

KALABRIJOS REGIONAS
„MAGNA GRAECIA“ UNIVERSITETAS
UNIVERSITETINĖ LIGONINĖ „MATER DOMINI“

Klinikinės mikrobiologijos skyrius

Vadovas: prof. Alfredo Focà

Laboratorija, turinti UNI EN 9001:2008 kokybės sertifikatą Nr. 22382, išduotą 2015-07-07.
„Klinikinės mikrobiologijos paslaugų teikimas taikant įprastinius ir molekulinis metodus“

Biocidų tyrimų programos ataskaita

Tiriami preparatai yra sterilizuojamąjį poveikį turinčios medžiagos, kurių veikimas pagrįstas laisvaisiais radikalais - atomais arba molekulėmis, turinčiais nelyginį elektronų skaičių išorinėje orbitoje. Dėl to jie yra nestabilūs ir, siekdami stabilios pusiausvyros, perima elektronus iš kitų molekulių, su kuriomis liečiasi. Elektronus atidavusios molekulės tampa nestabilios ir savo stabilumui atkurti ieško kitų elektronų. Taip prasideda grandininė elektronų atidavimo ir gavimo reakcija (stabilumas - nestabilumas). Įvairūs šioje elektronų perdavimo reakcijoje aktyvūs komponentai gali veikti kaip oksidatoriai, t. y. elektronų akceptorai, arba kaip reduktoriai, t. y. elektronų donorai.

Laisvųjų radikalų veikimo mechanizmas negrįžtamai veikia daugiausia ląstelių membranų lipidinius komponentus (lipidus ir fosfolipidus) bei branduolio baltymus (branduolio membranos poras).

Mikrobiologiniai bandymai bus atliekami su:

- elektronus atiduodančiais laisvaisiais radikalais, pasižyminčiais redukciniu aktyvumu šarminio pH terpėje ir skirtais instrumentams bei medicinos priemonėms sterilizuoti;
- elektronus priimančiais laisvaisiais radikalais, pasižyminčiais oksidaciniu aktyvumu ir skirtais paviršiams dekontaminuoti.

Tyrimo tikslas

Tyrimo tikslas buvo įvertinti tirpių miltelių DIAL ir EC-STER sterilizuojamąjį aktyvumą prieš *B. subtilis* ATCC 19695 sporas.

DIAL produkto veiksmingumas buvo vertintas šiais bandymais:

- 1) Sporicidinis poveikis *B. subtilis*, esant $8 \log_{10}$ (0,8 McF) koncentracijai, naudojant 0,3 % koncentracijos tirpalą, kai sąlyčio laikas yra 2, 5 ir 60 sek.
- 2) Sporicidinis poveikis *B. subtilis*, esant $8 \log_{10}$ (0,8 McF) koncentracijai, naudojant 0,25 % koncentracijos tirpalą, kai sąlyčio laikas yra 5, 10 ir 30 sek.
- 3) Sporicidinis poveikis *B. subtilis*, esant $8 \log_{10}$ (0,8 McF) koncentracijai, naudojant 0,2 % koncentracijos tirpalą, kai sąlyčio laikas yra 60 sek., 2 ir 3 min.
- 4) Sporicidinis poveikis *B. subtilis*, esant $8 \log_{10}$ (0,8 McF) koncentracijai, naudojant 0,18 % koncentracijos tirpalą, kai sąlyčio laikas yra 60 sek., 2 ir 3 min.
- 5) Sporicidinis poveikis *B. subtilis*, esant $8 \log_{10}$ (0,8 McF) koncentracijai, naudojant 0,15 % koncentracijos tirpalą, kai sąlyčio laikas yra 60 sek., 2 ir 3 min.
- 6) Sporicidinis poveikis *B. subtilis*, esant $8 \log_{10}$ (0,8 McF) koncentracijai, naudojant 0,3 % koncentracijos tirpalą, praėjus 6 valandoms nuo paruošimo, kai sąlyčio laikas yra 2, 5 ir 60 sek.
- 7) Sporicidinis poveikis *B. subtilis*, esant $8 \log_{10}$ (0,8 McF) koncentracijai, naudojant 0,3 % koncentracijos tirpalą, praėjus 48 valandoms nuo paruošimo, kai sąlyčio laikas yra 2, 5 ir 60 sek.
- 8) Sporicidinis poveikis *B. subtilis*, esant $8 \log_{10}$ (0,8 McF) koncentracijai, naudojant 0,25 % koncentracijos tirpalą, praėjus 7 dienoms nuo paruošimo, kai sąlyčio laikas yra 60 sek. ir 5 min.

