon lähietäisyydellä. Varsinkin loisteputkivalojen on todettu muuttavan indikaattorien värikoodeja ja haurastuttavan pakkausmateriaaleja. Ovelliset kaapit ovat suosituimpia säilytyspaikkoja esimerkiksi avohyllyjen sijaan. (Töytäri 2008, 192 - 193.) Paperi-laminaattipusseja tulee säilyttää tasaisessa lämpötilassa ultraviolettivalolta

suojattuna laminaattipuoli alaspäin. Säilytyslämpötilan tulee olla 18 – 24 °C ja kosteuden 40 - 60 prosenttia. Pusseja pitäisi varastoida alkuperäispakkauksissaan, sillä niistä ilmenee valmistajan antamat tiedot, kuten parasta ennen -merkinnät. Pussin sivusaumassa on eräkoodi, jonka kirjainkoodi kertoo valmistusvuoden ja numerokoodi valmistuskuukauden. Tehdasvalmisteisen paperi-laminaattipussin säilyvyys on viisi vuotta, mikäli säilytyspakkaus on ehjä ja säilytysolosuhteet oikeat. Lisäksi on myös teippikiinnityksellä suljettavia pusseja, joiden säilyvyys on vastaavasti kaksi vuotta. Saumattavat paperi-laminaattipussit suljetaan kuumasaumaimella, jonka lämpötila on 155 – 180 °C. Kuumasaumaimella suljettaessa paperi-laminaattipussin säilymisaika on siis pidempi, kuin teippikiinnitteisellä pussilla. Sterilointiprosessin lämpökäyneillä pakkauksilla on eri säilyvyysajat kuin käyttämättömillä. Kuumasaumatun paperi-laminaattipussin säilytysaika on kuusi kuukautta, kun taas teippikiinnitteisen pussin vain neljä viikkoa. (Lax ja Mikkola 2007, 74 - 75, 77.)

4 PARTIKKELIT JA MIKROBIT

Partikkeli tai hiukkanen on kiinteä tai nestemäinen kohde, joka on kooltaan 1 nm:stä 100 µm:iin. Partikkelit voivat olla eläviä tai elinkyvyttömiä. (Cleanrooms and associated controlled environments 2015; Puhdistilat ja puhtaat alueet 2008.) Mikrobit ovat pieneliöitä, joita ei näe paljaalla silmällä. Mikrobit voidaan jakaa bakteereihin, viruksiin, sieniin eli homeisiin, hiivoihin sekä loisiin eli alkueläimiin. Homeiden ja hiivojen kasvustot on mahdollista erottaa paljainkin silmin. (Evira 2016.)

4.1 Bakteerit

Bakteerit ovat yksisoluisia mikrobeja, joita on kaikkialla elinympäristössämme. Bakteerit lisääntyvät jakautumalla kahtia ja niiden lisääntymisnopeus on riippuvainen ympäristöolosuhteista kuten kosteudesta, lämpötilasta ja happamuudesta. Parhaiten bakteerit lisääntyvät mahdollisimman kosteassa ja neutraalissa ympäristössä, jonka pH on 6 - 8. Jotkin bakteerit kykenevät muuttumaan huonoissa ympäristöolosuhteissa itiömuotoon, joka on niiden säilyismuoto. Itiösolut kestävät bakteerisoluja paremmin ympäristön erilaisia olosuhteita kuten kuumuutta, kuivuutta ja kemiallisia aineita. Suotuisissa olosuhteissa itiöt muuttuvat uudestaan jakautumiskykyisiksi bakteerisoluiksi. Itiöitä muodostavia bakteereita on erityisesti mullassa sekä vesistöissä. Itiöiden tuhoamiseen tarvitaan yli 100 °C:n lämpötila. (Evira 2016.)

Bakteereita jaetaan niiden lämmönsietokyvyn mukaan. Kylmiin olosuhteisiin sopeutuneet bakteerit ovat kutsumanimeltään psykrotrofeja ja ne lisääntyvät 0 - +20 °C:n lämpötilassa. Parhaiten ne lisääntyvät kuitenkin +20 - +25 °C:n lämpötilassa. Mesofiiliset bakteerit ovat bakteereita, jotka lisääntyvät parhaiten tasalämpöisten eläinten ja ihmisten elimistön lämpötilassa eli niiden normaali kasvulämpötila on +30 - +37 °C. Ne kykenevät myös lisääntymään +20 - +25 °C:n lämpötilassa kuten psykrofitkin. Lämpimiin olosuhteisiin sopeutuneita bakteereita kutsutaan termofiileiksi, jotka pystyvät lisääntymään +45 - +65 °C:n lämpötilassa. Bakteereita voidaan jakaa myös sen mukaan, tarvitsevatko ne happea vai ei. Happea tarvitsevia bakteereita kutsutaan aerobisiksi ja hapettomissa olosuhteissa eläviä bakteereita anaerobisiksi. On myös olemassa fakultatiivisesti kasvavia bakteereita, jotka kasvavat siis sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa. (Evira 2016.)

4.2 Sienet

Homeet eli sienet ovat mikrobeja, jotka kasvavat rihmastoina. Niiden lisääntyminen tapahtuu rihmaston kappaleiden ja itiöiden avulla. Homeiden ravinnoksi käy puu, paperi sekä kaikki elintarvikkeet. Homeiden kasvun edellytyksenä on ilman happi. Homesolut kasvavat parhaiten +20 - +45 °C:n lämpötilassa. Homeet ja niiden itiöt tuhoutuvat +70 - +80 °C:n lämpötilassa. Ympäristön suhteen homeet ovat vaatimattomia, koska ne pystyvät kasvamaan muun muassa kuivien elintarvikkeiden pinnoilla sekä happamissa olosuhteissa, sillä niille suotuisin kasvualueen pH on 3 - 5. (Evira 2016.)

Hiivat ovat yksisoluisia mikrobeja, jotka esiintyvät joskus epämääräisinä soluryhmityminä. Niiden lisääntyminen tapahtuu pääasiassa kuroutumalla, mutta myös kahtia jakautumalla. Lisääntyäkseen hiivat tarvitsevat sokereita ja happea, mutta ne pystyvät myös kasvamaan hapettomassa eli anaerobisessa ympäristössä. Hiivojen optimilämpötila kasvulle on +20 - +35 °C. Yli +45 °C:n lämpötilassa hiivasolut tuhoutuvat. Paras pH-arvo lisääntymiselle on 5, mutta ne pystyvät myös lisääntymään pH-alueella 3 - 8. Hiivat tarvitsevat homeita enemmän kosteutta. (Evira 2016.)

4.3 Mikrobien osoittaminen

Mikrobiologiassa bakteerien ja sienten osoittamisen standardimenetelmänä on bakteeriviljely. Bakteerit ja sienet tarvitsevat kasvaakseen ravinteita ja sopivan kasvuympäristön. Monet mikrobit käyttävät selviytyäkseen pienimolekyylisiä aineita, jotka ovat peräisin monimutkaisten ravinteiden entsyymaattisesta hajoamisesta. Liuosta, joka sisältää tällaisia ravinteita, kutsutaan viljelyalustaksi. Viljelyt tehdään siis alustoille, jotka sisältävät tarvittavia ravinteita ja esimerkiksi viljelyalustaa jähmettävää agaria. Agar on merilevästä peräisin oleva hiilihydraatti, joka muodostuu lähinnä galaktoosista eikä sillä ole ravintoarvoa. (Cappuccino & Sherman 2014, 1.) Mikrobiologisen työskentelyn onnistumisen edellytyksenä on steriiliys, siksi on tärkeää käyttää steriilejä työvälineitä ja hallita työskentelyssään aseptinen tekniikka (Cappuccino & Sherman 2014, 3). Työskenneltäessä tulee huomioida aseptisen tekniikan lisäksi aseptinen työjärjestys. Aseptisellä työjärjestyksellä tarkoitetaan työtappaa, jossa työ aloitetaan aina puhtaimmasta edeten kohti likaisinta kohdetta. Tarkoituksena on estää mikrobien siirtymistä puhtaammalle alueelle. (Friman & Kivisalmi 2015, 168.)

Viljelymaljat säilytetään jääkaapissa niin, että maljojen kansipuoli on alla ja agarmalja on kannen päällä. Viljelyt tehdään huoneenlämpöisille maljoille. Viljelymaljojen kansia ei saa pitää turhaan auki ja näytettä viljeltäessä ei saa puhua tai yskiä avonaista maljaa kohti kontaminaatioiden välttämiseksi. Viljellyt maljat asetetaan inkuboitumaan eli laitetaan lämpökaappiin jälleen kansipuoli alaspäin. (Hellstén 2005, 101 – 102.) Inkubointi tehdään yleensä kliinisten näytteiden kohdalla 35 - 37 °C:ssa tavalisessa tai CO₂-ympäristössä (Katila 2004, 353).

