

Відділення клінічної мікробіології
Керівник: професор Alfredo Focà

Лабораторія із сертифікацією якості UNI EN 9001:2008 № 22382 від 07.07.2015
«Надання послуг клінічної мікробіології із застосуванням традиційних і молекулярних методів»

Звіт про програму досліджень біоцидів

Досліджувані препарати є речовинами зі стерилізувальною дією, що ґрунтується на активності вільних радикалів: атомів або молекул із непарною кількістю електронів на зовнішній орбіті. Це створює стан нестабільності, який спонукає їх забирати електрони в інших молекул, з якими вони контактують, для досягнення стійкої рівноваги. Молекули, що віддали електрони, стають нестабільними й шукають інші електрони для відновлення своєї стабільності, запускаючи ланцюгову реакцію віддавання та отримання електронів (стабільність-нестабільність). Різні компоненти, активні в цій реакції перенесення електронів, можуть діяти як окисники, тобто акцептори електронів, або як відновники, тобто донори електронів.

Механізм дії вільних радикалів є незворотним і спрямований переважно на ліпідні компоненти (ліпіди та фосфоліпіди) клітинних мембран і білки ядра (пори ядерної мембрани).

Мікробіологічним випробуванням будуть піддані:

- Вільні радикали - донори електронів, які мають відновну активність у середовищі з лужними значеннями pH, призначені для стерилізації інструментів і медичних виробів;
- Вільні радикали - акцептори електронів з окиснювальною дією, призначені для деконтамінації поверхонь.

Мета дослідження

Метою дослідження була оцінка стерилізувальної активності розчинних порошків DIAL та EC-STER щодо спор *B. subtilis* ATCC 19695.

Ефективність продукту DIAL оцінювали за допомогою таких випробувань:

- 1) Спороцидна активність щодо *B. subtilis* за концентрації $8 \log_{10}$ (0,8 McF), за робочої концентрації 0,3%, з часом контакту 2, 5, 60 с.
- 2) Спороцидна активність щодо *B. subtilis* за концентрації $8 \log_{10}$ (0,8 McF), за робочої концентрації 0,25%, з часом контакту 5, 10, 30 с.
- 3) Спороцидна активність щодо *B. subtilis* за концентрації $8 \log_{10}$ (0,8 McF), за робочої концентрації 0,2%, з часом контакту 60 с, 2, 3 хв.
- 4) Спороцидна активність щодо *B. subtilis* за концентрації $8 \log_{10}$ (0,8 McF), за робочої концентрації 0,18%, з часом контакту 60 с, 2, 3 хв.
- 5) Спороцидна активність щодо *B. subtilis* за концентрації $8 \log_{10}$ (0,8 McF), за робочої концентрації 0,15%, з часом контакту 60 с, 2, 3 хв.
- 6) Спороцидна активність щодо *B. subtilis* за концентрації $8 \log_{10}$ (0,8 McF), за робочої концентрації 0,3% через 6 годин після приготування, з часом контакту 2, 5, 60 с.
- 7) Спороцидна активність щодо *B. subtilis* за концентрації $8 \log_{10}$ (0,8 McF), за робочої концентрації 0,3% через 48 годин після приготування, з часом контакту 2, 5, 60 с.
- 8) Спороцидна активність щодо *B. subtilis* за концентрації $8 \log_{10}$ (0,8 McF), за робочої концентрації 0,25% через 7 днів після приготування, з часом контакту 60 с, 5 хв.

Ефективність продукту EC-STER оцінювали за допомогою такого випробування:

- 1) Спороцидна активність щодо *B. subtilis* за концентрації $8 \log_{10}$ (0,8 McF), за робочої концентрації 0,35%, з часом контакту 2, 10, 30 с.

Матеріали

Водорозчинний порошок DIAL;
Водорозчинний порошок Ec-Ster;
Спори *B. subtilis* ATCC 19695;
Чашки з агаром із баранячою кров'ю;
Nutrient Broth (поживний бульйон).

Методи

Приготування стерилізувальних розчинів

Розчинні порошки продуктів DIAL та Ec-Ster у різних концентраціях розчиняли у воді (водопровідній воді кімнатної температури) до повного розчинення.

Приготування спор *B. subtilis* ATCC 19695

Спори *B. subtilis* ATCC 19695 готували відповідно до вказівок виробника. Інокулюм для експериментів готували так, щоб отримати суспензію з каламутністю 0,8 McFarland (приблизно 10^8 колонієутворювальних одиниць/мл).

Ручний метод

До загального об'єму 10 мл кожного стерилізувального розчину (DIAL та EC-STER) додавали 100 мкл *B. subtilis* ATCC 19695 за 0,8 McF. Після кожного досліджуваного часу контакту аліквоту суспензії об'ємом 100 мкл висівали на чашки з агаром із баранячою кров'ю та інкубували за 37 °C протягом 24 годин. Після завершення інкубації оцінювали ріст мікроорганізмів.

Другу аліквоту об'ємом 100 мкл переносили в пробірки з Nutrient Broth. Після 24 годин інкубації за 37 °C 100 мкл висівали на чашки з агаром із баранячою кров'ю. Після завершення інкубації оцінювали ріст мікроорганізмів.