EC-STER produkto veiksmingumas buvo vertintas šiuo bandymu:

- 1) Sporicidinis poveikis *B. subtilis*, esant $8 \log_{10}$ (0,8 McF) koncentracijai, naudojant 0,35 % koncentracijos tirpalą, kai sąlyčio laikas yra 2, 10 ir 30 sek.

Medžiagos

Vandenyje tirpūs milteliai DIAL;
Vandenyje tirpūs milteliai Ec-Ster;
B. subtilis ATCC 19695 sporos;
Avių kraujo agaro lėkštelės;
Maistinis sultinys (Nutrient Broth).

Metodai

Sterilizuojamųjų tirpalų paruošimas

Įvairios koncentracijos tirpūs DIAL ir Ec-Ster produktų milteliai buvo tirpinami vandenyje (kambario temperatūros vandentiekio vandenyje), kol visiškai ištirpo.

B. subtilis ATCC 19695 sporų paruošimas

B. subtilis ATCC 19695 sporos buvo paruoštos pagal gamintojo nurodymus. Eksperimentams naudotas inokuliatas buvo paruoštas taip, kad būtų gauta 0,8 McFarland drumstumo suspensija (apie 10^8 kolonijas sudarančių vienetų/ml).

Rankinis metodas

Į kiekvieno sterilizuojamojo tirpalo (DIAL ir EC-STER) bendrą 10 ml tūrį buvo įpilta 100 µl B. subtilis ATCC 19695 0,8 McF suspensijos. Po kiekvieno tirto sąlyčio laiko 100 µl suspensijos alikvota buvo pasėta į avių kraujo agaro lėkšteles ir inkubuota 37 °C temperatūroje 24 valandas. Pasibaigus inkubacijai buvo įvertintas mikroorganizmų augimas.

Antra 100 µl alikvota buvo perkelta į mėgintuvėlius su maistiniu sultiniu (Nutrient Broth). Po 24 valandų inkubacijos 37 °C temperatūroje 100 µl buvo pasėta į avių kraujo agaro lėkšteles. Pasibaigus inkubacijai buvo įvertintas mikroorganizmų augimas.

Visuose atliktuose eksperimentuose buvo naudojama neigiama kontrolė galimam tiriamų tirpalų užteršimui nustatyti ir teigiama mikroorganizmų augimo kontrolė.

Automatizuotas metodas: Alfred 60, Alifax

Alfred 60, Alifax - visiškai automatizuota sistema, kuri, naudodama šviesos sklaidos (Light Scattering) technologiją, nustato mikroorganizmų buvimą ir aptinka jų dauginimosi aktyvumą, realiuoju laiku atvaizduodama augimo kreives ir pateikdama

kiekybinius skaičiavimo rezultatus kolonijas sudarančiais vienetais/ml.

Į kiekvieno sterilizuojamojo tirpalo (DIAL ir EC-STER) bendrą 10 ml tūrį buvo įpilta 100 µl B. subtilis ATCC 19695 0,8 McF suspensijos. Po kiekvieno tirto sąlyčio laiko 100 µl alikvota buvo perkelta į specialias matavimo kiuvetes (flakonus) su eugoniniu sultiniu, kuris sistemoje nuolat maišomas ir palaikomas pastovioje 37 °C temperatūroje. Tiriamų produktų veiksmingumui įvertinti nustatytas 24 valandų inkubacijos laikotarpis.

Visuose atliktuose eksperimentuose buvo naudojama neigiama kontrolė galimam tiriamų tirpalų užteršimui nustatyti ir teigiama mikroorganizmų augimo kontrolė.

