

Ocjena stupnja bakterijske kolonizacije na površinama premazanim preparatom easy-on™.

Izvješće o projektu za:

Urban Hygiene Limited
Sky Business Park
Robin Hood Airport
Doncaster
England
DN9 3GA

Pripremili:

Dr. Jamie Young i Dr. Justine Daniels Biomedical Research Centre

Autori:

Dr. Jamie Young
komercijalni istraživač
BMRC
Sheffield Hallam University
7th Floor Norfolk Building
Sheffield
S1 1WB

lipanj 2006.

Odlomak A: Kolonizacija na premazanim površinama

Odlomak B: Preživljavanje bakterija na očišćenim površinama

Odlomak C: Ukupni sažetak

Odlomak A: Kolonizacija na premazanim površinama

Sažetak

Pločice od 20 mm premazane trajnim premazom easy-on™ testirane su na otpornost na bakterijsku kolonizaciju kroz razdoblje od 5 dana. Rast sedam patogenih bakterijskih vrsta praćen je tijekom vremena, s time da su bakterije dodavane na pločice u obje hranjive podloge, kao i u jednostavnu slanu pufer otopinu. Pokazalo se da pločice premazane proizvodom easy-on™ sprječavaju kolonizaciju i rast bakterija *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subs. *enterica* i *Pseudomonas aeruginosa* nakon razdoblja od tri dana. Značajno je smanjeno i preživljavanje bakterije *Klebsiella pneumoniae*.

Materijali i metode

Bakterijske vrste

Vrsta	Kultura američkog tipa (ATCC) identifikacijski broj	Opis	Podloga
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC 12600	Gram-pozitivna, česti organizam kože	Hranjivi bujon
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	Gram-pozitivna, uobičajeni organizam u crijevima, neki su sojevi patogeni	Hranjivi bujon
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	Gram-pozitivna, 10% ljudskog stanovništva su nositelji, kod nekih pacijenata može uzrokovati ozbiljne infekcije	BHI bujon
<i>Salmonella enterica</i> subs <i>enterica</i>	ATCC 43971	Gram-pozitivna, čest uzrok trovanja hranom salmonelom	CASO bujon
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	Gram-pozitivna, krivac za trovanje hranom. Stvara spore koje su otporne na toplinu i na neke dezinficijense	Hranjivi bujon
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	ATCC 13883	Gram-pozitivna, čest uzročnik bolničke upale pluća	Hranjivi bujon
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	Gram-pozitivna, četvrti po redu uzročnik bolničkih infekcija. Zahtijeva vrlo jednostavne hranjive podloge te vrlo lako kolonizira površine	Hranjivi bujon

Sve korištene bakterijske vrste dostavila je u obliku vakuumski osušenih kultura tvrtka DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Baunschweig, Njemačka).

Podloge

Hranjivi agar/bujon, Caso agar/bujon i BHI agar/bujon dostavila je tvrtka Sigma-Aldrich (UK)

Hranjivi bujon/Agar

Pepton 5,0 g

Mesni ekstrakt 3,0 g

Agar, po potrebi 15,0 g

Destilirana voda 1000,0 g

Prilagoditi pH na 7,0

Caso bujon/Agar

Pepton iz kazeina 15,0 g

Pepton iz sojine kaše 5,0 g

NaCl 5,0 g

Agar, po potrebi 15,0 g

Destilirana voda 1000,0 ml

Prilagoditi pH na 7.3

BHI bujon Agar

BHI 37,0 g
Agar, po potrebi 15,0 g
Destilirana voda 1000,0 ml

Puferi i otopine

Ringerova $\frac{1}{4}$ otopina
Natrijev klorid 2,25 g/l
Kalijev klorid 0,105 g/l
Kalcijev klorid $6H_2O$ 0,12 g/l
Natrijev bikarbonat
Destilirana voda do 1000,00 ml
pH 7,0

Sve kemikalije i reagensi korišteni u ovom pokusu dostavila je tvrtka Sigma-Aldrich (UK) osim ako nije drugačije navedeno.

Metode

Sterilizacija premazanih pločica

Pločice od 22 mm premazane preparatom easy-on™ stavljene su u 90% etanol tijekom 30 min. Nakon sterilizacije, pločice su osušene na zraku u sterilnom laminaru.