Mikrobiologisia näytteitä voidaan viljellä erilaisilla steriileillä välineillä kuten muovisilla viljelysauvoilla tai puutikuilla. Näytteitä viljeltäessä on tärkeää välttää kontaminaatioita. Eri viljelymenetelmillä voidaan saada maljalla kasvamaan yhtä bakteeria yksittäisinä pesäkkeinä tai voidaan määrittää maljalta bakteerien kokonaismäärää. Viljelyt täytyy tehdä steriloidussa ympäristössä ja esimerkiksi työalue puhdistetaan desinfiointiaineella kontaminaatoriskin vähentämiseksi. Steriilit välineet ja liuokset pyritään säilyttämään niin, että ne eivät ole kosketuksissa steriloiduttomien pintojen kanssa. (Sanders 2012.)

Bakteeripesäkkeet muodostuvat maljalle yhden lisääntymiskykyisen bakteerin jakautuessa sen miljooniksi jälkeläisiksi, jotka eivät pysty liikkumaan vapaasti kiinteällä elatusaineella. Eri bakteerit muodostavat maljalle erinäköisiä pesäkkeitä ja ne voidaan erottaa toisistaan. (Hellstén 2005, 95). Maljoissa käytettäviä elatusaineita voidaan muokata niin, että elatusaine tehdään jollekin tietylle mikrobiryhmälle edulliseksi tai valikoivaksi eli selektiiviseksi. Selektiivisyys saadaan aikaan lisäämällä elatusaineeseen kemikaaleja tai antimikrobeja, joilla voidaan ehkäistä muiden mikrobien kasvu. Elatusaineissa voidaan myös hyödyntää eri kemikaaleja indikaattoreina, jolloin eri bakteeriryhmät voidaan erottaa värireaktioiden perusteella toisistaan. (Katila 2004, 351).

Suurin osa viljelyistä tapahtuu agar-pohjaisilla alustoilla, joita suuremmat laboratoriot valmistavat itse. Myös valmiita kaupallisia maljoja on tarjolla. Valmistuksessa käytetään yleensä kaupallisia ravinnejauheita. Usein ravinnejauheita täydennetään ei-syntetisillä eläin- tai kasvisperäisillä ravinteilla kuten eläinverellä, joista lampaanveri on käytetyin verityyppi verimaljoissa. Veden laadulla on tärkeä merkitys elatusaineiden valmistuksessa. Elatusaineiden steriiliys on myös aina testattava. Lisäksi maljoja tes-

tataan niiden toimivuuden mukaan tietyillä bakteerikannoilla, joiden tulee kasvaa testattavassa elatusaineessa. Selektiiviset maljat testataan myös kannoilla, joiden ei kuuluisi kasvaa maljalla. Tällä varmennetaan maljan selektiivisyys. Elatusaineet otetaan käyttöön vasta testauksen jälkeen ja niitä voidaan käyttää ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka. (Katila 2004, 352).

Elatusaineet ja kasvatusalustat voivat olla myös mahdollinen kontaminaation lähde puhdastiloissa ja puhdastiloihin vietävät elatusaineet ja kasvatusalustat täytyy olla steriilejä. Elatusaineiden sterilointitapoja ovat muun muassa autoklavointi ja suodatus. Kaupallisia valmiita kasvatusalustoja käytettäessä on suositeltavaa, että puhdastiloihin vietävät kasvatusalustat, joilla testataan puhdastilojen mikrobiologista puhtautta, ovat säteilytettyjä. (WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories 2011).

5 TUTKIMUKSELLINEN OPINNÄYTETYÖ

Opinnäytetyömme on tutkimuksellinen ja tutkimuksen menetelmä pohjautui kvantitatiiviseen tutkimukseen. Kvantitatiivinen tutkimus on tilastollista tutkimusta, jonka avulla selvitetään lukumääriin ja prosenttiosuuksiin liittyviä kysymyksiä. Kvantitatiivisen tutkimuksen avulla saadaan yleensä selvitettyä olemassa oleva tilanne, mutta tutkimuksen avulla ei pystytä riittävästi selvittämään asioiden syitä. (Heikkilä 2014, 15.)

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa on keskeistä johtopäätöksien tekeminen aiemmista tutkimuksista, aiempien teorioiden huomiointi, hypoteesien esittäminen ja käsitteiden määrittely. Lisäksi kvantitatiivisessa tutkimuksessa tehdään suunnitelmat koejärjestelyistä tai aineiston keruusta, jossa havaintoaineisto soveltuu määrälliseen, numeeriseen mittaamiseen. Menetelmässä määritellään myös perusjoukko, johon tulosten täytyy päteä sekä otetaan tästä perusjoukosta otos. Muuttujista muodostetaan taulukko ja aineisto saatetaan tilastollisesti käsiteltävään muotoon. Lopuksi tehdään päätelmät havaintoaineiston tilastolliseen analysointiin perustuen. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2014, 140.) Tässä opinnäytetyössä ei kuitenkaan ole määritetty perusjoukkoa ja otosta, sillä työn otanta oli pieni.

Kvantitatiivisia tutkimusmenetelmiä on useita ja meidän kohdallamme oli kyse kokeellisesta tutkimuksesta. Kokeellisessa tutkimuksessa testataan jonkin olettamuksen paikkansapitävyyttä koetilanteessa. Olennaista on, että pyritään tutkimaan vain tutkitun muuttujan vaikutusta vakioimalla kaikki muut tekijät. Perusjoukosta otetaan otos, johon koemuuttuja vaikuttaa. Tämän ryhmän tuloksia taas verrataan vertailuryhmän tuloksiin, joista puuttuu koemuuttujan vaikutus. (Heikkilä 2014, 19.)

Tässä opinnäytetyömme tutkimuksessa testasimme autoklaavipusseissa steriloitujen ja alkoholikäsiteltyjen materiaalien steriiliyttä mikrobiologisella menetelmällä eri säilytysaikojen jälkeen vakioimalla näytteenottotilanne. Koemuuttujana oli alkoholikäsitely ja säilytysaika ja vertailuryhmänä toimivat alkoholikäsittelemättömät autoklaavipussit.

6 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli selvittää mikrobiologisella viljelymenetelmällä autoklaavipusseissa steriloitujen tuotteiden steriilinä pysymistä alkoholikäsittelyn ja eripituisten säilytysaikojen jälkeen. Tavoitteenamme oli autoklaavipusseissa steriloitujen tuotteiden steriiliyttä tutkimalla selvittää vaikuttaako alkoholikäsittely autoklaavipusseihin niin, että materiaalit autoklaavipussien sisällä kontaminoituvat säilytyksen aikana. Tavoitteenamme oli myös selvittää, kuinka kauan autoklaavipusseissa steriloituvat välineet säilyvät steriileinä alkoholikäsittelyn jälkeen.

Omana henkilökohtaisena tavoitteenamme oli toteuttaa opinnäytetyö, jolla olisi uutuusarvoa, ja jonka avulla kasvattaisimme omaa tietämystämme ja ammattitaitoamme. Olimme myös erittäin kiinnostuneita puhdistilatyöskentelystä ja mikrobiologiasta. Näin ollen halusimme toteuttaa käytännön tutkimuksen, sillä koimme tämän tyyppisen opinnäytetyön olevan opettavainen ja mieluisa.

7 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyömme käytännön osuus toteutettiin Savonia-ammattikorkeakoulun laboriotiloissa, koska meillä ei ollut mahdollisuutta toteuttaa tutkimustamme puhdas-tiloissa. Käytännön osuuden suorittaminen kesti viisi kuukautta tarkoittaen sitä, että viimeiset viljelyt tehtiin materiaalien viiden kuukauden säilytysajan jälkeen. Autoklaavipusseissa olevat materiaalit steriloidiin Savonia-ammattikorkeakoulun välinehuollon autoklaaveissa.

7.1 Työssä käytettävät kasvatusalustat, näytteenotto- ja viljelymenetelmät

Käytimme työssämme kahdenlaisia kasvatusalustoja, joilla molemmilla oli omat inkubointilämpötilansa ja -aikansa haluttujen mikrobilaatujen esiin saamiseksi. Käytimme kokonaismikrobimääritykseen TSA-maljaa ja sienien määritykseen Saboraaud-maljaa. Työssämme ei ollut tarvetta käyttää sädetettyjä kasvualustoja, joita normaalisti käytetään puhtastilojen puhtauden osoittamiseen, koska emme työskennelleet oikeissa puhtastiloissa.

TSA eli tryptoni-soija-agar (Tryptone Soy Agar) on kaupallinen kasvatusalusta, jolla saadaan ympäristössä yleisesti esiintyviä mikrobeja esille laajakirjoisesti. Malja sisältää peptonia kaseiinista ja soijasta, natriumkloridia sekä agaria. Maljoja inkuboidaan $+32.5\text{ °C} \pm 2.5\text{ °C}$:ssa 24 - 72 tuntia kansi alaspäin. (VWR Chemicals, Tryptone Soy Agar 2016.)

Saboraaud-dekstroosi-agar (Sabouraud Dextrose Agar) on kaupallinen kasvatusalusta, jolla saadaan esille sienikasvua kuten hiivoja ja homeita. Malja sisältää D (+) -glukoosia, peptonia kaseiinista, lihauutetta ja agaria. Maljoja inkuboidaan $+20 - +25\text{ °C}$:ssa 3 - 5 päivää kansi alaspäin. (VWR Chemicals, Sabouraud Dextrose Agar 2016.)

