

Raport z programu badań nad biocydami

Badane preparaty są substancjami o działaniu sterylizującym opartym na aktywności wolnych rodników: atomów lub cząsteczek o nieparzystej liczbie elektronów na zewnętrznej orbicie. Powoduje to stan niestabilności, który skłania je do pobierania elektronów od innych cząsteczek, z którymi się stykają, aby osiągnąć stabilną równowagę. Cząsteczki, które oddały elektrony, stają się niestabilne i poszukują innych elektronów, aby odzyskać stabilność, uruchamiając reakcję łańcuchową oddawania i przyjmowania elektronów (stabilność-niestabilność). Poszczególne składniki aktywne w tej reakcji przenoszenia elektronów mogą działać jako utleniacze, a zatem akceptory elektronów, albo jako reduktory, a zatem donory elektronów.

Mechanizm działania wolnych rodników jest nieodwracalny i obejmuje przede wszystkim składniki lipidowe (lipidy i fosfolipidy) błon komórkowych oraz białka jądra komórkowego (pory błony jądrowej).

Badaniom mikrobiologicznym zostaną poddane:

- Wolne rodniki będące donorami elektronów, wykazujące działanie redukujące w nośniku o zasadowym pH, przeznaczone do sterylizacji instrumentów i wyrobów medycznych;
- Wolne rodniki będące akceptorami elektronów, o działaniu utleniającym, przeznaczone do dekontaminacji powierzchni.

Cel badania

Celem badania była ocena aktywności sterylizującej rozpuszczalnych proszków DIAL i EC-STER wobec przetrwalników *B. subtilis* ATCC 19695.

Skuteczność produktu DIAL oceniono za pomocą następujących testów:

- 1) Aktywność sporobójcza wobec *B. subtilis* przy stężeniu $8 \log_{10}$ (0,8 McF), przy stężeniu roboczym 0,3%, z czasem kontaktu 2, 5, 60 s.
- 2) Aktywność sporobójcza wobec *B. subtilis* przy stężeniu $8 \log_{10}$ (0,8 McF), przy stężeniu roboczym 0,25%, z czasem kontaktu 5, 10, 30 s.
- 3) Aktywność sporobójcza wobec *B. subtilis* przy stężeniu $8 \log_{10}$ (0,8 McF), przy stężeniu roboczym 0,2%, z czasem kontaktu 60 s, 2, 3 min.
- 4) Aktywność sporobójcza wobec *B. subtilis* przy stężeniu $8 \log_{10}$ (0,8 McF), przy stężeniu roboczym 0,18%, z czasem kontaktu 60 s, 2, 3 min.
- 5) Aktywność sporobójcza wobec *B. subtilis* przy stężeniu $8 \log_{10}$ (0,8 McF), przy stężeniu roboczym 0,15%, z czasem kontaktu 60 s, 2, 3 min.
- 6) Aktywność sporobójcza wobec *B. subtilis* przy stężeniu $8 \log_{10}$ (0,8 McF), przy stężeniu roboczym 0,3%, po 6 godzinach od przygotowania, z czasem kontaktu 2, 5, 60 s.
- 7) Aktywność sporobójcza wobec *B. subtilis* przy stężeniu $8 \log_{10}$ (0,8 McF), przy stężeniu roboczym 0,3%, po 48 godzinach od przygotowania, z czasem kontaktu 2, 5, 60 s.
- 8) Aktywność sporobójcza wobec *B. subtilis* przy stężeniu $8 \log_{10}$ (0,8 McF), przy stężeniu roboczym 0,25%, po 7 dniach od przygotowania, z czasem kontaktu 60 s, 5 min.

Skuteczność produktu EC-STER oceniono za pomocą następującego testu:

- 1) Aktywność sporobójcza wobec *B. subtilis* przy stężeniu $8 \log_{10}$ (0,8 McF), przy stężeniu roboczym 0,35%, z czasem kontaktu 2, 10, 30 s.

Materiały

Proszek DIAL rozpuszczalny w wodzie;
Proszek Ec-Ster rozpuszczalny w wodzie;
Przetrwalniki *B. subtilis* ATCC 19695;
Płytki z agarem z krwią baranią;
Nutrient Broth (bulion odżywczy).

Metody

Przygotowanie roztworów sterylizujących

Rozpuszczalne proszki produktów DIAL i Ec-Ster w różnych stężeniach rozpuszczano w wodzie (wodzie wodociągowej o temperaturze pokojowej) aż do całkowitego rozpuszczenia.

Przygotowanie przetrwalników *B. subtilis* ATCC 19695

Przetrwalniki *B. subtilis* ATCC 19695 przygotowano zgodnie z instrukcjami producenta. Inokulum używane w doświadczeniach przygotowano tak, aby uzyskać zawiesinę o mętności 0,8 McFarlanda (około 10^8 jednostek tworzących kolonie/ml).

Metoda manualna

Do całkowitej objętości 10 ml każdego roztworu sterylizującego (DIAL i EC-STER) dodano 100 μ l *B. subtilis* ATCC 19695 o mętności 0,8 McF. Po każdym badanym czasie kontaktu porcję 100 μ l zawiesiny wysiewano na płytki z agarem z krwią baranią i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 24 godziny. Po zakończeniu inkubacji oceniano wzrost drobnoustrojów.

Drugą porcję 100 μ l przenoszono do probówek zawierających Nutrient Broth. Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37 °C wysiewano 100 μ l na płytki z agarem z krwią baranią. Po zakończeniu inkubacji oceniano wzrost drobnoustrojów.

