

Łódź, dnia 31.10. 2020 r.



**Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i
Diagnostyki Mikrobiologicznej
90-235 Łódź
Pomorska 137
tel. 42 677-93-04; fax. 42 677-93-00**

Raport z badań

Ocena skuteczności dezynfekcji z wykorzystaniem RobUV (mobilnego modułu UV na bazie emiterów UV-C)

wykonany na zlecenie Zurad sp. z o. o.

Badania wykonali i raport sporządzili:

dr farm. Bożena Dudkiewicz

dr farm. Paweł Lisiecki

Badane urządzenie:

RobUV to mobilny moduł UV na bazie emiterów UV-C przeznaczony do zwalczania broni biologicznej, w tym do dezynfekcji. Efektem jego działania jest zjonizowanie powietrza oraz niszczenie DNA oraz RNA organizmów żywych (bakterii, grzybów, wirusów) na dowolnych powierzchniach wystawionych na oddziaływanie wysokoenergetycznego promieniowania UV-C). Urządzenie emituje promieniowanie UV-C w zakresie od 200 nm do 280 nm (peak 254 nm).

Zleceniodawca:

Zurad sp. z o.o.

Data dostarczenia urządzenia do badań:

15.10.2020 r.

Okres analizy:

20.10.2020 – 30.10.2020 r.

Metodyka badania:

Badanie wykonano zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP ang. good laboratory practice).

Podłoża i odczynniki

Podłoże TSA (Tryptic Soya Agar) (OXOID)

Podłoże Sabouraud z gentamicyną i chloramfenikolem (OXOID)

Rozcieńczalnik

Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej bez Ca i Mg – PBS (BIOMED)

1% roztwór Tween 80 (Sigma)

Szczepy wzorcowe

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Escherichia coli ATCC 10536

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Enterococcus hirae ATCC 10541

Bacillus subtilis ATCC 6633 (spory)

Candida albicans ATCC 10231

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 (spory)

Przygotowanie szczepów wzorcowych do badań.

W badaniach wykorzystano 2 szczepy bakterii gramujemnych – *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 i *Escherichia coli* ATCC 10536, dwa szczepy bakterii gramodatnich: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Enterococcus hirae* ATCC 10541 oraz dwa szczepy grzybów – *Candida albicans* ATCC 10231 (grzyb drożdżopodobny) i *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (spory grzyba pleśniowego). Dodatkowo wykorzystano przetrwalniki (spory) laseczki gramodatniej *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Szczepy pochodziły z amerykańskiej kolekcji drobnoustrojów (ATCC). W celu zachowania stałości ich cech fenotypowych i genotypowych były one zawieszane w płynnym podłożu BHI z dodatkiem 50% glicerolu i przechowywane w temperaturze -70°C. W badaniach posłużono się ich pierwszym pasażem. Wykorzystano 24 godz. hodowle szczepów bakterii na podłożu TSA inkubowane w temp. 35° C i 48 godzinne hodowle grzybów na podłożu Sabouraud z gentamicyną i chloramfenikolem inkubowane w temp. 25° C przez 72 godziny.

Przebieg badania

Przed doświadczeniem właściwym dokonano standaryzacji zawiesin wzorcowych szczepów użytych w badaniach, przygotowanych w jałowym rozcieńczalniku (PBS). Pomiarów gęstości optycznej zawiesin dokonywano przy użyciu nefelometru.

Gęstość optyczna przygotowanych zawiesin komórek szczepów bakterii wynosiła 0,5 według skali McFarlanda. Liczbę komórek w zawiesinach oceniano metodą dziesięciokrotnych rozcieńczeń i posiewu powierzchniowego. Wystandaryzowane zawiesiny bakterii zawierały od 10^8 do 10^{10} cfu/ml. Zawiesinę przetrwalników (spor) *Bacillus subtilis* w liczbie 5×10^7 cfu/ml przygotowano według procedury opisanej w normie PN-EN 13704.

Przygotowano również zawiesinę komórek szczepu drożdży *C.albicans* ATTC 10231 o gęstości optycznej 3,0 według skali McFarlanda oraz zawiesinę spor szczepu grzyba pleśniowego *A.brasiliensis* ATTC 16404 według rekomendacji PN-EN 13697, o gęstości optycznej 6,5 według skali McFarlanda. Liczbę komórek w zawiesinach oceniano metodą dziesięciokrotnych rozcieńczeń i posiewu powierzchniowego. Wystandaryzowane zawiesiny grzybów zawierały 10^7 cfu/ml.

Z tak przygotowanych zawiesin bakteryjnych pobierano po 100 μ l i posiewano metodą posiewu powierzchniowego na cztery podłoża TSA.