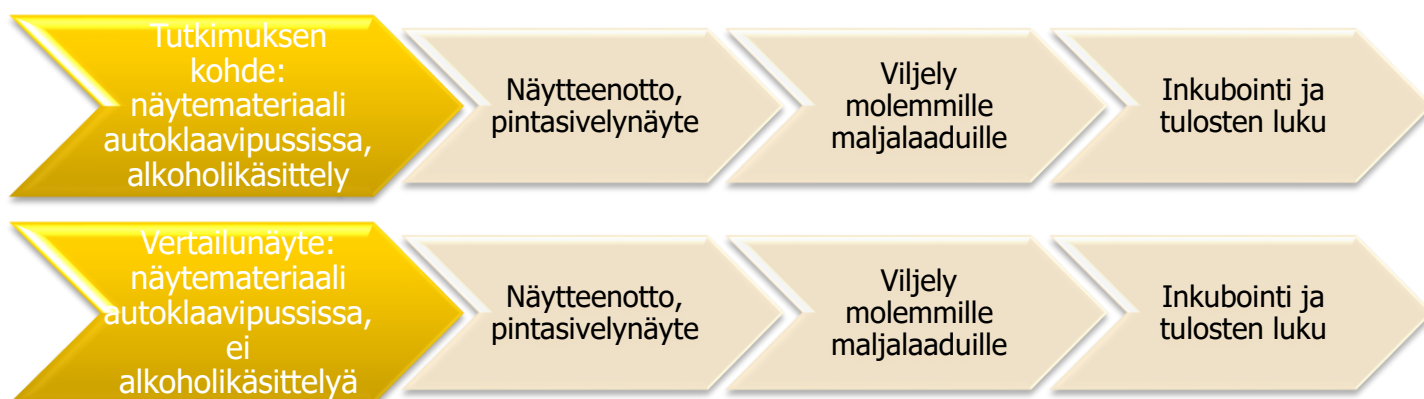
Käyttämämme näytteenottomenetelmä oli pintasivelynäytemenetelmä. Pintasivelynäytteenotossa näyte otetaan rakenteen pinnalta. Pintanäyte voidaan ottaa steriilissä laimennusliuoksessa kostutetulla steriilillä pumpulipuikolla, jolla pyyhittää tutkittavalta pinnalta esimerkiksi 100 cm^2 alue. Tämän jälkeen pumpulipuikko laitetaan koeputkeen, jossa on 5 ml steriiliä laimennusliuosta. Steriiliä laimennusliuosta viljellään pumpulitikulla kasvualustoille. (Asumisterveysohje 2003, 73.)

Käytimme käytännön näytteenoton pohjana Asumisterveysohjeen pintasivelynäytteenotto-ohjetta, jota sovelsimme omiin tarpeisiimme sopivaksi. Valitsimme tämän näytteenotto-ohjeen, koska se on yleisesti käytössä mikrobiologisten pintanäytteiden otossa ja yhdellä tämän opinnäytetyön tekijöistä oli käytännön kokemusta Asumisterveysohjeen pintasivelynäytteenotto-ohjeesta. Tutkittavan näytteen pinta-alan ollessa huomattavasti 100 cm² pienempi, sekä tutkittavien materiaalien ollessa oletettavasti steriilejä, vähensimme steriilin laimennusliuoksen määrän mahdollisimman vähäiseksi. Siksi päätimme käyttää laimennusliuosta 1,5 ml näytettä kohden, jotta mahdollisesti näytteestä irtoavan mikrobiston konsentraatio olisi laimennusliuoksessa mahdollisimman korkea. Viljely tehtiin maljoille niin, että näytteen pinnan sivelyn jälkeen, näytesuspensiota pipetoitiin maljalle 10 µl ja se levitettiin steriilillä lasisella viljelysauvalla kauttaaltaan maljalle.

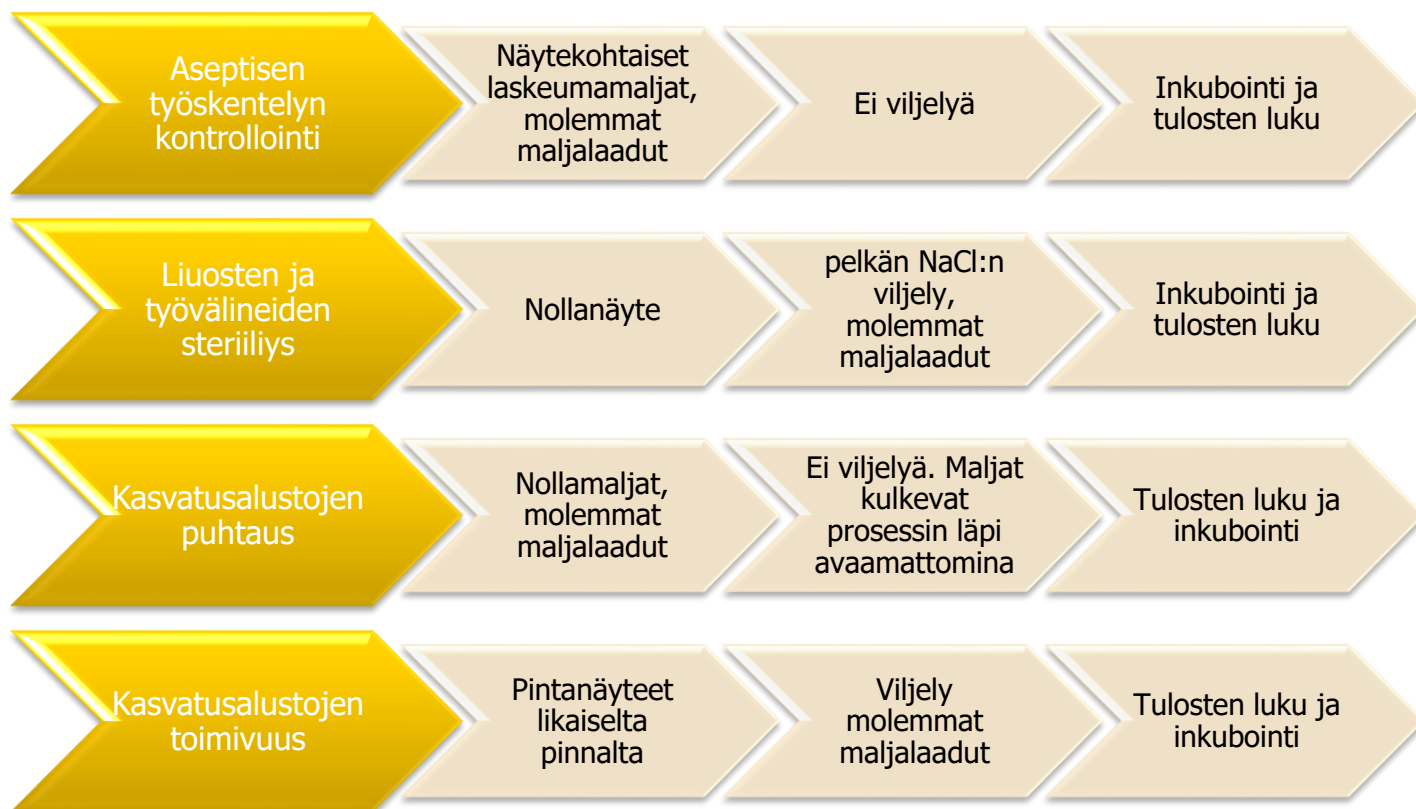
7.2 Käytännön prosessi

Kuviossa 1 on havainnollistettu koko tutkimusasetelma. Tutkimuksen kohteena olivat näytemateriaalit, jotka olivat autoklavoitu autoklaavipusseissa ja joille oli tehty alkoholikäsittely ennen säilytystä. Vertailunäytteinä olivat materiaalit, jotka olivat autoklavoitu autoklaavipusseissa, mutta joita ei käsitelty alkoholilla ennen säilytystä. Vertailunäytteitä tarvittiin, jotta pystyimme vertailemaan alkoholikäsittelyn mahdollista vaikutusta autoklaavipusseissa steriloitujen materiaalien steriilinä pysymiseen. Työssä kontrolloitiin aseptisia työskentelytapoja näytekohteisilla laskeumamaljoilla, jotka olivat avoinna koko näytteenoton ja viljelyn ajan laminaari-virtauskaapissa ja jotka inkuboitiin muiden maljojen mukana. Natriumkloridiliuoksen ja käytettyjen tarvikkeiden steriiliyttä kontrolloitiin nollanäytteellä. Nollanäyte käsiteltiin samoin kuin muutkin näytteet, mutta pumpulitikulla ei sivelty mitään pintaa eli nollanäyte ei sisältänyt näytteenottoa. Käytettyjä kasvatusalustoja kontrolloitiin sekä puhtauden, että toimivuuden kannalta. Puhtaus todettiin nollamaljoilla, joita ei avattu missään vaiheessa, mutta ne kulkivat muiden maljojen mukana koko prosessin ajan ja ne inkuboitiin muiden maljojen mukana. Maljojen toimivuutta taas testattiin niin, että maljoille viljeltiin pintasivelynäyte varmasti likaisesta pinnasta, joten otimme pintasivelynäytteet työpöydältä ja ikkunalaudalta. Tämän tarkoituksena oli saada maljoille pesäkkeitä, jotta pystyimme toteamaan maljojen toimivuuden. (kuva 2.)

