

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška RIBIČ

**UČINKOVITOST RAZKUŽIL NA DELOVNIH POVRŠINAH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EFFICIENCY OF DISINFECTANTS ON WORKING SURFACES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za živilstvo na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del je bil izveden v Službi za laboratorijsko kontrolo kakovosti na oddelku za mikrobiološko kontrolo v tovarni Krka d.d. Novo mesto.

Študijska komisija univerzitetnega študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Hrvoja Petkovića, za somentorico doc. dr. Barbaro Jeršek in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentor: doc. dr. Hrvoje Petković

Somentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Hrvoje Petković  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Barbara Jeršek  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Sonja Smole Možina  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Urška Ribič

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

- ŠD Dn  
DK UDK 579.24+579.26:615.012 (043)=163.6  
KG rast mikroorganizmov / farmacevtska industrija / kontaminacija delovnih površin / mikrobiološka kontrola proizvodnega okolja / razkužila / učinkovitost razkužil / baktericiden učinek / fungiciden učinek / sporociden učinek / etanol / kvarterne amonijeve spojine / perocetna kislina / *Staphylococcus aureus* / *Staphylococcus epidermidis* / *Pseudomonas aeruginosa* / *Pseudomonas cepacia* / *Bacillus subtilis* / *Candida albicans* / *Aspergillus brasiliensis*  
AV RIBIČ, Urška  
SA PETKOVIĆ, Hrvoje (mentor) / JERŠEK Barbara (somentorica) / SMOLE MOŽINA Sonja (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
LI 2010  
IN UČINKOVITOST RAZKUŽIL NA DELOVNIH POVRŠINAH  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 62 str., 16 pregl., 21 sl., 4 pril., 62 vir.,  
IJ sl  
JI sl / en  
AI V farmacevtski industriji je zagotavljanje mikrobiološke neoporečnosti okolja izrednega pomena. Namen naloge je bil preveriti učinkovitost dveh razkužil, ki sta v uporabi za razkuževanje proizvodnega okolja. Razkužilo Apesin Rapid ima za aktivno substanco kvarterne amonijeve spojine, razkužilo Apesin dezinfekcijski sprej pa je 70 % raztopina izopropanola in se uporablja nerazredčen. Kot delovno raztopino razkužila Apesin Rapid proizvajalec priporoča 0,5 % in 0,25 % raztopino pri kontaktnih časih 30 in 60 minut. Poleg omenjenih dveh smo uporabili še 0,01 % raztopino razkužila. Učinkovitost razkužil smo preverili s standardno metodo (SIST EN 1040:2001 za baktericidno delovanje, SIST EN 1275:2001 za fungicidno delovanje in SIST EN 14347:2005 za sporocidno delovanje) in z metodo umetne kontaminacije na nerjavečih ploščah, ki najbolje simulira delovne površine v proizvodnji. Razkužili smo testirali na različnih mikroorganizmih. Apesin dezinfekcijski sprej in Apesin Rapid v 0,5 % in 0,25 % koncentraciji sta delovali baktericidno proti bakterijam vrst *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Pseudomonas cepacia* in fungicidno proti kvasovkam vrste *Candida albicans*. 0,01 % raztopina razkužila Apesin Rapid je bila neučinkovita ne glede na vrsto testnih mikroorganizmov. Fungicidno delovanje proti plesnim vrste *Aspergillus brasiliensis* je imelo razkužilo Apesin dezinfekcijski sprej, pri razkužilu Apesin Rapid pa zadovoljivega fungicidega delovanja ni bilo pri nobeni uporabljeni koncentraciji, čeprav ima deklarirano fungicidno delovanje. Ker se v proizvodnji v primeru okužbe s plesnimi za razkuževanje uporablja razkužilo P3-Oxonia active, smo določili učinkovitost tega razkužila. Določili smo fungicidni učinek na plesni vrste *Aspergillus brasiliensis*. Proti sporogenim bakterijam vrste *Bacillus subtilis* razkužili Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej nista delovali sporocidno. Razkužili nimata deklariranega sporocidnega delovanja, zato smo take rezultate tudi pričakovali. Z uporabo obeh metod, standardne metode in z določitvijo protimikrobnega delovanja razkužil na umetno kontaminiranih ploščah, smo dobili primerljive rezultate. Fungicidnega učinka razkužila P3-oxonia active 150 in Apesin dezinfekcijski sprej na plesni vrste *A. brasiliensis* nismo določili, medtem ko so bili drugi rezultati skladni. Razlike v rezultatih med obema metodama so lahko zaradi različnih kontaktnih časov, načina vzorčenja in vrste metode (suspenzijska metoda in vzorčenje na površini). Ker je določanje protimikrobnega učinka po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla simulacija dejanskega stanja v proizvodnem okolju, bo potrebna izboljšava in standardizacija novo postavljene metode.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dn  
DC UDC 579.24+579.26:615.012 (043)=163.6  
CX microbial growth / pharmaceutical industry / contamination of working surfaces / microbiological control of production environment / disinfectants / disinfectant efficiency / bactericidal effects / fungicidal effects / sporicidal effects / ethanol / quaternary ammonium compounds / peracetic acid / *Staphylococcus aureus* / *Staphylococcus epidermidis* / *Pseudomonas aeruginosa* / *Pseudomonas cepacia* / *Bacillus subtilis* / *Candida albicans* / *Aspergillus brasiliensis*  
AU RIBIČ, Urška  
AA PETKOVIĆ, Hrvoje (supervisor) / JERŠEK, Barbara (co-advisor) / SMOLE MOŽINA Sonja (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology  
PY 2010  
TI EFFICIENCY OF DISINFECTANTS ON WORKING SURFACES  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XI, 62 p., 16 tab., 21 fig., 4 ann., 62 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Providing a microbial irreproachability of the working environment in pharmaceutical industry is of great importance. The main aim of this diploma work was to evaluate the efficiency of two disinfectants which are regularly used for the disinfection of the working environment and each of them has a different active ingredient. The Apesin Rapid contains quarter ammonium compounds as an active substance, whereas the Apesin disinfection spray is a 70 % solution of isopropanol and is used undiluted. The Apesin Rapid was used in three different working solutions. The manufacturer recommends 0.5 % and 0.25 % solutions in the duration of the exposure time of 30 and 60 minutes, respectively. In addition, we tested Apesin Rapid at the concentration of 0.01 % solution. The efficiency of disinfectants was evaluated by the standardized method SIST EN 1040:2001 for bactericidal, SIST EN 1275:2001 method for fungicidal, and EN 14347:2005 method for sporicidal efficiency. These methods were compared to the method of artificial contamination on stainless steel surfaces which simulates worktops in the real industrial environment. Both disinfectants were tested by a number of selected test-microorganisms. The Apesin disinfection spray and Apesin Rapid, at the concentrations of 0.5 % and 0.25 % displayed bactericidal effect on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* and fungicidal effect on *Candida albicans*. The 0.01 % working solution of Apesin Rapid was ineffective regardless of the test-organism used in this study. Apesin disinfection spray displayed fungicidal activity against *Aspergillus brasiliensis*, while Apesin Rapid did not show a sufficient fungicidal activity at any working concentrations tested, despite its declared fungicidal activity. The Apesin disinfection spray and Apesin Rapid disinfectants did not display sporicidal activity against sporogenous bacteria *Bacillus subtilis*. The results were expected since they do not have a declared sporicidal activity. Finally, the solution of P3-oxonia active 150 which contains peracetic acid as an active ingredient, often applied in the industry for prevention of fungal contamination, was also tested in this study. P3-oxonia active 150 proved efficient activity against *Aspergillus brasiliensis*. Comparable results were observed independently of the method applied, whether using standard methods described earlier or the method carried out on artificially contaminated stainless steel plates. Expectedly, we have observed a degree of discrepancies between the two methods, considering that one was a suspension method, while the other was carried out on a hard surface. Thus, these differences may have occurred due to the nature of contact and length of contact times. We suggest that the testing procedure in which artificial contamination of stainless steel plates was carried out and the antimicrobial effect observed using this approach is, in fact, a better approximation of an actual industrial environment. Within reason, this approach could be considered as an upgraded method. However, further standardization of this new method will be required.

**KAZALO VSEBINE**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA _____	III
KEY WORDS DOCUMENTATION _____	IV
KAZALO VSEBINE _____	V
KAZALO PREGLEDNIC _____	VII
KAZALO SLIK _____	VIII
KAZALO PRILOG _____	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV _____	X
<b>1 UVOD _____</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN _____	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE _____	2
<b>2 PREGLED OBJAV _____</b>	<b>3</b>
2.1 SNAŽNOST PROIZVODNEGA OKOLJA V FARMACIJI _____	3
<b>2.1.1 Snažnost površin in prostorov _____</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Mikrobiološka kontrola čistosti proizvodnega okolja _____</b>	<b>4</b>
2.1.2.1 Kontrola površin _____	5
2.1.2.2 Kontrola zraka _____	6
2.1.2.3 Kontrola osebja _____	7
2.1.2.4 Kontrola vode _____	7
2.2 RAZKUŽEVANJE IN RAZKUŽILA _____	9
<b>2.2.1 Razkuževanje _____</b>	<b>9</b>
<b>2.2.2 Učinkovitost razkuževanja _____</b>	<b>9</b>
<b>2.2.3 Delitev razkužil glede na kemično sestavo in po načinu delovanja _____</b>	<b>11</b>
<b>2.2.4 Učinek aktivnih komponent v razkužilih na različne mikroorganizme _____</b>	<b>11</b>
2.2.4.1 Alkoholi _____	13
2.2.4.2 Kvarterne amonijeve spojine _____	14
2.2.4.3 Raztopina vodikovega peroksida in očetne kisline (perocetna kislina) _____	14
2.2.4.4 Druga razkužila _____	14
<b>2.2.5 Metode določanja učinkovitosti razkužil _____</b>	<b>15</b>
2.3 MIKROORGANIZMI KOT KONTAMINANTI PROIZVODNEGA OKOLJA _____	18
<b>2.3.1 Bakterije rodu <i>Staphylococcus</i> _____</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2 Bakterije rodu <i>Pseudomonas</i> _____</b>	<b>19</b>
<b>2.3.3 Bakterije rodu <i>Bacillus</i> _____</b>	<b>19</b>
<b>2.3.4 Kvasovke rodu <i>Candida</i> _____</b>	<b>20</b>
<b>2.3.5 Plesni rodu <i>Aspergillus</i> _____</b>	<b>21</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE _____</b>	<b>22</b>
3.1 SHEMA DELA _____	22
3.2 MATERIALI _____	23

<b>3.1.1 Delovni mikroorganizmi</b>	<b>23</b>
<b>3.1.2 Testi za identifikacijo mikroorganizmov</b>	<b>23</b>
<b>3.1.3 Mikrobiološka gojišča</b>	<b>24</b>
<b>3.1.4 Razkužila</b>	<b>26</b>
<b>3.1.5 Raztopine in kemikalije</b>	<b>27</b>
<b>3.1.6 Laboratorijska oprema</b>	<b>28</b>
<b>3.2 METODE DE LA</b>	<b>29</b>
<b>3.2.1 Identifikacija bakterij</b>	<b>29</b>
3.2.2.1 Identifikacijski test ID 32 STAPH	30
3.2.2.2 Identifikacijski test ID 32 GN	30
3.2.2.3 Identifikacijski test BD BBL Crystal™ Identification Systems, Gram positive ID kit	31
<b>3.2.2 Priprava delovnih raztopin razkužila</b>	<b>31</b>
<b>3.2.3 Priprava delovnih mikroorganizmov</b>	<b>32</b>
3.2.3.1 Priprava mikroorganizmov	32
3.2.3.2 Priprava testnih suspenzij mikroorganizmov	32
3.2.3.3 Priprava suspenzij mikroorganizmov za validacijo metode	33
<b>3.2.4 Določitev biocidnega delovanja razkužil</b>	<b>34</b>
3.2.4.1 Določitev baktericidnega delovanja	36
3.2.4.2 Določitev fungicidnega delovanja	38
3.2.4.3 Določitev sporocidnega delovanja	39
<b>3.2.5 Določitev biocidnega učinka razkužil po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla</b>	<b>41</b>
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>43</b>
4.1 IDENTIFIKACIJA MIKROORGANIZMOV	43
4.2 PREVERJANJE UČINKOVITOSTI RAZKUŽIL S STANDARDNIMI METODAMI	43
4.2.1 Baktericidno delovanje	43
4.2.2 Fungicidno delovanje	45
4.2.3 Sporocidno delovanje	48
4.3 DOLOČITEV UČINKOVITOSTI RAZKUŽIL PO UMETNI KONTAMINACIJI PLOŠČ IZ NERJAVEČEGA JEKLA	50
4.3.1 Baktericidno delovanje razkužil na plošči iz nerjavečega jekla	50
4.3.2 Fungicidno delovanje razkužil na plošči iz nerjavečega jekla	52
4.3.3 Sporocidno delovanje razkužil na plošči iz nerjavečega jekla	54
<b>5 SKLEPI</b>	<b>56</b>
<b>6 POVZETEK</b>	<b>57</b>
<b>7 VIRI</b>	<b>58</b>
<b>ZAHVALA</b>	

**KAZALO PREGLEDNIC**

Pregl. 1: Začetna koncentracija bakterij ( $N_b$ ) v testni suspenziji in koncentracija bakterij ( $N_{Ab}$ ) v suspenziji po 30-minutnem delovanju različnih koncentracij razkužil	44
Pregl. 2: Redukcija viabilnosti ( $R_{Vb}$ ) bakterij v suspenziji po 30-minutnem delovanju razkužila	44
Pregl. 3: Začetna koncentracija kvasovk in plesni ( $N_f$ ) v testni suspenziji ter koncentracija kvasovk in plesni ( $N_{Af}$ ) v suspenziji po 30-minutnem delovanju različnih koncentracij razkužil	45
Pregl. 4: Redukcija viabilnosti ( $R_{Vf}$ ) kvasovk in plesni v suspenziji po 30-minutnem delovanju razkužila	46
Pregl. 5: Začetna koncentracija plesni ( $N_f$ ) v testni suspenziji in koncentracija plesni v suspenziji po 30-minutnem delovanju ( $N_{Af}$ ) razkužila P3-Oxonia Active	47
Pregl. 6: Redukcija viabilnosti plesni vrste <i>A. brasiliensis</i> v suspenziji po 30-minutnem delovanju razkužila P3-Oxonia Active	47
Pregl. 7: Začetna koncentracija spor ( $N_s$ ) v testni suspenziji in koncentracija spor ( $N_{As}$ ) v suspenziji po 30-minutnem delovanju različnih koncentracij razkužil	48
Pregl. 8: Ocena redukcije viabilnosti spor ( $R_{Vs}$ ) v suspenziji po 30-minutnem delovanju razkužila	49
Pregl. 9: Koncentracija bakterij v suspenziji za umetno kontaminacijo plošč iz nerjavečega jekla ( $N_{V1}$ ) in koncentracija bakterij na kontaminirani plošči po razkuževanju ( $N_{A1}$ ) glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo	50
Pregl. 10: Redukcija viabilnosti ( $R_{V2}$ ) bakterij na kontaminirani plošči iz nerjavečega jekla glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo	51
Pregl. 11: Koncentracija kvasovk in plesni v suspenziji za umetno kontaminacijo ( $N_{V1}$ ) ter koncentracija kvasovk in plesni na plošči po nanosu razkužil na kontaminirani plošči iz nerjavečega jekla ( $N_{A1}$ ) glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo	52
Pregl. 12: Redukcija viabilnosti ( $R_{V1}$ ) kvasovk in plesni na kontaminirani plošči iz nerjavečega jekla glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo	52
Pregl. 13: Začetno število plesni v suspenziji za kontaminacijo plošče iz nerjavečega jekla ( $N_{V1}$ ) in število plesni na kontaminirani plošči po razkuževanju z razkužilom P3-Oxonia active 150	53
Pregl. 14: Redukcija viabilnosti plesni na kontaminirani plošči po razkuževanju z razkužilom P3-Oxonia Active	53
Pregl. 15: Začetna koncentracija spor v suspenziji za kontaminacijo plošče iz nerjavečega jekla ( $N_{V1}$ ) in koncentracija spor na kontaminirani plošči po kontaminaciji in razkuževanju glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo	54
Pregl. 16: Redukcija viabilnosti ( $R_{V1}$ ) spor na kontaminirani plošči iz nerjavečega jekla glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo	54

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Plošča Rodac s hranljivim gojiščem SCDA _____	5
Slika 2: Kolonije bakterij vrste <i>Staphylococcus aureus</i> na plošči Rodac _____	6
Slika 3: Filter za membransko filtracijo Millipore (Todar, 2008a) _____	8
Slika 4: Kolonije bakterij vrste <i>Pseudomonas cepacia</i> na gojišču SCDA _____	8
Slika 5: Mehanizmi delovanja različnih aktivnih substanc razkužil (IFT Expert report, 2006: 86) _____	12
Slika 6: Celice bakterij vrste <i>Staphylococcus aureus</i> (Todar, 2008b) _____	18
Slika 7: Celice bakterij vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Aridis Pharmaceuticals, 2010) _____	19
Slika 8: Bakterije vrste <i>Bacillus subtilis</i> (Smith in Hussey, 2005) _____	20
Slika 9: Kvasovke vrste <i>Candida albicans</i> (Kunkel, 2008) _____	20
Slika 10: Apeks s konidiji plesni vrste <i>Aspergillus brasiliensis</i> (Sandle, 2010) _____	21
Slika 11: Kolonije plesni vrste <i>Aspergillus brasiliensis</i> na gojišču SAB _____	21
Slika 12: Shema poteka dela _____	22
Slika 13: Razkužilo Apesin Rapid _____	26
Slika 14: Razkužilo Apesin Desinfektions-spray _____	27
Slika 15: Primer rezultatov identifikacijskega testa ID 32 Staph za identifikacijo bakterij rodov <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> in sorodnih vrst, <i>Rothia</i> in <i>Aerococcus</i> _____	30
Slika 16: Identifikacijski test BD BBL Crystal™ Identification Systems, Gram positive ID kit za identifikacijo po Gramu pozitivnih aerobnih bakterij _____	31
Slika 17: Kolonije bakterij vrste <i>Staphylococcus aureus</i> in <i>Staphylococcus epidermidis</i> na poševnem gojišču SCDA _____	33
Slika 18: Testne suspenzije bakterij vrst <i>P. cepacia</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P.aeruginosa</i> in <i>S. aureus</i> _____	34
Slika 19: Shema določanja baktericidnega in fungicidnega učinka razkužil z metodo mebranske filtracije po standardih SIST EN 1040:2001 in SIST EN 1275:2001 _____	34
Slika 20: Shema določanja sporocidnega učinka razkužil z razredčevalno-nevtralizacijsko metodo po standardu SIST EN 14347:2005 _____	35
Slika 21: Shema določanja biocidnega učinka razkužil po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla _____	41



## **KAZALO PRILOG**

- Priloga A: Validacija standardne metode SIST EN 1040:2001 in negativne kontrole pri določitvi baktericidnega delovanja razkužil Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej
- Priloga B: Validacija standardne metode SIST EN 1275:2001 in negativne kontrole pri določitvi fungicidnega delovanja razkužil Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej
- Priloga C: Validacija standardne metode SIST EN 12347:2001 in negativne kontrole pri določitvi sporocidnega delovanja razkužil Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej
- Priloga D: Pozitivne in negativne kontrole pri določanju učinkovitosti razkužil po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla in po razkuževanju z razkužili Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej

**SEZNAM OKRAJŠAV**

<b>ATCC</b>	oznaka seva iz zbirke American Type Culture Collection
<b>B</b>	koncentracija spor (cfu/ml) pri kontroli nevtralizatorja
<b><i>B. subtilis</i></b>	bakterije vrste <i>Bacillus subtilis</i>
<b>c</b>	vsota kolonij na ploščah, upoštevanih v izračunu števila mikroorganizmov
<b>c<sub>1</sub></b>	vzorčna mesta z 0,5 % razkužilom Apesin Rapid
<b>c<sub>2</sub></b>	vzorčna mesta z 0,25 % razkužilom Apesin Rapid
<b>c<sub>3</sub></b>	vzorčno mesto z 0,01 % razkužilom Apesin Rapid
<b>C</b>	koncentracija spor (cfu/ml) v validaciji razredčevalno-nevtralizacijske metode
<b><i>C. albicans</i></b>	kvasovke vrste <i>Candida albicans</i>
<b>cfu</b>	kolonijska enota (ang. Colony forming units)
<b>d</b>	faktor redčenja ( $10^{-1}$ )
<b>d<sub>1</sub></b>	faktor redčenja prve upoštevane redčitve pri izračunu števila mikroorganizmov
<b>n</b>	število plošč, upoštevanih v izračunu števila mikroorganizmov
<b>N<sub>1</sub></b>	število zraslih mikroorganizmov na prvi plošči Rodac
<b>N<sub>2</sub></b>	število zraslih mikroorganizmov na drugi plošči Rodac
<b>N<sub>3</sub></b>	število zraslih mikroorganizmov na tretji plošči Rodac
<b>N<sub>Ab</sub></b>	koncentracija bakterij po delovanju razkužila (cfu/ml)
<b>N<sub>Af</sub></b>	koncentracija bakterij in plesni (cfu/ml) po razkuževanju
<b>N<sub>As</sub></b>	koncentracija spor (cfu/ml) po razkuževanju
<b>N<sub>A1</sub></b>	koncentracija preživelih mikroorganizmov v 1 ml po delovanju razkužila
<b>N<sub>b</sub></b>	začetna koncentracija bakterij (cfu/ml) v testni suspenziji
<b>N<sub>f</sub></b>	začetna koncentracija kvasovk oz. plesni (cfu/ml) v testni suspenziji
<b>N<sub>s</sub></b>	začetna koncentracija spor (cfu/ml) v testni suspenziji
<b>N<sub>V</sub></b>	koncentracija mikroorganizmov (cfu/ml) v suspenziji za validacijo membranske filtracije in za umetno kontaminacijo
<b>N<sub>Vs</sub></b>	koncentracija spor (cfu/ml) v suspenziji za validacijo suspenzijskega testa
<b>N<sub>W</sub></b>	koncentracija spor (cfu/ml) pri kontroli vode
<b>N<sub>Xb</sub></b>	koncentracija bakterij (cfu/ml) pri kontroli membranske filtracije
<b>N<sub>Xf</sub></b>	koncentracija kvasovk in plesni (cfu/ml) pri kontroli membranske filtracije
<b>N<sub>Yb</sub></b>	koncentracija bakterij (cfu/ml) pri kontroli filtracijskega testa
<b>N<sub>Yf</sub></b>	koncentracija kvasovk oz. plesni (cfu/ml) pri kontroli filtracijskega testa
<b>neg. k.</b>	negativne kontrole
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	bakterije vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b><i>P. cepacia</i></b>	bakterije vrste <i>Pseudomonas cepacia</i>
<b>poz. k.</b>	pozitivne kontrole
<b>RODAC</b>	plošča RODAC (ang. Replicate Organism Detection And Counting)
<b>R<sub>Vb</sub></b>	redukcija viabilnosti bakterij
<b>R<sub>Vf</sub></b>	redukcija viabilnosti kvasovk in plesni
<b>R<sub>Vs</sub></b>	redukcija viabilnosti spor
<b>R<sub>V1</sub></b>	redukcija viabilnosti mikroorganizmov po razkuževanju na plošči iz nerjavečega jekla

<b><i>S. aureus</i></b>	bakterije vrste <i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>S. epidermidis</i></b>	bakterije vrste <i>Staphylococcus epidermidis</i>
<b>SAB</b>	trdo gojišče Sabouraud (ang. Sabouraud agar medium)
<b>SCD</b>	tekoče gojišče SCD (ang. Soybean Casein Digest medium)
<b>SCDA</b>	trdo gojišče SCDA (ang. Soybean Casein Digest Agar)

## 1 UVOD

Mikroorganizmi nas obdajajo povsod, tako v zemlji, v vodi in v zraku, kot na površinah, na in v nas samih. V večini primerov so koristni za normalen potek življenja, v nekaterih primerih pa lahko predstavljajo tveganje in grožnjo za propad in uničenje stvari in procesov.

V nekaterih primerih je potreben nadzor nad prisotnostjo in številom mikroorganizmov, saj ponekod njihova prisotnost ni zaželjena, pa če tudi gre za popolnoma neškodljive vrste. Eno izmed takih okolij je farmacevtska industrija, predvsem prostori, kjer poteka proizvodnja zdravilnih učinkovin. Najbolj tveganju izpostavljena so okolja proizvodnje intravenoznih pripravkov, ki so namenjena direktnemu vnosu v človeško telo. V tej proizvodnji se zahteva sterilno okolje in vsak odstop od sterilnega lahko pomeni tveganje za okužbo.

Farmacevtska industrija ima razvit sistem zagotavljanja, vzdrževanja in nadzora čistoče okolja, vključuje pa vse komponente, ki predstavljajo morebiten izvor in prenos okužbe. Poleg redne analize mikrobiološke neoporečnosti oz. sterilnosti surovin, polizdelkov in končnih izdelkov je ključnega pomena tudi neoporečnost proizvodnega okolja. Čiščenje in kontrola čistoče se redno izvaja v farmacevtskih obratih, predvsem v okolju, kjer poteka proizvodnja farmacevtskih izdelkov.

Poleg rednega čiščenja je v farmacevtski industriji pomembno tudi razkuževanje, ki lahko poteka na več načinov, najpogostejša je uporaba kemičnih agensov. Poleg rednega in temeljitega razkuževanja je pomembna pravilna izbira razkužila, ki ustreza vsem kriterijem. Nepogrešljiv je tudi nadzor čistoče okolja, ki ga v farmacevtski industriji največkrat izvaja mikrobiološki laboratorij. V rednih časovnih intervalih se izvaja kontrola čistoče okolja, ki zajema vse udeležene komponente, ki lahko pridejo v stik s proizvedenim izdelkom. Tako se kontrolira čistoča zraka, vode, površin (tla, stene, stroji ipd.) in osebja.

Upoštevati moramo, da je mikrobna populacija zelo raznolika, nikoli ni splošnega pravila, kako enostavno in popolnoma odstraniti vse prisotne mikroorganizme. Za razkuževanje je potrebno izbrati razkužilo, ki ima širok spekter delovanja in enostavno uporabo, pri izbiri pa veliko vlogo igrata tudi ekonomičnost in netoksičnost.

## 1.1 NAMEN

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti učinkovitost razkužil, ki so v uporabi v proizvodnji tovarne Krka d.d. Novo mesto, na različnih mikroorganizmih, tako tipskih sevih kot tudi izolatih iz proizvodnje. Z različnima metodama preverjanja učinkovitosti razkužil (v suspenziji in na površini) smo želeli priti do primerljivih rezultatov.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da imata razkužili Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej baktericidno in fungicidno delovanje, ne pa sporocidnega. Za razkužili predvidevamo, da enako učinkujeta na površini kot v suspenziji ter da bolj učinkovito delujeta na tipske seve kot na izolate iz proizvodnje. Rezultate obeh metod določanja učinkovitosti razkužil (suspenzijska metoda in metoda določanja učinkovitosti na trdni površini) lahko med seboj primerjamo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SNAŽNOST PROIZVODNEGA OKOLJA V FARMACIJI

#### 2.1.1 Snažnost površin in prostorov

Do kontaminacije farmacevtskih izdelkov tekom proizvodnje prihaja zaradi mikrobiološko oporečnih vhodnih materialov (surovine, voda), oporečnega okolja in delovnih razmer v proizvodnji, pakiranja ali delavcev, ki sodelujejo v proizvodnem procesu. V farmacevtski industriji najdemo veliko produktov, ki so potencialna tarča za kontaminacijo z različnimi mikroorganizmi. Večkrat kontaminirani produkti so različne raztopine in mešanice, produkti z visoko vsebnostjo vode (sirupi, olja), alkoholne raztopine, konzervansi, razkužila, antiseptiki in drugi protimikrobni preparati, pa tudi tablete, praški in sorodni preparati. Farmacevtski in kozmetični proizvodi so danes kompleksne sestave in vsebujejo mnogo snovi, ki v določenih razmerah lahko favorizirajo rast in razmnoževanje mikroorganizmov. Proizvajalci se zaradi težnje potrošnikov trudijo dodajati vse več naravnih substanc (npr. jajčni ekstrakt, zelišča, vitamini, mlečni ekstrakti ipd.), ki naj ne bi vsebovali toliko protimikrobnih agensov. Seveda ti ob pomanjkljivi formulaciji produkta še povečajo tveganje mikrobiološke kontaminacije.