Rast bakterijskih kultura

Osušene kulture su resuspendirane tijekom 30 min u odgovarajućoj podlozi, te spremljene u tikvice s 250 ml hranjivog bujona, Caso bujona ili BHI bujona. Tikvice su inkubirane preko noći na 37°C. Nakon inkubacije, kulture su centrifugirane te je podloga odstranjena. Stanice su tada resuspendirane u $\frac{1}{4}$ Ringerove otopine i ponovno centrifugirane. Otklonjen je supernatant i stanice su suspendirane u podlozi kulture ili Ringerovoj otopini kako bi se dobila radna koncentracija od 107 stanica/ml. Broj stanica određen je pomoću komorice za brojanje stanica (hemocitometra) i svjetlosne mikroskopije.

Dodavanje bakterija na pločice

200 μ l opranih i resuspendiranih stanica dodano je na svaku premazanu pločicu. Kao negativna kontrola, 200 μ l sterilne hranjive podloge odnosno sterilne Ringerove otopine dodano je na posebne pločice. Jedan je skup pločica korišten i bez dodavanja bakterijskih stanica ili podloge/Ringerove otopine. Pločice su onda položene u sterilne petrijeve zdjelice i inkubirane na 22°C.

Uzorkovanje premazanih pločica

Pločice su uzorkovane 0., 1., 3. i 5. dana od početnog dodatka bakterijskih kultura. Svaka je pločica položena u sterilnu univerzalnu epruvetu s dodatkom 5 ml Ringerove otopine. Epruvete su protresene tijekom 10 min u Griffinovoj tresilici kako bi se s premazane površine odstranile bakterije. Napravljena je serija razrjeđivanja u Ringerovoj otopini. Nakon toga, 200 μ l otopine razrijeđene na 10³, 10⁴ i 10⁵ razmazano je na odgovarajuću agar pliticu. Plitice su preko noći položene u inkubator na 37°C, a stanice su izbrojane sljedećega jutra. Svaki pokus je proveden na trostrukim pločicama radi mogućnosti reprodukcije.

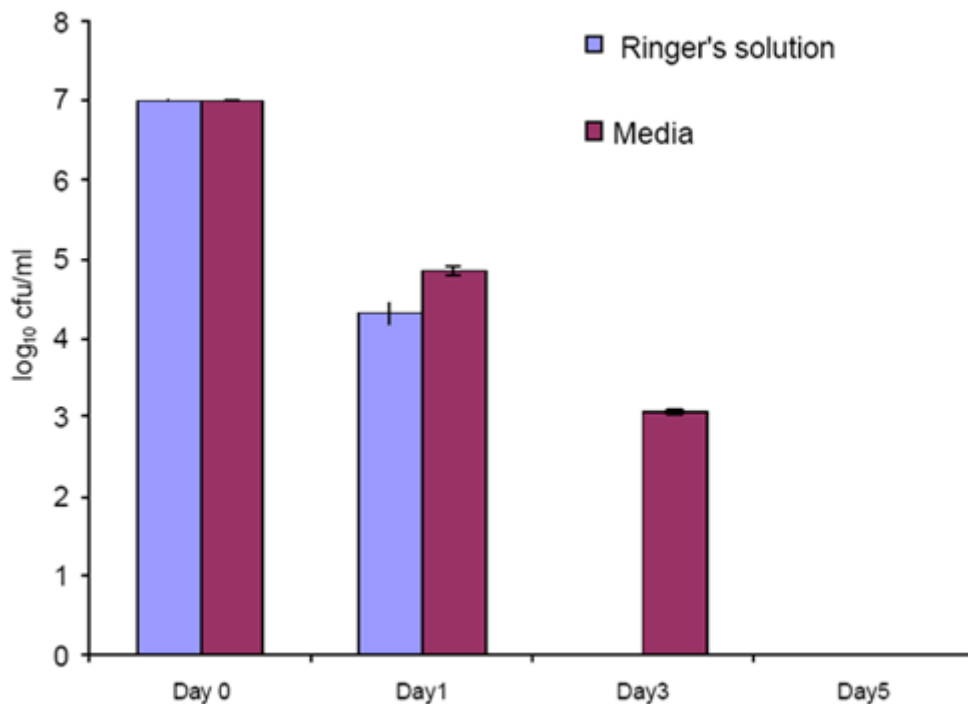
Analiza

Uzeta je aritmetička sredina svakog ponovljenog skupa te je izračunato standardno odstupanje.