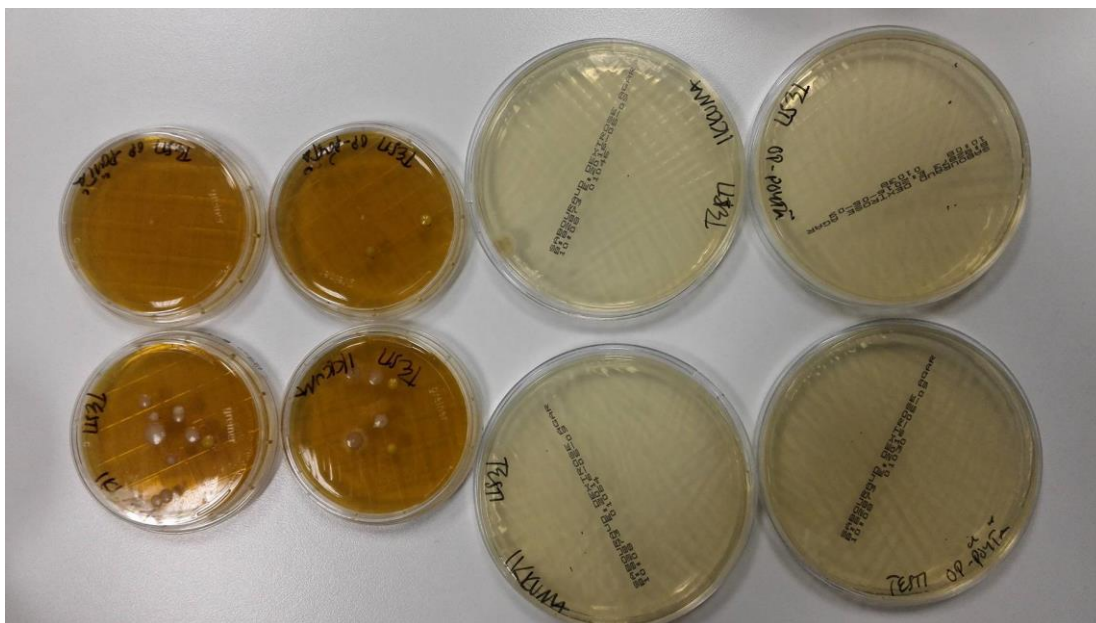
Näytemateriaalit



Kontrollointi



KUVIO 1. Tutkimusasetelmaa havainnollistava kaavio. (Rajala 2016.)



KUVA 2. Positiiviset maljakontrollit. (Tervo 2016.)

Toimeksiantajamme toiveena oli, että tutkisimme muovisia ja lasisia puhdistiloissa yleisesti käytössä olevia materiaaleja. Käytössämme oli kolmenlaisia materiaaleja; lasisia koeputkia, lasipulloja ja muoviruiskuja (kuva 3.). Lasisen koeputken valitsimme itse, lasipullot ja muoviruiskut osoitettiin meille Savonia-ammattikorkeakoulun ja toimeksiantajamme Savon ammatti- ja aikuisopiston Puhdistilakoulutuskeskuksen puolesta.



KUVA 3. Autoklaavipusseihin pakattavat näytemateriaalit. Kuvassa lasinen koeputki (1), lasipullo (2) ja muovinen ruisku (3). (Tervo 2016.)

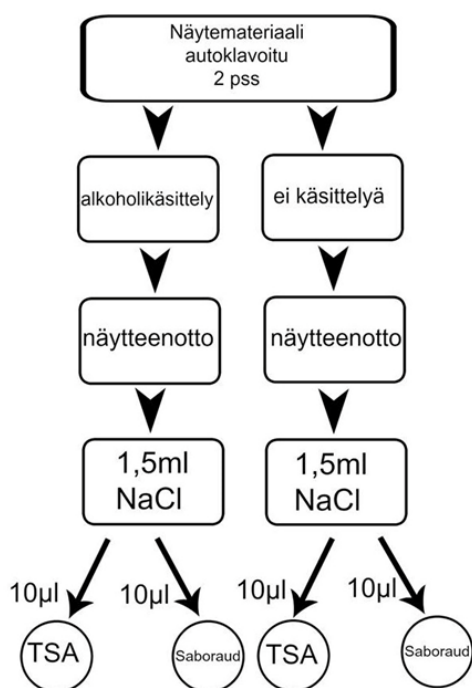
Kaikki tuotteet pakattiin omiin yksittäispakkauksiinsa. Jokaiselle, paitsi ensimmäiselle näytteenottokerralle, joka suoritettiin heti materiaalien autoklavoinnin jälkeen, varattiin kahdet kappaleet kutakin näytemateriaalia eli varsinainen näyte ja vertailunäyte. Ensimmäisessä viljelyssä emme tarvinneet vertailunäytteitä, sillä säilytysaikaa ei ollut. Pakkauksia autoklavoitiin yhteensä 30 pakkausta, eli 10 pakkausta kutakin materiaalia. Autoklavoinnin jälkeen puolet pakkauksista, eli yhteensä 15 pakkausta sisältäen saman verran kaikkia materiaaleja, käsiteltiin 70 til.- % alkoholilla ja puolet jätettiin käsittelemättä, jotta pystyimme vertailemaan alkoholikäsitteilyn mahdollista vaikutusta autoklaavipusseissa steriloitujen tuotteiden steriilinä pysymiseen. Kuvassa 4 on esimerkkinä käyttämiämme autoklaavissa steriloituja näytemateriaaleja autoklaavipusseissa. Kaikki alkoholikäsitellyt sekä käsittelemättömät pakkaukset säilytettiin avoimessa laatikossa Savonia-ammattikorkeakoulun laboratoriotilojen astiakaapin päällä lähellä katon rajaa, jotta pakkauksien mikrobialtistus vastaisi oletettavasti mahdollisimman hyvin puhdastilojen D-luokkaa, jossa puhdastiloihin sulku-tilojen kautta tuotuja materiaaleja ja tuotteita yleisesti säilytetään.



KUVA 4. Autoklaavissa steriloituja näytemateriaaleja autoklaavipusseissa. (Tervo 2016.)

Toteutimme näytteenotot ja viljelyt suunnittelemamme näytteenotto-ohjeen mukaisesti (Liite 1). Ensimmäiset näytteet otettiin materiaaleista välittömästi autoklavoinnin jälkeen. Tässä ensimmäisessä viljelyssä emme tarvinneet alkoholikäsittelemättömiä vertailunäytteitä, sillä säilytysaikaa ei ollut ja kaikki materiaalit sekä työvälineet käsiteltiin alkoholilla joka tapauksessa juuri ennen niiden vientiä laminaarivirtauskaappiin. Näin ollen näytemateriaaleja oli ensimmäisessä näytteenotossa vain yksi kappale kutakin kahden sijaan.

Lopuissa viljelyissä näytteet otettiin sekä alkoholikäsitellyistä, että käsittelemättömistä näytemateriaaleista eli näytemateriaaleja oli joka viljelykerralla kuusi kappaletta: kaksi muoviruiskua, kaksi lasipulloa ja kaksi lasista koeputkea. Näytteenotot toteutettiin yhden, kahden, kolmen ja viiden kuukauden säilytysajan jälkeen. Kuvio 2 havainnollistaa tutkimuksen näytteenoton ja viljelyn. Jokaisesta autoklaavipussin sisällä olevasta materiaalista otettiin yksi pintasivelynäyte, joka viljeltiin molemmille käytössä olevalle maljalaadulle (TSA ja Saboraud).



KUVIO 2. Kaavio, joka havainnollistaa näytteenoton ja viljelyn. Näytemateriaalit ovat kumpikin samaa laatua (esim. muoviruiskuja), joista toinen on alkoholikäsitelty ennen säilytystä ja toinen on käsittelemätön. (Rajala 2016).

Autoklaavipussissa olevasta materiaalista otettiin pintasivelynäyte niin, että steriili pumpulitikku kastettiin steriilissä 0,9 % natriumkloridiliuoksessa, jota oli 1,5 ml steriilissä korkillisessa koeputkessa. Steriilissä 0,9 %:ssa natriumkloridiliuoksessa kastetulla pumpulitikulla siveltiin autoklaavipussissa ollut näytemateriaali kauttaaltaan läpi kolme kertaa. Näytemateriaalia käsiteltiin vain steriileillä välineillä, kuten steriileillä pinseteillä ja pumpulipuikolla. Huolellisen sivelyn jälkeen tikku katkaistiin koeputkeen niin, että se osa mistä tikkua oli pidetty kiinni, ei mennyt putken sisälle. Tämän jälkeen koeputki tikkuineen sekoitettiin vorteksilla huolellisesti ja näytesuspensiota pipetoitiin 10 µl TSA- ja Saboraud-maljoille ja se levitettiin huolellisesti kauttaaltaan maljalle steriilillä lasisella viljelysauvalla. Kaikki työssä käytetyt materiaalit ja välineet on esitelty liitteessä 2.