Rezultatai

Rankinis metodas

Padermė B. subtilis ATCC 19695 - 0,8 McF (apie 10^8 KSV/ml)

Sąlyčio laikas

Produktas	2 sek.	5 sek.	10 sek.	30 sek.	60 sek.	2 min.	3 min.	5 min.
T2; Mėginys Nr. 3 Partija: 74/s/15 Naudojimo koncentracija: 0,3 %	-	-			-			
DESAN; Mėginys Nr. 5 Partija: 82/s/15 Naudojimo koncentracija: 0,3 %	-	-			-			
DIAL; Mėginys Nr. 2 Partija: 6/15 Naudojimo koncentracija: 0,25 %		-	-	-	-			-
T2; Mėginys Nr. 1 Partija: 74/s/15 Naudojimo koncentracija: 0,2 %					-	-	-	
DESAN; Mėginys Nr. 8 Partija: 83/s/15 Naudojimo koncentracija: 0,2 %					-	-	-	
DIAL; Partija: 6/14 Naudojimo koncentracija: 0,18 %					-	-	-	
DESAN; Mėginys Nr. 6 Partija: 82/s/15 Naudojimo koncentracija: 0,15 %					-	-	-	
EC-STER; Partija: 07/14 Naudojimo koncentracija: 0,35 %	-		-	-				

Paiškinimas: - augimo nėra.

Automatizuotas metodas: Alfred 60, Alifax

Padermė B. subtilis ATCC 19695 - 0,8 McF (apie 10^8 KSV/ml)

Sąlyčio laikas

Produktas	2 sek.	5 sek.	10 sek.	30 sek.	60 sek.	2 min.	3 min.	5 min.
T2; Mėginys Nr. 3 Partija: 74/s/15 Naudojimo koncentracija: 0,3 %	-	-			-			
DESAN; Mėginys Nr. 5 Partija: 82/s/15 Naudojimo koncentracija: 0,3 %	-	-			-			
DIAL; Mėginys Nr. 2 Partija: 6/15 Naudojimo koncentracija: 0,25 %		-	-	-	-			-
T2; Mėginys Nr. 1 Partija: 74/s/15 Naudojimo koncentracija: 0,2 %					-	-	-	
DESAN; Mėginys Nr. 8 Partija: 83/s/15 Naudojimo koncentracija: 0,2 %					-	-	-	
DIAL; Partija: 6/14 Naudojimo koncentracija: 0,18 %					-	-	-	
DESAN; Mėginys Nr. 6 Partija: 82/s/15 Naudojimo koncentracija: 0,15 %					-	-	-	
EC-STER; Partija: 07/14 Naudojimo koncentracija: 0,35 %	-		-	-				

Paaiškinimas: - augimo nėra.

Rezultatų aptarimas

Pagal EN 13704 standartą atlikti eksperimentai parodė DIAL ir EC-STER produktų sporicidinį aktyvumą prieš B. subtilis ATCC 19695 sporas.

Tirpalai parodė veiksmingumą tiek taikant rankinį, tiek automatizuotą metodą eksperimentinėmis sąlygomis, kai buvo naudojami skirtingi sąlyčio laikai ir įvairios tiriamų produktų koncentracijos.

Remiantis gautais rezultatais, tie patys tirpalai buvo naudojami morfologiniams stebėjimams konfokaliniu mikroskopu. B. subtilis sporos po sąlyčio su skirtingų koncentracijų DIAL ir Ec-Ster tirpalais, taip pat teigiama ir neigiama kontrolės buvo nudažytos akridino oranžiniu - gyvybiniu dažikliu, kuris jungiasi su nukleorūgštimis. Atlikus mikroskopinius stebėjimus, mėginiuose, kurie buvo paveikti sterilizuojamaisiais tirpalais, ir neigiamoje kontrolėje nebuvo pastebėta nei sporinių formų, nei vegetacinių ląstelių, kaip parodyta 1-8 paveiksluose. Priešingai, teigiamoje kontrolėje raudonos ir žalios fluorescencijos emisija parodė atitinkamai Bacillus subtilis sporų ir vegetacinių ląstelių buvimą (9-11 pav.).

2015-12-18

Prof. Alfredo Focà

Vertimo pastaba. Pateiktame 7 puslapių originalo faile nėra tekste minimų 1-11 paveikslų. Originalo lentelėse pateikti produktų pavadinimai ir rezultatai išlaikyti nepakeisti.