Najpogosteje izolirani mikroorganizmi iz proizvodnega okolja farmacije so bakterije, ki naseljujejo človeško kožo (npr. grampozitivni koki vrst *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*, *Corynebacteria spp.*, *Micrococcus luteus* in *Micrococcus varians*) in bakterijske spore, prisotne v aerosolu (npr. *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* in *Bacillus subtilis*). Včasih se pojavijo še plesni, razvite iz spor v aerosolu (npr. *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.* ipd.). Redko, a vendarle najdemo tudi gramnegativne bakterije (npr. *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas cepacia* in druge) (Cundell, 2004).

Velik problem predstavljajo biofilmi na površinah, ki jih tvorijo mikroorganizmi. Študije so pokazale, da bakterije hitro naselijo in kolonizirajo katerikoli material. Med pritrjevanjem na površino bakterije spremenijo svoj fenotip in postanejo nekoliko drugačne od planktonskih (Bredholt in sod., 1998). Trdne površine spodbujajo bakterije, da izločajo eksopolimerne snovi, ki ščitijo bakterijske celice pred vplivi okolja. Predvsem spore bakterij rodu *Bacillus* se močno pritrdijo na površino in njihovo odstranjevanje predstavlja poseben problem. Razvoj in razmnoževanje celic na površini sčasoma privede do nastanka večplastnega biofilma, ki je svojevrsten ekosistem z mikroorganizmi, ujetimi v polisaharidni matriks. Mikroorganizmi v biofilmih so še posebej odporni, po eni strani zaradi povečane rezistence zaradi spremenjene fiziologije po pritrditvi na podlago, po drugi zaradi ekstracelularnih polisaharidov, ki ščitijo celice. Gladke površine otežujejo naselitev bakterij in tako se biofilmi težje tvorijo na suhih in dobro očiščenih površinah (Bredholt in sod., 1998).

### 2.1.2 Mikrobiološka kontrola čistosti proizvodnega okolja

Pri zagotavljanju mikrobiološke kakovosti farmacevtskih izdelkov je ključnega pomena kontrola kakovosti farmacevtskih izdelkov, vendar ne smemo zanemarjati mikrobiološke kontrole proizvodnega okolja, ki je temelj za zagotavljanje mikrobiološke neoporečnosti proizvedenih izdelkov (Kuhar, 2006). Kontrola mikrobiološke kakovosti farmacevtskih izdelkov in proizvodnega okolja se je intenzivneje začela šele v šestdesetih letih 20. stoletja. Na to so vplivali primeri množičnih okužb z mikrobiološko oporečnimi farmacevtskimi izdelki, med drugimi mednarodna epidemija med letoma 1970 in 1971 s kontaminiranimi intravenoznimi pripravki. Vključitev mikrobiologije v kontrolo okužb je uradno priznal CDC (Centers for Disease Control and Prevention) v zgodnjih 70. letih prejšnjega stoletja. Tako je postalo znano, da mikrobiološka kakovost ni samoumevna, temveč je potreben temeljit nadzor nad mikrobiološko kakovostjo surovin, kontaktne embalaže, končnih izdelkov in tudi okolja in osebja, ki je vključeno v proizvodnjo.

Danes je nadzor nad okužbami povsod zelo razvit in se stalno prilagaja novim potrebam, pomembno vlogo pri tem imajo mikrobiološki laboratoriji. Razvoj novih, izpopolnjenih metod nadzora mikrobiološke neoporečnosti se stalno povečuje zaradi mnogih dejavnikov, med katere spadajo tudi pojav rezistence, novih patogenov in novih tehnologij. Nadzor nad mikrobiološko neoporečnostjo farmacevtskih produktov izvaja mikrobiološki laboratorij, ki ima zahtevno in kompleksno delo. Laboratorij mora prepoznati, identificirati in okarakterizirati prisotne mikroorganizme, tudi novo prisotne patogene. Nekateri izmed njih, predvsem plesni in kvasovke, so lahko ključni vzrok za pojav okužb in jih je tudi težje določiti. V večini mikrobioloških laboratorijev se poleg klasičnih mikrobioloških metod uporabljajo tudi novejše, hitre in specifične tehnike, v katerih se direktno določajo sekvence DNA oz. RNA (Stratton in Greene, 1999).

Zagotavljanje mikrobiološke kakovosti zdravil je pomembno vsaj iz naslednjih razlogov (Kuhar, 2006):

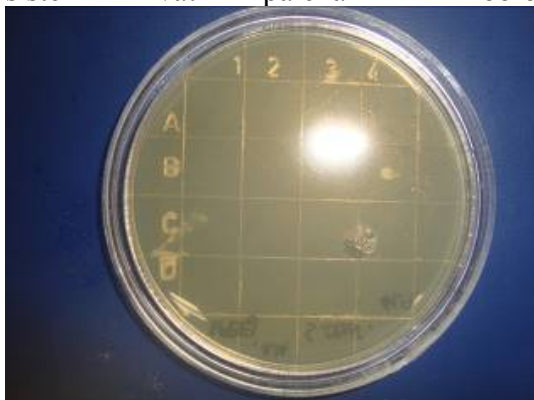
- ~ Razgradnja zdravilne učinkovine, kjer mikroorganizmi lahko zdravilno učinkovino razgradijo in ta postane neučinkovita. To velja zlasti pri penicilinih in drugih antibiotikih, pa tudi alkaloidih, analgetikih, steroidih in barbituratih.
- ~ Estetska nesprejemljivost, kjer pride do vidnih sprememb, spremembe vonja, okusa in strukture.
- ~ Razgradnja konzervansov, kjer lahko nekatere bakterije iz rodov *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Nocardia* razgradijo molekule konzervansov, tako da te izgubijo protimikrobno delovanje.
- ~ Možni so tudi toksični učinki na bolnika zaradi kontaminacije farmacevtskega izdelka z mikroorganizmi, ki so sicer del normalne človeške flore, patogeni postanejo šele ob izjemnih okoliščinah kot na primer: zmanjšana imunska odpornost, s kemoterapevtiki uničena nepatogena mikrobna populacija.

Mikrobiološka kontrola preparatov kot tudi okolja se redno izvaja s strani oddelka za mikrobiološko kontrolo. Mikrobiološko preiskujejo surovine (naravne ali sintetične), vode, polizdelke in končne preparate. Da bi proizvodnja potekala v kar najbolj čistem okolju, se redno izvaja tudi mikrobiološka kontrola prostorov in osebja. Vzorčenje poteka v točno določenih časovnih intervalih, pogostejše pa je v času validiranja in pri morebitnih

neustreznih rezultatih. Vzorčna mesta so vnaprej določena, za vsako izmed njih so postavljene tudi mejne vrednosti, t.j. število zraslih mikroorganizmov po vzorčenju, ki je še dovoljeno (Cundell, 2004). Če število mikroorganizmov na vzorčnem mestu preseže dovoljene mejne vrednosti, se izvedejo določeni ukrepi (npr. pogostejše čiščenje in ponovno vzorčenje). Z mikrobiološkimi preiskavami proizvodnih površin, opreme, osebja in zraka lahko določimo učinkovitost čiščenja in razkuževanja opreme, mikrobiološko ustreznost zraka, vire in pogostost pojavljanja mikroorganizmov in tudi (skupaj s testiranjem mikrobiološke neoporečnosti surovin, voda in izdelkov) možnosti za mikrobiološko neustreznost končnih proizvodov (Evancho in sod., 2001).

### 2.1.2.1 Kontrola površin

V proizvodnji farmacevtskih izdelkov se redno izvajajo kontrole površin, med katere štejemo stene, tla in proizvodno opremo. Kontrola sten in tal se izvaja z odtisom plošče Rodac (ang. Replicate Organism Detection and Counting) (slika 1) ali z vzorčenjem z brisi s sterilnimi vatnimi palčkami in mikrobiološko preiskavo brisa.



Slika 1: Plošča Rodac s hranljivim gojiščem SCDA

S sterilno vatno palčko se pobriše 20 cm<sup>2</sup> veliko površino, tako da se bris med vzorčenjem obrača in smer vsaj dvakrat spremeni (Bornšek, 2006). Metoda vzorčenja z brisi je zelo uporabna, saj se lahko vzorči na gladkih in grobih površinah neodvisno od materiala, v vzorcih se lahko določi različne mikroorganizme. Metoda je uporabna predvsem v sterilni proizvodnji, kamor bi vstop s hranljivimi gojišči predstavljal nevarnost okužbe (Kuhar in Kolenc, 2000), s čimer lahko favoriziramo rast in razmnoževanje morebitno prisotnih mikroorganizmov v prostoru.

Plošče Rodac so manjše petrijeve plošče, napolnjene z gojiščem z inaktivatorjem. Namenjene so vzorčenju površin. Ploščo Rodac odkrijemo, tik preden odzamemo odtis vzorčene površine in jo odtisnemo na površino. Dobra stran metode je, da lahko s ploščo Rodac vzorčimo različne površine, slaba stran pa, da je potrebno po vsakem odtisu površino razkužiti, da ne pride do povečanega razmnoževanja mikroorganizmov na mestu vzorčenja zaradi odtisa hranljivega gojišča (Kuhar in Kolenc, 2000).





Slika 2: Kolonije bakterij vrste *Staphylococcus aureus* na plošči Rodac

### 2.1.2.2 Kontrola zraka

Mikroorganizmi v zraku se lahko nahajajo v obliki spor (bakterije, plesni), lahko pa so suspendirani v vodnih kapljicah, pritrjeni na prašne delce ali delce kože (Brown, 2003). Prisotnost mikroorganizmov v zraku se lahko določa z več metodami, med katerimi sta bolj poznani sedimentacijska metoda, kjer se na točno določena vzorčna mesta za predpisani čas horizontalno izpostavijo nepokrite petrijeve plošče z gojiščem, in volumetrična metoda, kjer z vzorčevalnikom prečrpamo določen volumen zraka in prestrežemo delce na hranljivo gojišče.

Sedimentacijska metoda izkorišča gravitacijsko silo in zračne tokove v prostoru. Ker pa tok zraka v prostoru ni nikoli konstanten, ima gravitacijska sila manjšo vlogo. Sedimentacijska metoda je starejša in najbolj enostavna metoda, ima pa nekaj pomanjkljivosti. Na rezultate vzorčenja vpliva hitrost zračnega toka oziroma tokov in turbulenca. Delci aerosola v premeru merijo od 0,3  $\mu\text{m}$  do 100  $\mu\text{m}$ . Zaradi gravitacijske sile se usedajo le težji delci (večji od 5  $\mu\text{m}$ ), manjši ostajajo v zraku (Stetzenbach in sod., 2004). Metoda daje kvalitativne in ne kvantitativnih rezultatov. Zaradi naštetih razlogov je ta metoda ponavadi le orientacijska metoda in ne prikazuje dejanskega stanja (Kuhar in Kolenc, 2000).

Volumetrična metoda se vedno več uporablja. Vzorčevalniki so različne naprave za vzorčenje, ki lahko izkoriščajo metodo filtracije, kjer črpalke zrak posesajo skozi filtre, ki ujamejo mikroorganizme iz zraka, ali delujejo na principu lovljenja delcev iz zraka na gojišče ali druge površine (Bornšek, 2006). Vzorčevalnik prečrpava zrak s pomočjo črpalke, ventilatorjev ali sesalcev, kar omogoča kalibracijo vzorčevalnika in določitev volumna vzorca. Poznamo enostopenjske vzorčevalnike, kjer je tok zraka neposredno usmerjen proti površini plošče z gojiščem, in večstopenjske, ki omogočajo selektivno vzorčenje delcev velikosti 0,3  $\mu\text{m}$  do 15  $\mu\text{m}$ . Vzorčevalnik prečrpa določeno količino zraka v časovni enoti. Ko pridejo celice mikroorganizmov preko vzorčevalnika z določeno hitrostjo na gojišče, nekatere ne morejo več tvoriti kolonij. Tako se število kolonij, ki zrastejo na gojišču, glede na statistično določen faktor poveča in izrazi kot korigirano število mikroorganizmov v določenem volumnu zraka. Pred začetkom merjenja s predposkusom določimo vzorčni volumen. Če je ta prevelik, lahko pride do konfluentne rasti mikroorganizmov, kar onemogoča določitev števila kolonij.

Z vzorčenjem zraka proizvodnega okolja dobimo informacijo o prisotnosti in sestavi mikrobnih populacij v zraku oz. bioaerosola. Bioaerosol imenujemo kompleks mikroorganizmov (bakterije, virusi, plesni, spore) in njihovih delcev suspendiranih v zraku (Zorman in Jeršek, 2008). Glede na prisotnost in sestavo bioaerosola v proizvodnem okolju lahko ocenimo stanje čistoče in tveganje okužbe.

#### 2.1.2.3 Kontrola osebja

Osebje v proizvodnji predstavlja veliko tveganje okužbe, saj gre za najmanj predvidljiv vir kontaminacije. Prvotnega pomena je splošno zdravje in osebna higiena osebja v proizvodnji, možnost okužbe predstavlja tudi človeška koža, ki jo normalno poseljujejo številni mikroorganizmi, med njimi predvsem mikrokoki in stafilokoki. Roke in koža so lahko izvor ali prenašalec okužbe. Primarna zaščita je uporaba zaščitne obleke in rokavic. Delovna obleka mora biti narejena iz ustreznega materiala, pokrivati pa mora zadostni del telesa. Prirejena mora biti higienskemu režimom, ki so predpisani za posamezne enote (Dragaš, 1984). Pomembni deli proizvodnih obratov so garderobe, kjer si delavci oblečejo zaščitne delovne obleke in ostalo potrebno zaščitno opremo (rokavice, kapa, maska).

Pri kontroli osebja v proizvodnji se vzorčijo konice prstov, ki se v delovnih rokavicah ali brez (odvisno od delovnega mesta) odtisnejo na gojišče SCDA v petrijevi plošči. Ta se nato inkubira 5 dni na temperaturi 30-35 °C, nato pa se prešteje zrasle kolonije mikroorganizmov. Jemljejo se tudi odtisi obleke s ploščami Rodac na različnih delih zaščitne obleke (npr. rokav, prsni del). Plošče inkubiramo 5 dni na temperaturi 30-35 °C in nato preštejemo zrasle kolonije (Kuhar in Kolenc, 2000).

#### 2.1.2.4 Kontrola vode

Voda se v farmacevtski proizvodnji uporablja kot sestavina farmacevtskih izdelkov (surovina) ali kot čistilno sredstvo. Ker se v njej zelo hitro razmnožujejo gramnegativne bakterije, je visoko rizična surovina. Posebej problematične so vode, ki ne vsebujejo klora, ki bi zaviral rast mikroorganizmov (voda za injekcije in prečiščena voda) (Kuhar in Kolenc, 2000). Za razkuževanje vode se uporabljajo tako kemični kot tudi fizikalni postopki. Pri kemičnem razkuževanju je najpogostejše kloriranje, pri fizikalnih postopkih pa razkuževanje z UV-žarki, ultrazvokom in membranskimi metodami, kot sta mikrofiltracija in ultrafiltracija.

Za kontrolo vode in ostalih tekočin lahko uporabljamo metodo najverjetnejšega števila, MPN (ang. Most Probable Number). V tekočih gojiščih naredimo redčitveno vrsto vzorca, kateremu določamo vsebnost mikroorganizmov, in po inkubaciji pregledamo rast, ki se ponavadi vidi kot pojav motnosti. Število redčitev, kjer se pojavi rast, zabeležimo (Gonzalez, 1995) in z verjetnostnim računom ugotovljamo približno število mikroorganizmov v preiskovanem vzorcu.

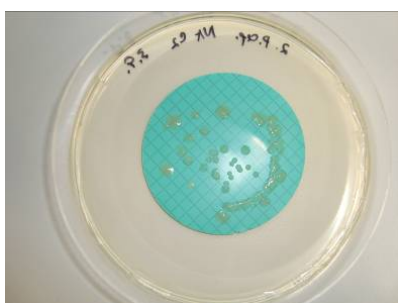
Membranska filtracija je metoda, ki se uporablja za mikrobiološke preiskave tekočih vzorcev, kot so voda, sirupi, koncentracije in podobno. Pri visoki viskoznosti je potrebno vzorec redčiti (DiGiacomo in sod., 2001). Z njo lahko kvantitativno in kvalitativno določimo število mikroorganizmov, kvasovk, bakterij in plesni v določeni količini vzorca.

Mikrobne celice se med filtracijo ujamejo v mrežo filtra, ki nato preprečuje preraščanje kolonij (Smole Možina, 2003). Uporablja se lahko za način razkuževanja vode, kot tudi pri analizi vzorcev vode, saj morebitno prisotni mikroorganizmi po filtraciji ostanejo na filtru. Membranske filtracije ponujajo številne prednosti, kot so: nevariabilnost končnega produkta, ni dodajanja kemičnih agensov ali pa zelo majhne količine, nizka poraba energije, kompaktnost postavitve in kratek čas aktivacije (Konieczny, 1998).



Slika 3: Filter za membransko filtracijo Millipore (Todar, 2008a)

Naprava za filtriranje je z gumijasto cevko preko steklenice za odsesavanje in Woulffove steklenice direktno povezana na vakuumsko črpalko. V spodnjem delu filtracijske enote, ki je prikazan na sliki 3, je sinter ploščica, na katero položimo membranski filter, nato pa pritrdimo še lijak za filtracijo, v katerega nalijemo preiskovani vzorec. Z odprtjem ventila se prične filtracija. Po filtriranju odstranimo filter, ki je zadržal vse mikrobne celice, in ga položimo v petrijevo ploščo s hranljivim gojiščem in inkubiramo 5 dni na temperaturi 30-35 °C, nato pa pregledamo zrasle kolonije na filtru (slika 4) (Kuhar in Kolenc, 2000). Število zraslih kolonij na plošči primerjamo s številom kolonij mejne vrednosti in vrednotimo rezultat. Če število kolonij na plošči preseže mejno vrednost, izvedemo ukrepe, ki so lahko le opozorilo obratu ali pa zahteve po ponovnem čiščenju in nato zopet vzorčimo.



Slika 4: Kolonije bakterij vrste *Pseudomonas cepacia* na gojišču SCDA

## 2.2 RAZKUŽEVANJE IN RAZKUŽILA

### 2.2.1 Razkuževanje

Skrb za čistočo nas v različnih oblikah spremlja že od rojstva dalje. Znanost in delovne izkušnje omogočajo nenehen razvoj. Vedno znova se odkrivajo novi mikroorganizmi, ki bi v določenih razmerah lahko povzročali škodo, svetovne institucije pa porabijo ogromno denarja za odkrivanje snovi, ki bi te organizme zavrle v rasti oz. jih uničile (Dakič, 2004). Pasteur in Koch sta konec 19. stoletja odkrila prve povzročitelje nalezljivih bolezni in predstavila koncept okužbe z mikroorganizmi (Stratton in Greene, 1999), že pred njima pa je ginekolog Semmelweis uvedel aseptične metode dela v ginekologiji in s tem resnično pripomogel k manjšemu številu smrtnosti porodnic zaradi porodne sepse. Od babic in ginekologov je zahteval, da si pred pregledom bolnic operejo roke z vodo in milom ter jih nato še dezinficirajo v raztopini klornega apna (Dakič, 2004). Tudi Lister se je držal pravila, da je potrebna eliminacija mikrobov, ki lahko povzročijo okužbo in je za razkuževanje svojih kirurških instrumentov in oblačil uporabljal fenol (Stratton in Greene, 1999).

Izraza razkuževanje oz. dezinfekcija in sterilizacija se pogosto uporabljata v enakem kontekstu, vendar pa je njun pomen dokaj drugačen. Sterilizacija v splošnem pomeni odstranitev oz. uničenje vseh oblik mikrobov, medtem ko se pojem razkuževanja nanaša na redukcijo patogenih mikroorganizmov, z izjemo bakterijskih endospor. Ta definicija ne velja popolnoma (Rutala, 1999), saj nekatera razkužila lahko popolnoma odstranijo tudi endospore, če so z njimi dovolj dolgo v kontaktu. Znana je definicija dezinfekcije, ki je bila sprejeta leta 1972 v Hamburgu na mednarodnem kolokviju o določanju vrednosti dezinfekcijskih sredstev. Pravi, da je dezinfekcija ciljano zmanjšanje števila klic z namenom, da se s posegom v strukturo ali presnovo nezaželenih mikroorganizmov, neodvisno od njihovega funkcijskega stanja, onemogoči njihovo prenašanje (Dakič, 2004).

Poznamo več načinov razkuževanja, in sicer z mehanskimi (absorpcija, filtracija), fizikalnimi (segrevanje, precipitacija, sušenje, sedimentacija, pritisk ali podpritisk v vakuumu, ultravijolično sevanje, ultrazvok) in kemičnimi postopki (razkužila) ali z uporabo kombinacij le-teh (Dakič, 2004).

Čiščenje, razkuževanje in vzdrževanje čistoče v farmacevtskih obratih je ključnega pomena za proizvodnjo ustreznih in učinkovitih preparatov. Poleg uporabe ustreznih metod čiščenja in razkuževanja ter nadzora le-teh je potrebna tudi stalna kontrola mikrobiološke kakovosti vode in okolja.

### 2.2.2 Učinkovitost razkuževanja

Na učinkovitost razkuževanja vpliva mnogo dejavnikov, tako izbira razkužila, lastnosti mikroorganizmov, način razkuževanja ter samo okolje in njegove lastnosti. Nekateri izmed dejavnikov, ki jih moramo upoštevati pri izbiri razkužila, so: vrsta in koncentracija mikroorganizmov, tip okolja, prisotnost organskih spojin, tip in stopnja mikrobne kontaminacije, način in čas razkuževanja, temperatura in pH razkuževalnega procesa (Rutala, 1999).

Pred več kot 30 leti je Earle H. Spaulding predstavil različne pristope k razkuževanju in sterilizaciji. Shematska predstavitev treh različnih pristopov je postala klasična opredelitev področja razkuževanja tudi pri profesionalni izdelavi plana čiščenja in razkuževanja. Ta predstavitev je uporabna v bolnišnicah in drugih zdravstvenih ustanovah, laboratorijih in proizvodnji hrane, pijače, zdravil ipd. Spaulding je mesta oz. predmete razdelil glede na nujnost razkuževanja v tri skupine: kritična, polkritična in nekritična. V kritično skupino spadajo predmeti, za katere obstaja visoka stopnja tveganja okužbe, če pride do kontaminacije s katerikoli mikroorganizmi, vključno z bakterijskimi spori. V tej skupini morajo biti predmeti sterilni. Sem spadajo razni kirurški instrumenti, implantati. Za njih se odsvetuje uporaba kemičnih razkužil, razen v primeru, da je predmet termolabilen. V polkritično skupino uvrščamo stvari, za katere velja, da ne smejo vsebovati nikakršnih mikroorganizmov z izjemo bakterijskih endospor. V tej skupini se predmeti lahko razkužujejo s kemičnimi razkužili, vendar moramo paziti, da so visoko učinkovita. V nekritično skupino pa sodijo površine oziroma predmeti, katere lahko razkužujemo že na samem mestu uporabe in jih ni potrebno prenesti v za to namenjene prostore. Za njihovo razkuževanje lahko uporabimo tudi manj učinkovita razkužila (Rutala, 1999).

Razkužila so kemične snovi, ki s svojim delovanjem uničijo predvsem vegetativne oblike mikroorganizmov, praviloma pa ne tudi njihovih spor. Razkužilo deluje baktericidno (virucidno, fungicidno), če bakterije (viruse, glive) ubije oz. uniči, ali bakteristatično (fungistatično), če le preprečuje njihovo razmnoževanje (Seme, 2002b). Pomembno je, da je razkužilo pravilno izbrano glede na spekter delovanja, tip okolja, čas in temperaturo optimalnega delovanja razkužila. Pri izbiri moramo upoštevati varnost, učinkovitost in kompatibilnost (Crawford in sod., 2000). Pri tem si pomagamo s splošnimi lastnostmi idealnega razkužila (Rutala, 1999), ki so: širok spekter protimikrobnega delovanja, enostavna uporaba, kratek čas delovanja, neobčutljivost na okoljske dejavnike (aktivnost tudi ob prisotnosti organskih spojin, ki lahko otežijo delovanje in kompatibilnost z detergenti in mili), netoksičnost (ne sme biti strupen oz. alergen za uporabnika), površinska kompatibilnost (ne sme poškodovati površine čiščenja), brez vonja (brez dražečih substanc), ekonomičnost, topnost v vodi, stabilnost (pri skladiščenju), dobre očiščevalne lastnosti. Pri pripravi razkužila moramo vedno upoštevati navodila proizvajalca. Višja koncentracija razkužila in daljši čas izpostavitve, kot sta navedena v navodilih proizvajalca, ne zagotavljata vedno boljšega učinka (Kuhar in Kolenc, 2000). Upoštevati moramo tudi, da razkužila navadno število mikroorganizmov le zmanjšajo in jih ne odpravijo popolnoma. Delovne raztopine razkužil se morajo pripravljati dnevno sveže, voditi pa moramo tudi zapisnik o pripravi. Ne nazadnje je potrebno omeniti, da je pri razkuževanju potrebna intervalna uporaba razkužil, kar pomeni, da se po določenem času (npr. doba nekaj mesecev) zamenja razkužilo, saj konstantna uporaba enega lahko privede do rezistence mikroorganizmov. Študija je pokazala (Conner in sod., 1994), da je bila z rotacijo razkužil dosežena boljša eliminacija mikroorganizma (npr. kisló-bazično) v primerjavi z uporabo le enega.

### 2.2.3 Delitev razkužil glede na kemično sestavo in po načinu delovanja

Razkužila lahko delimo na več načinov: groba in fina (glede na predmet, ki ga razkužujemo), organska in anorganska, po kemični sestavi in glede na mehanizem delovanja.

Glede na kemično sestavo in aktivne substance lahko razkužila razdelimo na več skupin:

- ~ fenolne spojine (bifenoli, halofenoli)
- ~ alkoholi
- ~ aldehidi (formaldehid, glutaraldehid)
- ~ dušikove heterociklične spojine
- ~ kvarterne amonijeve spojine
- ~ gvanidini (bigvanidini, polimerni bigvanidini)
- ~ peroksigeni (ozon, vodikov peroksid, perocetna kislina)
- ~ halogeni (klorove spojine, jodove spojine)
- ~ derivati težkih kovin (srebrove spojine, baker, živosrebrne spojine)

Po načinu delovanja razkužila delimo v tri večje skupine (Seme, 2002b):

- ~ snovi, ki poškodujejo celično membrano
- ~ snovi, ki denaturirajo beljakovine
- ~ snovi, ki spremenijo funkcionalne skupine beljakovin in nukleinskih kislin

Nekatera razkužila po tem načinu delitve lahko uvrstimo tudi v več skupin hkrati.