Viljelyiden jälkeen maljoja inkuboitiin yhteensä viiden päivän ajan maljojen valmistajan antamien ohjeiden mukaisesti, joten TSA-maljoja inkuboitiin 32,5°C:ssa ja Saboraud-maljoja huoneenlämmössä. Maljat luettiin 2 - 3 vuorokauden sekä viiden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Maljojen ensimmäinen luku tehtiin aina laminaarivirtauskaapissa kontaminaatioiden välttämiseksi.

7.3 Huomioitavat virhelähteet

Näytteenotossa mahdollisia kontaminaatioiden lähteitä olivat käyttämämme sakset, pinsetit sekä lasinen viljelysauva, koska emme saaneet niitä suoraan käyttöön steriileinä. Sakset käsittelimme ennen laminaarivirtauskaappiin laittoa huolellisesti 99,5 til.- % alkoholilla. Saksia käytimme 0,9 % natriumkloridiampullien auki leikkaamiseen, jotta pystyimme pipetoimaan liuosta steriileihin koeputkiin tarkalleen 1,5 ml. Pylimme leikkaamaan ampullin auki niin, että sakset eivät koskettaneet steriiliä natriumkloridiliuosta, mutta kontaminaation riski oli silti olemassa.

Pinsetit ja lasiset viljelysauvat steriloidimme 99,5 til.- % etanolilla ja bunsenlampun liekillä niin, että upotimme ne ensin etanoliin ja sen jälkeen käytimme liekissä. Näin teimme ennen jokaista näytteenottotilannetta, eli ennen kuin otimme uuden materiaalin autoklaavipussista pinseteillä ja ennen kuin viljelimme näytettä viljelysauvalla maljalle. Ennen maljoille viljelyä odotimme hetken, että lasisauva jäähtyi, jotta välttyttiin agarin sulamiselta. Todennäköisyys sille, että pinseteillä tai viljelysauvoilla olisimme kontaminoineet näytteemme, oli kuitenkin hyvin vähäinen, koska steriloidimme ne liekillä ennen käyttöä.

Muita mahdollisia kontaminaation lähteitä olivat huolimaton työskentely, huolimattomasti puhdistettu laminaarivirtauskaappi ja muut työskentelytilat, sekä mahdollinen huoneilman pääsy laminaarivirtauskaappiin.

8 TULOKSET JA TULOSTEN ARVIOINTI

Toteutimme näytteenotot ja viljelyt toukokuun ja syyskuun 2016 välillä. Kaikkien viljelyiden tulokset olivat negatiivisia eli maljoilla ei havaittu kasvua, lukuun ottamatta neljättä viljelyä. Neljäs viljely tehtiin kolmen kuukauden säilytyksen jälkeen, jolloin alkoholikäsitellyn lasipullon viljelyssä oli havaittavissa kasvua molemmilla maljaladuilla. Saboraud-maljalla oli kolme pesäkettä ja TSA-maljalla oli 54 pesäkettä. Kyseisen viljelyn laskeumamaljoilla ei ollut kasvua. Kyseisen näytteenottokerran nollamaljoilla, eikä nollanäytteissä ollut kasvua. Positiivisilla kontrollimaljoilla oli odotetusti kasvua.

Koska viiden kuukauden säilytyksen jälkeen tehdyissä viljelyissä ei havaittu kasvua oletamme, että kolmen kuukauden viljelyissä on mitä ilmeisemmin tapahtunut kontaminaatio. Emme voi olla täysin varmoja siitä, että kyseessä on kontaminaatio tai mistä kontaminaatio johtuu, mutta pohdimme kuitenkin joitakin mahdollisia vaihtoehtoja. Nämä vaihtoehdot olivat näytteen kontaminoituminen työn suorituksen aikana, työvälineiden kontaminaatio tai laminaarivirtauskaapin ilman aiheuttama kontaminaatio. Käynnistimme laminaarivirtauskaapin kymmenen minuuttia ennen työs kentelyn aloittamista ja puhdistimme laminaarivirtauskaapin huolellisesti alkoholiliuoksella, kuten laminaarivirtauskaapin käyttöohje ohjeistaa. Mietimme, että onko kesän ajan vähällä käytöllä ollut laminaarivirtauskaappi kuitenkin jotenkin kerännyt itseensä tavallista enemmän mikrobeja ja sen takia sisällä virrannut ilma ei ehtinyt puhdistua kunnolla ohjeenmukaisista toimenpiteistä huolimatta.

TAULUKKO 3. Viiden eri näytteenottokerran viljelytulokset kaikista näytemateriaaleista. (Rajala 2016.)

	TSA 0kk	Sabo- raud 0kk	TSA 1kk	Sabo- raud 1kk	TSA 2kk	Sabo- raud 2kk	TSA 3kk	Sabo- raud 3kk	TSA 5kk	Sabo- raud 5kk
Lasipullo alkoholikäsittely	ei näy- tettä	ei näy- tettä	-	-	-	-	54	3	-	-
Lasipullo käsittelemätön	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muoviruisku alkoholikäsittely	ei näy- tettä	ei näy- tettä	-	-	-	-	-	-	-	-
Muoviruisku käsittelemätön	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lasinen koeputki alkoholikäsittely	ei näy- tettä	ei näy- tettä	-	-	-	-	-	-	-	-
Lasinen koeputki käsittelemätön	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Viljelyiden tulokset (taulukko 3) viittaavat siihen, että autoklaavipussien alkoholikäsitteily ei vaikuta autoklaavipussissa steriloitujen materiaalien steriilinä pysymiseen viiden kuukauden säilytyksen aikana näissä olosuhteissa. Emme siis saaneet näillä käytetyillä menetelmillä sellaisia tuloksia, jotka voisivat viitata alkoholikäsitteilyn vaikuttavan materiaalien kontaminoitumiseen autoklaavipusseissa alkoholikäsitteilyn jälkeen. Totesimme myös käyttämiemme kasvatusalustojen oikeanlaisen toimivuuden, koska nollamaljat pysyivät puhtaina ja positiivisille kontrollimaljoille saimme runsaasti mikrobikasvua. Tuloksia voidaan siten pitää näiltä osin luotettavina, vaikkakin otoksen pienuuden takia vain suuntaa antavina.

9 POHDINTA

Valitsimme opinnäytetyömme aiheen kahdesta eri syystä. Ensinnäkin, olimme kaikki erittäin kiinnostuneita mikrobiologiasta ja puhdastilatyöskentelystä. Tässä opinnäytetyössä pääsimme käyttämään mikrobiologisia menetelmiä sekä lisäksi tutustumaan mikrobiologiaan ja puhdastilatyöskentelyyn myös kirjallisuuden kautta. Toiseksi, halusimme toteuttaa työn, jossa oli kirjallisen osuuden lisäksi toteutettavana jokin käytännön työn osuus. Tutkimuksellinen opinnäytetyö osoittautuikin oivalliseksi projektiiksi, sillä siten pääsimme tutustumaan tutkimusprosessin suunnitteluun ja toteutukseen.

Opinnäytetyöprosessimme alkoi aiheeseen sopivan kirjallisuuden etsinnällä, käsitteiden avaamisella ja alan standardeihin tutustumisella ja perehdyimme paremmin opinnäytetyömme liittyviin olennaisiin aihepiireihin eli puhdastiloihin, sterilointiin ja desinfektioon sekä mikrobiologisiin viljelyihin. Haastavinta oli löytää työhömmme sopivaa asiantuntevaa kirjallisuutta ja rajata kirjallisuudesta saamamme tieto sopivan suuriseksi, jotta tieto olisi tarpeeksi kattavaa, mutta pysyisi aiheessamme. Mielestämme osasimme tuoda esille olennaisimmat asiat, joilla myös pystyimme perustelemaan käytännön tutkimusprosessissa käytettyjä menetelmiä.

Tärkeää oli myös, että kirjallisuuslähteistä hankitut tiedot olivat asianmukaista ja ajantasaista. Asumisterveysohje on 13 vuotta vanha, mutta siitä ei ole julkaistu uudempiä versioita ja sen antama ohjeistus on edelleen käytössä oleva ja ajankohtainen. Siksi sen käyttäminen lähteenä oli mielestämme asianmukaista. Osa käyttämistämme lähteistä oli myös alan oppikirjoja, eikä varsinaista tieteellistä kirjallisuutta. Niistä poimitut teoretiset tiedot olivat mielestämme kuitenkin asianmukaisia, koska oppikirjoista saimme lisää yleistietoa aiheestamme.