Rezultati

Staphylococcus aureus

Kod bakterija koje su bile suspendirane u Ringerovoj otopini primijećen je potpuni gubitak stanica iz kulture 3. dana, a 5. dana kod bakterija suspendiranim u hranjivoj podlozi. Gubitak bakterijskih stanica prilično je brz, s padom od 10⁷ cfu/ml do 2x10⁴ cfu/ml u Ringerovoj otopini i 7x10⁴ cfu/ml u hranjivoj podlozi do 1. dana (Slika 1)



Slika 1. Koncentracija stanica bakterije *Staphylococcus aureus* dodanih na premazane pločice tijekom vremena. Stupci pogrešaka ukazuju na standardno odstupanje

Zaključci

Premaz easy-on™ sprječava kolonizaciju *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subs *enterica* i *Pseudomonas aeruginosa* nakon razdoblja od 3 dana na tretiranim površinama.

Premaz easy-on™ značajno smanjuje preživljavanje *Klebsiella pneumoniae* u puferiranoj otopini kada bude dodan na tretiranu površinu

Premaz easy-on™ ne inhibira kolonizaciju *E. coli* ili *Bacillus cereus*. Međutim, primjećuje se smanjenje broja stanica.

Kada se primijeti gubitak broja stanica, obično je on veći kod stanica koje su resuspendirane u jednostavnoj slanoj pufer otopini.

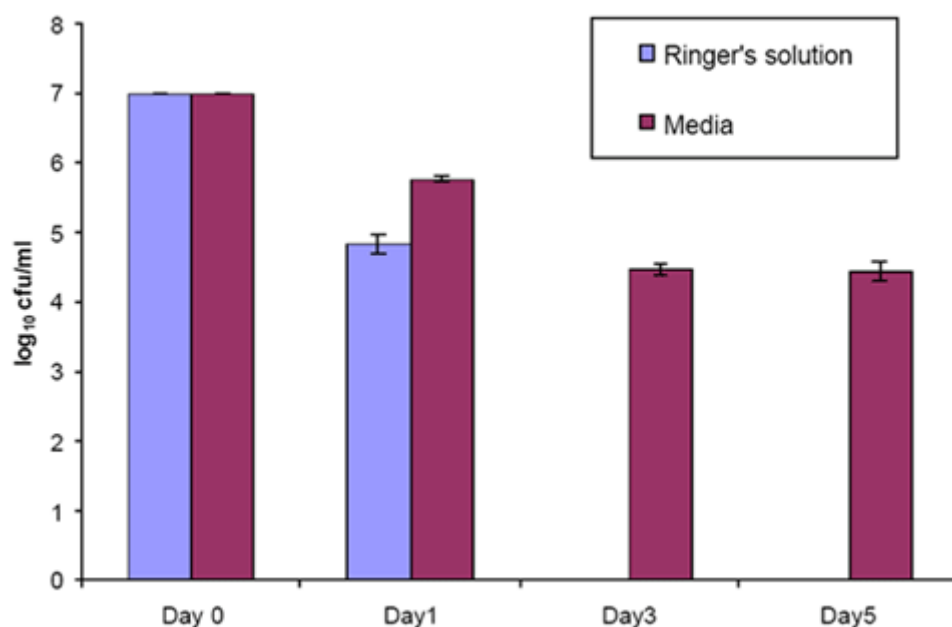
Odlomak B: Preživljavanje bakterija na površinama premazanim trajnim preparatom easy-on™ nakon primjene dezinficijensa Presept (Dikloroizocijanurat)

Sažetak

Drvene dašćice premazane su vinilskom emulzijskom bojom, akrilnom bojom ili trajnim premazom easy-on™. Dodane su kulture bakterija, a nakon toga površine su očišćene pomoću 1000 ppm otopine proizvoda Presept (Johnson & Johnson, US). Nakon čišćenja, dašćice su inkubirane na agar plitici tijekom 1 i 3 dana. Rezultati su pokazali da se sa dašćica premazanim proizvodom easy-on™, bakterije mogu odstraniti jednostavnim postupkom čišćenja. Na dašćicama premazanim emulzijskom i akrilnom bojom bakterije su preživjele i nakon čišćenja.