### 2.2.4 Učinek aktivnih komponent v razkužilih na različne mikroorganizme

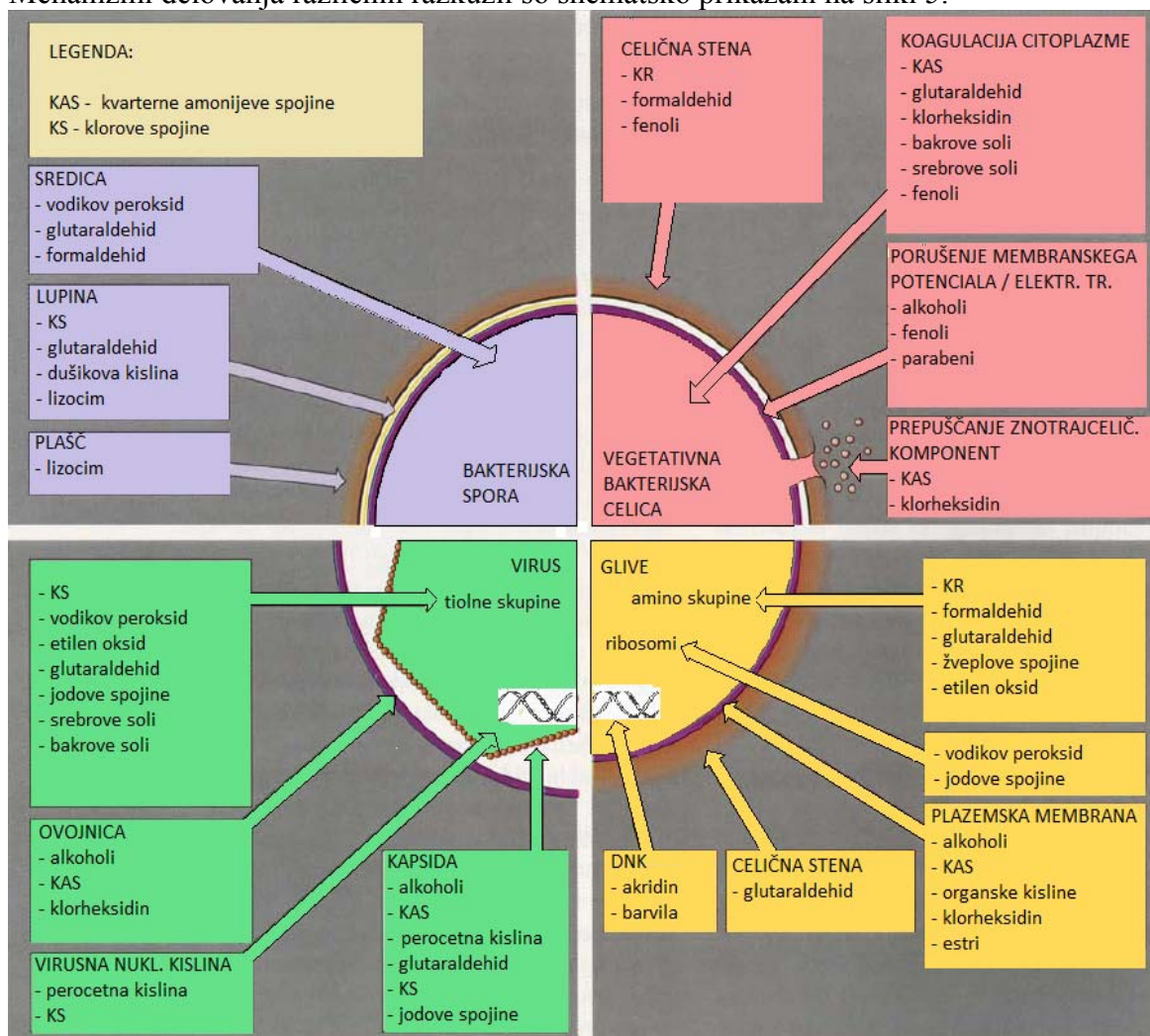
Strukturna celovitost celične membrane je odvisna od razporeditve lipidov in beljakovin, ki jo sestavljajo (Seme, 2002b). S porušenjem organizacije membrane organska topila in detergenti (fenolne spojine, bigvanidini oz. gvanidini in alkoholi) motijo njeno funkcijo. Fenolne spojine delujejo na širok spekter mikroorganizmov že pri nizkih koncentracijah in porušijo celično membrano (IFT Expert report, 2006). Heksaklorofen spada med halogenirane difenilfenole in deluje predvsem na grampozitivne koke. Ker se zelo dobro resorbira skozi kožo in ima posledično nevrotoksični učinek, je njegova uporaba močno omejena. Gvanidini oz. bigvanidini delujejo predvsem na vegetativne oblike grampozitivnih bakterij, med gramnegativnimi bakterijami pa le na tiste z lipidno ovojnico. Med njimi je znan klorheksidin, ki se v 0,05 – 0,1 % vodni raztopini uporablja za razkuževanje rok, večje koncentracije pa so toksične in dražijo kožo. Tudi alkoholi poškodujejo celične membrane in denaturirajo beljakovine. Imajo sicer dober antimikrobni učinek, vendar pa ne uničujejo bakterijskih spor. Vodne raztopine etanola in izopropanola se uporabljajo predvsem za hitro razkuževanje rok.

Med razkužila, ki denaturirajo beljakovine, spadajo kisline, baze in alkoholi. V zdravstvene namene se med njimi uporablja le alkohol (Seme, 2002b).

Razkužila, kot so oksidanti (klorove in jodove spojine, perocetna kislina) in alkilirajoča sredstva (aldehidi), spremenijo eno ali več funkcionalnih skupin encimskih katalitičnih mest ali nukleinskih spojin in privedejo do motenj njihove funkcije. Pri klorovih spojinah je razkuževalni učinek odvisen od prisotnosti in količine hipoklorne kisline, ki nastaja pri raztapljanju klora in klorovih spojin v vodi. Te spojine se uporabljajo predvsem za

razkuževanje pitne vode. Natrijev hipoklorit je v 0,5 – 1 % raztopini dobro razkužilo za razkuževanje površin. Jod ima močan germiciden učinek in deluje tudi na bakterijske spore, alkoholna raztopina pa je že od nekdaj veljala kot razkužilo za kožo. Vendar ima leta kar nekaj pomanjkljivosti, med drugim draži kožo, pušča madeže in deluje korozivno. Te pomanjkljivosti nimajo jodofori, ki so zmesi joda in površinsko aktivnih snovi (polivinilpirolidon, polietilenglikol), ki jodu povečajo topnost in ga stabilizirajo v vodnem mediju. Perocetna kislina kot oksidant učinkovito uničuje vse mikroorganizme, tudi bakterijske spore. Uporablja se za razkuževanje površin in predmetov. Med alkilirajočimi sredstvi sta pomembna predvsem glutaraldehid, ki je v 2 % raztopini dobro razkužilo za razkuževanje predmetov v zdravstvu, in formaldehid, ki pa se zaradi dražečega učinka danes skoraj ne uporablja več. Učinkovito uničujeta vse mikroorganizme, vključno z bakterijskimi spori (Seme, 2002b).

Mehanizmi delovanja različnih razkužil so shematsko prikazani na sliki 5.



Slika 5: Mehanizmi delovanja različnih aktivnih substanc razkužil (IFT Expert report, 2006: 86)

### 2.2.4.1 Alkoholi

Kadar govorimo o alkoholih kot razkužilih, mislimo na vodne raztopine etanola ali izopropanola. Večinoma delujejo bolj baktericidno (fungicidno) kot bakteristatično (fungistatično), niso sporocidi. Optimalne koncentracije za uničenje mikroorganizmov so med 60 – 90 % v/v, če pa je koncentracija pod 50 %, njihovo delovanje močno pade.

Bistvo delovanja alkoholov je denaturacija beljakovin. Teorijo delovanja so potrdili pri opazovanju absolutnega etanola, ki je imel slabši baktericidni učinek kot vodna raztopina etanola, saj beljakovine hitreje denaturirajo ob prisotnosti vode. Pokazano je bilo tudi, da alkoholi uničijo encim dehidrogenazo pri bakterijah vrste *E. coli* ter da etanol pospeši fazo lag bakterij vrste *Enterobacter aerogenes*. Kasneje so dokazali, da pride do bakteristatičnega učinka z inhibicijo produkcije esencialnih metabolitov za hitro celično podvajanje (Rutala, 1999).

Metanol ima slabše baktericidno delovanje, zato se kot razkužilo redko uporablja. Študije baktericidnega delovanja etanola v različnih koncentracijah na več vrst bakterij v času delovanja 10 sekund so pokazale naslednje (Rutala, 1999):

Vrsta bakterij:	Koncentracija etanola, ki povzroči popolno redukcijo bakterij (v/v)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30-100 %
<i>Serratia marcescens</i>	40-100 %
<i>Escherichia coli</i>	40-100 %
<i>Salmonella typhi</i>	40-100 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	60-95 %
<i>Streptococcus pyogenes</i>	60-95 %

Izopropanol ima nekoliko boljše baktericidno delovanje kot etanol pri bakterijah vrst *E. coli* in *S. aureus*. Etanol in izopropanol v visokih koncentracijah dajeta dobre rezultate tudi pri uničenju virusov, kot npr. HIV, HBC, HCV, dokazano pa etanol uniči tudi bakterije vrste *Mycobacterium tuberculosis* (Rutala, 1999).

Uporaba alkoholov za razkuževanje je sicer široka, vendar pa ni priporočljiva za razkuževanje predmetov, kjer je potrebna popolna eliminacija mikroorganizmov (npr. kirurški instrumenti), saj so neučinkoviti proti bakterijskim sporam. Ponavadi se uporabljajo za razkuževanje manjših površin, predmetov in rok. Komercialno dostopni pripravki za razkuževanje ponavadi vsebujejo mešanico več alkoholov v skupni koncentraciji 20–70 % v/v. Za razkuževanje rok se ponavadi uporablja sterilna raztopina alkohola, in sicer 80 % etanol in 70 % izopropanol. Ker suši kožo, je navadno raztopini dodan glicerol (2 %).



#### 2.2.4.2 Kvarterne amonijeve spojine

Kvarterne amonijeve spojine so po kemijski sestavi spojine, ki jih sestavljajo substituirane amonijeve enote, v katerih je središčni dušikov atom vezan na štiri ogljikove atome s kovalentno vezjo. Z ionsko vezjo se na dušikov atom veže alkilni ali heterociklični radikal in skupaj tvorita pozitivno nabito kationsko skupino, ki je funkcionalni del molekule. Vsaka enota ima lahko svoje antimikrobne karakteristike, odvisno od vezane skupine. Spojine, ki se ponavadi uporabljajo kot razkužila, so: alkil dimetil benzil amonijev klorid, alkil didecil dimetil amonijev klorid in dialkil dimetil amonijev klorid (Rutala, 1999).

Delovanje kvarternih amonijevih spojin je inaktivacija encimov v celici, denaturacija celičnih proteinov in uničenje celične membrane (Rutala, 1999). Načeloma delujejo baktericidno, fungicidno in virucidno (proti lipofilnim virusom), ne delujejo pa na bakterijske spore in hidrofilne viruse. Zelo slabo delujejo tudi proti mikobakterijam.

Uporabljamo jih kot splošna razkužila. Ne smemo jih tretirati kot antiseptike, snovi, ki se uporabljajo za razkuževanje kože ali sluznice. Ugotovljeno je bilo, da se v njih podobno kot v nekaterih drugih razkužilih (npr. fenolih, jodoforih), zlahka naselijo in tam preživijo gramnegativne bakterije (Rutala, 1999). Njihovo čistilno delovanje je ponavadi boljše od razkuževalnega (Dragaš, 1984). Ponavadi se uporabljajo za čiščenje in razkuževanje sten, tal in pohištva (Rutala, 1999).

#### 2.2.4.3 Raztopina vodikovega peroksida in očetne kisline (perocetna kislina)

Gre za izredno dobro razkužilo s hitrim delovanjem na vse mikroorganizme. Deluje tudi sporocidno tudi pri nizkih temperaturah in ob prisotnosti organskih snovi, ki ponavadi zmanjšajo učinek razkuževanja. Ne poškoduje predmetov in ne pušča ostankov po končanem razkuževanju. Lahko deluje korozivno, vendar ta učinek uravnavamo z različnimi dodatki in uravnavanjem vrednosti pH (Rutala, 1999). Perocetna kislina je v višjih koncentracijah lahko eksplozivna (Dragaš, 1984), zato je potrebna pazljivost pri pripravi raztopin. Raztopine za razkuževanje morajo biti sveže, saj so izredno nestabilne. Aktivnost 1 % raztopine perocetne kisline v vodi v 6 dneh pade za polovico (hidroliza), medtem ko 40 % raztopina izgubi le 1 – 2 % aktivnosti v mesecu dni.

Perocetna kislina je oksidant, ki denaturira beljakovine, spremeni permeabilnost celične stene in oksidira S-vezi v beljakovinah, encimih in drugih metabolitih.

Zelo dober antimikrobni učinek je viden že pri nizkih koncentracijah, v manj kot 5 minutah inaktivira vse grampozitivne in gramnegativne bakterije, kvasovke in plesni, viruse in bakterijske spore. Uporablja se lahko za razkuževanje površin, naprav, prostorov in rok (Dragaš, 1984).

#### 2.2.4.4 Druga razkužila

Fenoli delujejo proti vegetativnim oblikam celic, so pa neučinkoviti proti sporam. Delujejo fungicidno, učinkovito uničujejo tudi nekatere viruse. Njihova glavna slabost je toksičnost, povzročajo razjede na koži (Lynn, 1980).

Aldehidi delujejo na večino mikroorganizmov, vključno na bakterijske spore. Učinek je odvisen od koncentracije in časa delovanja (Dragaš, 1984). Delovanje proti sporam lahko znatno povečamo z višjo temperaturo. Za vsakdanjo uporabo niso primerni zaradi iritacije kože in ostalih tkiv (Lynn, 1980).

Med oksidante spadajo jodove in klorove spojine, vodikov peroksid in perocetna kislina (trivialno ime za raztopino vodikovega peroksida in očetne kisline). Halogeni so učinkoviti proti večini mikroorganizmov, tudi proti bakterijskim sporam. So nestabilni, občutljivi na svetlobo, temperaturo, pH in prisotnost organskih snovi. Klorove spojine se uporabljajo predvsem za razkuževanje vode, površin in naprav, jodove spojine pa predvsem za kožo (Dragaš, 1984). Peroksigene spojine (poleg perocetne kisline) učinkovito uničujejo vse mikroorganizme, vključno z bakterijskimi spori (Seme, 2002b).

Gvanidini so učinkoviti proti bakterijam (proti grampozitivnim nekoliko bolj kot proti gramnegativnim) in nekaterim glivam, ne uničijo pa virusov in spor. Predvsem klorheksidin se uporablja v medicinski in veterinarski praksi, saj ne deluje toksično in iritantno na kožo (Lynn, 1980).

Med derivate težkih kovin kot razkužila štejemo srebrove in bakrove pripravke. Srebrovi pripravki se uporabljajo pri očesnih okužbah in okuženih opeklinah, bakrovi pa največkrat kot pripravki za razkuževanje vode (preprečujejo rast alg v bazenih) (Lynn, 1980).

### **2.2.5 Metode določanja učinkovitosti razkužil**

Učinkovitost razkužil se lahko meri na več načinov. Najpogosteje se od razkužila pričakuje vsaj  $5\text{-log}_{10}$  redukcijo patogenih bakterij v časovnem okvirju 5-10 minut in  $3\text{-log}_{10}$  redukcijo bakterij v 30 sekundah (Rutala, 1999). Uničenje bakterijskih spor, ki je mogoče le z določenimi razkužili, navadno zahteva daljši kontaktni čas (Mazzola in sod., 2003). Zelo malo razkužil deluje tako proti vegetativnim oblikam mikroorganizmov kot tudi proti sporam. Med njimi so halogeni, peroksigeni in glutaraldehidi. Trenutno ni standardne metodologije, po kateri bi lahko primerjali razkužila in proces razkuževanja za uničenje spor na trdnih površinah. Obstajajo standardi, v katerih je metodologija preizkušanja razkužil proti sporam v suspenziji, vendar pa tako ne moremo simulirati dejanskega procesa razkuževanja v okolju (Mehmi in sod., 2009).

Metodo fenolnega koeficienta sta razvila Rideal in Walker leta 1903, temelji pa na primerjavi učinkovitosti fenola in testiranega protimikrobnega sredstva. Gaitan Herrera (2004) opisuje protokol določanja fenolnega koeficienta za testiranje razkužil ali za testiranje rezistence bakterij. V metodi vzporedno prenašamo mikroorganizme v različne raztopine fenola in testiranega protimikrobnega sredstva in po inkubaciji pregledamo, pri kateri koncentraciji je rast mikroorganizmov. Fenolni koeficient izračunamo kot razmerje med koncentracijo testiranega protimikrobnega sredstva, ki uniči mikroorganizme v času med 5 in 10 minut, in koncentracijo raztopine fenola, ki uniči mikroorganizme v istem času in enakih razmerah. Eksperiment lahko poteka tudi ob prisotnosti organske snovi, v t.i. nečistem okolju (Gaitan Herrera, 2004).

Najenostavnejša metoda določanja učinkovitosti razkužil je suspenzijski test, kjer raztopini razkužila dodamo mikroorganizem in premešamo. Po določenem kontaktnem času delovanje razkužila ustavimo z dodatkom nevtralizacijskega sredstva ali mehansko (npr. filtracija). Število preživelih mikroorganizmov določamo z metodo nacepljanja na hranljivo gojišče, po inkubaciji pa pregledamo zrasle kolonije. Razkužilo je učinkovito, če povzroči ustrezno redukcijo števila mikroorganizmov.

Po standardnih metodah (SIST EN 1040:2001, SIST EN 1275:2001, SIST EN 14347:2005) lahko določimo osnovno protimikrobno delovanje razkužil z razredčevalno-nevtralizacijsko metodo ali metodo membranske filtracije. V poskusu določamo redukcijo viabilnosti mikroorganizmov po kontaktnem času z raztopino razkužila. Delovanje razkužila ustavimo z dodatkom nevtralizatorja ali s filtracijo, po inkubaciji padoločimo preživele mikroorganizme in izračunamo redukcijo viabilnosti. Le-ta mora biti vsaj  $10^5$  pri bakterijah in vsaj  $10^4$  pri kvasovkah, plesnih in sporah, da lahko trdimo, da ima razkužilo baktericidno, fungicidno oziroma sporocidno delovanje. Po določitvi osnovnega protimikrobnega delovanja razkužil lahko po standardnih metodah preverjamo tudi protimikrobno delovanje razkužil v različnih razmerah, t.j. v čistem in nečistem okolju (ob prisotnosti organskih snovi). Kot standardni delovni metodi sta navedeni razredčevalno-nevtralizacijska metoda in metoda membranske filtracije suspenzije razkužila, dodanih mikroorganizmov in dodatka organske snovi (goveji albumin in ovčji eritrociti). Z izbrano metodo testiramo delovanje razkužila ob prisotnosti organske snovi v suspenziji po dodatku izbranih mikroorganizmov. Priporočeni kontaktni čas delovanja je 60 minut, ki ga ustavimo z dodatkom nevtralizatorja ali z membransko filtracijo in določamo število preživelih mikroorganizmov, nato pa izračunamo redukcijo viabilnosti, ki mora biti vsaj  $10^5$  pri baktericidnem in vsaj  $10^4$  pri fungicidnem delovanju. Zahtevani mikroorganizmi v poskusu so bakterije vrst *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Enterococcus hirae* pri določanju baktericidnega delovanja razkužil, kvasovke vrste *Candida albicans* ter plesni vrste *Aspergillus niger* za fungicidno delovanje. Standarda SIST EN 13727:2004 in SIST EN 13624:2004 sta uporabna predvsem za določanje učinkovitosti razkužil za instrumente, ki se uporabljajo na medicinskem področju. Nadaljevalna različica sta standarda SIST EN 14561:2006 in SIST EN 14562:2006, ki opisujeta metodo določanja učinkovitosti razkužil v t.i. čistem in nečistem okolju na steklenem nosilcu. Metoda določanja učinkovitosti je razredčevalno-nevtralizacijska metoda, kontaktni čas delovanja razkužila 60 minut in zahtevani testirani mikroorganizmi so enaki. Redukcija viabilnosti mora biti vsaj  $10^5$  pri baktericidnem delovanju in vsaj  $10^4$  pri fungicidnem delovanju.

V standardu SIST EN 13697:2001 je opisana metoda določanja učinkovitosti razkužil na neporoznih površinah. Testno površino umetno kontaminiramo s suspenzijo mikroorganizmov in organske snovi ter počakamo, da je površina suha. Na kontaminirano mesto naneseemo raztopino razkužila, ki ga testiramo, in pustimo stati določen čas pri ustrezni temperaturi. Po kontaktnem času aktivnost razkužila ustavimo z nevtralizacijo. Površino potopimo v raztopino nevtralizatorja in speremo preživele celice. Raztopino prenesemo v sveže gojišče, inkubiramo in pregledamo preživele celice. Izračunamo redukcijo viabilnosti, ki mora biti po zahtevah standarda vsaj  $10^4$  v kontaktnem času 5 minut (Scientific Services, 2009).

Problem v metodi določanja učinkovitosti razkužil na površini predstavlja zagotovitev stalnega števila mikroorganizmov po umetni kontaminaciji površine, ko se ta posuši. Število preživelih klic ni konstantno, zato je metoda določanja učinkovitosti na nosilcu boljša izbira, vendar pa je slabša simulacija realnih razmer. Optimalen test določanja učinkovitosti razkužila mora kar najbolje približati testne pogoje razmeram v realnem okolju (Reybrouck, 1998).

Test z nosilcem je najstarejša oblika testiranja učinkovitosti razkužil. Nosilec poljubnega materiala umetno kontaminiramo s suspenzijo mikroorganizmov. Ko se suspenzija na nosilcu posuši, ga za določen kontaktni čas potopimo v raztopino razkužila, nato pa inkubiramo na hranljivem gojišču. Po inkubaciji pregledamo morebitne zrasle kolonije in vrednotimo rezultat (Reybrouck, 1998). Metode določanja učinkovitosti razkužila na nosilcu ne smemo zamenjevati z metodo določanja učinkovitost razkužila na površini. Bistvena razlika je v načinu razkuževanja. Pri metodi z nosilcem, na katerem je mikrobnna kultura, nosilec potopimo v raztopino razkužila za določen kontaktni čas. Pri metodi razkuževanja na trdni površini pa razkužilo naneseemo na površino, na kateri je mikrobnna kultura, in pustimo delovati kontaktni čas oz. dokler se razkužilo ne posuši (Reybrouck, 1998).

Najbolj zanesljiva metoda določanja učinkovitosti razkuževanja je metoda razkuževanja umetno kontaminirane površine. Bistvo metode je, da na testno površino naneseemo suspenzijo mikroorganizmov in počakamo, da je površina suha. Nato naneseemo raztopino razkužila in ga enakomerno razporedimo po vzorčeni testni površini. Po določenem kontaktnem času površino vzorčimo. Vzorcimo lahko na več načinov: z odtisom hranljivega gojišča, ki ga nato inkubiramo, ali s spiranjem, kjer vrednotimo preživelost mikroorganizmov v izprani tekočini (Reybrouck, 1998).

Učinkovitost razkužil na površini so že preverjali Mehmi in sod. (2009), ki so plošče iz nerjavečega jekla umetno kontaminirali s suspenzijami spor bakterij rodu *Bacillus* ter nato nanje naneseeli razkužilo v spreju z razdalje 10 cm. Po 2-minutnem kontaktnem času so dodali tekoče gojišče z nevtralizatorjem. Po 2 minutah so del suspenzije prenesli v raztopino sladkorja, aminokislin in mineralov ter inkubirali 45 min pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji so del suspenzije, v kateri so preživele spore ponovno vzklile, prenesli v gojišče z nevtralizatorjem, naredili redčitveno vrsto in ustrezne redčitve prenesli na hranljivo gojišče. Po inkubaciji so na podlagi zraslih kolonij izračunali redukcijo viabilnosti in določili delovanje razkužila (Mehmi in sod., 2009). Podobno metodo umetne kontaminacije so naredili tudi v primeru, ko so na manjše ploščice iz nerjavečega jekla naneseeli suspenzijo bakterij vrste *Pseudomonas aeruginosa* in suspenzijo razmazali s sterilno bombažno krpico. Postopek so ponavljali vsak dan 13 dni, 10. in 14. dan pa so kontaminirano površino vzorčili s ploščo Rodac, da so preverili rast in nastanek biofilma. Plošče so nato pomočili v raztopine razkužil in zopet vzorčili s ploščami Rodac (Conner in sod., 1994).

Določanja učinkovitosti razkužil na trdni površini so se lotili tudi Mariscal in sod. (2007), ki so merili preživelost bakterije vrste *E. coli* po razkuževanju biofilma na trdni površini s pomočjo fluorescence. Umetno so kontaminirali nosilce različnih materialov (steklo, PVC, polipropilen, polikarbonat in silikon) in nosilce inkubirali 48 ur pri 37 °C, da se je ustvaril

biofilm. Po inkubaciji so nosilce tretirali z različnim razkužili ( 70 % raztopino etanola, 3 % raztopino vodikovega peroksida in 1 % raztopino natrijevega hipoklorita). Delovanje razkužil so po 30 minutah kontaktnega časa ustavili z nevtralizacijo, nato pa merili fluorescenco pri času 0, po 1 uri in po 18 urah. Kot test viabilnosti bakterij vrste *E. coli* so izkoristili aktivnost glukoronidaze na fluorogenem substratu. Aktivnost glukoronidaze je linearno sovpadala z izračunom koncentracije bakterij (cfu/ml) v suspenziji. Po 30-minutnem kontaktnem času so vsa tri razkužila popolnoma uničila bakterije na vseh nosilcih. S poskusom so želeli pokazati učinkovitost različnih razkužil na različnih materialih in razviti metodo hitrega določanja preživelosti bakterij. Zelo pomembna je sestava nosilca oz. elementa razkuževanja, saj so v poskusu pokazali, da je tvorba biofilma na steklu in polipropilenu manjša kot na ostalih materialih.

## 2.3 MIKROORGANIZMI KOT KONTAMINANTI PROIZVODNEGA OKOLJA

### 2.3.1 Bakterije rodu *Staphylococcus*

Leta 1880 je škotski kirurg Ogston s Pasteurjevo metodo kultivacije izoliral grampozitivne koke (slika 6), ki se nahajajo v skupkih in pri ljudeh povzročajo številne okužbe. Takrat je rod dobil ime *Staphylococcus*. Danes jih poznamo že preko 30 različnih vrst. So negibljivi, fakultativni anaerobi, bolje rastejo v aerobnem okolju in ne sporulirajo. Glede na izdelovanje koagulaze (encim, ki pretvarja fibrinogen v fibrin), delimo stafilokoke v dve skupini; koagulazno pozitivne in koagulazno negativne stafilokoke (Seme, 2002a). Stafilokoki se prenašajo z dotikom, redkeje preko zraka.



Slika 6: Celice bakterij vrste *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008b)

*Staphylococcus aureus* je ena najpomembnejših patogenih vrst v rodu stafilokokov, ki povzroča lokalizirane gnojne okužbe kože, kirurških ran, opeklin, vnetje očesne veznice in srednjega ušesa, lahko pa se širi tudi v kri in povzroči meningitis ali sepsa (Seme, 2002a). Bakterije vrste *S. aureus* povzročajo zastrupitve s hrano, saj nekateri sevi izločajo endotoksine. Približno 20 -30 % odraslih oseb je sicer zdravih nosilcev teh bakterij (Seme, 2002a). Primarni habitati sta mukoza nosno-žrelne votline in koža (Casey in sod., 2007), najdemo pa jih tudi v zraku, na prašnih delcih in v vodi (Malheiros in sod., 2009).

Bakterije vrste *S. aureus* lahko obravnavamo kot oportunistične bakterije, saj lahko povzročijo nevarne zaplete pri novorojenčkih, dojenčkih, starih ljudeh in bolnikih z zmanjšano odpornostjo. Povzročajo številne lokalizirane gnojne okužbe in tudi okužbe, ki

so kot posledica širjenja bakterij preko krvi v različne organe in organske sisteme. Bakterije imajo odlične sposobnosti prilagoditve za preživetje v organizmu in na površinah. Površinski polisaharidi in različni beljakovinski receptorji omogočajo vstop in pritrditev bakterij na površini ali v notranjosti gostitelja, poleg tega pa izločajo glikokaliks (zunajcelično polisaharidno snov), ki obda skupke bakterij (nastane biofilm) ter tako učvrsti pritrditev bakterije na površino (Seme, 2002a).

### 2.3.2 Bakterije rodu *Pseudomonas*

Bakterije rodu *Pseudomonas* so nefermentativni, po Gramu negativni bacili, ki ne sporulirajo in rastejo le ob prisotnosti kisika (aerobi). Za nefermentativne bacile je značilno, da so nezahtevni glede hranil in za svojo rast uporabljajo številne vire ogljika; enostavne in sestavljene ogljikove hidrate, alkohole in aminokislino (Müller-Premru, 2002). Minimalne zahteve po hranilih omogočajo rast v vodi tudi do koncentracije  $10^5 - 10^7$  cfu/ml (Arnou in Flaherty, 1999). V naravi so prisotni v vodi, zemlji in na rastlinah, dobro rastejo v vlažnih okoljih. V rod spada več kot 200 vrst, razlikujemo pa jih po morfologiji kolonij in biokemičnih lastnostih (Müller-Premru, 2002).