Podobnie, z przygotowanych zawiesin komórek grzybów pobierano po 100 μ l i posiewano metodą posiewu powierzchniowego na cztery podłoża Sabouraud z gentamicyną i chloramfenikolem.

Jedno z czterech podłoży stanowiło próbę kontrolną wzrostu szczepu, nie poddanego procesowi dezynfekcji przez badane urządzenie. Trzy pozostałe podłoża posiane zawiesinami drobnoustrojów wzorcowych zostały poddane dezynfekcji, odpowiednio przez: 5 minut, 15 minut oraz 30 minut. Czas dezynfekcji odmierzano 15 minut po uruchomieniu urządzenia. Urządzenie było

umieszczone w odległości jednego metra od powierzchni podłogi, na które posiano drobnoustroje.

Podłoża z drobnoustrojami inkubowano w warunkach tlenowych, przez 48 godzin, w temperaturze 35°C (bakterie) oraz 72 godziny, w temperaturze 25°C (grzyby). Po tym czasie liczono wyrosłe kolonie i wyliczano liczbę komórek w 1 ml posianej zawiesiny (cfu/ml). Obliczano również odsetek redukcji (%) oraz logarytm redukcji liczby zdolnych do wzrostu komórek bakterii i grzybów po dezynfekcji w stosunku do liczby komórek nie poddanych dezynfekcji.

Wyniki badań

Skuteczność dezynfekcji w stosunku do wzorcowych szczepów bakterii i grzybów badano z wykorzystaniem urządzenia RobUV (mobilnego modułu UV na bazie emiterów UV-C).

Efektywność dezynfekcji oceniano zmianą liczebności komórek (cfu/ml) oraz odsetkiem (%) i logarytmem ich redukcji. Otrzymane wartości przedstawiono w tabelach 1–7.

Po 5-minutowej dezynfekcji odnotowano zahamowanie wzrostu (odsetek redukcji 100%) dwóch szczepów: *E.hirae* ATTC 10541 i *E.coli* ATTC 10536.

W stosunku do pozostałych szczepów wzorcowych uzyskano niemal 100% redukcję wzrostu. Wynosiła ona odpowiednio: dla *P.aeruginosa* ATTC 1544, *S.aureus* ATTC 6538, *B.subtilis* ATTC 6633 (spory) – 99,99%; dla szczepu *C.albicans* ATTC 10231 – 99,96% a dla grzyba pleśniowego *A.brasiliensis* ATTC 16404 (spory) – 99,90%.

15-minutowa dezynfekcja spowodowała całkowite zahamowanie wzrostu komórek szczepów: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *E.hirae* ATTC 10541, *B.subtilis* ATTC 6633 (spory), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *E.coli* ATTC 10536 oraz grzyba drożdżowego *Candida albicans* ATCC 10231.

W przypadku spor szczepu *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 15-minutowa dezynfekcja spowodowała redukcję ich liczebności do poziomu 99,98%, a 30-minutowa – do poziomu 99,99%.

Innym parametrem pozwalającym ocenić skuteczność dezynfekcji było wyliczenie logarytmu redukcji liczebności zdolnych do wzrostu komórek. Jest on zalecany do oceny skuteczności działania bakteriobójczego, grzybobójczego i sporobójczego chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych (PN-EN 1275, PN-EN 1040, PN-EN 1276, PN-EN 13704). Wyniki takiej analizy przedstawiono w tabelach 1-7.

Największy logarytm redukcji zdolnych do wzrostu komórek szczepów bakterii (*S.aureus*, *E.hirae*, *E.coli*, *P.aeruginosa*), przekraczający wartość 8,0, uzyskano po 5-minutowej dezynfekcji.

Dla komórek grzyba drożdżopodobnego *C.albicans* największy logarytm redukcji, wynoszący 7,0, uzyskano po 15 minutowej dezynfekcji.

Także największy logarytm redukcji, wynoszący 7,69, osiągnięto po 15 minutowej dezynfekcji spor *B.subtilis*.

Największy logarytm redukcji spor *A.brasiliensis*, wynoszący 4,2, osiągnięto dopiero po 30-minutowej dezynfekcji.