Saamiemme tulosten perusteella autoklaavipusseissa steriloidut tuotteet pysyivät steriileinä ainakin viisi kuukautta alkoholikäsitelyn jälkeen. Tosin kolmannen kuukauden säilytysajan jälkeen, saimme alkoholikäsitellyn lasipullon viljelystä mikrobipesäkeitä kasvatusalustoille, ja näistä tuloksista heräsi kysymys, että voisivatko autoklaavipussit kuitenkin päästää sisälleen mikrobeja alkoholikäsitelyn vaikutuksesta. Koska muissa alkoholikäsiteltyjen autoklaavipussien näytteissä ei kasvua ollut, epäilimme kyseessä olevan kontaminaatio. Tämän vuoksi teimme vielä viljelyn viiden kuukauden

säilytysajan jälkeen. Alkuperäisenä tarkoituksenamme oli tehdä viljelyitä vain kolmen kuukauden säilytysaikaan asti, mutta koska meidän oli mahdollista tehdä vielä yhden viljelyt, päätimme tehdä ne viiden kuukauden säilytysajan jälkeen ja toivoimme näiden viljelyiden tuovan varmistusta kontaminaatioepäilyllemme. Viiden kuukauden säilytysajan jälkeen tehdyistä viljelyistä saimmekin jälleen negatiiviset tulokset. Saamamme mikrobikasvu maljoilla johtui siis mitä ilmeisimmin kontaminaatiosta, jonka lähde on kuitenkin hankalaa selvittää, sillä meidän näkemyksemme mukaan kontaminaation mahdollisia lähteitä oli useita. Esimerkiksi omissa aseptisissa työskentelytavoissa on voinut tulla virheitä. Laminaarivirtauskaapin käyttö oli myös ollut vähäistä kesän aikana, joten on mahdollisuus, että laminaarivirtauskaappiin olisi voinut kertyä mikrobeja, jotka olisivat laminaarivirtauskaapin käynnistyksessä nousseet työskentelytilan ilmaan ja kontaminoineet näytteen tai viljelysuspension.

Tulosten luotettavuuteen vaikutti olennaisesti myös se, ettei meillä ollut käytössämme työtä varten puhdastiloja, vaan työ suoritettiin koulun laboratoriotiloissa ja laminaarivirtauskaapissa. Tästäkin syystä pidimme tutkimuksestamme saatavia tuloksia vain suuntaa antavina. Myöskään tutkimusympäristöä ei voitu täysin vakioda, sillä tilat olivat todennäköisesti myös muiden henkilöiden käytössä tutkimuksemme aikana. Samassa tilassa tapahtuva liike ja työskentely on voinut vaikuttaa tutkimuksen tuloksiin, koska tiloissa tapahtuva liike nostattaa lattiatason mikrobeja korkeammalle, jopa tutkittavien materiaalien säilytyskorkeudelle. Tämä mikrobien nousu on voinut mahdollisesti jopa kontaminoida tutkittavien pakkauksien sisällä olevia materiaaleja, vaikkakin se on erittäin epätodennäköistä. Mikrobien nousu on voinut myös nostaa kontaminaatoriskiä näytteenoton ja viljelyn aikana kontaminoimalla laminaarivirtauskaappia tai aiheuttamalla mikrobilaskeumaa suoraan kasvatusalustoille. Nämä kontaminaatoriskit pyrimme kuitenkin minimoimaan hyvillä aseptisillä työskentelytavoilla ja kontrolloimme tätä mahdollista kontaminaatiolähdettä käyttämällä laskeumanäytteitä näytteenoton ja viljelyn aikana.

9.1 Eettiset kysymykset

Opinnäytetyömme osalta esiin nousee muutamia eettisiä periaatteita, jotka koskevat opinnäytetyötämme erityisesti ja joiden on toteuduttava luotettavuuden ja rehellisyyden varmistamiseksi. Tutkimuksen tekemiseen kuuluu tutkimusetiikka eli hyvän tieteellisen käytännön noudattaminen. Tutkimusetiikalla tarkoitetaan yleisesti sovittuja pelisääntöjä kollegoiden, tutkimuskohteen, rahoittajien, toimeksiantajien ja suuren yleisön kesken. Hyvä tieteellinen käytäntö tarkoittaa sitä, että tutkijat noudattavat eettisesti kestäviä tiedonhankintamenetelmiä ja tutkimusmenetelmiä. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että tutkimuksessa käytetään sellaisia tiedonhankinta- ja tutkimusmenetelmiä, jotka tiedeyhteisö on hyväksynyt. Tiedonhankinnassa hyvä tieteellinen käytäntö on sellaista, että tutkija perustaa tiedonhankintansa oman alansa tieteellisen kirjallisuuden tuntemuksella, muilla asianmukaisilla tiedonlähteillä, riittävillä laboratorionkokeilla, havainnoilla ja oman tutkimuksensa analysoinnilla. (Vilka 2015, 41 - 42.)

Hyvä tieteellinen käytäntö edellyttää myös, että tutkimustulokset täyttävät tieteelliselle tutkimukselle asetetut vaatimukset, jotta tutkimus tuottaisi uutta tietoa tai esittäisi miten vanhaa tietoa voidaan hyödyntää tai yhdistää uudella tavalla. Hyvä tieteellinen käytäntö edellyttää lisäksi sitä, että tutkija noudattaa rehellisyyttä, yleistä huolellisuutta ja tarkkuutta tutkimustyössä ja tutkimustulosten esittämisessä. Tuloksia ei yleistetä kriitikittömästi ja raportointi ei saa olla harhaanjohtavaa tai puutteellista. Tulosten yleistäminen kriitikittömästi tarkoittaa sitä, ettei tuloksia sepitetä tai kaunistella eli niistä ei esitetä tekaistuja havaintoja. (Vilka 2015, 42 - 45; Hirsjärvi, Remes ja Sajavaara 2014, 26 .)

Tutkijan on myös kunnioitettava toisten tutkijoiden työtä ja saavutuksia, eli tutkijan toiminnan tulee olla rehellistä ja vilpitöntä, jotta se olisi hyvän tieteellisen käytännön mukaista. Toisten tutkijoiden saavutukset osoitetaan tekstissä tarkoin lähdeviittein ja toisten tekstiä ei saa suoraan plagioida. Oma sekä toisten tutkijoiden tulokset tulee esittää tekstissä oikeassa valossa. Voidaankin sanoa, että mitä tarkempaa ja huolellisempaa viittaaminen ja lähdeviittausten merkitseminen on, sitä paremmin hyvä tieteellinen käytäntö toteutuu tutkimuksessa. (Vilka 2015, 42 - 45.)

Opinnäytetyöhön lainaamamme teksti on ollut asianmukaisesti lähdemerkitty, lähteestä saatu informaatio on ilmaistu omin sanoin tarkoin lähdeviittein. Lisäksi olemme kertoneet opinnäytetyössämme käytetyt menetelmät, tutkimuksen toteutuksen, havainnot ja tutkimukseen liittyvät puutteet huolellisesti, jotta raportointi ei olisi harhaanjohtavaa eikä puutteellista. Käyttämämme tutkimusmenetelmä oli sovellettu Asumisterveysohjeesta ja siten sen käyttö oli kokeellisen tutkimuksemme menetelmänä perusteltua, koska Asumisterveysohjeen ohje pintasivelynäytteen ottamiseen on yleisesti käytössä. Opinnäytetyömme noudattaa siten hyvän tieteellisen käytännön periaatteita niin tutkimusmenetelmän valinnan, lähteiden käytön ja niihin viittausten sekä raportoinnin osalta.

Opinnäytetyömme nostaa esiin eettisten periaatteiden lisäksi muutamia eettisiä kysymyksiä. Näitä ovat aseptinen omatunto, aseptiset työskentelytavat ja käyttämiemme kirjallisten lähteiden ajantasaisuus. Aseptisellä omatunnolla tarkoitetaan sitoutumista aseptisiin työtapoihin, jolloin ei olla riippuvaisia toisten valvonnasta. Aseptisiin työtapoihin kuuluu, että työsuunta kulkee puhtaammasta likaisempaan. (Friman ja Kivisalmi 2016, 168; Karhumäki, Jonsson ja Saros 2016, 64.) Aseptiset työskentelytavat olivat olennainen osa tutkimuksemme luotettavuutta. Tulosten kannalta oli tärkeää, että emme itse kontaminoisi näytteitä työskentelymme aikana. Suurimmaksi osaksi olimme osanneetkin työskennellä aseptisesti, koska mahdollinen kontaminaatio tapahtui vain yhden näytteen kohdalla.

Lähdetietoja hyödyntämällä esittelimme aiheeseen liittyvää teoriaa. Teorian pohjalta pystyimme myös suorittamaan tutkimuksemme ja siksi tutkimuksen luotettavuuden kannalta oli tärkeää, että käyttämämme lähteet olivat ajantasalla. Käyttämämme lähteet, yhtä lähdettä lukuunottamatta, ovat korkeintaan 15 vuotta vanhoja, joten lähteistä saatavat tiedot pitäisivät siltä osin olla ajantasaisia. Toinen tärkeä seikka on lähteiden luotettavuus. Valitsimme lähteiksemme standardeja, artikkeleita, kirjallisuutta ja alan oppikirjoja. Standardien hyväksymisestä ja julkaisusta vastaavat standardikeskusjärjestöt. Valitsimme kirjallisuuden ja artikkeleiden kirjoittajat ja kokoajat ovat alansa asiantuntijoita. Näin ollen, pidämme valitsemaamme kirjallisuutta mielestämme luotettavana ja riittävän ajantasaisena.