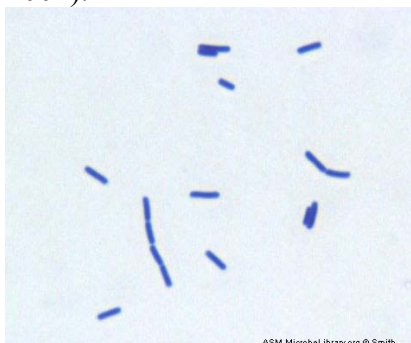
Slika 7: Celice bakterij vrste *Pseudomonas aeruginosa* (Aridis Pharmaceuticals, 2010)

Slika 7 prikazuje bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa*, ki so pomembni predstavniki rodu, saj imajo lahko številne virulentne dejavnike: polarne piluse, encime, toksine, v nekaterih okoliščinah tudi polisaharidno kapsulo. Tvorijo dva eksotoksina (A in S) in endotoksin ter so najpogostejši povzročitelj okužb med nefermentativnimi bakterijami. Le redko so del normalne človeške flore, prenašajo se z dotiki in kapljično. So invazivne in toksigene, povzročajo lokalno infekcijo, ki pa se lahko razširi sistemsko. Slednja je pogosta pri ljudeh z okvaro kože in sluznic ali z oslabljenim imunskim sistemom (npr. bolniki z levkemijo, kroničnimi boleznimi, po transplantacijah ipd.). Tudi pri ljudeh, ki imajo sicer dobro imunsko odpornost, lahko pride do lokalne okužbe kože. Okužbe z bakterijami rodu *Pseudomonas* spadajo med deset najpogostejših bolnišničnih okužb. Najpogosteje povzročajo okvare dihal, sečil, sklepov, kosti, centralnega živčnega sistema, ušes, oči in kože (Iversen in sod., 2008).

### 2.3.3 Bakterije rodu *Bacillus*

V rod *Bacillus* spadajo po Gramu pozitivne aerobne in fakultativno anaerobne palčke (bacili) (slika 8), ki sporulirajo. Največkrat so saprofiti v zemlji, vodi in na rastlinah, najdemo jih tudi v različnih ekstremnih življenjskih okoljih, kot sta morski mulj in gejzirji. Večina vrst je nepatogenih za ljudi in živali. Številne vrste so pomembne, saj izdelujejo

antibiotike (bacitracin, polimiksin, subtilin, bacilin) in druge organske metabolite (Gubina, 2002).



Slika 8: Bakterije vrste *Bacillus subtilis* (Smith in Hussey, 2005)

*Bacillus subtilis* je modelni organizem grampozitivnih bakterij (poleg *S. aureus*) in predstavlja dober eksperimentalni sistem za študije genske regulacije in celičnega metabolizma. (Chen in sod., 2010). Ob okužbi lahko povzroči sepso, endokarditis, meningitis in okužbe na dihalih. Vir okužbe so ponavadi kontaminirana živila, zunajčrevesne okužbe pa nastanejo zaradi okužbe z nečistimi rokami ali z vdihavanjem (Gubina, 2002).

#### 2.3.4 Kvasovke rodu *Candida*

Kvasovke rodu *Candida* spadajo med enocelične glive (slika 9), ki se razmnožujejo nespolno, pretežno z brstenjem. Gre za heterogeno skupino organizmov, znotraj katere se posamezne skupine razlikujejo po metabolni aktivnosti in strukturnih lastnostih. Najdemo jih v zemlji, na rastlinah, živalih, insektih in v vodi, pogosto pa naseljujejo tudi sveža in obdelana živila ter druge surove ali obdelane industrijske produkte. Prisotnost neželenih kvasovk v proizvodnih procesih lahko povzroča veliko škode in finančne izgube. Najpogosteje se kontaminacija s kvasovkami rodu *Candida* kaže kot izguba okusa, proizvodnje plina in teksturne spremembe živil. Kvasovke, ki povzročajo škodo, se lahko razmnožujejo na površinah v kompleksnih biofilmih. Tako so celice bolj zaščitene pred razkuževanjem (Salo in Wirtanen, 2005). Glive rodu *Candida* so skupaj z bakterijami del normalne mikrobne flore na koži in v prebavilih. Poznamo tudi številne dejavnike, ki še povečajo možnost nastanka oportunističnih okužb. Ti so: nevtropenija, zdravljenje z visokimi odmerki kortikosteroidov in dolgotrajno zdravljenje z antibiotiki (Matos, 2002).

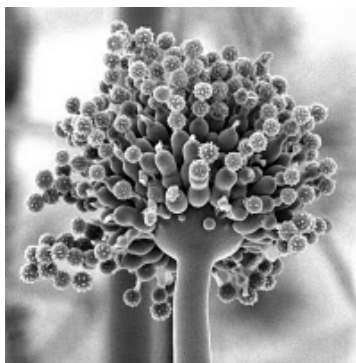


Slika 9: Kvasovke vrste *Candida albicans* (Kunkel, 2008)

Normalno nepoškodovan epitelij je sicer dobro varovalo pred vstopom kandid v organizem, ob poškodbi pa lahko pride do invazije kandid v globlje plasti in krvožilni sistem. Virulentni dejavniki so najbolj preučeni za kvasovke vrste *Candida albicans*, katerih invazivnost je povezana z nastankom psevdohif in neobčutljivostjo na fagocitozo. Lahko se močno pritrldijo na epitelijske celice sluznice in žil ter prodirajo vanje (Matos, 2002).

### 2.3.5 Plesni rodu *Aspergillus*

Spadajo med nitaste glive. V naravi so zelo razširjene in na enostavnih gojiščih hitro rastejo. Po načinu spolnega razmnoževanja jih uvrščamo v deblo askomicet, njihov zračni micelij pa se razlikuje po vrsti, starosti kolonije, sestavi medija in temperaturi rasti. Za vse vrste aspergilov so značilni konidiofori, ki so lahko gladki ali hrapavi. Vrsto se lahko razlikujejo tudi po pigmentu konidijev, ki kolonije značilno obarvajo, kot vidimo na sliki 11. Konidiofori so preoblikovane celice hif, ki imajo na koncu mešičke (vezikule), iz katerih izhajajo konidiogene celice, imenovane fialide, iz katerih brstijo konidiji (slika 10). Plesni rodu *Aspergillus* najdemo v zemlji, na prašnih delcih, v zraku in živilih, mnogo jih poseljuje razpadajoče rastlinje (Matos, 2002).



Slika 10: Apeks s konidiji plesni vrste *Aspergillus brasiliensis* (Sandle, 2010)



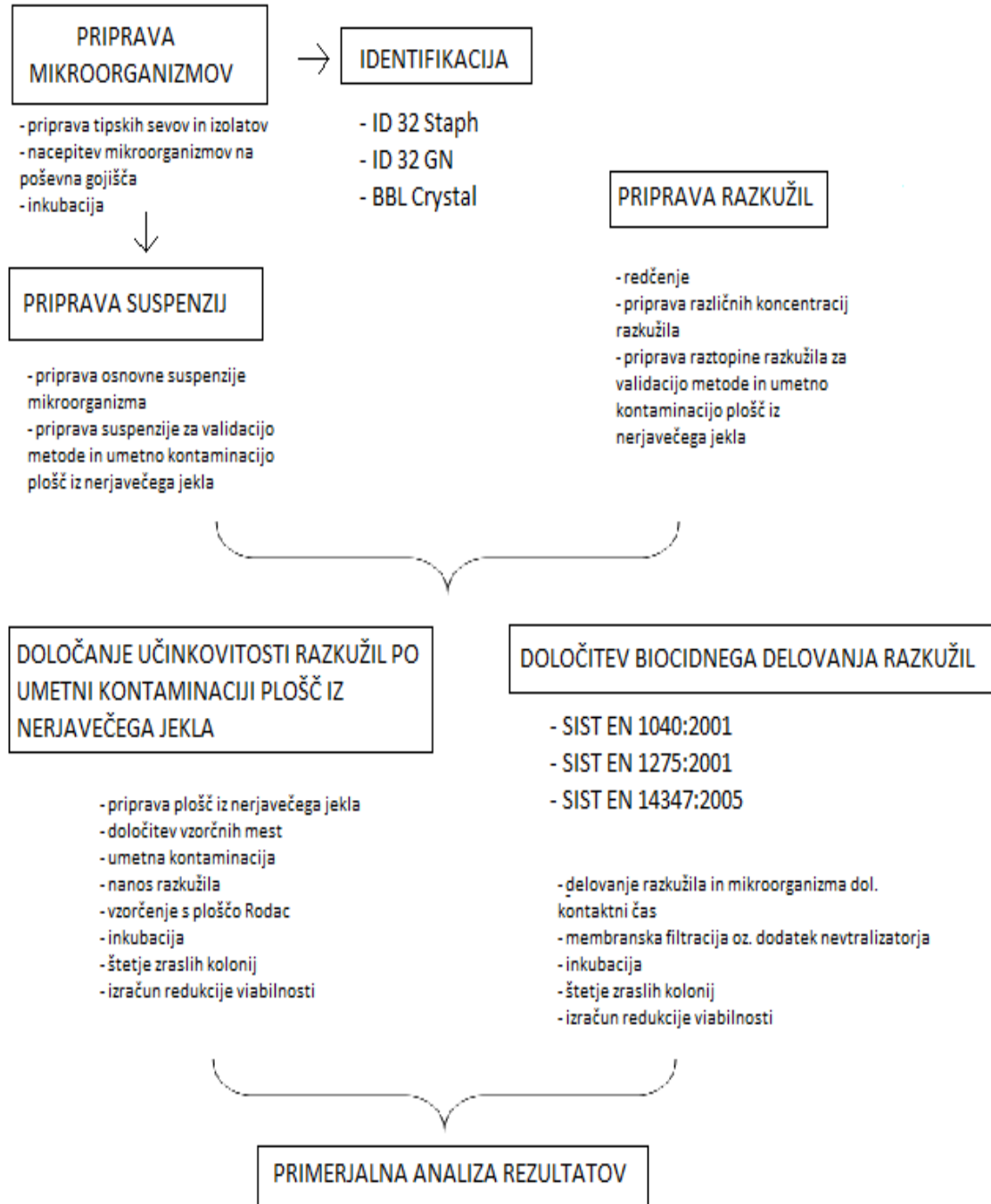
Slika 11: Kolonije plesni vrste *Aspergillus brasiliensis* na gojišču SAB

Kontaminirajo živila in pijače, povzročajo tudi druge zdravstvene težave. Mednje spada invazivna pljučna aspergiloza, do katere pride z vdihavanjem spor iz zraku. Prizadene predvsem ljudi s hematološkimi malignimi obolenji, nevtropenijo, po transplanaciji krvotvornih matičnih celic in po zdravljenjih z velikimi odmerki kortikosteroidov. Alergijska bronhopulmonalna aspergiloza se največkrat pojavlja pri osebah, ki so pogosto izpostavljene veliki količini spor v zraku (kmetje, delavci na farmah).



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 SHEMA DELA



Slika 12: Shema poteka dela

## 3.2 MATERIALI

### 3.1.1 Delovni mikroorganizmi

Za izvedbo poskusa smo uporabili tako tipske seve kot seve, izolirane iz proizvodnje obratov Krka d.d. Novo mesto, in sicer:

Tipski sevi:

- ~ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- ~ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- ~ *Candida albicans* ATCC 10231
- ~ *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404
- ~ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Sevi izolirani iz proizvodnje:

- ~ Izolat 1 (okrogla kolonija bele barve, zrasla na gojišču SCDA po vzorčenju zraka)
- ~ Izolat 2 (okrogla kolonija rumene barve, zrasla na filtru po membranski filtraciji vode)

Seve smo izolirali iz vzorcev površin odvzetih za mikrobiološko kontrolo, ki se redno izvajajo v prostorih obratov proizvodnje v Krki d.d. Novo mesto.

### 3.1.2 Testi za identifikacijo mikroorganizmov

- ~ ID 32 STAPH (BioMérieux, Ref. 32 500, 831090901, Lyon, Francija)
- ~ ID 32 GN kit of 25 stripes + 25 ampules APIAUX Medium (BioMérieux, Ref. 32 100, 830306401, Lyon, Francija)
- ~ Računalniški program za identifikacijo ATB Plus (BioMérieux, verzija 2.10.9 Lyon, Francija)
- ~ BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton, Dickinson and Company, Cat. No. 245140, 8308168, Sparks, Maryland 21152, ZDA)
- ~ BBL Crystal Panel Viewer (Becton, Dickinson and Company, Maryland 21152, ZDA)
- ~ BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID Inoculum fluid (IF) tubes (Becton, Dickinson and Company, Cat. No. 245038, Sparks, Maryland 21152, ZDA)
- ~ API suspension Medium, 2 ml (BioMérieux, Ref. 70 700, Lyon, Francija)
- ~ API NaCl 0,85% Medium, 2 ml (BioMérieux, 832756201, Lyon, Francija)
- ~ Reagent VP A + VP B (BioMérieux, Ref. 70 572, Lyon, Francija)
- ~ Reagent NIT 1 + NIT 2 (BioMérieux, Ref. 70 442, Lyon, Francija)
- ~ Reagent FB (BioMérieux, Ref. 70 562, Lyon, Francija)
- ~ Mineralno olje (BioMérieux, Ref. 70 100, Lyon, Francija)

### 3.1.3 Mikrobiološka gojišča

Uporabljali smo naslednja mikrobiološka gojišča:

#### Gojišče SCDA (ang. Soybean casein digest agar medium)

15 g pankreatinskega hidrolizata kazeina (ang. Casein hydrolysate, LP0041, Oxoid Limited, 680590, Basingstoke, Hampshire, Anglija), 5 g sojine moke (Oxoid limited, LP0044, Basingstoke, Hampshire, Anglija) in 5 g NaCl (Merck KGaA, K39486504, Darmstadt, Nemčija) smo raztopili v 1000 ml prečiščene vode. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo, izmerili pH, ki je moral biti  $7,3 \pm 0,2$ , in ga korigirali z 1N NaOH (Merck, B0166589, Darmstadt, Nemčija), nato pa prefiltrirali čez predhodno navlažen filter papir. Dodali smo 15 g agarja (Oxoid Limited, LP0011, Basingstoke, Hampshire, Anglija) in vsebino segrevali, dokler se agar ni raztopil. Raztopino smo vlili v epruvete, zaprli z aluminijastimi pokrovčki, nato pa sterilizirali v avtoklavu 20 minut. Po sterilizaciji smo košarice z epruvetami ali pustili na sobni temperaturi in jih po dveh dneh shranili v hladilniku ali prestavili v vodno kopel na  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , če smo gojišča vlivali v petrijevke.

#### Gojišče SCDA z dodatkom nevtralizatorja

Priprava gojišča SCDA z dodatkom nevtralizatorja poteka po enakem postopku, kot je opisano za gojišče SCDA, le da smo komponentam pri pripravi dodali še nevtralizator, ki ga sestavljajo 3 g Tween-80 (ang. Polysorbate-80, Croda, 000363421, ZDA), 0,1 g L-histidina (Merck KGaA, K39498951, Darmstadt, Nemčija) in 0,3 g lecitina (ang. L- $\alpha$ -phosphotidylcholine from egg yolk, Sigma Aldrich chem., 61755, DMGBH, Nemčija).

#### Gojišče SCDA z dodatkom inaktivatorja

Gojišče SCDA z inaktivatorjem smo pripravili po postopku priprave gojišča SCDA, le da smo dodali še inaktivator, ki ga sestavlja 3 g Tween 80 (Croda, 601D0027, ZDA), 0,1 g L-histidin (Merck KGaA, K39498951, Darmstadt, Nemčija), 0,3 g lecitina (Sigma Aldrich chem., 1390591, DMGBH, Nemčija) in 0,5 g Na tiosulfata (Merck KGaA, A0051816, Darmstadt, Nemčija)

#### Gojišče SCD (ang. Soybean casein digest medium)

17 g pankreatinskega hidrolizata kazeina (Oxoid Limited, 680590, Basingstoke, Hampshire, Anglija), 3 g sojine moke (Oxoid limited, LP0044, Basingstoke, Hampshire, Anglija), 5 g NaCl (Merck KGaA, K39486504, Darmstadt, Nemčija), 2,5 g dekstroze (Becton, Dickinson and Company, 8045188, Oxford, Anglija) in 2,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merck KGaA, B379309, Darmstadt, Nemčija) smo raztopili v 1000 ml sterilne vode. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in izmerili pH, ki je moral biti  $7,3 \pm 0,2$ , ter korigirali z NaOH (Merck, B0166589, Darmstadt, Nemčija). Raztopino smo prefiltrirali skozi navlažen filter papir in vlili v epruvete in avtoklavirali 20 min pri temperaturi  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Gojišče SCD z dodatkom nevtralizatorja

Gojišče SCD z dodatkom nevtralizatorja smo pripravili po enakem postopku, kot je opisano za gojišče SCD, le da smo komponentam pri pripravi dodali še nevtralizator, ki ga sestavljajo

3 g Tween-80 (ang. Polysorbate-80, Croda, 000363421, ZDA), 0,1 g L-histidina (Merck KGaA, K39498951, Darmstadt, Nemčija) in 0,3 g lecitina (ang. L- $\alpha$ -phosphatidylcholine from egg yolk, Sigma Aldrich chem., 61755, DMGBH, Nemčija).

### SAB (ang. Sabouraud agar medium)

Gojišče smo pripravili z raztapljanjem 10 g peptona, mešanico mesnega peptona (Becton, Dickinson and Company, 6194902, Oxford, Anglija) in kazeina (Oxoid Limited, 680590, Basingstoke, Hampshire, Anglija) in 40 g dekstroze (Becton, Dickinson and Company, 8045188, Oxford, Anglija) v 1000 ml prečiščene vode. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo, izmerili pH, ki je moral biti  $5,6 \pm 0,2$ , in ga korigirali z 1 N NaOH (Merck, B0166589, Darmstadt, Nemčija), nato pa prefiltrirali skozi predhodno navlažen filter papir. Dodali smo 15 g agarja (Oxoid Limited, 949821-04, Basingstoke, Hampshire, Anglija) in zopet segrevali. Nato smo jo vlili v steklene epruvete in 20 minut sterilizirali v avtoklavu. Košarice smo pustili 2 dni na sobni temperaturi, pregledali morebitno rast in nato prestavili v hladilnik.

### Hranljivo gojišče za vzgojo in štetje spor bakterij vrste *Bacillus subtilis*

Na tehtnici smo zatehtali 6,0 g peptona, 1,0 g glukoze, 1,5 g mesnega in 3,0 g kvasnega ekstrakta. Sestavine smo raztopili s segrevanjem v 1000 ml vode, prefiltrirali skozi Büchnerjev lij, ohladili na sobno temperaturo in izmerili pH (6,6 – 6,8), ki smo ga korigirali z NaOH (Merck, B0166589, Darmstadt, Nemčija). Raztopini smo dodali 15,0 g agarja in segrevali, da se je raztopil. Pripravljeno gojišče smo razlili v epruvete in jih zložili v košarico. Sledila je sterilizacija v avtoklavu.

### Gojišče za sporulacijo bakterij vrste *Bacillus subtilis*

Postopek priprave in sestava gojišča sta enaka kot za gojišče za vzgojo in štetje spor bakterij vrste *Bacillus subtilis*, le da smo sestavinam dodali še 0,3 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Honeywell Riedel-deHaën, 7326A, Hanover, Nemčija). Pripravljeno gojišče smo razlili po približno 200 ml v Rouxove steklenice, zaprli in sterilizirali v avtoklavu.

### 3.1.4 Razkužila

Pri delu smo uporabljali naslednja razkužila:

- ~ Apesin Rapid (Tana, Werner & Mertz Germany, dobavitelj: IVEC d.o.o, Maribor, Art.nr.: 01404604)
- ~ Apesin Desinfektions-spray (Tana, Werner & Mertz Germany, dobavitelj: IVEC d.o.o., Maribor, Art.nr.:0407216)
- ~ P3- Oxonia Active 150 (Ecolab, Maribor, Slovenija, UD3042)

#### Apesin Rapid

Gre za hitro in učinkovito razkužilo, ki je v 0,25 % raztopini učinkovito proti bakterijam, glivam, HBV/HIV, rotavirusom in adenovirusom. Deluje na osnovi kvarternih amonijevih spojin (IVEC d.o.o., 2008b), ne vsebuje pa formaldehida in ostalih aldehydov. Primeren je za uporabo na površinah in predmetih iz PVC, PP, PE, pleksi-stekla, gume, umetnih mas, linoleja, nerjavečih materialov, kromiranih armatur in na drugih potencialno infektivnih materialih, prav tako pa je uporaben tudi na površinah obdelanih s premazi. Gre za tekočino, pakirano v 2 l plastenkah (slika 11), mlečne barve in parfimiranega vonja. Za uspešno redukcijo posameznih vrst mikroorganizmov je potrebna ustrezna koncentracija in določen čas (npr. 0,25 % / 60 min, 0,5 % / 30 min). Izdelek je biološko razgradljiv.



Slika 13: Razkužilo Apesin Rapid

#### Apesin Desinfektions-spray

Razkužilo deluje baktericidno in fungicidno, prav tako inaktivira viruse (HBV/HIV). Gre za dezinfekcijsko in čistilno sredstvo s površinskim delovanjem v obliki spreja. Je brezbarvna tekočina na bazi alkohola (70 % izopropanol), ne vsebuje klor, aldehydov in fenolov. Koži je neškodljiv, njegova vrednost pH je 9, lahko draži oči in dihala. Uporablja se za razkuževanje aparatov, pohištva in ostalih površin. Sredstvo ni primerno za uporabo na alkohol neodpornih materialih (npr. pleksi steklo), zaradi lahke vnetljivosti ga ne uporabljamo ob odprtem ognju in ne škropimo pregretyh teles. Razkužilo je pakirano v 1000 ml plastenki (slika 12) in se uporablja nerazredčeno. Iz razdalje 20-30 cm s pomočjo pršilke enakomerno ovlažimo zelen predmet ali pa navlažimo krpo in predmete obrišemo. Proizvod je biološko razgradljiv in namenjen profesionalni uporabi (Krka d.d., 2007).



Slika 14: Razkužilo Apesin Desinfektions-spray

### P3- Oxonia Active 150

Kemijsko gre za mešanico raztopine vodikovega peroksida in očetne kisline, ki pa se kot razkužilo trivialno poimenuje tudi perocetna kislina. Razkužilo je bistra brezbarvna tekočina ostrega, jedkega vonja. Pri pripravi in uporabi raztopine moramo preprečiti stik razkužila s kožo in očmi. Povzroča lahko opekline in draži dihala, zato je priporočljiva uporaba zaščitne maske (Ecolab, 2007). To razkužilo se redno uporablja pri razkuževanju prostorov, kjer pride do kontaminacij s plesnimi.

### **3.1.5 Raztopine in kemikalije**

Uporabili smo naslednje raztopine in kemikalije:

#### Fiziološka raztopina

9 g NaCl (Merck KGaA, K39486504, Darmstadt, Nemčija) smo s segrevanjem raztopili v 1000 ml sterilne vode. Po ohladitvi na sobno temperaturo smo izmerili pH, ki smo ga korigirali z NaOH do  $\text{pH } 7 \pm 0,2$ . Raztopino smo nato po 200 ml prelili v steklenice in jih zaprli z vatnimi zamaški. Fiziološko raztopino smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C.

#### Fiziološka raztopina z dodatkom 0,5 % v/v Tween 80

9 g NaCl (Merck KGaA, K39486504, Darmstadt, Nemčija) smo s segrevanjem raztopili v 1000 ml sterilne vode. Ko se je NaCl raztopil, smo dodali 0,5 g Tween 80 (Croda, 601D0027, ZDA) in raztopino ohladili do sobne temperature. Izmerili smo pH in ga korigirali z NaOH do  $\text{pH } 7 \pm 0,2$ . Raztopino smo nato vlili v steklenice po 300 ml in steklenice zaprli z vatnimi zamaški. Steklenice z raztopino smo avtoklavirali 20 min na 121 °C.

### Raztopina peptona

1 g peptona smo s segrevanjem raztopili v 1000 ml sterilne vode. Ko se je pepton raztopil, smo raztopino ohladili na sobno temperaturo in izmerili pH, ki smo ga korigirali z NaOH do  $\text{pH } 7 \pm 0,2$ . Raztopino smo v volumnu 200 ml prelili v steklenice in zaprli z vatnimi zamaški. Peptonsko raztopino smo pred uporabo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C.

### Sterilna voda

#### **3.1.6 Laboratorijska oprema**

- ~ Brezprašna komora (PIO SMBC 122A, Iskra, Ljubljana, Slovenija)
- ~ Gorilnik (Integra Biosciences, Zizers, Švica)
- ~ Vrtinčno mešalo (MS2 Minishaker, Ika, Staufen, Nemčija )
- ~ Inkubator T25 / 20-25 °C (Kambič, Semič, Slovenija)
- ~ Inkubator T26 / 30-35 °C (Kambič, Semič, Slovenija)
- ~ Avtoklav (Sauter Belimed, Grosuplje, Slovenija)
- ~ Pipete 10 ml (Corning Inc, Costar, New York, ZDA)
- ~ Pipete 1 ml (Corning Inc, Costar, New York, ZDA)
- ~ Avtomatska pipeta programirana 32 x 55  $\mu\text{l}$  in 13 x 135  $\mu\text{l}$  (Biomérieux, Francija)
- ~ Plastične petrijevke (Oroplastik, Horjul, Slovenija)
- ~ Računalniški program za identifikacijo bakterij (Biomérieux, Francija)
- ~ Vodna kopel (Kambič, Semič, Slovenija)
- ~ Hladilnik (Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Nemčija )
- ~ Aparat za membransko filtracijo (Millipore, Francija)
- ~ Filtri z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$  ( Millipore, Francija)
- ~ Plošče Rodac (Oroplastik, Horjul, Slovenija)
- ~ Stresalnik (Vibromix 402 EVT, Aubagne, France)
- ~ Centrifuga (Eppendorf- centrifuge 5416, Nemčija)
- ~ Tehtnica (Mettler Toledo, AX 205, Ohio, ZDA)
- ~ Plošče iz nerjavečega jekla, 30 cm x 30 cm

Poleg navedene opreme smo uporabljali še naslednje laboratorijske pripomočke: cepilna zanka, steklene epruvete, stojala za epruvete, erlenmajer steklenica 1000 ml, erlenmajer steklenica 100 ml, štoparica, kovinske palčke za razmaz vzorca, Roux-posoda, steklene kroglice, vatne palčke.

## 3.2 METODE DELA

Eksperiment smo opravili v treh delih. V prvem delu smo izolirali in identificirali mikroorganizme, tipske seve in izolate iz proizvodnega okolja.

V drugem delu smo s standardno metodo (SIST EN 1040:2001, SIST EN 1275:2001, SIST EN 14347:2005) preverjali učinkovitost razkužil na izbranih mikroorganizmih. Pred začetkom dela smo opravili več predposkusov, s katerimi smo želeli preveriti ustreznost izbranega postopka v standardu. Pri določanju baktericidnega in fungicidnega delovanja smo imeli na izbiro dve metodi, in sicer razredčevalno-nevtralizacijsko metodo in metodo membranske filtracije. Izbrali smo metodo membranske filtracije, katere izvedba je hitrejša. Pri določanju sporocidnega delovanja v standardu metode membranske filtracije ni opisane, zato smo uporabili razredčevalno-nevtralizacijsko metodo. Glede na rezultate iz predposkusov smo se odločili za nekaj prilagoditev standardnih postopkov. Vzeli smo tri delovne koncentracije razkužila Apesin Rapid, od katerih je bila le najvišja v aktivnem rangu (po navodilih proizvajalca pri izbranem kontaktnem času), ostali dve pa nižji, saj smo želeli priti do rezultatov, kjer razkužilo ni imelo baktericidnega učinka. Pri vseh koncentracijah smo upoštevali 30 minutni kontaktni čas, ki je potreben za delovanje razkužila v aktivnem območju. Razkužilo Apesin dezinfekcijski sprej smo testirali nerazredčen. Delo po standardu SIST EN 14347:2005 smo prilagodili, saj celotnega postopka nismo mogli izvesti z materialom in opremo, ki nam je bila na razpolago. Po standardu bi poleg bakterij vrste *B. subtilis* morali uporabiti tudi bakterije vrste *B. cereus*, vendar tipskega seva nismo imeli. Prav tako nismo nacepljali testne suspenzije spor na krvni agar. Skrajšali smo tudi čas inkubacije, ker so kolonije bakterij vrste *B. subtilis* zrasle že po 48 urah. Poleg omenjenih prilagoditev smo spustili tudi kontrolo suspenzije spor z referenčno substanco (glutaraldehidom ali perocetno kislino).