Tabela 1. Wpływ dezynfekcji urządzeniem RobUV na przeżywalność komórek szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Czas dezynfekcji (min.)	Liczebność komórek drobnoustrojów (cfu/ml)*	Odsetek redukcji (%)	Log redukcji
Kontrola (przed dezynfekcją)	$1,3 \times 10^{10}$	-	-
5	$2,0 \times 10^1$	99,99	8,81
15	0	100	10,11
30	0	100	10,11

*-jednostki tworzące kolonię

Tabela 2. Wpływ dezynfekcji urządzeniem RobUV na przeżywalność komórek szczepu *Enterococcus hirae* ATCC 10541

Czas dezynfekcji	Liczebność komórek drobnoustrojów (cfu/ml)*	Odsetek redukcji (%)	Log redukcji
Kontrola (przed dezynfekcją)	$3,7 \times 10^8$	-	-
5	0	100	8,56
15	0	100	8,56
30	0	100	8,56

*-jednostki tworzące kolonię

Tabela 3. Wpływ dezynfekcji urządzeniem RobUV na przeżywalność komórek szczepu *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Czas dezynfekcji	Liczebność komórek drobnoustrojów (cfu/ml)	Odsetek redukcji (%)	Log redukcji
Kontrola (przed dezynfekcją)	$5,0 \times 10^7$	-	-
5	$5,6 \times 10^3$	99,99	3,95
15	0	100	7,69
30	0	100	7,69

Tabela 4. Wpływ dezynfekcji urządzeniem RobUV na przeżywalność komórek szczepu *Escherichia coli* ATCC 10536

Czas dezynfekcji	Liczebność komórek drobnoustrojów (cfu/ml)*	Odsetek redukcji (%)	Log redukcji
Kontrola (przed dezynfekcją)	$8,0 \times 10^8$	-	-
5	0	100	8,9
15	0	100	8,9
30	0	100	8,9

*-jednostki tworzące kolonię

Tabela 5. Wpływ dezynfekcji urządzeniem RobUV na przeżywalność komórek szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442

Czas dezynfekcji	Liczebność komórek drobnoustrojów (cfu/ml)*	Odsetek redukcji (%)	Log redukcji
Kontrola (przed dezynfekcją)	$5,4 \times 10^9$	-	-
5	$4,0 \times 10^1$	99,99	8,13
15	0	100	9,73
30	0	100	9,73

*-jednostki tworzące kolonię

Tabela 6. Wpływ dezynfekcji urządzeniem RobUV na przeżywalność komórek szczepu *Candida albicans* ATCC 10231

Czas dezynfekcji	Liczebność komórek drobnoustrojów (cfu/ml)*	Odsetek redukcji (%)	Log redukcji
Kontrola (przed dezynfekcją)	$1,0 \times 10^7$	-	-
5	$4,0 \times 10^1$	99,96	5,4
15	0	0	7,0
30	0	0	7,0

*-jednostki tworzące kolonię

Tabela 7. Wpływ dezynfekcji urządzeniem RobUV na przeżywalność komórek szczepu *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Czas dezynfekcji	Liczebność komórek drobnoustrojów (cfu/ml)*	Odsetek redukcji (%)	Log redukcji
Kontrola (przed dezynfekcją)	$1,1 \times 10^7$	-	-
5	$1,0 \times 10^5$	99,90	2,04
15	$1,6 \times 10^3$	99,98	3,84
30	$7,0 \times 10^2$	99,99	4,20

*-jednostki tworzące kolonię

Wnioski

W ocenie skuteczności dezynfekcji z wykorzystaniem urządzenia RobUV (mobilny moduł UV na bazie emiterów UV-C) firmy Zurad sp. z o.o. postanowiono odnieść się do wymagań dla bakteriobójczej, grzybobójczej i sporobójczej aktywności chemicznych środków dezynfekcyjnych. Wg tych norm urządzenie skutecznie redukowało liczebność komórek wzorcowych szczepów drobnoustrojów (bakterii i grzybów).

Dla bakterii skuteczna była już **5 minutowa dezynfekcja**. Wyznaczony logarytm redukcji zdolnych do wzrostu komórek przekroczył wartość 8. Dla bakteriobójczej aktywności chemicznych środków dezynfekcyjnych wymagany jest log redukcji wynoszący co najmniej 5.

Dla spor *B. subtilis* uzyskano log redukcji większy niż 7 po **15 minutowej dezynfekcji**. Dla sporobójczej aktywności chemicznych środków dezynfekcyjnych wymagany jest log redukcji wynoszący co najmniej 3.

Dla grzybobójczej aktywności chemicznych środków dezynfekcyjnych wymagany jest log redukcji wynoszący co najmniej 4. Taki poziom redukcji dla *C. albicans* osiągnięto **po 5 minutowej dezynfekcji**, ale dla *A. brasiliensis* **dopiero po 30 minutach**.

Wyniki naszych badań wskazują, że minimalny czas niezbędny do przeprowadzenia skutecznej dezynfekcji z wykorzystaniem urządzenia RobUV (mobilny moduł UV na bazie emiterów UV-C) wynosi 30 minut.