Klebsiella pneumoniae

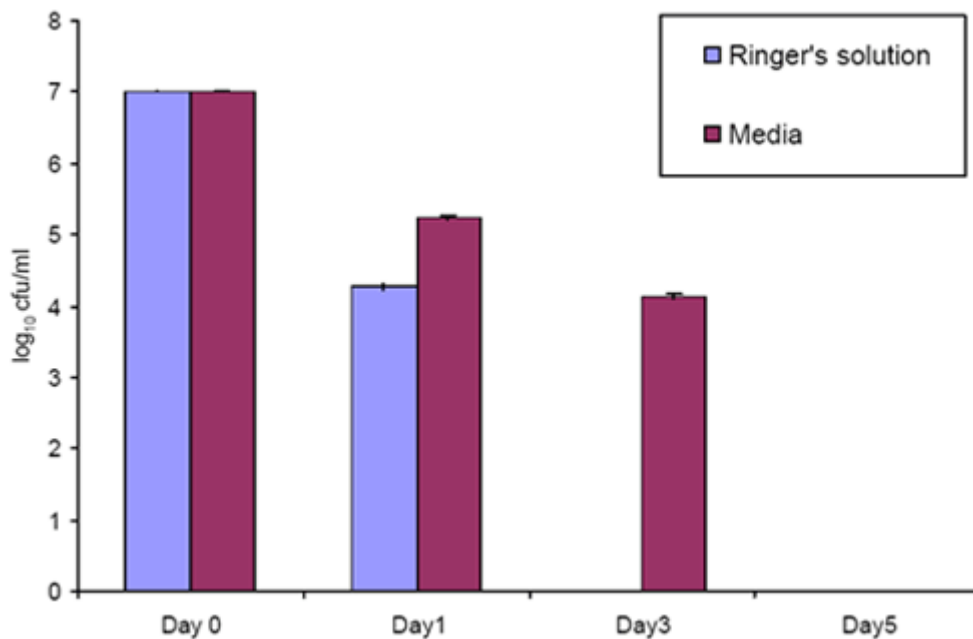
Primijećen je potpuni gubitak broja stanica kada su bakterije resuspendirane u Ringerovoj otopini; međutim, broj stanica je samo pao na razinu od $2,7 \times 10^4$ cfu/ml 5. dana kada su bakterije resuspendirane u mediju (Slika 6)



Slika 6. Koncentracija stanica *Klebsiella pneumoniae* dodanih na premazane pločice tijekom vremena. Stupci pogrešaka ukazuju na standardno odstupanje.

Pseudomonas aeruginosa

Kod stanica koje su suspendirane u Ringerovoj otopini primijećen je potpuni gubitak održivih stanica 3. dana, a do 5. dana kod stanica suspendiranih u podlozi. Do polaganijeg pada broja stanica došlo je kod bakterija u podlozi, u usporedbi s bakterijama u Ringerovoj otopini (Slika 7).



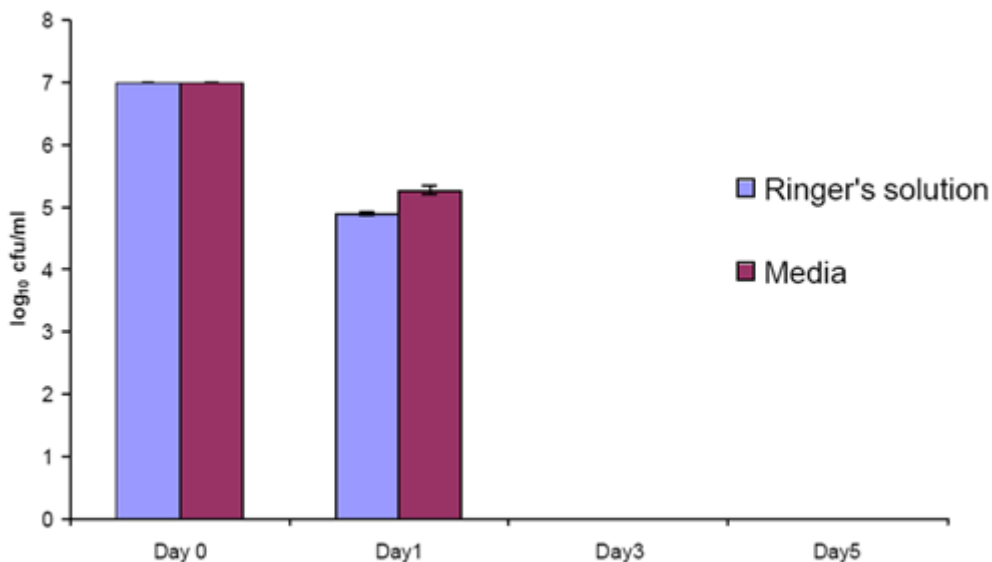
Slika 7. Koncentracija stanica *Pseudomonas aeruginosa* dodanih na premazane pločice tijekom vremena. Stupci pogrešaka ukazuju na standardno odstupanje.