V tretjem delu smo želeli pokazati delovanje razkužila direktno na površini, kontaminirani z mikroorganizmi. Pri določanju učinkovitosti razkužil po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla smo v predposkusu vzorčili po dveh metodah, in sicer s ploščami Rodac in z brisi vatnih palčk, ki smo jih po vzorčenju razmazali po hranljivem gojišču. Pri izračunu preživelih mikroorganizmov smo opazili bistvene razlike, pri brisih z vatnimi palčkami je zraslo precej manj kolonij kot na ploščah Rodac. Predvidevamo, da je vzorčenje z brisi vatnih palčk podalo manj natančne rezultate, zato tega načina kasneje pri delu nismo uporabili. Kot simulacijo delovne površine smo uporabili plošče iz nerjavečega jekla. To je najpogostejši material delovnih površin.

### 3.2.1 Identifikacija bakterij

Za identifikacijo bakterij smo uporabili tri identifikacijske teste. Za identifikacijo tipskih sevov smo se odločili zaradi uvajanja v delo in osvojitve tehnike dela z identifikacijskimi testi. Hkrati je bil to tudi potrditveni test, da so kolonije na poševnem gojišču ustrezne bakterije oz. da ni prišlo do kontaminacije tekom hranjenja gojišč v hladilniku. Pri izolatih iz proizvodnje nismo vedeli, za katere bakterije gre in smo jih tako lahko identificirali.



### 3.2.2.1 Identifikacijski test ID 32 STAPH

Gre za standardiziran sistem za identifikacijo bakterij rodov *Staphylococcus*, *Micrococcus* in sorodnih vrst, *Rothia* in *Aerococcus*. Test je sestavljen iz testne ploščice, na kateri je 32 luknjic, od katerih je v 26 dehidriranih testnih substratov za biokemijske teste (slika 15). Za vrednotenje rezultatov smo uporabili pripadajoč računalniški program in podatkovno bazo.



Slika 15: Primer rezultatov identifikacijskega testa ID 32 Staph za identifikacijo bakterij rodov *Staphylococcus*, *Micrococcus* in sorodnih vrst, *Rothia* in *Aerococcus*

Za identifikacijo posameznega seva smo s sterilno stekleno palčko odvzeli del kolonije zraslih bakterij in jo raztopili v mediju (ang. API suspension Medium). Z avtomatsko pipeto smo odvzeli vzorec in v vsako luknjico na testni ploščici nanesli 55  $\mu$ l suspenzije celic. Testno ploščico smo 24 ur inkubirali pri 30-35  $^{\circ}$ C. Nato smo testno ploščico odkrili in na ustrezna mesta dodali reagentne, počakali nekaj minut in ploščico namestili na prostor za branje z računalnikom. Računalnik je pregledal teste in nam podal rezultate glede na spremembo barve in motnosti ter pri določeni verjetnosti identificiral bakterije. Upoštevali smo rezultate, kjer je bila verjetnost za določeno vrsto mikroorganizmov vsaj 90 %.

### 3.2.2.2 Identifikacijski test ID 32 GN

S testom ID 32 GN identificiramo po Gramu negativne bakterije. Test vsebuje testno ploščico, na kateri je 32 luknjic, v 26 luknjicah je dehidriran testni substrat. Za izvedbo smo uporabili različna gojišča. Rezultate smo vrednotili s pripadajočim računalniškim programom in podatkovno bazo.

S sterilno palčko smo odvzeli del kolonije zraslih bakterij in ga resuspendirali v API NaCl 0,85% Medium. 200  $\mu$ l raztopine smo prenesli v stekleničko z gojiščem API AUX in premešali. Nato smo z avtomatsko pipeto v vsako luknjico na testni ploščici nanesli 135  $\mu$ l suspenzije. Testno ploščico smo 24 ur inkubirali pri 30-35  $^{\circ}$ C, nato pa jo namestili na prostor za branje z računalnikom in izvedli identifikacijo. Računalnik je pregledal teste in

podal rezultate glede na spremembo barve in motnosti ter identificiral bakterije. Upoštevali smo rezultate, kjer je bila verjetnost za določeno vrsto mikroorganizmov vsaj 90 %.

### 3.2.2.3 Identifikacijski test BD BBL Crystal™ Identification Systems, Gram positive ID kit

To je identifikacijski test za aerobne po Gramu pozitivne bakterije, ki vsebuje 29 dehidriranih substratov za biokemijske teste, kot so fermentacija, oksidacija, hidroliza in degradacija določenih snovi. Nekaterim substratom je dodan kromogen oz. fluorogen za identifikacijo pozitivnih reakcij. Test sestavlja ploščica BBL, ki vsebuje 30 luknjic, od tega 29 testnih in eno kontrolno, ter raztopino BBL (slika 16).



Slika 16: Identifikacijski test BD BBL Crystal™ Identification Systems, Gram positive ID kit za identifikacijo po Gramu pozitivnih aerobnih bakterij

V raztopini BBL smo resuspendirali nekaj kolonij bakterij in suspenzijo vlili v poseben prostor na ploščici BBL. Raztopino smo enakomerno porazdelili po ploščici, da je prešla v vse luknjice. Ploščico BBL smo zaprli, označili in 24 ur inkubirali pri 30-35 °C. Po pretekli inkubaciji smo ploščico pregledali na aparatu BBL. En del ploščice smo pregledali pod dnevno, drugega pa pod UV-svetlobo. S primerjavo barvne oz. profilne karte smo ovrednotili rezultate, ki smo jih vpisali v posebno tabelo. Dobljene rezultate posameznih luknjic smo nato vpisali v računalniški program. Ta nam je podal rezultate iz baze podatkov, za katero vrsto bakterij gre in s kolikšno verjetnostjo.

### **3.2.2 Priprava delovnih raztopin razkužila**

Koncentrat razkužila Apesin Rapid smo redčili s sterilno vodo. Ustrezno koncentracijo delovne raztopine razkužila Apesin Rapid smo pripravili z dozatorjem, kjer smo s pritiskom na plastenko napolnili dozirni lonček. Koncentrat smo napolnili do 20 ml, ga vlili v večjo posodo in redčili z vodo, da smo dobili delovno raztopino. Pripravili smo tri koncentracije razkužila, in sicer 0,5 %, 0,25 % in 0,01 %.

Razkužilo Apesin dezinfekcijski sprej je bilo že komercialno pripravljeno za direktno uporabo.

Delovno raztopino razkužila P3-Oxonia Active 150 smo naredili v digestoriju z ustrežno zaščito (zaščitna očala, maska in rokavice). V 1000 ml steklenico smo odmerili 200 ml vode in dodali 90 ml koncentriranega etanola (96 %). Po rahlem mešanju smo dodali še 10 ml razkužila P3-Oxonia Active 150 in dobro premešali.

Za validacijo raztopin razkužil smo vzeli 8 ml 0,5 % raztopine razkužila Apesin Rapid, Apesin dezinfekcijski sprej ali razkužila P3-Oxonia Active, kateremu smo dodali 2 ml sterilne vode.

### **3.2.3 Priprava delovnih mikroorganizmov**

#### **3.2.3.1 Priprava mikroorganizmov**

Tipski sevi bakterij vrst *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, kvasovk vrste *Candida albicans* ATCC 10231 in plesni vrste *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 so bili shranjeni v hladilniku na poševnih gojiščih SCDA oz. SAB. Za zagotavljanje preživelosti mikroorganizmov smo jih povprečno na 21 dni precepili na sveža gojišča. Za pripravo delovnih mikroorganizmov smo nekaj kolonij prenesli na sveža poševna gojišča. Epruvete smo nato zaprli, označili (ime, sev in datum) in inkubirali 24-48 ur pri 30-35 °C za bakterije oz. pri 20-25 °C za kvasovke in 72 ur pri temperaturi 20-25 °C za plesni ter epruvete s kulturo nato shranili v hladilniku.

Tipski sev bakterij vrste *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 9027, ki je bil shranjen liofiliziran, smo raztopili v fiziološki raztopini in suspenzijo nacepili na poševno gojišče SCDA. Epruveto smo zaprli, označili in inkubirali 24-48 ur pri 30-35 °C, nato pa shranili v hladilniku.

Izolata iz delovnih obratov proizvodnje (izolat 1, izolat 2) smo dobili na gojiščih SCDA. Izbrane kolonije smo prenesli na nova gojišča SCDA in jih inkubirali 24-48 ur pri 30-35 °C. Nato smo jih do identifikacije shranili v hladilniku.

#### **3.2.3.2 Priprava testnih suspenzij mikroorganizmov**

Mikroorganizme smo nacepili na poševno gojišče (SCDA za bakterije in SAB za kvasovke in plesni) in inkubirali 24-48 ur pri 30-35 °C (SCDA) ter 72 ur pri 20-25 °C (SAB). Nato smo v vsako epruveto (slika 17) vlili 5 ml fiziološke raztopine za bakterije in 3 ml fiziološke raztopine z 0,5 % Tween 80 za plesni, premešali na vrtničnem mešalu in suspenzijo odlili v 100 ml erlenmajer steklenico.



Slika 17: Kolonije bakterij vrste *Staphylococcus aureus* in *Staphylococcus epidermidis* na poševnem gojišču SCDA

Tako smo dobili 30 ml oz. 18 ml testne suspenzije, za katero smo predvideli, da je v njej koncentracija mikroorganizmov okoli  $10^8$  cfu/ml. Za testiranje baktericidnega učinka (SIST EN 1040:2001) bi morali imeti koncentracijo bakterij  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml –  $5 \times 10^8$  cfu/ml in za testiranje fungicidnega učinka (SIST EN 1275:2001) bi morali imeti koncentracijo kvasovk in plesni med  $1,5 \times 10^7$  cfu/ml –  $5 \times 10^7$  cfu/ml.

Pri pripravi suspenzije spor bakterij vrste *B. subtilis* smo postopek povzeli po navodilih Code of federal regulation, Food and drugs (Code of federal regulations, 1979). Sveže zraslo kulturo na gojišču za sporogene bakterije smo sprali s 3 ml fiziološke raztopine in suspenzijo prenesli v Roux -posodo, v kateri je bilo gojišče za sporulacijo. Suspenzijo smo s sterilnimi steklenimi kroglicami enakomerno razporedili po površini gojišča. Gojišče smo nato 5-7 dni inkubirali pri temperaturi 30-35 °C. Za izločitev spor smo v Roux-posodo dodali 30-40 ml fiziološke raztopine, jih resuspendirali s steklenimi kroglicami in suspenzijo odlili v stekleno erlenmajerico. Dobljeno suspenzijo smo nato 15 minut centrifugirali pri 2500 obratih/min, odlili supernatant in pelet resuspendirali z vodo, ogreto na 70°C. Tako smo uničili preostale vegetativne celice. Celoten postopek centrifugiranja, spiranja in segrevanja smo ponovili dvakrat. Po standardu (SIST EN 14347:2005) smo morali imeti suspenzijo spor, v kateri je koncentracija spor  $3 \times 10^8$  –  $1 \times 10^9$  cfu/ml.

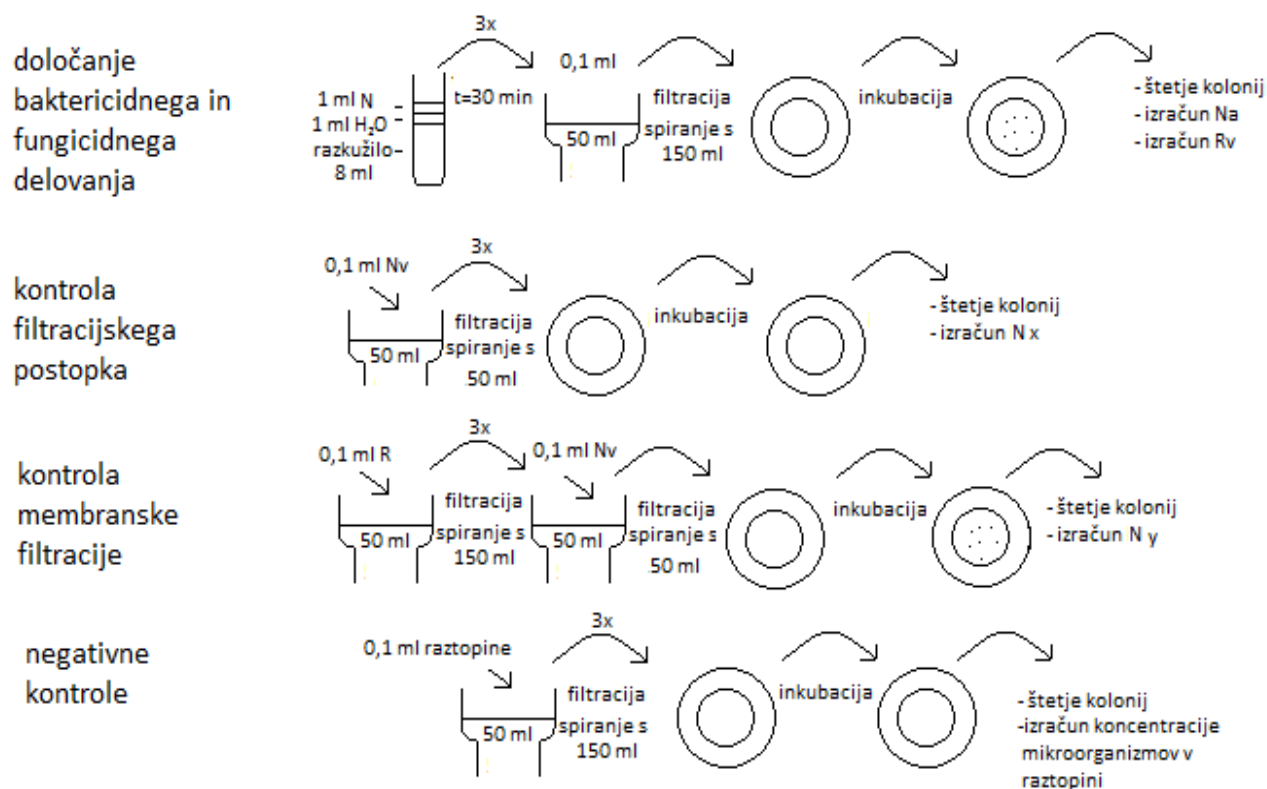
Točno koncentracijo mikroorganizmov oz. spor smo določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču SCDA ali SAB (SIST EN ISO 4833, 2003).

### 3.2.3.3 Priprava suspenzij mikroorganizmov za validacijo metode

Za validacijo posamezne metode bi morali imeti v suspenziji  $6 \times 10^2$ -  $3 \times 10^3$  cfu/ml bakterij,  $6 \times 10^2$ -  $1,5 \times 10^3$  cfu/ml kvasovk in plesni in  $3 \times 10^4$  –  $1 \times 10^5$  cfu/ml spor bakterij vrste *B. subtilis*, zato smo testno mikrobo suspenzijo redčili 1:9 s fiziološko raztopino oz. s fiziološko raztopino z 0,5 % Tween 80 pri kvasovkah in plesnih (slika 18). Kot pri testni suspenziji smo morali tudi v tej suspenziji določiti točno koncentracijo mikroorganizmov z metodo štetja kolonij na trdem gojišču SCDA oz. SAB (SIST EN ISO 4833, 2003).

Slika 18: Testne suspenzije bakterij vrst *P. cepacia*, *S. epidermidis*, *P.aeruginosa* in *S. aureus*

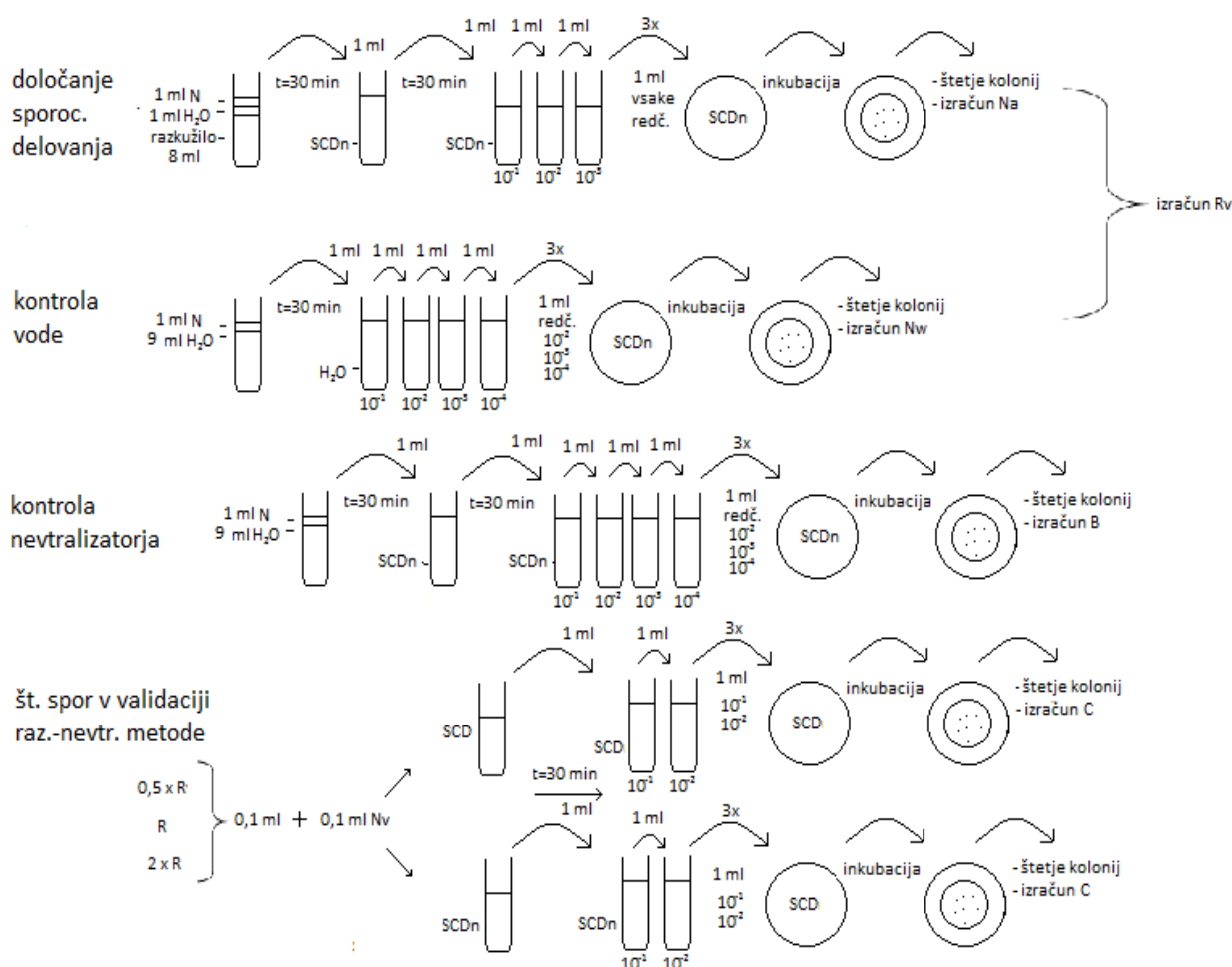
### 3.2.4 Določitev biocidnega delovanja razkužil



Slika 19: Shema določanja baktericidnega in fungicidnega učinka razkužil z metodo membranske filtracije po standardih SIST EN 1040:2001 in SIST EN 1275:2001

**Legenda:** **N:** testna suspenzija mikroorganizmov, **razkužilo:** raztopina razkužila, **N<sub>a</sub>:** koncentracija mikroorganizmov po delovanju razkužila, **N<sub>v</sub>:** suspenzija mikroorganizmov za validacijo, **N<sub>x</sub>:** koncentracija mikroorganizmov pri kontroli filtracijskega postopka, **N<sub>y</sub>:** koncentracija mikroorganizmov pri kontroli membranske filtracije, **R<sub>v</sub>:** redukcija viabilnosti, **R:** raztopina razkužila za validacijo, **raztopine:** raztopine za negativne kontrole.

Na shemi določanja baktericidnega in fungicidnega učinka razkužila je prikazan postopek, ki smo ga izvedli po standardu SIST EN 1040:2001 in SIST EN 1275:2001 (slika 19). Raztopini razkužila smo dodali testno suspenzijo mikroorganizma in po kontaktnem času izvedli membransko filtracijo. Filter smo nato prenesli na hranljivo gojišče SCDA in postavili v inkubator. Po inkubaciji smo določili število zraslih mikroorganizmov po delovanju razkužila in izračunali redukcijo viabilnosti. V kontroli filtracijskega postopka smo prefiltrirali suspenzijo mikroorganizmov za validacijo in po inkubaciji določili parameter  $N_x$ . Pri kontroli membranske filtracije smo po filtriranju raztopine razkužila prefiltrirali še suspenzijo mikroorganizmov za validacijo inkubirali in določili parameter  $N_y$ . Za negativne kontrole smo prefiltrirali fiziološko raztopino, fiziološko raztopino z dodatkom 0,5 % v/v Tween 80, sterilno vodo in peptonsko raztopino.



Slika 20: Shema določanja sporocidnega učinka razkužil z razredčevalno-nevtralizacijsko metodo po standardu SIST EN 14347:2005

**Legenda:** N: testna suspenzija spor, **razkužilo:** raztopina razkužila, **SCD:** gojišče SCD, **SCDn:** gojišče SCD z dodatkom nevtralizatorja, **N<sub>a</sub>:** koncentracija spor po delovanju razkužila, **N<sub>v</sub>:** suspenzija spor za validacijo, **R<sub>v</sub>:** redukcija viabilnosti, **R:** raztopina razkužila za validacijo, **N<sub>w</sub>:** koncentracija spor pri kontroli vode, **B:** kontrola nevtralizatorja, **C:** koncentracija spor v validaciji razredčevalno-nevtralizacijske metode.

Na sliki 20 je prikazan postopek določanja sporocidnega učinka razkužila po standardu SIST EN 14347:2005. Po kontaktnem času raztopine razkužila in testne suspenzije spor smo izvedli nevtralizacijo. Ustrezne redčitve smo nacepili na plošče s hranljivim gojiščem in po inkubaciji določili število spor po delovanju razkužila. V kontroli vode smo za kontaktni čas združili sterilno vodo in testno suspenzijo spor in po inkubaciji določili parameter  $N_W$ , ter izračunali redukcijo viabilnosti. V kontroli nevtralizatorja smo raztopino sterilne vode in testne suspenzije spor za kontaktni čas prenesli v gojišče z nevtralizatorjem, redčili, inkubirali in določili parameter B. Pri določanju števila spor v validaciji razredčevalno-nevtralizacijske metode smo tri različne raztopine razkužila in suspenzijo spor za validacijo prenesli v serijo gojišč z ali brez dodanega nevtralizatorja, naredili redčitveno vrsto in inkubirali. Po inkubaciji smo določili parameter C.

### 3.2.4.1 Določitev baktericidnega delovanja

Baktericidno delovanje razkužil smo določali s standardno metodo (SIST EN 1040:2001) z membransko filtracijo.

Testne suspenzije bakterij smo redčili s fiziološko raztopino, da smo dobili 1:9 redčitveno vrsto. 1 ml redčitev  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  in  $10^{-8}$  testne suspenzije bakterij smo odpipetirali v plastične petrijeve plošče v treh ponovitvah in prelili z gojiščem SCDA. Gojišče smo premešali in počakali, da se je strdilo. Gojišča smo 24-48 ur inkubirali pri 30-35°C in prešteli zrasle kolonije na ploščah in izračunali povprečje ponovitev. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali koncentracijo bakterij v osnovni testni suspenziji. Začetno koncentracijo bakterij v testni suspenziji smo določili po formuli 1:

$$N_b = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d_1} \quad \dots(1)$$

$N_b$ : začetna koncentracija bakterij (cfu/ml),  $c$ : vsota kolonij bakterij na ploščah, ki smo jih upoštevali v računu,  $n_1$ : število plošč prve upoštewane redčitve,  $n_2$ : število plošč druge upoštewane redčitve,  $d_1$ : faktor redčenja prve upoštewane redčitve.

Baktericidno delovanje razkužila smo določili tako, da smo v epruvete odpipetirali 8 ml delovne raztopine razkužila (0,5 %, 0,25 % in 0,01 %) ali dezinfekcijskega spreja in dodali 1 ml sterilne vode ter 1 ml testne suspenzije bakterij. Epruvete smo zaprli, vklopili štoparico in dobro premešali na vrtinčnem mešalu. Kontaktni čas razkužila je bil 30 minut na sobni temperaturi.

Medtem smo na napravi za membransko filtracijo sestavili posode za filtracijo, namestili filtre s premerom por 0,45  $\mu\text{m}$  in v vsako posodo za filtracijo nalili 50 ml izpiralne tekočine. Pred iztekom kontaktnega časa smo suspenzijo še enkrat dobro premešali, nato pa v treh ponovitvah prenesli po 0,1 ml suspenzije v posodo za filtracijo, kamor smo natočili 50 ml izpiralne tekočine in takoj filtrirali. Ko se je tekočina prefiltrirala, smo še enkrat sprali s 150 ml izpiralne tekočine in filter prenesli na gojišče SCDA. Gojišča smo 24-48 ur inkubirali pri 30-35 °C.

Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije, izračunali povprečje ponovitev in določili koncentracijo bakterij po delovanju razkužila ( $N_{Ab}$ ) po formuli 2:

$$N_{Ab} = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d_1} \quad \dots(2)$$

$N_{Ab}$ : koncentracija bakterij po delovanju razkužila (cfu/ml),  $c$ : vsota kolonij bakterij na ploščah, ki smo jih upoštevali v računu,  $n_1$ : število plošč prve upošteevane redčitve,  $n_2$ : število plošč druge upošteevane redčitve,  $d_1$ : faktor redčenja prve upošteevane redčitve.

Iz dobljenih rezultatov smo po formuli 3 izračunali še redukcijo viabilnosti bakterij  $R_{vb}$ :

$$R_{vb} = \frac{N_b}{N_{Ab}} \quad \dots(3)$$

$R_{vb}$ : redukcija viabilnosti bakterij,  $N_b$ : začetna koncentracijabakterij (cfu/ml),  $N_{Ab}$ : koncentracija bakterij po delovanju razkužila (cfu/ml)

Pri validaciji metode smo morali imeti nižje koncentracije bakterij kot v osnovni suspenziji, zato smo osnovno suspenzijo redčili 1:9 s fiziološko raztopino. Redčitve  $10^{-6}$  in  $10^{-7}$  smo nacepili (1 ml) v treh ponovitvah na petrijeve plošče in prelili z gojiščem SCDA. Po 24-48 urah inkubacije na 30-35 °C smo prešteli zrasle kolonije, izračunali povprečje ponovitev in določili katera redčitev osnovne suspenzije najbolj ustreza zahtevam za koncentracijo bakterij v suspenziji za validacijo.

Za kontrolo filtracijskega postopka smo v treh ponovitvah prenesli 0,1 ml suspenzije bakterij za validacijo ( $N_{vb}$ ) v posodo za filtracijo, kamor smo dodali 50 ml izpiralne tekočine. Rastopino smo filtrirali in sprali s 50 ml izpiralne tekočine. Filtre smo prenesli na gojišča SCDA ter inkubirali 24-48 ur pri 30-35 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije, izračunali povprečje ponovitev in parameter  $N_{xb}$  po formuli 4:

$$N_{xb} = \frac{c}{n \times d \times V} \quad \dots(4)$$

$N_{xb}$ : koncentracija bakterij (cfu/ml) pri kontroli membranske filtracije,  $c$ : vsota kolonij bakterij na ploščah, ki smo jih upoštevali v računu,  $n$ : število plošč, upoštevanih v izračunu,  $d$ : faktor redčenja ( $10^{-1}$ ),  $V$ : volumen vzorca.

Pri kontroli membranske filtracije ( $N_{yb}$ ), ki pomeni validacijo metode z določitvijo števila mikroorganizmov na filtru, ki je bil predhodno že v stiku z razkužilom, smo v posode za membransko filtracijo, kamor smo že nalili 50 ml izpiralne tekočine prenesli 0,1 ml (3 ponovitve) rastopine razkužila za validacijo. Vsebinsko smo prefiltrirali in sprali s 150 ml izpiralne tekočine. V posodo smo nato ponovno natočili 50 ml izpiralne tekočine in dodali 0,1 ml suspenzije mikroorganizmov za validacijo. Po filtriranju smo sprali s 50 ml sterilne vode. Filtre smo prenesli na pripravljena gojišča SCDA, ki mo jih nato inkubirali 24-48 ur pri 30-35 °C. Po preštetju zraslih kolonij in izračunu povprečja ponovitev smo dobili parameter  $N_{yb}$  po formuli 5:

$$N_{yb} = \frac{c}{n \times d \times V} \quad \dots(5)$$

$N_{yb}$ : koncentracija bakterij (cfu/ml) pri kontroli filtracijskega testa,  $c$ : vsota kolonij bakterij na ploščah, ki smo jih upoštevali v računu,  $n$ : število plošč, upoštevanih v izračunu,  $d$ : faktor redčenja ( $10^{-1}$ ),  $V$ : volumen vzorca.