До всіх експериментів включали негативний контроль для виявлення можливої контамінації досліджуваних розчинів і позитивний контроль росту мікроорганізмів.

Автоматизований метод Alfred 60, Alifax

Alfred 60, Alifax - повністю автоматизована система, яка завдяки технології світлорозсіювання (Light Scattering) визначає наявність мікроорганізмів і виявляє їхню реплікаційну активність, відображаючи криві росту в реальному часі та надаючи кількісні результати в колонієутворювальних одиницях/мл.

До загального об'єму 10 мл кожного стерилізувального розчину (DIAL та EC-STER) додавали 100 мкл *B. subtilis* ATCC 19695 за 0,8 McF. Після кожного досліджуваного часу контакту аліквоту об'ємом 100 мкл переносили у спеціальні вимірювальні кювети (флакони), що містили бульйон Eugon, який у системі постійно перемішується і термостатується за 37 °C. Для оцінки ефективності досліджуваних продуктів встановили період інкубації 24 години.

До всіх експериментів включали негативний контроль для виявлення можливої контамінації досліджуваних розчинів і позитивний контроль росту мікроорганізмів.

Результати

Ручний метод

Штам: *B. subtilis* ATCC 19695 - 0,8 McF (приблизно 10^8 КУО/мл)

Час контакту

Продукт	2 с	5 с	10 с	30 с	60 с	2 хв	3 хв	5 хв
T2 Зразок № 3 Партія: 74/s/15 Робоча концентрація: 0,3%	-	-			-			
DESAN Зразок № 5 Партія: 82/s/15 Робоча концентрація: 0,3%	-	-			-			
DIAL Зразок № 2 Партія: 6/15 Робоча концентрація: 0,25%		-	-	-	-			-
T2 Зразок № 1 Партія: 74/s/15 Робоча концентрація: 0,2%					-	-	-	
DESAN Зразок № 8 Партія: 83/s/15 Робоча концентрація: 0,2%					-	-	-	
DIAL Партія: 6/14 Робоча концентрація: 0,18%					-	-	-	
DESAN Зразок № 6 Партія: 82/s/15 Робоча концентрація: 0,15%					-	-	-	
EC-STER Партія: 07/14 Робоча концентрація: 0,35%	-		-	-				

Умовне позначення: - відсутність росту. Порожні клітинки залишено порожніми, як в оригіналі.

Результати

Автоматизований метод Alfred 60, Alifax

Штам: *B. subtilis* ATCC 19695 - 0,8 McF (приблизно 10^8 КУО/мл)

Час контакту

Продукт	2 с	5 с	10 с	30 с	60 с	2 хв	3 хв	5 хв
T2 Зразок № 3 Партія: 74/s/15 Робоча концентрація: 0,3%	-	-			-			
DESAN Зразок № 5 Партія: 82/s/15 Робоча концентрація: 0,3%	-	-			-			
DIAL Зразок № 2 Партія: 6/15 Робоча концентрація: 0,25%		-	-	-	-			-
T2 Зразок № 1 Партія: 74/s/15 Робоча концентрація: 0,2%					-	-	-	
DESAN Зразок № 8 Партія: 83/s/15 Робоча концентрація: 0,2%					-	-	-	
DIAL Партія: 6/14 Робоча концентрація: 0,18%					-	-	-	
DESAN Зразок № 6 Партія: 82/s/15 Робоча концентрація: 0,15%					-	-	-	
EC-STER Партія: 07/14 Робоча концентрація: 0,35%	-		-	-				

Умовне позначення: - відсутність росту. Порожні клітинки залишено порожніми, як в оригіналі.

Обговорення

Експерименти, проведені відповідно до стандарту EN 13704, виявили спороцидну активність продуктів DIAL та EC-STER щодо спор *B. subtilis* ATCC 19695.

Розчини продемонстрували ефективність як за ручного, так і за автоматизованого методу в експериментальних умовах із різним часом контакту та різними концентраціями досліджуваних продуктів.

Після отримання результатів ті самі розчини використовували для морфологічних спостережень за допомогою конфокального мікроскопа. Спори *B. subtilis* після контакту з розчинами DIAL та Ec-Ster різних концентрацій, а також позитивний і негативний контроль забарвлювали акридиновим оранжевим - вітальним барвником, що зв'язує нуклеїнові кислоти. Під час мікроскопічних спостережень у зразках, які контактували зі стерилізовальними розчинами, та в негативному контролі не виявляли ні спорових форм, ні вегетативних клітин, як показано на рисунках 1-8. Натомість у позитивному контролі червона та зелена флуоресценція виявляла відповідно наявність спор і вегетативних клітин *Bacillus subtilis* (рис. 9-11).

18 грудня 2015 р.

Prof. Alfredo Focà

Примітка до перекладу. Український переклад наданого семисторінкового італійського звіту. Назви продуктів, числові значення та результати таблиць збережено. Рисунки 1-11, згадані в тексті, відсутні в наданому оригіналі. Італійський оригінал залишається першоджерелом.