Negativne kontrole

Nikakav rast bakterija nije primijećen u bilo kojoj negativnoj kontroli koja je korištena u ovome pokusu.

Salmonella enterica subsp. enterica

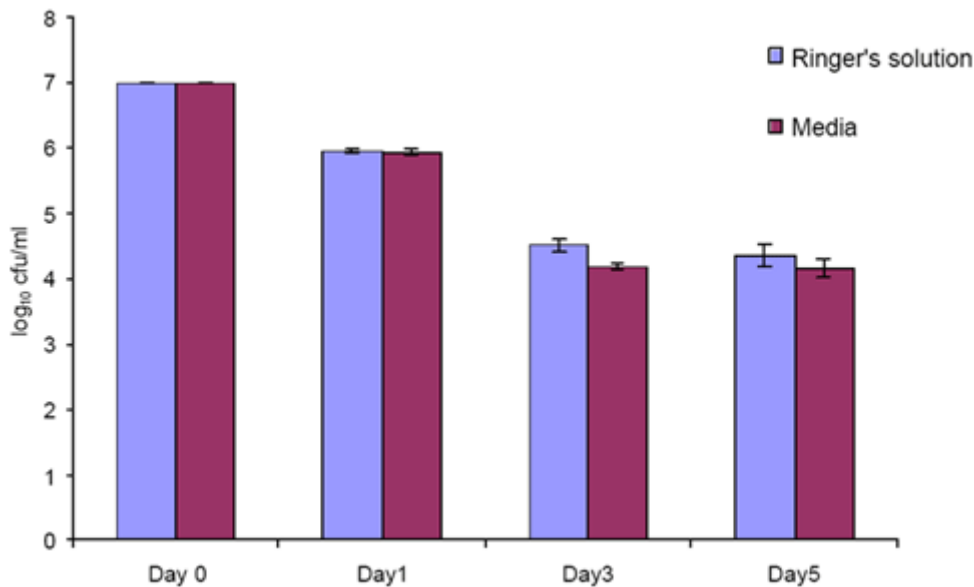
Primijećen je potpuni gubitak bakterijskih stanica do 3. dana u obje stanične suspenzije. Primijećen je brži gubitak broja stanica kada su bakterije resuspendirane u Ringerovoj otopini, u usporedbi hranjivom podlogom, s obzirom da su brojevi stanica pali na 7.6×10^4 cfu/ml, odnosno na $1,8 \times 10^5$ cfu/ml do 1. dana (Slika 4).



Slika 4. Koncentracija stanica *Salmonella enterica subsp. enterica* dodanih na premazane pločice tijekom vremena. Stupci pogrešaka ukazuju na standardno odstupanje.

Bacillus cereus

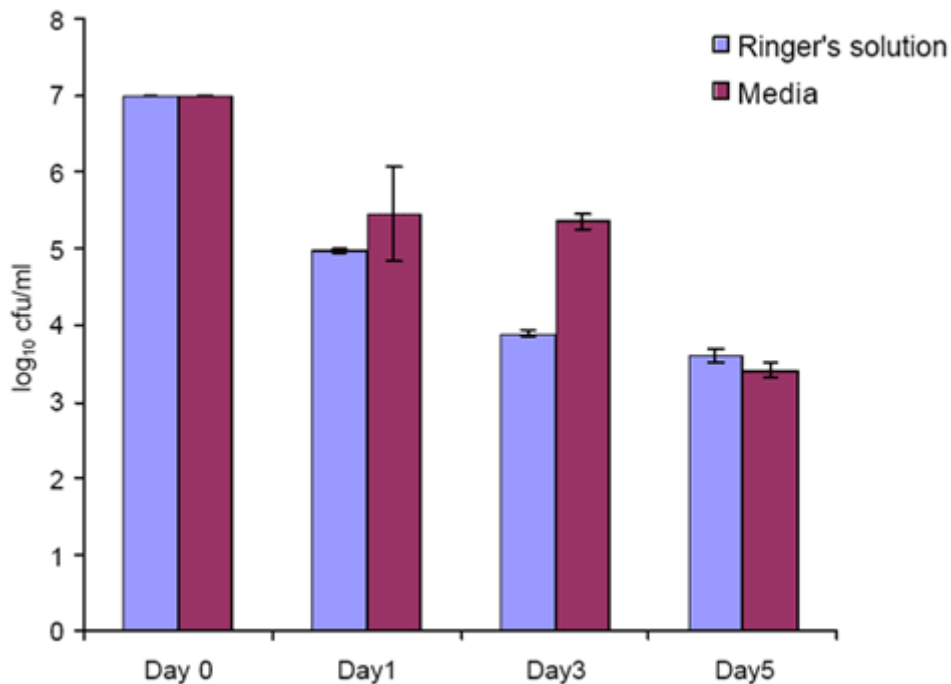
Bakterijske stanice su u visokom omjeru još uvijek bile održive u Ringerovoj otopini kao i u hranjivoj podlozi. Broj stanica je opao, ali je primijećeno da je postigao stabilnu razinu od $3,1 \times 10^4$ cfu/ml u Ringerovoj otopini i $1,2 \times 10^4$ cfu/ml u hranjivoj podlozi do 3. dana. Nije bilo značajne razlike između koncentracije stanica u Ringerovoj otopini i podlozi do 5. dana. (Slika 5)