Za negativno kontrolo smo prefiltrirali 0,1 ml fiziološke rastopine, 0,1 ml peptonske rastopine in 0,1 ml sterilizirane vode v treh ponovitvah. Vsak vzorec negativne kontrole smo sprali s 150 ml izpiralne tekočine in filtre prenesli na gojišča SCDA, ki smo jih



inkubirali 24-48 ur pri 30-35 °C, nato pa pregledali plošče, če je bila prisotna rast mikroorganizmov.

Dobljene rezultate in izračunane parametre smo primerjali z zahtevami standardne metode določanja baktericidnega učinka (SIST EN 1040:2001) in tako vrednotili baktericidno delovanje razkužil. Zahteve standardne metode določanja baktericidnega učinka (SIST EN 1040:2001)

- $N_b = 1,5 \times 10^8$  cfu/ml –  $5 \times 10^8$  cfu/ml
- $N_{vb} = 6 \times 10^2$  cfu/ml –  $3 \times 10^3$  cfu/ml
- $N_{xb} \geq 0,05 \times N_v$
- $N_{yb} \geq 0,05 \times N_v$
- $R_{vb} \geq 10^5$
- Števna plošča: 15 – 300 kolonij

#### 3.2.4.2 Določitev fungicidnega delovanja

Fungicidno delovanje razkužil ( $N_{Af}$ ) smo določali s standardno metodo (SIST EN 1275:2001) z metodo membranske filtracije.

Postopek dela je bil enak postopku določanja baktericidnega delovanja, le prilagojen za kvasovke in plesni. Za redčenje in pripravo suspenzij smo uporabili fiziološko raztopino z dodanim Tween-80, kot gojišče smo uporabljali gojišče SAB. Razlike so bile tudi v času in temperaturi inkubacije, in sicer čas 24-48 ur za kvasovke in 72 ur za plesni, temperatura inkubacije je bila 20-25 °C.

Za negativno kontrolo smo v treh ponovitvah prefiltrirali 0,1 ml peptonske raztopine, 0,1 ml sterilizirane vode in 0,1 ml fiziološke raztopine z 0,5 % Tween 80, sprali s 150 ml izpiralne tekočine in filtre prenesli na gojišča SAB, ki smo jih inkubirali 72 ur pri 20-25 °C.

Dobljene rezultate in izračunane parametre smo primerjali z zahtevami standardne metode določanja fungicidnega učinka (SIST EN 1275:2001) in tako vrednotili fungicidno delovanje razkužil.

Zahteve standardne metode določanja fungicidnega učinka (SIST EN 1275:2001)

- $N_f = 1,5 \times 10^7$  cfu/ml –  $5 \times 10^7$  cfu/ml
- $N_{vf} = 6 \times 10^2$  cfu/ml –  $1,5 \times 10^3$  cfu/ml
- $N_{xf} \geq 0,05 \times N_v$
- $N_{yf} \geq 0,05 \times N_v$
- $R_{vf} \geq 10^4$
- Števna plošča: 15 – 150 kolonij

### 3.2.4.3 Določitev sporocidnega delovanja

Sporocidno delovanje razkužil smo določali s standardno metodo (SIST EN 14347:2005 ) z razredčitveno-nevtralizacijsko metodo.

Koncentracijo spor v testni suspenziji spor smo določili z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. Osnovno suspenzijo spor smo redčili 1:9 s fiziološko raztopino in na petrijeve plošče odpipetirali po 1 ml v treh ponovitvah redčitev  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  in  $10^{-8}$  ter prelili z gojiščem SCDA. Po 24-48 urah inkubacije na 30-35 °C smo šteli zrasle kolonije, izračunali povprečno število kolonij za posamezno redčitev in izračunali koncentracijo spor v testni suspenziji. Začetno število spor ( $N_s$ ) v testni suspenziji smo določili po formuli 6:

$$N_s = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d_1} \quad \dots(6)$$

$N_s$ : začetna koncentracija spor (cfu/ml) v testni suspenziji,  $c$ : vsota kolonij kolonij na ploščah, ki smo jih upoštevali v izračunu,  $n_1$ : število plošč prve upoštewane redčitve,  $n_2$ : število plošč druge upoštewane redčitve  $d_1$ : faktor redčenja prve upoštewane redčitve.

Pri določanju sporocidnega delovanja razkužil smo v epruveto odpipetirali 8 ml ustrezne raztopine razkužila in 1 ml sterilne vode, nato pa smo dodali 1 ml testne suspenzije spor. Vključili smo štoparico in dobro premešali ter suspenzijo pustili stati 30 min na sobni temperaturi. Po pretečenem kontaktnem času smo odpipetirali 0,1 ml suspenzije in prenesli v 10 ml tekočega gojišča SCD z nevtralizatorjem. Dobro smo premešali na vrtničnem mešalu in zopet pustili stati 30 min na sobni temperaturi. Po nevtralizaciji smo naredili redčitveno vrsto (1:9) testne suspenzije v tekočem gojišču SCDA z nevtralizatorjem,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , premešali in odpipetirali po 1 ml iz vsake epruvete (3 ponovitve) ter prelili z gojiščem SCDA z nevtralizatorjem. Plošče smo inkubirali 24-48 ur na 30-35 °C. Postopek smo izvedli z razkužilom Apesin Rapid v vseh treh koncentracijah in Apesin dezinfekcijskim sprejem. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije bakterij in izračunali število spor po delovanju razkužila ( $N_{As}$ ) po formuli 7:

$$N_{As} = \frac{c \times 100}{n \times d_1} \quad \dots(7)$$

$N_{As}$ : koncentracija spor (cfu/ml) po razkuževanju,  $c$ : vsota kolonij na ploščah, ki smo jih upoštevali v izračunu,  $n$ : število plošč, upoštevanih v računu,  $d_1$ : faktor redčenja prve upoštewane redčitve.

Za kontrolo vode smo v epruveto odpipetirali 9 ml sterilne vode in dodali 1ml testne suspenzije. Vključili smo štoparico in pustili suspenzijo stati 30 min na sobni temperaturi. Po pretečenem času smo premešali in 0,1 ml suspenzije prenesli v 10 ml sterilne vode, kjer smo zopet pustili stati 30 min na sobni temperaturi. Kasneje smo naredili redčitveno vrsto (1:9) suspenzije z vodo. Redčitve  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  in  $10^{-4}$  smo nanesti na plošče (1 ml v treh ponovitvah) in prelili z gojiščem SCDA z nevtralizatorjem ter inkubirali 24-48 ur na 30-35 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in določili parameter  $N_w$ , ki predstavlja število spor v kontroli vode, po naslednji formuli 8:

$$N_w = \frac{c \times 100}{n \times d_1} \quad \dots(8)$$

$N_w$ : koncentracija spor (cfu/ml) pri kontroli vode,  $c$ : vsota kolonij na ploščah, ki smo jih upoštevali v izračunu,  $n$ : število plošč, upoštevanih v računu,  $d_1$ : faktor redčenja prve upoštewane redčitve.

Iz vrednosti  $N_{As}$  in  $N_w$  smo izračunali redukcijo viabilnosti spor v suspenziji ( $R_{Vs}$ ) po formuli 9:

$$R_{Vs} = \frac{N_w}{N_{As}} \quad \dots(9)$$

$R_{Vs}$ : redukcija viabilnosti spor,  $N_w$ : koncentracija spor (cfu/ml) pri kontroli vode,  $N_{As}$ : koncentracija spor (cfu/ml) po razkuževanju.

V testu kontrole nevtralizatorja smo v 9 ml sterilne vode odpipetirali 1 ml testne suspenzije, premešali in vklopili štoparico. Suspenzijo smo pustili stati 30 min na sobni temperaturi, po pretečenem času pa zopet premešali in 1 ml suspenzije prenesli v epruveto z 10 ml tekočega gojišča SCD z nevtralizatorjem. Po premešanju smo suspenzijo pustili stati 30 min na sobni temperaturi, nato pa naredili redčitveno vrsto (1:9) s tekočim gojiščem SCDA z nevtralizatorjem do redčitve  $10^{-4}$ . 1 ml redčitev  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  in  $10^{-4}$  smo v treh ponovitvah prenesli na plošče in prelili z gojiščem SCDA z nevtralizatorjem ter dali inkubirati 24-48 na 30-35 °C. Tako smo določili parameter **B** po formuli 10.

$$B = \frac{c \times 100}{n \times d_1} \quad \dots(10)$$

**B**: koncentracija spor (cfu/ml) pri kontroli nevtralizatorja, **c**: vsota kolonij, upoštevanih v računu, **n**: število plošč upoštevanih v računu, **d<sub>1</sub>**: faktor redčenja upoštevane redčitve.

Za validacijo smo redčili osnovno suspenzijo spor 1:9 s fiziološko raztopino, saj smo morali imeti nižjo koncentracijo spor. 1 ml redčitev  $10^{-6}$  in  $10^{-7}$  smo v treh ponovitvah prenesli v petrijeve plošče in prelili z gojiščem SCDA. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije bakterij, izračunali povprečje in določili ustrezno redčitev testne suspenzije za suspenzijo spor za validacijo ( $N_{Vs}$ ) po formuli 11:

$$N_{Vs} = \frac{c}{n \times d_1} \quad \dots(11)$$

$N_{Vs}$ : koncentracija spor (cfu/ml) v suspenziji za validacijo suspenzijskega testa, **c**: vsota kolonij, upoštevanih v računu, **n**: število plošč, upoštevanih v računu, **d<sub>1</sub>**: faktor redčenja upoštevane redčitve.

Pripravili smo tri različne raztopine 0,5 % razopine razkužila Apesin Rapid, koncentracijo v aktivnem rangi (c1), dvojno koncentracijo (c2) in polovično delovno koncentracijo (c3). Ker je Apesin dezinfekcijski sprej že komercialno pripravljena delovna raztopina, različnih koncentracij nismo pripravljali. Nato smo si pripravili vrsto epruвет z 10 ml gojišča SCD z nevtralizatorjem in drugo vrsto z gojiščem SCD brez nevtralizatorja. V vsako epruveto z gojiščem smo dodali 0,1 ml suspenzije spor za validacijo in dobro premešali na vrtničnem mešalu. Nato smo v pripravljena gojišča s spori dodali še 0,1 ml ustrezne raztopine razkužila, vključili štoparico in pustili stati 30 minut na sobni temperaturi. Po 30 minutah smo raztopine ponovno premešali in naredili redčitvene vrste do redčitve  $10^{-2}$ , 1:9 z gojiščem SCD z nevtralizatorjem in z gojiščem SCD brez nevtralizatorja. Odvzeli smo 1 ml suspenzije redčitev  $10^{-1}$  in  $10^{-2}$  (3 ponovitve) in odpipetirali v petrijevo ploščo ter prelili z gojiščem SCDA. Plošče smo inkubirali 24-48 ur na 30-35 °C, prešteli zrasle kolonije bakterij ter določili parameter **C** po formuli 12.

$$C = \frac{c \times 100}{n \times d_1} \quad \dots(12)$$

**C**: koncentracija spor (cfu/ml) v validaciji razredčevalno-nevtralizacijske metode, **c**: vsota kolonij, upoštevanih v računu, **n**: število plošč, upoštevanih v računu, **d<sub>1</sub>**: faktor redčenja upoštevane redčitve.

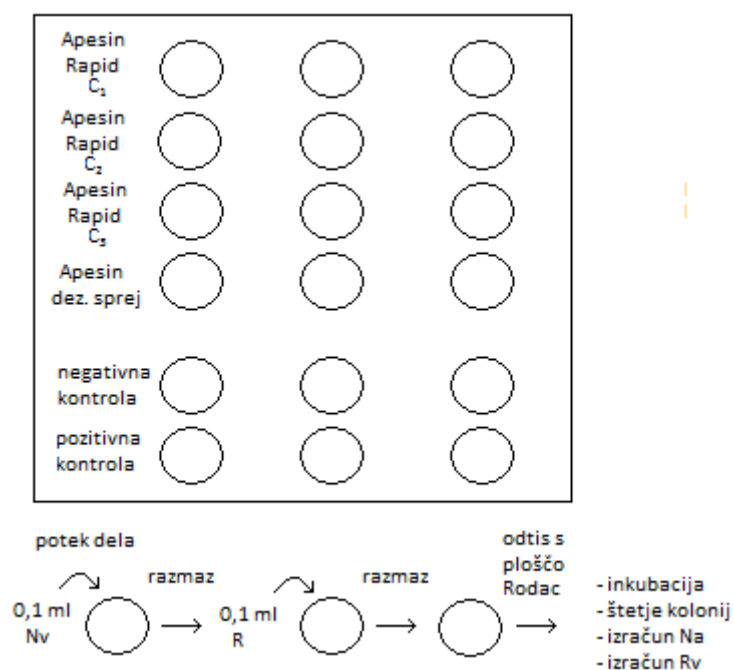
Za kontrolo toksičnosti smo postopek ponovili, le da smo v epruvete namesto raztopine razkužila dodali 1 ml sterilne vode.

Dobljene rezultate in izračunane parametre smo primerjali z zahtevami standardne metode določanja sporocidnega učinka (SIST EN 14347:2005) in tako vrednotili sporocidno delovanje razkužil.

Zahteve standardne metode določanja fungicidnega učinka (SIST EN 14347:2005)

- $N_s = 3 \times 10^8$  cfu/ml –  $1 \times 10^9$  cfu/ml
- $N_{Vs} = 3 \times 10^4$  cfu/ml –  $1 \times 10^5$  cfu/ml
- $N_w = 3 \times 10^7$  cfu/ml –  $1 \times 10^8$  cfu/ml
- $B \geq N_w$
- $C = 3 \times 10^4$  cfu/ml –  $1 \times 10^5$  cfu/ml
- $R_{Vs} \geq 10^4$
- Števna plošča: 15 – 300 kolonij

### 3.2.5 Določitev biocidnega učinka razkužil po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla



Slika 21: Shema določanja biocidnega učinka razkužil po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla

**Legenda:** **Apesin Rapid c<sub>1</sub>**: vzorčna mesta z 0,5 % razkužilom Apesin Rapid, **Apesin Rapid c<sub>2</sub>**:vzorčna mesta z 0,25 % razkužilom Apesin Rapid, **Apesin Rapid c<sub>3</sub>**: vzorčna mesta z 0,01 % razkužilom Apesin Rapid, **Apesin dez. sprej**: vzorčna mesta z Apesin dezinfekcijskim sprejem, **negativna kontrola**: negativne kontrole in **pozitivna kontrola**: pozitivne kontrole, N<sub>v</sub>: suspenzija mikroorganizmov, R: raztopina razkužila.

Metodo določanja učinkovitosti razkužil po umetni kontaminaciji na ploščah smo zasnovali sami na podlagi procesa razkuževanja, ki poteka v proizvodnem okolju. Z metodo smo želeli pokazati, kako učinkovito je razkužilo pri razkuževanju površin.

Na sterilnih ploščah iz nerjavečega jekla smo določili vzorčna mesta (slika 21). Na ploščah smo za vsako vzorčno mesto naredili obris plošče Rodac. Obris nam je zagotovil enako površino za nanos suspenzije in vzorčenje. Za vsak vzorec smo si pripravili tri mesta vzorčenja (tri ponovitve). Prav tako smo pripravili tudi mesta vzorčenja za pozitivno in negativno kontrolo. Za umetno kontaminacijo smo uporabili suspenzijo mikroorganizmov, ki smo jo imeli za validacijo metode membranske filtracije pri določanju biocidnega delovanja razkužil ( $N_V$ ). Testna suspenzija mikroorganizmov ( $N$ ) je imela previsoko koncentracijo mikroorganizmov, da bi jo lahko uporabili za vzorčenje s ploščami Rodac. Negativne kontrole so bili odtisi sterilne plošče, za pozitivno kontrolo pa smo na mesta vzorčenja nanесли po 0,1 ml suspenzije za validacijo, jo razmazali in nato vzorčili s ploščo Rodac.

Na mesta, namenjena testiranju biocidnega učinka, smo nanесли po 0,1 ml suspenzije mikroorganizmov in jo razmazali s sterilnimi kovinskimi palčkami za razmaz. Sledil je nanos razkužila (0,1 ml) na kontaminirana mesta in razmazali po celotni površini vzorčenja. Površino plošče smo nato vzorčili s ploščami Rodac z gojišči z inaktivatorjem. Med razkuževanjem v proizvodnem okolju se razkužilo ne pusti 30 minut na površini kot smo imeli kontaktni čas med razkužilom in mikroorganizmi v standardnih metodah (SIST EN 1040:2001, SIST EN 1275:2001, SIST EN 14347:2005). Zato v metodi razkuževanja umetno kontaminiranih plošč iz nerjavečega jekla nismo uporabili 30-minutnega kontaktnega časa, ampak smo po nanosu razkužila takoj vzorčili s ploščo Rodac.

Po vzorčenju smo plošče Rodac inkubirali 24-48 ur pri 30-35 °C za bakterije, 24-48 ur pri 20-25 °C za kvasovke in 72 ur pri 20-25 °C za plesni, nato pa prešteli zrasle kolonije na površini gojišča ter izračunali povprečje ponovitev in koncentracijo preživelik mikroorganizmov po formuli 13:

$$N_{A1} = \left( \frac{N_1 + N_2 + N_3}{3} \right) \times 10 \quad \dots(13)$$

$N_{A1}$ : koncentracija preživelih mikroorganizmov v 1 ml po delovanju razkužila,  $N_1$ : število zraslih mikroorganizmov na prvi plošči Rodac,  $N_2$ : število zraslih mikroorganizmov na drugi plošči Rodac,  $N_3$ : število zraslih mikroorganizmov na tretji plošči Rodac.

Z dobljenimi rezultati smo izračunali tudi redukcijo viabilnosti ( $R_{V1}$ ) po formuli 14:

$$R_{V1} = \frac{N_V}{N_{A1}} \quad \dots(14)$$

$R_{V1}$ : redukcija viabilnosti mikroorganizmov po razkuževanju na plošči iz nerjavečega jekla,  $N_{V1}$ : koncentracija mikroorganizmov (cfu/ml) v suspenziji za validacijo membranske filtracije in za umetno kontaminacijo,  $N_{A1}$ : koncentracija preživelih mikroorganizmov v 1 ml po delovanju razkužila.

Za ustrezno biocidno delovanje razkužil smo določili redukcijo viabilnosti vsaj  $10^2$  cfu/ml.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 IDENTIFIKACIJA MIKROORGANIZMOV

Pri identifikaciji tipskega seva *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 s testom ID32GN smo potrdili, da gre za bakterije vrste *P. aeruginosa* z verjetnostjo 95,8 %. Z verjetnostjo 3,7 % bi bile bakterije lahko vrste *P. fluorescens*, kar smo lahko ovrgli. Pri identifikaciji tipskega seva *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 s testom ID 32 STAPH smo potrdili, da gre za bakterije vrste *S. aureus* z verjetnostjo 99,8 %. Z verjetnostjo 0,1 % bi lahko bile bakterije vrste *S. haemolyticus*, vendar tega rezultata nismo upoštevali. Pri identifikaciji tipskega seva *Bacillus subtilis* ATCC 6633 s testom BBL Crystal Gram-Positive ID Kit smo potrdili, da gre za bakterije vrste *B. subtilis*. Z identifikacijo tipskih sevov smo želeli le preveriti, da med hranjenjem bakterijskih kolonij na gojiščih v hladilniku ni prišlo do kontaminacije.

S testom ID 32 STAPH smo določili, da so Izolat 1 bakterije vrste *S. epidermidis* z verjetnostjo 94,6 %. Z 2,1 % verjetnostjo smo identificirali bakterije vrste *Staphylococcus capitis*, vendar smo ta rezultat ovrgli. S testom ID 32 GN smo določili, da so Izolat 2 bakterije vrste *Pseudomonas cepacia* z verjetnostjo 99,9 %. Z verjetnostjo 0,1 % smo identificirali bakterije vrste *Pseudomonas fluorescens*. Tega rezultata nismo upoštevali.

Tipski sevi so izbrani glede na zahteve standardov (SIST EN 1040:2001, SIST EN 1275:2001, SIST EN 14347:2005), izolati pa so naključno izbrane kolonije mikroorganizmov iz proizvodnje, izbrali smo kolonije, ki se najpogosteje pojavljajo pri vzorčenju proizvodnega okolja.

### 4.2 PREVERJANJE UČINKOVITOSTI RAZKUŽIL S STANDARDNIMI METODAMI

#### 4.2.1 Baktericidno delovanje

Koncentraciji bakterij vrst *P. aeruginosa* in *S. epidermidis* sta ustrezali koncentraciji, ki je predpisana v standardni metodi (SIST EN 1040:2001), koncentraciji bakterij vrst *S. aureus* in *P. cepacia* pa sta bili nekoliko višji od zahtevanih (preglednica 1).

Po 30-minutnem kontaktnem času bakterijske suspenzije z različnimi koncentracijami razkužil smo z membransko filtracijo določili preživele bakterije.

Pregl. 1: Začetna koncentracija bakterij ( $N_b$ ) v testni suspenziji in koncentracija bakterij ( $N_{Ab}$ ) v suspenziji po 30-minutnem delovanju različnih koncentracij razkužil

			<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>S. epidermidis</i>
<b>Začetna koncentracija bakterij (<math>N_b</math>) (cfu/ml)</b>			$2,2 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$3,8 \times 10^8$
<b>Konc. bakterij po delovanju razkužila (<math>N_{Ab}</math>) (cfu/ml)</b>	<b>Razkužilo</b>	<b>Koncentracija razkužila (%)</b>				
	<b>Apesin Rapid</b>	<b>0,5</b>	< 10	< 10	< 10	< 10
		<b>0,25</b>	< 10	< 10	$4,6 \times 10^2$	< 10
		<b>0,01</b>	$> 3 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$	$> 3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$
<b>Apesin dezinfekcijski sprej</b>	<b>nerazredčen</b>	< 10	< 10	< 10	< 10	

Pri določanju baktericidnega delovanja razkužil so letalen učinek pokazale tri delovne raztopine razkužil, in sicer 0,5 % in 0,25 % raztopina Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej. Pri 0,01 % koncentraciji razkužila Apesin Rapid ni bilo baktericidnega delovanja. Iz rezultatov v preglednici 1 smo izračunali redukcijo viabilnosti za vsako vrsto bakterij in vsako koncentracijo razkužila (preglednica 2).

Pregl. 2: Redukcija viabilnosti ( $R_{vb}$ ) bakterij v suspenziji po 30-minutnem delovanju razkužila

<b>Razkužilo</b>	<b>Koncentracija razkužila (%)</b>	<b><math>R_{vb}</math> (cfu/ml)</b>			
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>S. epidermidis</i>
<b>Apesin Rapid</b>	<b>0,5</b>	$> 2,2 \times 10^7$	$> 1,0 \times 10^8$	$> 1,6 \times 10^8$	$> 3,8 \times 10^7$
	<b>0,25</b>	$> 2,2 \times 10^7$	$> 1,0 \times 10^8$	$3,5 \times 10^6$	$> 3,8 \times 10^7$
	<b>0,01</b>	$< 7,3 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$	$< 5,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
<b>Apesin dezinfekcijski sprej</b>	<b>nerazredčen</b>	$> 2,2 \times 10^7$	$> 1,0 \times 10^8$	$> 1,6 \times 10^8$	$> 3,8 \times 10^7$

Redukcija viabilnosti nam pove, za koliko se je zmanjšala preživelost bakterij po 30-minutnem kontaktnem času bakterij in raztopine razkužila. Da za razkužilo lahko trdimo, da ima dobro baktericidno delovanje, je zahtevana redukcija viabilnosti vsaj  $10^5$  cfu/ml (SIST EN 1040:2001). Take rezultate smo dobili za razkužilo Apesin Rapid pri 0,5 % in 0,25 % koncentraciji, pri 0,01 % koncentraciji ne. Te rezultate smo tudi pričakovali, saj je v navodilih proizvajalca navedeno, da je pri 30 minutnem kontaktnem času primerna 0,5 % koncentracija razkužila Apesin Rapid. Dobro je delovala tudi 0,25 % koncentracija. 0,01% koncentracija je prenizka, saj uniči premajhno število bakterij. Tudi Apesin dezinfekcijski sprej je pokazal dobro baktericidno delovanje in posledično tudi ustrezno redukcijo viabilnosti. Iz rezultatov sklepamo, da sta obe razkužili ustrezni za razkuževanje v proizvodnih prostorih, pomembna je le izbira prave koncentracije in kontaktnega časa.

Razkužilo Apesin dezinfekcijski sprej na bazi alkohola je pokazalo dobro baktericidno delovanje na testnih vrstah bakterij. Apesin dezinfekcijski sprej ima kot aktivno substanco 70 % izopropanol, ki ima učinkovito baktericidno delovanje. Uporaba alkoholnih razkužil je izredno pogosta, saj so poznani kot hitro delujoči in varni za uporabo. Alkoholi so učinkoviti v koncentracijah 50-90 %, najpogostejša je raba v koncentraciji 70 %, redčena z vodo. Tudi razkužilo Apesin Rapid, ki za aktivno substanco vsebuje kvarterne amonijeve spojine ima dobro baktericidno delovanje v koncentracijah 0,5 % ali več pri kontaktnem

času 30 minut, kar se ujema z navodili proizvajalca. V našem poskusu je baktericidno delovanje pokazala tudi 0,25 % koncentracija, kar pa se ne sklada z navodili proizvajalca, saj smo za to koncentracijo uporabili prekratek kontaktni čas (pri 0,25 % koncentraciji razkužila Apesin Rapid je predpisani kontaktni čas 60 minut). Dokazali smo, da kvarterne amonijeve spojine dobro delujejo proti grampozitivnim bakterijam, nekoliko višjo odpornost so pokazale gramnegativne.

Za validacijo membranske filtracije smo morali imeti nižje koncentracije bakterij kot v osnovni suspenziji (priloga A1) in koncentracije bakterij ( $N_{vb}$ ) so ustrezale zahtevam standardne metode, razen pri bakterijah vrste *P. cepacia*.

Števila bakterij pri kontroli filtracije ( $N_{xb}$ ) lahko jemljemo kot pozitivno kontrolo, saj pokažejo preživetje bakterij po filtraciji in spiranju. Tako smo pokazali, da filtracija in tekočina za spiranje nista imeli protimikrobnega učinka. Pri kontroli filtracijskega testa v sklopu validacije metode smo pokazali, da bakterije lahko rastejo na filtru, ki je bil predhodno že v stiku z raztopino razkužila in spran z izpiralno tekočino. Ker razkužilo in bakterijska suspenzija ne prideta v kontakt, na število bakterij v poskusu vpliva le razkužilo, medtem ko metoda, oprema in druge komponente na bakterije nimajo vpliva.

Pri poskusu smo naredili tudi negativne kontrole različnih raztopin, ki smo jih v testih uporabljali, da bi se izognili morebitnim napačnim rezultatom, če bi bila kontaminirana katera od uporabljenih raztopin. Ker na filtru po inkubaciji ni bilo kolonij, smo lahko potrdili, da so bile uporabljene raztopine sterilne (priloga A2).

#### 4.2.2 Fungicidno delovanje

Koncentracija kvasovk vrste *C. albicans* v osnovni suspenziji je bila glede na zahteve standardne metode (SIST EN 1275:2001) ustrezna, koncentracija plesni vrste *A. brasiliensis* pa nekoliko nižja (preglednica 3).

Po 30-minutnem kontaktnem času razkužil in osnovne suspenzije kvasovk in plesni smo raztopino prefiltrirali na aparatu za membransko filtracijo in določili preživlele kvasovke oz. plesni (preglednica 3).

Pregl. 3: Začetna koncentracija kvasovk in plesni ( $N_f$ ) v testni suspenziji ter koncentracija kvasovk in plesni ( $N_{Af}$ ) v suspenziji po 30-minutnem delovanju različnih koncentracij razkužil

Začetna koncentracija kvasovk in plesni ( $N_f$ ) (cfu/ml)			<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
			$3,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
Koncentracija kvasovk in plesni po delovanju razkužila ( $N_{Af}$ ) (cfu/ml)	Razkužilo	Koncentracija razkužila (%)		
	Apesin Rapid	0,5	< 10	$9 \times 10^3$
		0,25	< 10	$1,7 \times 10^4$
		0,01	$> 3 \times 10^4$	$> 3 \times 10^4$
Apesin dezinfekcijski sprej	nerazredčen	< 1	$0,3 \times 10^2$	



Iz rezultatov, dobljenih po delovanju razkužil na kvasovke in plesni, smo nato izračunali redukcijo viabilnosti, ki jo je povzročila posamezna raztopina razkužila na testno kulturo (preglednica 4).