9.2 Opinnäytetyön merkitys

Opinnäytetyömme tutkimustulokset antavat tietoa autoklaavipussien alkoholikäsitteilyn merkityksestä niiden säilyvyyteen ja niissä autoklavoitujen tuotteiden steriilinä pysymiseen. Erityisen merkitykselliseksi opinnäytetyön tekee sen uutuusarvo, sillä vastaavanlaista tutkimusta ei ole aiemmin tehty. Jos tutkimuksessamme olisi tullut ilmi, että autoklavoitu materiaali ei säily steriilinä pakkauksessaan alkoholikäsitteilyn jälkeen, olisi se vaatinut jatkotutkintaa. Tällöin olisi ollut suositeltavaa suorittaa uusi kattavampi tutkimus vakioituissa olosuhteissa ja oikeissa puhdistiloissa. Ja, jos tällainen tutkimustulos olisi toistunut, olisi se saattanut johtaa puhdistilakäytänteiden muuttamiseen alkoholikäsitteilyjen autoklaavipussien säilytyksen suhteen.

Tutkimuksen tulokset kuitenkin osoittivat, että autoklaavipusseissa steriloidut tuotteet säilyvät alkoholikäsitteilyn jälkeen steriileinä ainakin viisi kuukautta näissä olosuhteissa säilytettynä. Näin ollen voidaan olettaa, että nykyiset puhdistilakäytänteet alkoholikäsitteilyjen autoklaavipussien säilytyksen suhteen ovat oikeita. Tutkimuksemme otanta on kuitenkin hyvin pieni, joten tulokset sinällään ovat vain suuntaa antavia.

Opinnäytetyömme kehitti meitä opinnäytetyön tekijöitä tieteelliseen ajatteluun ja saimme kokemusta toiminnallisen opinnäytetyön ja tieteellisen koeasettelun suunnittelusta ja toteutuksesta. Sen lisäksi kehitimme aseptiseen työskentelyyn liittyviä tietoja ja taitoja. Kartutimme työn suorituksessa mikrobiologian osaamistamme viljelyiden teon, inkuboinnin ja tutkimisen kautta. Työn edetessä tuli eteen myös asioita, jotka olisimme voineet tehdä toisin. Ryhmässä olisimme voineet enemmän keskustella siitä, että kuinka olemme käsittäneet teoriaan liittyvät käsitteet ja itse tekemämme työohjeet ja varmistaa sen, että meillä jokaisella oli oikea ymmärrys tekemästämme työstä. Toisaalta nekin omalta osaltaan opettivat meille, miten tärkeää huolellinen suunnittelu sekä avoin ja rohkea keskustelu on luotettavien tulosten ja onnistuneen projektin toteutumiselle. Ryhmämme yhteishenki on kuitenkin pysynyt hyvänä koko opinnäytetyön teon ajan ja arvostamme suuresti jokaisen ryhmämme jäsenen panostusta opinnäytetyömme eteen. Jokaisen ryhmämme jäsenen työpanos, vaikka se on ollut meillä jokaisella erilainen, on hitsautunut sulavasti yhteen ja tuottanut tämän opinnäytetyön.

LÄHTEET

AGRICOLA, K. 2014. Particle deposition monitoring, the missing link in contamination control. *Renhets Teknik* 2014:3, 6-13.

ASUMISTERVEYSOHJE 2003. Sosiaali- ja terveysministeriö. Asuntojen ja muiden oleskelutilojen fysikaaliset, kemialliset ja mikrobiologiset tekijät. Helsinki: AT Julkaisutoimisto Oy. [Viitattu 29.03.2016] Saatavilla: http://www.finlex.fi/pdf/normit/14951-asumisterveysohje_pdf.pdf

CAPPUCCINO, J. ja SHERMAN, N. 2014. *Microbiology: A Laboratory Manual*. 10. painos. Edinburgh Gate: Pearson Education Limited.

CLEANROOMS AND ASSOCIATED CONTROLLED ENVIRONMENTS 2015. Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration (ISO 14644-1:2015). SFS-EN ISO 14644-1. Vahvistettu 2015-12-13. [Viitattu 19.04.2016]. Yleinen teollisuusliitto. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto. Saatavilla: <https://online-sfs-fi.ezproxy.savonia.fi/fi/index/tuotteet/SFS/CENISO/ID2/1/400487.html.stx>

CLEANROOMS AND ASSOCIATED CONTROLLED ENVIRONMENTS 2013. Part 9: classification of surface cleanliness by particle concentration (ISO 14644-9:2012). SFS-EN ISO 14644-9. Vahvistettu 2013-02-11. [Viitattu 19.04.2016]. Yleinen teollisuusliitto. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto. Saatavilla: <https://online-sfs-fi.ezproxy.savonia.fi/fi/index/tuotteet/SFS/CENISO/ID2/1/222543.html.stx>

EVIRA 2016. Elintarvikkeet. Hygieniaosaaminen. Tietopaketti. Elintarvikkeiden riski- ja vaaratekijät. Mikrobiologiset vaaratekijät. [Viitattu 29.03.2016] Saatavilla: <http://www.evira.fi/portal/fi/etusivu/>

FRIMAN, T. ja KIVISALMI, V. 2015. *Laboratorion välinehuolto*. 1. painos. Saarijärvi: Saarijärven Offset Oy.

HEIKKILÄ, T. 2014. *Tilastollinen tutkimus*. Edita Publishing Oy.

HELLSTÉN, S. 2005. Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus.

HIRSJÄRVI, S., REMES, P. ja SAJAVAARA, P. 2014. Tutki ja kirjoita. 19. painos. Porvoo: Bookwell Oy.

KARHUMÄKI, E., JONSSON, A., ja SAROS, M. 2016. Mikrobit hoitotyön haasteena. 4., uudistettu painos. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.

KATILA, M-L. 2004. Tavallisimmat menetelmät bakteriologian, mykologian ja parasitologian tutkimuksissa. Julkaisussa: PENTTILÄ, I. Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Porvoo: WSOY.

LANKKINEN, H. ja PENTTI, M. 2008. Desinfektioaineet. Julkaisussa: HIRVONEN, K., KARHUMÄKI, T. ja TUOMINEN, E. (Toim.) Välinehuolto. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

LAX, R. ja MIKKOLA, I. 2007. Välinehuollon perusteet. 2. tarkistettu painos. Tampere: Tampere Paino Oy.

MANUFACTURE OF STERILE MEDICINAL PRODUCTS 2008. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Annex 1. Enterprise And Industry Directorate-General. Brussels: European Commission. [Viitattu 5.5.2015]. Saatavilla: [http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/ANNEX%2001\[2008\].PDF](http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/ANNEX%2001[2008].PDF)

MCFADDEN, R 2016. A Basic Introduction to Clean Rooms. Coastwide Laboratories. [Viitattu 6.5.2015] Saatavilla: <http://www.coastwidelabs.com/Technical%20Articles/Cleaning%20the%20Cleanroom.htm>

PACKAGING FOR TERMINALLY STERILIZED MEDICAL DEVICES 2009. Part 3: Paper for use in the manufacture of paper bags (specified in en 868-4) and in the manufacture of pouches and reels (specified in en 868-5). Requirements and test methods. SFS-EN 868-3. Vahvistettu 2009-10-12. [Viitattu 19.04.2016]. Yleinen teollisuusliitto. Helsinki: Suomen Standardisointiliitto. Saatavilla: www.sfs.fi

PAKATTUINA STERILOITUJEN TERVEYDENHUOLLON LAITTEIDEN JA TARVIKKEIDEN PAKKAUKSET 2009. Osa 5: Huokoisista materiaaleista ja muovikalvosta valmistetut suljettavat pussit ja rullat. Vaatimukset ja testimenetelmät. SFS-EN 868-5. Vahvistettu 2009-10-12. [Viitattu 19.04.2016]. Yleinen Teollisuusliitto. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto. Saatavilla: www.sfs.fi

PUHDASTILAKOULUTUSKESKUS 2015. Esimerkki puhdastilojen tilaratkaisusta. [Kuva] Saatavilla: http://puhdastila.sakky.fi/sites/default/files/pohjapiirros_1.jpg

PUHDASTILAT JA PUHTAAT ALUEET 2008. Osa 6: Sanasto. SFS EN ISO 14644-6. Vahvistettu 2008-08-18. [Viitattu 19.04.2015]. Yleinen teollisuusliitto. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto. Saatavilla: www.sfs.fi

RAJALA, H.-R. 2016. Kaavio, joka havainnollistaa näytteenoton ja viljelyn. [Kuvio]

RAJALA, H.-R. 2016. Kaavio, joka havainnollistaa tutkimusasetelman. [Kuvio]

RAJALA, H.-R. 2016. Viiden eri näytteenottokerran viljelytulokset kaikista näyttemateriaaleista. [Taulukko]

RAJALA, K. 2007. Puhdastilatyöskentely. Analyysi. 44. vuosikerta. Suomen laboratorioalan liitto ry:n ammatti- ja yhdistyslehti. 3/2007. [Viitattu 18.02.2016]. Saatavilla: http://www.laboratorioalanliitto.fi/wpcontent/uploads/analyysi_3_07_net.pdf

RATIA, M. VUENTO, R ja LAITINEN, K. 2010a. Desinfektio ja desinfektio menetelmät. Julkaisussa: ANTTILA, V-J. HELLSTÉN, S. RANTALA, A. ROUTAMAA, M. SYRJÄLÄ, H. ja VUENTO, R. Hoitoon liittyvien infektioiden torjunta. 6. painos. Porvoo: WS Bookwell Oy.