We wszystkich doświadczeniach uwzględniono kontrolę ujemną do wykrywania ewentualnego zanieczyszczenia badanych roztworów oraz kontrolę dodatnią wzrostu drobnoustrojów.

Metoda automatyczna Alfred 60, Alifax

Alfred 60, Alifax to w pełni zautomatyzowany system, który dzięki technologii rozpraszania światła (Light Scattering) określa obecność drobnoustrojów i wykrywa ich aktywność replikacyjną, przedstawiając krzywe wzrostu w czasie rzeczywistym i dostarczając ilościowe wyniki w jednostkach tworzących kolonie/ml.

Do całkowitej objętości 10 ml każdego roztworu sterylizującego (DIAL i EC-STER) dodano 100 μ l *B. subtilis* ATCC 19695 o mętności 0,8 McF. Po każdym badanym czasie kontaktu porcję 100 μ l przenoszono do specjalnych kuwet pomiarowych (fiolek) zawierających bulion Eugon, który w systemie jest stale mieszany i utrzymywany w temperaturze 37 °C. Aby ocenić skuteczność badanych produktów, ustawiono czas inkubacji na 24 godziny.

We wszystkich doświadczeniach uwzględniono kontrolę ujemną do wykrywania ewentualnego zanieczyszczenia badanych roztworów oraz kontrolę dodatnią wzrostu drobnoustrojów.

Wyniki

Metoda manualna

Szczep: *B. subtilis* ATCC 19695 - 0,8 McF (około 10^8 CFU/ml)

Czas kontaktu

Produkt	2 s	5 s	10 s	30 s	60 s	2 min	3 min	5 min
T2 Próbka nr 3 Partia: 74/s/15 Stężenie robocze: 0,3%	-	-			-			
DESAN Próbka nr 5 Partia: 82/s/15 Stężenie robocze: 0,3%	-	-			-			
DIAL Próbka nr 2 Partia: 6/15 Stężenie robocze: 0,25%		-	-	-	-			-
T2 Próbka nr 1 Partia: 74/s/15 Stężenie robocze: 0,2%					-	-	-	
DESAN Próbka nr 8 Partia: 83/s/15 Stężenie robocze: 0,2%					-	-	-	
DIAL Partia: 6/14 Stężenie robocze: 0,18%					-	-	-	
DESAN Próbka nr 6 Partia: 82/s/15 Stężenie robocze: 0,15%					-	-	-	
EC-STER Partia: 07/14 Stężenie robocze: 0,35%	-		-	-				

Legenda: - brak wzrostu. Puste komórki pozostawiono puste, tak jak w oryginale.

Wyniki

Metoda automatyczna Alfred 60, Alifax

Szczep: *B. subtilis* ATCC 19695 - 0,8 McF (około 10^8 CFU/ml)

Czas kontaktu

Produkt	2 s	5 s	10 s	30 s	60 s	2 min	3 min	5 min
T2 Próbka nr 3 Partia: 74/s/15 Stężenie robocze: 0,3%	-	-			-			
DESAN Próbka nr 5 Partia: 82/s/15 Stężenie robocze: 0,3%	-	-			-			
DIAL Próbka nr 2 Partia: 6/15 Stężenie robocze: 0,25%		-	-	-	-			-
T2 Próbka nr 1 Partia: 74/s/15 Stężenie robocze: 0,2%					-	-	-	
DESAN Próbka nr 8 Partia: 83/s/15 Stężenie robocze: 0,2%					-	-	-	
DIAL Partia: 6/14 Stężenie robocze: 0,18%					-	-	-	
DESAN Próbka nr 6 Partia: 82/s/15 Stężenie robocze: 0,15%					-	-	-	
EC-STER Partia: 07/14 Stężenie robocze: 0,35%	-		-	-				

Legenda: - brak wzrostu. Puste komórki pozostawiono puste, tak jak w oryginale.

Omówienie

Doświadczenia przeprowadzone zgodnie z normą EN 13704 wykazały aktywność sporobójczą produktów DIAL i EC-STER wobec przetrwalników *B. subtilis* ATCC 19695.

Roztwory wykazały skuteczność zarówno w metodzie manualnej, jak i automatycznej, w warunkach doświadczalnych obejmujących zmienne czasy kontaktu i różne stężenia badanych produktów.

Po uzyskaniu wyników te same roztwory wykorzystano do obserwacji morfologicznych przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Przetrwalniki *B. subtilis* po kontakcie z roztworami DIAL i Ec-Ster w różnych stężeniach, a także kontrolę dodatnią i ujemną, wybarwiono oranżem akrydynowym - barwnikiem przyżyciowym wiążącym kwasy nukleinowe. Obserwacje mikroskopowe nie wykazały obecności form przetrwalnikowych ani komórek wegetatywnych w próbkach, które miały kontakt z roztworami sterylizującymi, ani w kontroli ujemnej, jak pokazano na rycinach 1-8. Natomiast w kontroli dodatniej fluorescencja czerwona i zielona ujawniła odpowiednio obecność przetrwalników i komórek wegetatywnych *Bacillus subtilis* (ryc. 9-11).

18 grudnia 2015 r.

Prof. Alfredo Focà

Uwaga do tłumaczenia. Polskie tłumaczenie dostarczonego siedmiostronicowego raportu w języku włoskim. Zachowano nazwy produktów, wartości liczbowe i wyniki w tabelach. Ryciny 1-11 wspomniane w tekście nie są zawarte w dostarczonym oryginale. Oryginał włoski pozostaje dokumentem źródłowym.