Pregl. 4: Redukcija viabilnosti ( $R_{Vf}$ ) kvasovk in plesni v suspenziji po 30-minutnem delovanju razkužila

Razkužilo	Koncentracija razkužila (%)	$R_{Vf}$ (cfu/ml)	
		<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Apesin Rapid	0,5	$> 3,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^3$
	0,25	$> 3,8 \times 10^6$	$6,5 \times 10^2$
	0,01	$< 1,3 \times 10^3$	$< 3,7 \times 10^2$
Apesin dezinfekcijski sprej		$> 3,8 \times 10^6$	$3,7 \times 10^5$

Pri standardni metodi določanja fungicidnega učinka (SIST EN 1275:2001) je za ustrezno fungicidno delovanje razkužila potrebna vsaj  $10^4$  cfu/ml redukcija viabilnosti. Pri kvasovkah vrste *C. albicans* je ta učinek imelo 0,5 % in 0,25 % razkužilo Apesin Rapid ter Apesin dezinfekcijski sprej. Najnižja, 0,01 % koncentracija razkužila Apesin Rapid ni imela ustrezne redukcije viabilnosti. Redukcija viabilnosti plesni vrste *A. brasiliensis* za dosego fungicidnega učinka je bila dosežena z Apesin dezinfekcijskim sprejem. Razkužilo Apesin Rapid na plesni vrste *A. brasiliensis* ni delovalo fungicidno.

S standardno metodo (SIST EN 1275:2001) smo želeli pokazati, da imata obe razkužili ustrezno fungicidno delovanje. Iz rezultatov je razvidno, da je razkužilo Apesin Rapid dobro delovalo na kvasovke vrste *C. albicans* pri 0,5 % in 0,25 % koncentraciji, ne pa pri 0,01 % koncentraciji. Na kvasovke je imel fungicidni učinek tudi Apesin dezinfekcijski sprej. Na plesni vrste *A. brasiliensis* je imelo ustrezen fungicidni učinek razkužilo Apesin dezinfekcijski sprej, ne pa razkužilo Apesin Rapid. Razkužili Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej imata v proizvajalčevem opisu deklarirano fungicidno delovanje. Po številu preživelih plesni je bil Apesin dezinfekcijski sprej bolj učinkovit proti plesnim vrste *A. brasiliensis* kot razkužilo Apesin Rapid v katerikoli uporabljeni koncentraciji. Ker so rezultati fungicidnega delovanja razkužila Apesin Rapid na plesni vrste *A. brasiliensis* neustrezni, lahko trdimo, da razkužilo nima ustreznega fungicidnega delovanja, saj bi moralo učinkovati vsaj pri najvišji koncentraciji (0,5 %).

Glede na deklarirano delovanje in naše rezultate lahko trdimo, da je za razkuževanje kvasovk in plesni ustrezna uporaba razkužila Apesin dezinfekcijski sprej in ne razkužila Apesin Rapid.

Za alkohole velja, da imajo dobro baktericidno delovanje, slabše pa delujejo virucidno in sporicidno. Zelo malo podatkov je o fungicidnem delovanju, vendar naj bi delovali fungicidno. Salo in Wirtanen (2005) sta opravila poskus z uporabo več razkužil na različne izolate kvasovk in prišla do sklepa, da imajo na kvasovke najboljši učinek ravno razkužila, ki vsebujejo alkohol. Tudi iz naših rezultatov lahko sklepamo, da ima alkohol (izopropanol) dobro delovanje proti kvasovkam vrste *C. albicans* in se lahko uporablja za razkuževanje površin, kontaminiranih s kvasovkami. Alkohol je reduciral tudi plesni vrste *A. brasiliensis*, vendar ne popolnoma, kot smo pričakovali glede na proizvajalčev opis.

Fungicidno delovanje kvarternih amonijevih spojine je omejeno le na nekatere vrste (Lynn, 1980). Razkužilo Apesin Rapid ima ustrezno fungicidno delovanje proti kvasovkam vrste *C. albicans*, in sicer v 0,5 % in 0,25 % koncentraciji. Redukcijo kvasovk vrste *C. albicans* pri 0,25 % koncentraciji nismo pričakovali, saj smo uporabili prekratek čas delovanja za tako nizko koncentracijo razkužila glede na navodila proizvajalca. Glede na dobljene rezultate bi bila ustrezna uporaba razkužila Apesin Rapid tudi v 0,25 % koncentraciji pri 30 minutnem kontaktnem času pri razkuževanju objektov, kontaminiranih s kvasovkami vrste *C. albicans*. Razkužilo Apesin Rapid je neučinkovito proti plesnim vrste *A. brasiliensis* v vseh treh koncentracijah.

Ker pri plesni vrste *A. brasiliensis* razkužilo Apesin Rapid ni imelo fungicidnega učinka, smo se odločili preveriti 0,5 % raztopino razkužila P3-Oxonia Active, ki vsebuje perocetno kislino kot razkužilo s fungicidnim delovanjem. Razkužilo P3-Oxonia Active se uporablja v praksi, kadar pride do kontaminacije s plesnimi v proizvodnih obratih farmacevtske industrije kjer smo izvajali poskuse. Postopek smo ponovili po standardni metodi (SIST EN 1275:2001).

Razkužilo P3-Oxonia Active je popolnoma uničilo plesni vrste *A. brasiliensis*. Velja, da je perocetna kislina dobro učinkovita proti večini mikroorganizmov in tudi proti bakterijskim sporam in je zato izredno dobro razkužilo (Seme, 2002b). Njena slaba stran je toksičnost, v višjih koncentracijah lahko tudi škodljivo deluje na nekatere materiale (npr. kovine).

Pregl. 5: Začetna koncentracija plesni ( $N_f$ ) v testni suspenziji in koncentracija plesni v suspenziji po 30-minutnem delovanju ( $N_{Af}$ ) razkužila P3-Oxonia Active

Začetna koncentracija plesni ( $N_f$ ) (cfu/ml)			<i>A. brasiliensis</i>
			$1,1 \times 10^7$
Koncentracija plesni po delovanju razkužila ( $N_{Af}$ ) (cfu/ml)	Razkužilo	Koncentracija razkužila (%)	
	Raztopina P3-Oxonia Active	0,5	< 10

Iz rezultatov v preglednici 7 smo izračunali redukcijo viabilnosti plesni vrste *A. brasiliensis* po delovanju P3-Oxonia Active (preglednica 6).

Pregl. 6: Redukcija viabilnosti plesni vrste *A. brasiliensis* v suspenziji po 30-minutnem delovanju razkužila P3-Oxonia Active

Razkužilo		$R_{vf}$ (cfu/ml)
Raztopina P3-Oxonia Active	Koncentracija razkužila (%)	<i>A. brasiliensis</i>
	0,5	$> 1,1 \times 10^6$

Redukcija viabilnosti je bila  $>10^6$ , razkužilo je popolnoma uničilo vse plesni vrste *A. brasiliensis*. Uporaba razkužila P3-Oxonia Active za razkuževanje prostorov, kjer pride do kontaminacije s plesnimi, je v splošni praksi farmacevtskih obratov, kjer smo izvajali poskus. To prakso podpirajo tudi naši rezultati.

Za validacijo metode pri določanju fungicidnega delovanja (SIST EN 1275:2001) smo morali imeti suspenzijo z nižjo koncentracijo kvasovk in plesni, kot je bila osnovna

suspenzija (priloga B1). Koncentracija kvasovk vrste *C. albicans* in koncentracija plesni vrste *A. brasiliensis* sta bili nekoliko višji od zahtevane.

Število kvasovk in plesni pri kontroli filtracije ( $N_{xf}$ ) smo primerjali s številom kvasovk in plesni v suspenziji za validacijo ( $N_{vf}$ ) in pokazali, da metoda ne vpliva na rast in preživetje kvasovk in plesni. Rezultate  $N_{xf}$  smo uporabili tudi kot pozitivno kontrolo. Ne metoda in ne izpiralna tekočina nimata antimikrobnega učinka na kvasovke in plesni. Pri kontroli filtracijskega testa ( $N_{vf}$ ) smo do večjih razlik v številu kolonij ni prišlo, kar pomeni, da predhodna filtracija razkužila ni imela fungicidnega učinka na kasneje filtrirano suspenzijo kvasovk in plesni. Ker razkužilo in kvasovke oz. plesni niso prišli v kontakt, fungicidnega delovanja ni bilo. Glede na rezultate lahko trdimo, da metoda membranske filtracije, pogoji dela in uporabljane raztopine v poskusu nimajo fungicidnega učinka in ne vplivajo na preživetje kvasovk vrste *C. albicans* in plesni vrste *A. brasiliensis*.

Za raztopine, ki smo jih uporabili v testih, smo naredili negativne kontrole (priloga B2). Iz rezultatov je razvidno, da so bile uporabljene raztopine v poizkusu sterilne.

#### 4.2.3 Sporocidno delovanje

Sporocidno delovanje razkužil smo določili s standardno metodo (SIST EN 14347:2005). V začetni suspenziji smo določili koncentracijo spor ( $N$ ) (preglednica 7), ki je bila višja od zahtevane.

Pri določevanju sporocidnega delovanja razkužil smo uporabili razredčevalno-nevtralizacijsko metodo, s katero smo določili število spor bakterij vrste *B. subtilis* po 30-minutnem delovanju razkužil (preglednica 7).

Pregl. 7: Začetna koncentracija spor ( $N_s$ ) v testni suspenziji in koncentracija spor ( $N_{As}$ ) v suspenziji po 30-minutnem delovanju različnih koncentracij razkužil

		<i>B. subtilis</i>	
<b>Začetna koncentracija spor (<math>N_s</math>) (cfu/ml)</b>		2,2 x 10 <sup>9</sup>	
<b>Koncentracija spor v kontroli vode (<math>N_w</math>) (cfu/ml)</b>		> 3,3 x 10 <sup>8</sup>	
<b>Koncentracija bakterij po delovanju razkužila (<math>N_{As}</math>) (cfu/ml)</b>	<b>Razkužilo</b>	<b>Koncentracija razkužila (%)</b>	
	<b>Apesin Rapid</b>	<b>0,5</b>	> 3,3 x 10 <sup>8</sup>
		<b>0,25</b>	> 3,3 x 10 <sup>8</sup>
		<b>0,01</b>	> 3,3 x 10 <sup>8</sup>
	<b>Apesin dezinfekcijski sprej</b>	<b>nerazredčen</b>	> 3,3 x 10 <sup>8</sup>

Po 30-minutnem kontaktnem času razkužila s testno suspenzijo spor, sporocidnega delovanja nismo opazili, saj je število zraslih kolonij na ploščah po testiranju preraslo dovoljene meje za števnost plošče. Razkužili nista imeli sporocidnega delovanja v nobeni od preizkušenih koncentraciji. Po pregledu literature (IVEC, 2008a; IVEC, 2008b) sporocidno delovanje tudi ni bilo deklarirano pri nobenem uporabljenem razkužilu. Pri določitvi števila spor pri kontroli vode opazimo, da voda ne vpliva na rast bakterij, saj je rezultat število spor po kontaktnem času in pred nevtralizacijo. Rezultat lahko uporabimo

kot pozitivno kontrolo, saj spore niso bile v kontaktu z raztopino razkužila ne z gojiščem z nevtralizatorjem. Število bakterij je podobno tako pri kontroli kot po testu sporocidnega delovanja.

Iz rezultatov v preglednici 7 smo izračunali tudi redukcijo viabilnosti (preglednica 8).

Pregl. 8: Ocena redukcije viabilnosti spor ( $R_{Vs}$ ) v suspenziji po 30-minutnem delovanju razkužila

Razkužilo	Koncentracija razkužila (%)	$R_{Vs}$ (cfu/ml)
		<i>B. subtilis</i>
Apesin Rapid	0,5	< 1
	0,25	< 1
	0,01	< 1
Apesin dezinfekcijski sprej		< 1

Ker se število spor pred določanjem fungicidnega učinka in po njem bistveno ne razlikuje, redukcije viabilnosti praktično ni. Izračun predstavlja oceno redukcije viabilnosti spor ( $R_{Vs}$ ), saj dejanskega števila nismo mogli določiti zaradi neštevnosti plošč.

Le malo razkužil je učinkovitih tako proti vegetativnim oblikam celic kot tudi proti sporam (Mehmi in sod., 2009). Bakterijske spore so izredno odporne in imajo dobro razvite mehanizme preživetja v neustreznih razmerah, kar pomeni, da jih tudi razkužilo težje uniči kot vegetativne celice.

Iz naših rezultatov sklepamo, da nobeno izmed uporabljenih razkužil, ne Apesin dezinfekcijski sprej in ne Apesin Rapid, nimata ustreznega sporocidnega delovanja, zato njuna uporaba ni ustrezna, kadar sumimo na kontaminacijo z bakterijskimi sporami. Rezultati se ujemajo z dejstvi, da imajo alkoholi in kvarterne amonijeve spojine zelo malo vpliva na bakterijske endospore. Mehmi in sod. (2009) so v svoji študiji sporocidnega delovanja različnih razkužil na bakterijske spore več vrst rodu *Bacillus* pokazali, da imata dobro sporocidno delovanje dve razkužili, in sicer 6 % vodikov peroksid in razkužilo, ki je vsebovalo klorov dioksid in kvarterne amonijeve spojine. Zato sklepamo, da kvarterne amonijeve spojine lahko delujejo sporocidno v kombinaciji z drugimi aktivnimi substancami. Sporocidno delovanje pa velja tudi za 1 % perocetno kislino (Mazzola in sod., 2003), zato se lahko ob morebitni kontaminaciji z bakterijskimi sporami ali za preventivo uporabi kot razkužilo tudi perocetna kislina, pri kateri pa se odsvetuje rutinska uporaba, saj lahko deluje toksično in korozivno.

Za validacijo metode smo izbrali ustrezno redčitev testne suspenzije, katere koncentracija je blizu zahtevani koncentraciji po standardu (priloga C1). V kontroli nevtralizatorja (B) smo želeli pokazati, da nevtralizator v gojišču nima vpliva na preživetje spor (priloga C1). Število spor se ni zmanjšalo na račun delovanja nevtralizatorja. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Mehmi in sod. (2009), ki so zabeležili minimalno odstopanje števila spor v kontroli nevtralizatorja; torej ima nevtralizator zanemarljiv učinek na preživetje spor. Vendar rezultati poskusa ne ustrezajo zahtevam, zapisnim v standardu, kjer bi parameter B moral biti enak ali večji kot  $N_w$ , kontrola vode. V poskusu tega rezultata nismo dobili, saj so bile v kontroli vode plošče neštevne in točnega števila nismo mogli določiti. Rezultatov B in  $N_w$  ne moremo primerjati.

Parameter C pove število preživelih spor po kontaktnem času različnih raztopin razkužil in razlike v preživelosti med testom z gojiščem SCD brez nevtralizatorja in gojiščem SCD z nevtralizatorjem. Po standardu bi število C moralo sovpadati s številom  $N_V$ , torej bi moralo število spor ostajati enako pred in po testu. V našem testu smo dobili parametre C nekoliko nižje, kot bi morali. Nekaj manj preživelih spor smo dobili v testu z gojiščem SCD brez nevtralizatorja, kar nam pove, da je razkužilo ohranilo protimikrobni učinek tudi med inkubacijo, saj njegovega delovanja nismo zaustavili z nevtralizacijo. Torej lahko rečemo, da izbrani nevtralizator ni ustrezen za inaktivacijo delovanja uporabljenih razkužil. Vidne razlike v preživelosti spor pa opazimo tudi med različnimi koncentracijami razkužil v testu z gojiščem SCD z nevtralizatorjem. Nasprotno s pričakovanim smo opazili, da je pri višji koncentraciji razkužila preživelo več spor. Iz tega vidimo, da razkužili Apesin dezinfekcijski sprej in Apesin Rapid nimata sporocidnega delovanja, ne glede na to, katero koncentracijo testiramo.

Za raztopine, ki smo jih uporabili v testih, smo naredili negativne kontrole (priloga C2). Iz rezultatov vidimo, da so bile uporabljene raztopine v poizkusu sterilne.

### 4.3 DOLOČITEV UČINKOVITOSTI RAZKUŽIL PO UMETNI KONTAMINACIJI PLOŠČ IZ NERJAVEČEGA JEKLA

#### 4.3.1 Baktericidno delovanje razkužil na plošči iz nerjavečega jekla

Za umetno kontaminacijo plošč iz nerjavečega jekla smo uporabili suspenzijo bakterij, ki smo jo uporabili že v določanju baktericidnega delovanja razkužil po standardni metodi (SIST EN 1040:2001) (preglednica 9). Po umetni kontaminaciji in nanosu razkužila smo na vzorčna mesta odtisnili ploščo Rodac in po inkubaciji določili število bakterij ( $N_{A1}$ ), kot je prikazano v preglednici 9:

Pregl. 9: Koncentracija bakterij v suspenziji za umetno kontaminacijo plošč iz nerjavečega jekla ( $N_{V1}$ ) in koncentracija bakterij na kontaminirani plošči po razkuževanju ( $N_{A1}$ ) glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo

			<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>P.</i> <i>cepacia</i>	<i>S.</i> <i>epidermidis</i>
<b>Začetna koncentracija bakterij (<math>N_{V1}</math>) (cfu/ml)</b>			$1,8 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$> 3 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$
<b>Konc. bakterij po delovanju razkužila (<math>N_{A1}</math>) (cfu/ml)</b>	<b>Razkužilo Apesin Rapid</b>	<b>Koncentracija razkužila (%)</b>				
		<b>0,5</b>	< 10	< 10	< 10	< 10
		<b>0,25</b>	< 10	< 10	< 10	< 10
	<b>0,01</b>	$2,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$> 3 \times 10^3$	$1,4 \times 10^2$	
	<b>Apesin dezinfekcijski sprej</b>	<b>nerazredčen</b>	< 10	< 10	< 10	< 10

V preglednici 9 vidimo, da so bile preživele bakterije pri 0,01 % Apesin Rapid. 0,5 % in 0,25 % koncentraciji razkužila Apesin Rapid, kot tudi razkužilo Apesin dezinfekcijski sprej, sta popolnoma uničila bakterije. Iz rezultatov smo izračunali redukcijo viabilnosti.

Pregl. 10: Redukcija viabilnosti ( $R_{V2}$ ) bakterij na kontaminirani plošči iz nerjavečega jekla glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo

Razkužilo		Redukcija viabilnosti (cfu/ml)			
	Koncentracija (%)	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.cepacia</i>	<i>S.epidermidis</i>
Apesin Rapid	0,5 %	$> 1,8 \times 10^2$	$> 2,5 \times 10^2$	$> 3 \times 10^2$	$> 2,1 \times 10^2$
	0,25 %	$> 1,8 \times 10^2$	$> 2,5 \times 10^2$	$> 3 \times 10^2$	$> 2,1 \times 10^2$
	0,01 %	9,0	22,7	$< 1$	15,0
Apesin dez.sprej	nerazredčen	$> 1,8 \times 10^2$	$> 2,5 \times 10^2$	$> 3 \times 10^2$	$> 2,1 \times 10^2$

Redukcija viabilnosti bakterij je ustrezna pri 0,5 % in 0,25 % koncentraciji razkužila Apesin Rapid in pri razkužilu Apesin dezinfekcijski sprej. 0,01 % raztopina razkužila Apesin Rapid je prenizka ( $< 10^2$  cfu/ml) in ustreznega baktericidnega učinka ni bilo.

S primerjavo rasti pri pozitivni kontroli (priloga D1) lahko rečemo, da je rast približno enaka in da razkužilo Apesin Rapid v koncentraciji 0,01 % nima baktericidnega delovanja. V preglednici vidimo, da so bile plošče iz nerjavečega jekla, ki smo jih uporabili v poskusu, sterilne, saj po inkubaciji plošč Rodac za negativno kontrolo ni bilo rasti. Število zraslih bakterijskih kolonij je ustrezno glede na koncentracijo, ki smo jo nacepili pri umetni kontaminaciji.

Rezultati podajo podobne ugotovitve, do katerih smo prišli tudi pri določanju baktericidnega učinka razkužil pri standardni metodi (SIST EN 1040:2001). Tudi v tem poskusu sta obe razkužili, Apesin dezinfekcijski sprej in Apesin Rapid v 0,5 % in 0,25 % koncentraciji, pokazali dobro baktericidno delovanje. Rezultati so nas presenetili, saj je bilo pokazano (Mehmi in sod., 2009), da je delovanje razkužil ponavadi bolj učinkovito v suspenziji kot na površini. Na površini celice bakterij začnejo tvoriti biofilm, s katerim se zavarujejo pred zunanjimi vplivi in razkužilo težje prihaja v stik z bakterijskimi celicami. Rezultate, ki smo jih dobili v našem poskusu, pa si razlagamo kot prekratek čas, ki je minil med umetno kontaminacijo in nanosom razkužila, saj smo želeli simulirati proces razkuževanja v proizvodnem okolju, kjer razkužilo ne deluje na površini 30 minut. Ker celice potrebujejo določen čas, da ustvarijo biofilm, v našem primeru pa je bil ta čas nezadosten, je razkužilo lahko prišlo v stik z vsemi celicami na površini. Poleg prekratkega kontaktnega časa pa je možna razlaga popolne redukcije tudi v načinu vzorčenja. Pri nanosu suspenzij in vzorčenju smo bili natančni, a obstaja možnost, da z odtisom plošče Rodac na vzorčno površino nismo pobrali vseh celic. Problem vzorčenja s ploščo Rodac lahko pokažemo tudi s primerjavo zraslih kolonij (oz. preračunane koncentracije cfu/ml) na plošči pozitivne kontrole in s številom, ki smo ga na ploščo nacepili. Koncentracija bakterij pri pozitivni kontroli je precej manjša, kot bi pričakovali glede na nacepljeno koncentracijo. Z odtisom plošče Rodac na površino torej ne vzorčimo vseh bakterijskih celic, ki so na vzorčeni površini. Rezultati vzorčenja s ploščami Rodac v praksi nam podajo le kvalitativne rezultate in ne kvantitativnih. Dobimo informacijo o prisotnosti bakterij, ne pa o resničnem številu bakterij v okolju.

#### 4.3.2 Fungicidno delovanje razkužil na plošči iz nerjavečega jekla

Za umetno kontaminacijo smo vzeli redčitev osnovne suspenzije kvasovk oz. plesni, ki smo jo uporabili tudi kot suspenzijo za validacijo pri določevanju fungicidnega učinka (SIST EN 1275:2001). Po umetni kontaminaciji in nanosu razkužila smo na vzorčna mesta odtisnili ploščo Rodac in po inkubaciji določili število bakterij (preglednica 11).

Pregl. 11: Koncentracija kvasovk in plesni v suspenziji za umetno kontaminacijo ( $N_{V1}$ ) ter koncentracija kvasovk in plesni na plošči po nanosu razkužil na kontaminirani plošči iz nerjavečega jekla ( $N_{A1}$ ) glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo

Začetna koncentracija kvasovk oz. plesni ( $N_{V1}$ ) (cfu/ml)			<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
			$5,8 \times 10^3$	$9 \times 10^3$
Konc. kvasovk oz. plesni po delovanju razkužila ( $N_{A1}$ ) (cfu/ml)	Razkužilo	Koncentracija razkužila (%)		
	Apesin Rapid	0,5	< 10	$1,2 \times 10^2$
		0,25	< 10	$1,1 \times 10^2$
		0,01	$1,0 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$
Apesin dezinfekcijski sprej	Nerazredčen	< 10	$0,9 \times 10^2$	

Rezultati so podobni kot pri standardni metodi; kvasovke vrste *C. albicans* je uničila 0,5 % in 0,25 % koncentracija razkužila Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej. Najnižja koncentracija razkužila Apesin Rapid ni pokazala fungicidnega delovanja. Na podlagi rezultatov smo izračunali redukcijo viabilnosti ( $R_{V1}$ ) (preglednica 12).

Pregl. 12: Redukcija viabilnosti ( $R_{V1}$ ) kvasovk in plesni na kontaminirani plošči iz nerjavečega jekla glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo

Razkužilo		Redukcija viabilnosti (cfu/ml)	
	Koncentracija (%)	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Apesin Rapid	0,5 %	$5,8 \times 10^2$	75,0
	0,25 %	$5,8 \times 10^2$	81,8
	0,01 %	58,0	19,0
Apesin dez.sprej	nerazredčen	$5,8 \times 10^2$	33,3

Pri izračunu redukcije viabilnosti smo ustrezne rezultate dobili le pri kvasovkah vrste *C. albicans*, pri vseh raztopinah razkužila, razen pri razkužilu Apesin Rapid v 0,01 % koncentraciji.

Na plesni vrste *A. brasiliensis* fungicidnega delovanja ni pokazalo nobeno razkužilo. Povsod je bilo število preživelih plesni previsoko. Tako smo potrdili ugotovitve iz prejšnjega poskusa določanja fungicidnega delovanja razkužil Apesin dezinfekcijski sprej in Apesin Rapid po (EN SIST 1275:2001), kjer smo dokazali učinkovito fungicidno delovanje obeh razkužil v ustrezni koncentraciji proti kvasovkam vrste *C. albicans*, ne pa proti plesni vrste *A. brasiliensis*, kjer fungicidnega delovanja razkužila Apesin Rapid ni bilo. Pri višjih koncentracijah razkužila Apesin Rapid je sicer prišlo do redukcije viabilnosti plesni vrste *A. brasiliensis*, vendar ne dovolj, da bi lahko razkužilo uporabili za

razkuževanje pri kontaminaciji s plesnimi. Rezultat fungicidnega delovanja razkužila Apesin dezinfekcijski sprej je nasproten od rezultata, ki smo ga dobili z delom po standardni metodi EN SIST 1275:2001. Pri določanju fungicidnega učinka razkužila Apesin dezinfekcijski sprej na plošči iz nerjavečega jekla nismo dobili zadostne redukcije viabilnosti, da bi razkužilo pripisali fungicidno delovanje na plesni vrste *A. brasiliensis*.

S ploščami Rodac smo naredili pozitivne in negativne kontrole (priloga D2). Po inkubaciji plošč Rodac smo prešteli zrasle kolonije in ugotovili, da so bile plošče iz nerjavečega jekla, uporabljene v poskusu sterilne, saj rasti na ploščah Rodac za negativno kontrolo ni bilo. Pri pozitivni kontroli smo imeli čisto kulturo kvasovk.

Zaradi dobrih rezultatov razkuževanja z razkužilom P3-Oxonia Active smo to razkužilo preizkusili tudi po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla s plesnimi vrste *A. brasiliensis* (preglednica 13) in iz rezultatov izračunali redukcijo viabilnosti ( $R_{V1}$ ) (preglednica 14).

Pregl. 13: Začetno število plesni v suspenziji za kontaminacijo plošče iz nerjavečega jekla ( $N_{V1}$ ) in število plesni na kontaminirani plošči po razkuževanju z razkužilom P3- Oxonia active 150

Začetna koncentracija plesni ( $N_{V1}$ ) (cfu/ml)			<i>A. brasiliensis</i>
			$9 \times 10^3$
Koncentracija plesni po delovanju razkužila ( $N_{A1}$ ) (cfu/ml)	Razkužilo	Koncentracija razkužila (%)	
	P3-Oxonia Active 150	0,5	$1 \times 10^2$

Med inkubacijo na ploščah Rodac so zrasle kolonije plesni, kar pomeni, da razkužilo plesni ni popolnoma uničilo, kot smo to predvidevali iz rezultatov po standardni metodi določanja fungicidnega učinka. Število zraslih kolonij je nekoliko manjše na ploščah, odtisnjenih na mesto delovanja razkužila kot pri pozitivni kontroli (priloga D3). Rezultate si lahko razlagamo tudi kot neenakomerno razporeditev razkužila.

Pregl. 14: Redukcija viabilnosti plesni na kontaminirani plošči po razkuževanju z razkužilom P3-Oxonia Active

$R_{V2}$ (cfu/ml)	
Razkužilo (%)	<i>A. brasiliensis</i>
0,5	90

Iz izračuna redukcije viabilnosti vidimo, da do redukcije  $10^2$  cfu/ml ni prišlo.