RATIA, M. VUENTO, R ja LAITINEN, K. 2010b. Puhdistuksen, desinfektion ja steriloinnin tavoitteet ja tarve. Julkaisussa: ANTTILA, V-J. HELLSTÉN, S. RANTALA, A. ROUTAMAA, M. SYRJÄLÄ, H. & VUENTO, R. Hoitoon liittyvien infektioiden torjunta. 6. painos. Porvoo: WS Bookwell Oy.

SANDERS, E. R. 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. [Viitattu 17.02.2016] Saatavilla: <http://www.jove.com/video/3064/aseptic-laboratory-techniques-plating-methods>

SAKSALA, P. & SOMERHARJU, L. 2015. Sosiaali- ja terveysalan fysiikka & kemia. 9. uudistettu painos. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.

SMITH, C. 2012. Laminar Flow Hoods and Biological Safety Cabinets. [Viitattu 24.03.2016] Saatavilla:

<http://web.a.ebscohost.com.ezproxy.savonia.fi/ehost/detail/detail?vid=3&sid=269e8bd0-308a-4000-8a9c-6ffb39b9643d%40sessionmgr4001&hid=4107&bdata=Jmxhbm9Zmkmc2l0ZT1laG9zdC1saXZl#AN=104484937&db=ccm>

STERILIZATION 2015. Steam sterilizers. Large sterilizers. SFS-EN 285. Vahvistettu 2015-12-31. [Viitattu 19.04.2016] Yleinen Teollisuusliitto. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto. Saatavilla: <https://online-sfs-fi.ezproxy.savonia.fi/fi/index/tuotteet/SFS/CEN/ID2/2/400530.html.stx>

TERVO, M.-M. 2016. Autoklaavipusseihin pakattavat näytemateriaalit. [Valokuva]

TERVO, M.-M. 2016. Autoklaavissa steriloituja näytemateriaaleja autoklaavipusseissa. [Valokuva]

TERVO, M.-M. 2016. Positiiviset maljakontrollit. [Valokuva]

TÖYTÄRI, P. 2008. Kertakäyttöisten pakkausmateriaalien varastointi ja säilytys. Julkaisussa: HIRVONEN, K., KARHUMÄKI, T. & TUOMINEN, E. Välinehuolto. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

TÖYTÄRI, P. ja HIRVONEN, K. 2008. Pakkausmateriaaleille asetetut vaatimukset. Julkaisussa: HIRVONEN, K., KARHUMÄKI, T. & TUOMINEN, E. Välinehuolto. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

VILKKA, H. 2015. Tutki ja kehitä. 4. uudistettu painos. Juva: Bookwell Oy.

VWR CHEMICALS 2015. Tryptone Soy Agar. [Viitattu 06.09.2016] Saatavilla:
http://www.reactivosparadiagnostico.com/customers/viewTDS.php?file=101114ZA_EN.pdf&id=08abc35d43ad3bd9b455a698d9a61687e74e02e2e38abc4

VWR CHEMICALS 2016. Saubourad Dextrose Agar. [Viitattu 06.09.2016] Saatavilla:
http://www.reactivosparadiagnostico.com/customers/viewTDS.php?file=100884ZA_EN.pdf&id=173adb6ad7d971fba2d13edb655c6c5523f3101d339ee74

WHO GOOD PRACTICES FOR PHARMACEUTICAL MICROBIOLOGY LABORATORIES
2011. Annex 2. World Health Organization. WHO Technical Report Series, No. 961.
[Viitattu 25.4.2016]. Saatavilla:
http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/trs961/trs961_annex2.pdf

LIITE 1. NÄYTTEENOTTO-OHJE

Näytteenoton aikana tulee käyttää suojatakia ja suojakäsineitä.

TARVIKKEET:

laminaarivirtauskaappi
steriilejä pinsettejä
steriilejä pumpulitikkuja
tehdaspuhtaita suojakäsineitä
suojatakki
pipettejä (1,5ml ja 10 µl)
steriilejä pipetinkärkiä
koeputkiteline
steriilejä viljelysauvoja
permanent tussi
vortex
steriilejä lasisia koeputkia korkkeineen
steriiliä 0,9 % NaCl-liuosta
viljelyalustoja
väh. 70 % etanolia

1. Laita laminaarivirtauskaapin virtaus päälle n. 10 minuuttia ennen työskentelyn aloittamista ja puhdista laminaarivirtauskaappi kauttaaltaan 70 % etanolilla. Käytä puhdistuksessa suojakäsineitä ja tehdaspuhdasta sellupaperia/käsipyyhkeitä.
2. Laita suojakäsineet käteesi ja suihkuta ne märäksi 70 % etanolilla. Puhdista kaikki laminaarivirtauskaappiin vietävät näytteenottoon tarvittavat tarvikkeet 70 % etanolilla. Suihkuta tarvikkeet tai niiden suojana oleva materiaali kauttaaltaan 70 % etanolilla. Pyyhi vortex 70 % etanolilla.
3. Suihkuta näytemateriaalien autoklaavipussit kauttaaltaan etanolilla, pyyhi pinnalla mahdollisesti oleva pöly, jotta sitä ei joutuisi laminaarivirtauskaappiin.
4. Vaihda puhtaat suojakäsineet ja suihkuta ne märäksi 70 % etanolilla.
5. Aloita laminaarityöskentely. Avaa tarvikkeiden pakkausmateriaalit varovasti valmiiksi. Asettele tarvitsemasi tarvikkeet hyvään ja selkeään työjärjestykseen. Merkitse viljelyalustat ja koeputket tarvittavilla merkinnöillä.

6. Annostele NaCl-liuos koeputkiin.
7. Avaa näyttemateriaalin paperilaminaattipussi. Ota näyttemateriaali varovasti pussista ulos pinseteillä ja varo näyttemateriaalin osumista laminaarin pinnalle tai esimerkiksi paperilaminaattipussin ulkopinnoille.
8. Avaa NaCl-liuoskoeputki ja laita koeputken korkki laminaarin tasolle alassuin. Ota pumpulitikku ja kasta se märäksi NaCl-liuoksessa. Pyyhi pumpulitikulla näyttemateriaali huolellisesti kauttaaltaan samalla pumpulitikkaa pyöritellen. Pyyhi näyttemateriaali kauttaaltaan kolme kertaa.
9. Laita pumpulitikku takaisin NaCl-liuokseen ja katkaise tikku koeputkeen niin, että se osa tikkua mistä on pidetty kiinni näytteenotossa jää koeputken ulkopuolelle.
10. Sulje koeputki ja vorteksoi huolellisesti noin 30 sekunnin ajan.
11. Avaa koeputki ja pipetoi 10 µl näytesuspensiota suoraan kasvatusalustalle. Levitä suspensio kasvatusalustalle kauttaaltaan viljelysauvalla. Pidä kasvatusalustan kantta vain raollaan pipetoinnin ja suspension levityksen aikana.
12. Anna kasvatusalustan olla kansipuoli ylöspäin noin viisi minuuttia ennen kuin viet kasvatusalustan inkuboitumaan.

LIITE 2. KÄYTETYT LAITTEET JA VÄLINEET

Autoklaavi Matachana S100, Clinichem autoklaavi (lasipullojen ja koeputkien autoklaavaus)

System DE-23 autoklaavi (muoviruiskujen autoklaavaus)

Memmert UN30 lämpökaappi

KOJAIR laminaarivirtauskaappi

Scientific Industries Vortex Genie 2 sekoituslaite

PureLab Flex vedenpuhdistin, huollettu 18.8.15/Intermed

Autoklaavipussinauha (koeputket) Wipak Medical Steriking R40 75mm, lot 1212

Autoklaavipussi (ruiskut) 150 x 300mm, lot 1502

Autoklaavipussi (lasipullot) 150 x 200mm, lot 1311

Steriilit koeputket VWR, lot 3142-347SQ-345, ref 211-0063. Viim. käyttöpv. 2016-11.

Manufactured for VWR International, LLC Radnor, PA19087 By Labcon North America

Selefa Powder-Free Examination Gloves, Nitrile. Koko S. Lot 117898-01-0988. Ref 210253S. Viim. käyttöpv. 2018-07

Selefa Powder-Free Examination Gloves, Nitrile. Koko M. Lot 118460-01-1298. Ref 210253M. Viim. käyttöpv. 2018-08

Etax AA Etanoli 500ml, min. 99,5 paino/vikt. %. Lot 1572. Valmistaja ALTIA Oyj, 05200 Rajamäki

Steriili NaCl 20 ml ampulli. Braun 9mg/ml. 14185013. Erä 4.2017

Sabouraud 4% Dextrose Agar, VWR Chemicals. Lot 82873. Ref 100884ZA Viim. käyttöpv. 2016/05/09

Envirocheck Contact Plates, Merck KGaA. Lot 135462. Viim. käyttöpv. 2016/06/04