Ker se rezultat nekoliko razlikuje od rezultata, ki smo ga dobili z uporabo standardne metode določanja fungicidnega delovanja razkužila P3-Oxonia Active 150 po SIST EN 1275:2001, sklepamo, da smo neustrezne rezultate v metodi določanja učinkovitosti razkužila na plošči iz nerjavečega jekla dobili zaradi pomanjkljivo zasnovane metode. Za neustrezne rezultate lahko krivimo pomanjkljivosti v metodi, za katere pa bi bilo zaželeno, da se odpravijo in da se razvije izboljšana metoda, ki bi se standardizirala, saj bi tako lahko z metodo preverili učinkovitost razkužil na površini, kar je tudi simulacija razkuževanja v proizvodnem okolju.



Naredili smo tudi pozitivne in negativne kontrole rasti plesni (priloga D, preglednica 3). Iz preglednice je razvidno, da so bile plošče iz nerjavečega jekla, uporabljene v poskusu, sterilne, število zraslih kolonij na ploščah Rodac pri pozitivni kontroli pa je ustrezno glede na koncentracijo plesni, ki smo jo uporabili v poskusu.

#### 4.3.3 Sporocidno delovanje razkužil na plošči iz nerjavečega jekla

Pri umetni kontaminaciji smo uporabili suspenzijo spor, ki smo jo uporabili tudi pri validaciji metode pri določevanju sporocidnega delovanja razkužil po standardu SIST EN 14347:2005 ( $N_{V1}$ ). Po inkubaciji plošč Rodac smo določili število zraslih bakterij po delovanju razkužil ( $N_{A1}$ ) (preglednica 15).

Pregl. 15: Začetna koncentracija spor v suspenziji za kontaminacijo plošče iz nerjavečega jekla ( $N_{V1}$ ) in koncentracija spor na kontaminirani plošči po kontaminaciji in razkuževanju glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo

			<i>B. subtilis</i>
<b>Začetna koncentracija spor (<math>N_{V1}</math>) (cfu/ml)</b>			$2,3 \times 10^4$
<b>Konc. spor po delovanju razkužila (<math>N_{A1}</math>) (cfu/ml)</b>	<b>Razkužilo</b>	<b>Koncentracija razkužila (%)</b>	
	<b>Apesin Rapid</b>	<b>0,5</b>	$7,3 \times 10^2$
		<b>0,25</b>	$2,0 \times 10^3$
		<b>0,01</b>	$3,2 \times 10^3$
	<b>Apesin dezinfekcijski sprej</b>	<b>Nerazredčen</b>	$6,7 \times 10^2$

Na ploščah so zrasle kolonije *B. subtilis* pri vseh koncentracijah razkužil, kar potrjuje dejstvo, da razkužili Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej nimata sporocidnega delovanja in nista primerna za razkuževanje ob kontaminaciji z bakterijskimi spori bakterije vrste *B. subtilis*. Nekoliko manj kolonij je zraslo na ploščah Rodac, s katerimi smo vzorčili mesta, kamor smo nanесли razkužilo Apesin Rapid v 0,5 % koncentraciji in Apesin dezinfekcijski sprej, vendar ne moremo trditi, da imata razkužili sporocidno delovanje, kar potrjuje ugotovitve, do katerih smo prišli v poskusu, kjer smo določali sporocidno delovanje razkužil s standardno metodo (14347:2005). Vzorec s ploščami Rodac je le informativnega značaja, saj nam ne poda dejanskih rezultatov o številu prisotnih spor.

Iz rezultatov smo izračunali redukcijo viabilnosti ( $R_{V1}$ ) (preglednica 16).

Pregl. 16: Redukcija viabilnosti ( $R_{V1}$ ) spor na kontaminirani plošči iz nerjavečega jekla glede na vrsto razkužila in njegovo koncentracijo

<b>Razkužilo</b>		<b>Redukcija viabilnosti (cfu/ml)</b>
	<b>Koncentracija (%)</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>Apesin Rapid</b>	<b>0,5 %</b>	31,5
	<b>0,25 %</b>	11,5
	<b>0,01 %</b>	7,2
<b>Apesin dez.sprej</b>	<b>nerazredčen</b>	34,3

Tudi iz rezultatov izračunane redukcije viabilnosti vidimo, da do zadostne redukcije ( $10^2$  cfu/ml) viabilnosti spor ni prišlo pri nobeni koncentraciji razkužila, zato lahko trdimo, da razkužili nimata sporocidnega delovanja.

Naredili smo tudi pozitivne in negativne kontrole, ki so prikazane v prilogi D4. Iz rezultatov je razvidno, da je število zraslih kolonij na plošči Rodac za pozitivno kontrolo nekoliko nižje od pričakovanega. Predvidevamo, da je bila suspenzija spor neenakomerno razporejena po površini vzorčenja. Na ploščah Rodac za negativno kontrolo ni bilo rasti, kar pomeni, da so bile plošče iz nerjavečega jekla, uporabljene v poskusu, sterilne.

## 5 SKLEPI

Iz rezultatov dela diplomske naloge smo prišli do naslednjih sklepov:

Razkužili Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej imata baktericidni učinek na bakterije vrst *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Pseudomonas cepacia*, potrebno pa je izbira primerne koncentracije razkužila.

Razkužili Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej nimata sporocidnega učinka na bakterije vrste *Bacillus subtilis*.

Obe razkužili imata fungicidni učinek na kvasovke vrste *Candida albicans*.

Razkužilo Apesin dezinfekcijski sprej ima fungicidni učinek na plesni vrste *Aspergillus brasiliensis*, medtem ko razkužilo Apesin Rapid na te vrste plesni ne učinkuje.

Razkužili Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej učinkovito delujeta na tipske seve in na izolate iz proizvodnega okolja.

Standardne metode določanja učinkovitosti razkužila (SIST EN 1040:2001, SIST EN 1275:2001, SIST EN 14347:2005) in določitev učinkovitosti razkužila na umetno kontaminiranih ploščah iz nerjavečega jekla dajeta primerljive rezultate.

Metodo določanja učinkovitosti razkužil na ploščah iz nerjavečega jekla, ki smo jo uporabili, bi bilo smiselno dodelati in standardizirati. Metoda daje podobne rezultate kot standardna, njena izvedba pa je hitrejša in bolj enostavna.

## 6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo preverjali učinkovitost dveh razkužil, Apesin dezinfekcijski sprej, katerega aktivna substanca je izopropanol, in Apesin Rapid, ki ima za aktivno substanco kvarterne amonijeve spojine. Obe razkužili se redno uporabljata v prostorih farmacevtske industrije, v kateri smo izvajali poskuse. Želeli smo pokazati, da imata razkužili ustrezno baktericidno, fungicidno in sporocidno delovanje, ki je potrebno za zagotavljanje mikrobiološke neoporečnosti okolja, kjer poteka proizvodnja farmacevtskih izdelkov.

Ker je razkuževanje površinsko in standardne suspenzijske metode ugotavljanja učinkovitosti razkužil niso pokazatelj dejanskega stanja, smo oblikovali enostavno metodo umetne kontaminacije plošč iz nerjavečega jekla, ki je tudi najbolj pogost material delovnih površin v proizvodnji. Z obema metodama smo želeli priti do podobnih rezultatov.

Pri izbiri mikroorganizmov za določanje biocidnega učinka smo se odločili za različne skupine, grampozitivne (rod *Staphylococcus*) in gramnegativne (rod *Pseudomonas*) bakterije, kvasovke (vrsta *Candida albicans*), plesni (vrsta *Aspergillus brasiliensis*) in sporogene bakterije (vrsta *Bacillus subtilis*). Tako smo lahko določili učinkovitost razkužil na različnih skupinah mikroorganizmov.

Ugotovili smo, da je pri izbiri razkužil pomembno poznati mikroorganizme, ki se najpogosteje pojavljajo v izbranem okolju, razmere in način razkuževanja. Ni vseeno, kaj razkužujemo, saj nekatera razkužila lahko delujejo toksično in dražeče (npr. perocetna kislina), zato niso primerna za rutinsko uporabo, škodljivo pa lahko delujejo tudi na nekatere vrste materialov. Pomembno je predvideti vrsto kontaminantov, saj vsako razkužilo ne deluje proti vsem mikroorganizmom. Še posebej je to pomembno, če imamo kontaminacijo s plesnimi ali bakterijskimi sporami.

Alkoholi in kvarterne amonijeve spojine so primerne za rutinsko uporabo pri razkuževanju, vendar je potrebna posebna pazljivost, kadar obstaja možnost kontaminacije s plesnimi ali bakterijskimi sporami. V tem primeru je možna uporaba raztopine razkužila P3-Oxonia Active, vendar je potrebna pazljivost pri njeni uporabi, saj ima lahko toksične učinke na uporabnika in lahko povzroča defekte nekaterih materialov.

Pri zagotavljanju mikrobiološke neoporečnosti proizvodnega okolja je potrebno redno in natančno vzorčenje vseh akterjev proizvodnje farmacevtskih izdelkov: vhodnih materialov, surovin in vode, okolja (zrak, površine) in osebja, ki je vključeno v proizvodnjo. Pri vzorčenju se svetuje uporaba metod, ki v celoti lahko podajo natančnejše rezultate dejanskega stanja, saj ima vsak način vzorčenja svoje prednosti in pomanjkljivosti.

## 7 VIRI

- Aridis Pharmaceuticals. 2010. Cystic fibrosis disease. San Jose, Aridis Pharmaceuticals: 1 str. (<http://www.aridispharma.com/cystic-fibrosis-disease.html>) (Apr. 2010)
- Arnou P.M., Flaherty J.P. 1999. Nonfermentative gram-negative bacilli. V: Hospital epidemiology and infection control. 2<sup>nd</sup> ed. Mayhall C.G. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 431-451
- Bornšek M. 2006. Vpliv snažnosti polnilnih linij za brezalkoholne pijače na kakovost končnih proizvodov. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 12-12
- Bredholt S., Maukonen J., Kujanpää K., Alanko T., Olofson U., Husmark U., Sjöberg A.M., Wirtanen G. 1998. Microbial methods for assessment of cleaning and disinfection of food-processing surfaces scanned in a low-pressure system. European Food Research and Technology, 209: 145-152
- Brown K.L. 2003. Control of airborne contamination. V: Hygiene and food processing. Lelieveld M., Mostert A., Holah J., White B. (eds.). Cambridge, Woodhead: 106-121
- Casey A.L., Lambert P.A., Elliot T.S.J. 2007. Staphylococci. International Journal of Antimicrobial Agents, 29: 23-32
- Chen H., Yao J., Wang F., Zhou Y., Chen K., Zhuang R., Choi M. M. F., Zaray G. 2010. Toxicity of three phenolic compounds and their mixtures on the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* in the aquatic environment. Science of the Total Environment, 408: 1043-1049
- Code of federal regulations: Food and drugs: Chapter 21. 1979. Washington, U. S. Government printing office: 247-249
- Conner D. E., Eckman M. K. 1994. Rotation of phenolic disinfectants enhances efficiency against adherent *Pseudomonas aeruginosa*. Pharmaceutical Technology Europe, 6: 44-47
- Crawford L., Yu Z.-J., Keegan E., Yu T. 2000. A comparison of commonly used surface disinfectants. Alcohol-, phenol-, chlorine-, and quaternary amine- based disinfectants. California, Infection Control Today: 1 str. (<http://www.infectioncontrolday.com/articles/0b1feat2.html>) (Apr. 2010)
- Cundell A.M. 2004. Microbial testing in support of aseptic processing. Pharmaceutical Technology, 28: 56-66
- Dakič M. 2004. Dezinfekcija, dezinskecija, deratizacija. 1. izd. Ljubljana, Inštitut za sanitarno inženirstvo in Zbornica sanitarnih tehnikov in inženirjev Slovenije: 147 str.

- DiGiacomo R., Gallagher P. 2001. Soft drinks. V: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Downes F., Ito K. (eds.). Washington, DC, American Public Health Association: 569-571
- Dragaš A.Z. 1984. Razkužila. V: Ugotavljanje in preprečevanje bolnišničnih okužb: zbrana predavanja enosemesterskega podiplomskega izobraževanja iz hospitalne higiene za višje medicinske sestre v šolskem letu 1983/1984. Dragaš A.Z. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani, Inštitut za mikrobiologijo: 18-26
- Ecolab. 2007. Varnostni list. P3-oxonia active 150. Maribor, Ecolab d.o.o.: 6 str.
- Gaitan Herrera A. 2004. Testing disinfectants in the food factory: Phenol coefficient method. V: Public health microbiology: Methods and protocols. Spencer J. F. T., Ragout de Spencer A. L. (eds.). Totowa, Humana Press Inc.: 281-288
- Gonzalez J. M. 1995. A general purpose program for obtaining most probable tables. Journal of Microbiological Methods, 26: 215-218
- Gubina M. 2002. Rod *Bacillus*. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 229-232
- IFT Expert report panelists. 2006. Antimicrobial resistance: Implications for the food system. An expert report. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 5: 71-137
- IVEC. 2008a. Varnostni list. Apesin dezinfekcijski spray. Maribor, IVEC d.o.o.: 5 str.
- IVEC. 2008b. Varnostni list. Apesin Rapid. Maribor, IVEC d.o.o.: 5 str.
- Iversen B. G., Brantsæter A. B., Aavitsland P. 2008. Nationwide study of invasive *Pseudomonas aeruginosa* infection in Norway: Importance of underlying disease. Journal of Infection, 57: 139-146
- Konieczny K. 1998. Disinfection of surface and ground waters with polymeric ultrafiltration membranes. Desalination, 119: 251-258
- Kopkins C.C. 1999. Pharmacy service. V: Hospital epidemiology and infection control. 2<sup>nd</sup> ed. Mayhall C.G. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1035-1042
- Krka d.d. 2007. Apesin dezinfekcijski sprej Varnostni list v skladu z direktivo 2001/58/ES. Novo mesto, Krka d.d. Novo mesto: 7 str.
- Krka d.d. 2008. P3-Oxonia Active 150 Varnostni list v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006. Novo mesto, Krka d.d. Novo mesto: 9 str.

- Kuhar A. 2006. Mikrobiološka kontrola v farmacevtski proizvodnji. Interno učno gradivo. Novo mesto, Krka d.d. Novo mesto, Služba za laboratorijsko kontrolo kakovosti, Oddelek za mikrobiološko kontrolo: 14 str.
- Kuhar A., Kolenc D. 2000. Mikrobiološka kontrola čistoče. Interno učno gradivo. Novo mesto, Krka d.d. Novo mesto, Sektor za upravljanje kakovosti, Oddelek za mikrobiološko kontrolo: 8 str.
- Kunkel D. 2008. Germs that infect humans. Laval, Armand-Frappier Museum: 1 str.  
([http://www.musee-afrappier.qc.ca/en/index.php?pageid=3113b&image=3113b\\_muguet](http://www.musee-afrappier.qc.ca/en/index.php?pageid=3113b&image=3113b_muguet))  
(Apr. 2010)
- Leahy T.J., Roche K.L., Christopher M.R. 1999. Microbiology of sterilization processes. V: Validation of pharmaceutical processes. 2<sup>nd</sup> ed. Carleton F.J., Agalloco J.P. (eds.). New York, Macel Dekker, Inc: 353-380
- Lynn B. 1980. Chemical disinfectants, antiseptics and preservatives. V: Pharmaceutical microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. Hugo W.B., Russell A.D. (eds.). London, Blackwell Scientific Publications: 155-184
- Malheiros P.S., Passos C.T., Casarin L.S., Serraglio L., Tondo E.C. 2009. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry leat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. Food Control, 21: 298-301
- Mariscal A., Carnero-Varo M., Gutierrez-Bedmar M., Garcia-Rodriguez A., Fernandez-Crehuet J. 2007. A fluorescent method for assessing the antimicrobial efficiency of disinfectant against *Escherichia coli* ATCC 35218 biofilm. Applied Microbiology and Biotechnology, 77: 233-240
- Matos T. 2002. Oportunistične glive. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.) Ljubljana, Medicinski razgledi: 481-496
- Mazzola P.G., Vessoni Penna T.C., Martins A. 2003. Determination of decimal reduction time (D value) of chemical agents used in hospitals for disinfection purposes. BMC Infectious Diseases, 3: 6-7
- Mehmi M., Marshall L.J., Lambert P.A., Smith J. C. 2009. Evaluation of disinfecting procedures for aseptic transfer in hospital pharmacy departments. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 63: 123-138
- Morton. H.E. 1983. Alcohols. V: Disinfection, sterilization and preservation. 3<sup>rd</sup> ed. Block S.S. (ed.). Philadelphia, Lea & Febiger: 225-239
- Müller-Premru M. 2002. Nefermentativni po Gramu negativni bacili. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.) Ljubljana, Medicinski razgledi: 225-228

- Reybrouck G. 1998. The testing of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 269-272
- Rutala W.A. 1999. Selection and use of disinfectants in healthcare. V: *Hospital epidemiology and infection control*. 2<sup>nd</sup> ed. Mayhall C.G. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1161-1187
- Salo S., Wirtanen G. 2005. Disinfectant efficacy on foodborne spoilage yeast strains. *Food and Bioproducts Processing*, 83: 288-296
- Sandle T. 2010. Pharmaceutical microbiology: Updates to the European Pharmacopoeia for microbiology. Elstree, Pharmaceutical Microbiology Blog: 1 str.  
(<http://pharmig.blogspot.com/2010/01/updates-to-european-pharmacopoeia-for.html>) (Apr. 2010)
- Scientific Services. 2009. Efficacy tests (EN 13697), Difcil-S disinfectant. Louth, Scientific Services: 7 str.  
(<http://www.difficil-s.com/contents/efficacy7.pdf>) (Apr. 2010)
- Seme K. 2002a. Stafilokoki. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.) Ljubljana, Medicinski razgledi: 139-145
- Seme K. 2002b. Sterilizacija in razkuževanje. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.) Ljubljana, Medicinski razgledi: 417-426
- SIST EN 1040:2001. Kemična razkužila in antiseptiki - Osnovno fungicidno delovanje - Preskusna metoda in zahteve (faza 1). 2001: 31 str.
- SIST EN 1275:2001. Kemična razkužila in antiseptiki - Osnovno baktericidno delovanje - Preskusna metoda in zahteve (faza 1). 2001: 29 str.
- SIST EN 13624:2004. Kemična razkužila in antiseptiki – Kvantitativni suspenzijski preskus za ocenjevanje fungicidnega delovanja kemičnih razkužil za instrumente, ki se uporabljajo na medicinskem področju – Preskusna metoda in zahteve (faza 2, stopnja 1). 2004: 39 str.
- SIST EN 13697:2002. Kemična razkužila in antiseptiki – Kvantitativni preskus na neporoznih površinah za ocenjevanje baktericidnega in/ali fungicidnega delovanja kemičnih razkužil v živilski in drugih industrijah, gospodinjstvu in javnih ustanovah – Preskusna metoda in zahteve brez mehanskega delovanja (faza 2/stopnja 2). 2002: 4-6
- SIST EN 13727:2004. Kemična razkužila in antiseptiki – Kvantitativni suspenzijski preskus za ocenjevanje baktericidnega delovanja kemičnih razkužil za instrumente, ki se uporabljajo na medicinskem področju – Preskusna metoda in zahteve (faza 2, stopnja 1). 2004: 36 str.



- SIST EN 14561:2006. Kemična razkužila in antiseptiki – Kvantitativni preskus s steklenim nosilcem za vrednotenje baktericidnega delovanja kemičnih razkužil in antiseptikov za instrumente, ki se uporabljajo v medicini – Preskusna metoda in zahteve (faza 2, stopnja 2). 2006: 37 str.
- SIST EN 14562:2006. Kemična razkužila in antiseptiki – Kvantitativni preskus s steklenim nosilcem za vrednotenje fungicidnega delovanja kemičnih razkužil in antiseptikov na kvasovke za instrumente, ki se uporabljajo v medicini – Preskusna metoda in zahteve (faza 2, stopnja 2). 2006: 40 str.
- SIST EN 14347:2005. Kemična razkužila in antiseptiki - Osnovno sporocidno delovanje- Preskusna metoda in zahteve (faza 1, stopnja 1). 2005: 37 str.
- Smith A. C., Hussey M A. 2005. Gram Stain: Gram – Positive Rods. Maryland, University of Maryland: 1 str.  
(<http://www.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=1989>) (Apr. 2010)
- Smole Možina S. 2003. Metode mikrobiološke preiskave živil. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87-113
- Stetzenbach L., Buttner M., Cruz P. 2004. Detection and numeration of airborne biocontaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 170-174
- Stratton IV C.W., Greene J.N. 1999. Role of the microbiology laboratory in hospital epidemiology and infection control. V: Hospital epidemiology and infection control. 2<sup>nd</sup> ed. Mayhall C.G. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1423-1436
- Todar K. 2008a. Textbook of bacteriology: Control of microbial growth. Madison, University of Wisconsin: 6 str.  
([http://www.textbookofbacteriology.net/control\\_2.html](http://www.textbookofbacteriology.net/control_2.html)) (Okt. 2009)
- Todar K. 2008b. Textbook of bacteriology: *Staphylococcus aureus* and staphylococcal disease. Madison, University of Wisconsin: 6 str.  
(<http://textbookofbacteriology.net/staph.html>) (Nov. 2009)
- Williams R., Blowers R., Garrod L., Shooter R. 1966. Staphylococcal infections: Introduction. V: Hospital infection causes and prevention. 2<sup>nd</sup> ed. Williams R.E.O. (ed.). London, Lloyd-Luke (Medical books): 22-41
- Zorman T., Jeršek B. 2008. Assessment of bioaerosol concentrations in different indoor environments. *Indoor Built Environment*, 17, 2: 155-163
- ZZV Maribor. 1995. Preiskava Apesin Rapid - hitro učinkovitega dezinfekcijskega sredstva. Maribor, ZZV- Zavod za zdravstveno varstvo Maribor: 7 str.

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorju somentorici doc. dr. Barbari Jeršek in mentorju doc. dr. Hrvoju Petkoviću, ki sta mi nudila vso pomoč pri sestavi in poteku dela, ter pripravi in pregledu besedila.

Prof. dr. Sonji Smole Možina se zahvaljujem za strokoven in natančen pregled diplomske naloge v vlogi recenzentke.

Iskrena hvala tudi ge. Andreji Kuhar za omogočeno delo v laboratorijih oddelka za mikrobiološko kontrolo v Krki d.d., Novo mesto ter ge. Heleni Kotnik in ge. Romani Zorko za pomoč pri delu, za vse koristne napotke in nasvete. Zahvala gre tudi vsem ostalim zaposlenim na oddelku za mikrobiološko kontrolo v Krki d.d. za razumevanje in pomoč.

Iskrena hvala tudi moji družini, Maticu in prijateljem, ki so mi vedno stali ob strani.

## PRILOGE

### Priloga A: Validacija standardne metode SIST EN 1040:2001 in negativne kontrole pri določitvi baktericidnega delovanja razkužil Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej

Priloga A 1: Koncentracije bakterij v suspenziji za validacijo membranske filtracije ( $N_{vb}$ ), za kontrolo filtracije ( $N_{xb}$ ) in po kontroli filtracijskega testa ( $N_{yb}$ )

Parametri validacije membranske filtracije	Koncentracija bakterij (cfu/ml)			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>S. epidermidis</i>
$N_{vb}$	$1,8 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$> 3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$
$N_{xb}$	$> 3 \times 10^4$	$3,9 \times 10^3$	$> 3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$
$N_{yb}$	$> 3 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$	$> 3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$

Priloga A 2: Koncentracija bakterij v raztopinah za negativne kontrole pri določanju baktericidnega delovanja razkužil Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej

Negativne kontrole	Koncentracija bakterij (cfu/ml)
Sterilna voda	$< 10$
Peptonska raztopina	$< 10$
Fiziološka raztopina	$< 10$

## Priloga B: Validacija standardne metode SIST EN 1275:2001 in negativne kontrole pri določitvi fungicidnega delovanja razkužil Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej

Priloga B 1: Koncentracije kvasovk in plesni v suspenziji za validacijo ( $N_{Vf}$ ), za kontrolo filtracije ( $N_{Xf}$ ) ter po kontroli filtracijskega testa ( $N_{Yf}$ )

Parametri validacije membranske filtracije	Koncentracija kvasovk oz. plesni (cfu/ml)	
	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
$N_{Vf}$	$5,8 \times 10^3$	$9 \times 10^3$
$N_{Xf}$	$2,6 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$
$N_{Yf}$	$4,6 \times 10^3$	$5,4 \times 10^3$

Priloga B 2: Koncentracija kvasovk in plesni v raztopinah za negativne kontrole pri določanju fungicidnega delovanja razkužil Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej

Negativne kontrole	Koncentracija kvasovk oz. plesni (cfu/ml)
Sterilna voda	< 10
Peptonska raztopina	< 10
Fiziološka raztopina z dodatkom 0,5 % v/v Tween 80	< 10

### Priloga C: Validacija standardne metode SIST EN 12347:2001 in negativne kontrole pri določitvi sporocidnega delovanja razkužil Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej

Priloga C 1: Koncentracije spor v suspenziji za validacijo ( $N_{Vs}$ ), po testu kontrole nevtralizatorja (B) in po validaciji metode (C)

Parametri validacije razredčevalno-nevtralizacijske metode				<i>B. subtilis</i>	
Koncentracija spor v suspenziji za validacijo ( $N_{Vs}$ ) (cfu/ml)				$2,3 \times 10^4$	
Koncentracija spor po testu kontrole nevtralizatorja (B) (cfu/ml)				$> 3 \times 10^5$	
Koncentracija spor po validaciji metode (C) (cfu/ml)	Gojišče	Razkužilo	Koncentracija razkužila (%)		
	Tekoče gojišče SCD z nevtralizatorjem	Apesin Rapid	1 %	$> 2,1 \times 10^3$	
			0,5 %	$7,9 \times 10^3$	
			0,25%	$1,5 \times 10^3$	
		Apesin dez. sprej	Nerazredčeno	$2,0 \times 10^2$	
			Apesin Rapid	1 %	$9,5 \times 10^1$
				0,5 %	$7,5 \times 10^1$
0,25%	$1,9 \times 10^2$				
Apesin dez. sprej	Nerazredčeno	$1,7 \times 10^2$			

Priloga C 2: Koncentracija spor v raztopinah za negativne kontrole pri določanju sporocidnega delovanja razkužil Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej

Negativne kontrole	Št. kvasovk oz. plesni (cfu/ml)
Sterilna voda	< 10
Fiziološka raztopina	< 10

### Priloga D: Pozitivne in negativne kontrole pri določanju učinkovitosti razkužil po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla in po razkuževanju z razkužili Apesin Rapid in Apesin dezinfekcijski sprej

Priloga D 1: Koncentracija bakterij na plošči pri pozitivni in negativni kontroli pri določanju učinkovitosti razkužil po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla

Vrsta bakterij	Število bakterij (cfu/ml)			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>S. epidermidis</i>
<b>Pozitivna kontrola</b>	$3,4 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$	$> 3 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$
<b>Negativna kontrola</b>	$< 10$	$< 10$	$< 10$	$< 10$

Priloga D 2: Koncentracija kvasovk in plesni na plošči pri pozitivni in negativni kontroli pri določanju učinkovitosti razkužil po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla

Vrsta gliv	Število kvasovk in plesni (cfu/ml)	
	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
<b>Pozitivna kontrola</b>	$3 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$
<b>Negativna kontrola</b>	$< 10$	$< 10$

Priloga D 3: Koncentracija plesni na plošči pri pozitivni in negativni kontroli pri določanju učinkovitosti razkužila P3-Oxonia Active po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla

	Število <i>A. brasiliensis</i> (cfu/ml)
<b>Pozitivna kontrola</b>	$5,2 \times 10^2$
<b>Negativna kontrola</b>	$< 10$

Priloga D 4: Koncentracija bakterij, zraslih iz spor na plošči pri pozitivni in negativni kontroli pri določanju učinkovitosti razkužil po umetni kontaminaciji plošč iz nerjavečega jekla

	Število <i>B. subtilis</i> (cfu/ml)
<b>Pozitivna kontrola</b>	$5,1 \times 10^2$
<b>Negativna kontrola</b>	$< 10$

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška RIBIČ

**UČINKOVITOST RAZKUŽIL NA DELOVNIH  
POVRŠINAH**

**DIPLOMSKO DELO**

**Univerzitetni študij**

**Ljubljana, 2010**