Slika 5. Koncentracija stanica *Bacillus cereus* dodanih na premazane pločice tijekom vremena. Stupci pogrešaka ukazuju na standardno odstupanje.

Escherichia coli

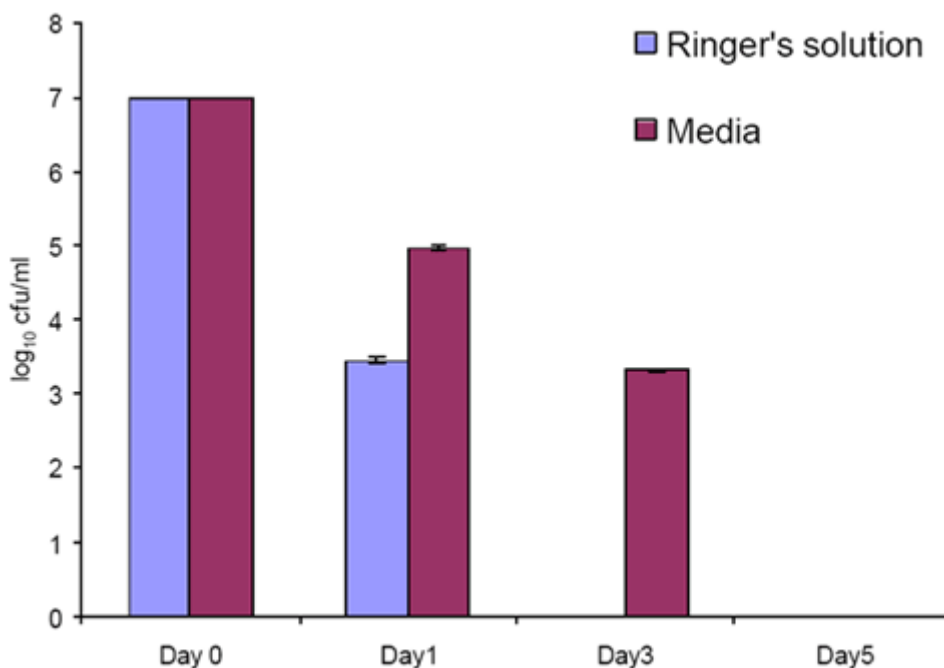
Pronađene su održive stanice *E. Coli* 5. dana. Broj stanica se doista smanjio tijekom vremena, bez značajne razlike između podloge i Ringerove otopine. Konačne koncentracije stanica bile su $3,9 \times 10^3$ cfu/ml za Ringerovu otopinu te $2,5 \times 10^3$ u podlozi. (Slika 2)



Slika 2. Koncentracija stanica *Escherichia coli* dodanih na premazane pločice tijekom vremena. Stupci pogrešaka ukazuju na standardno odstupanje.

Listeria monocytogenes

Potpuni gubitak stanica u Ringerovoj otopini primijećen je do 3. dana, a do 5. dana u podlozi. Pad broja stanica bio je mnogo brži kod bakterija suspendiranim u Ringerovoj otopini, čiji broj je pao na $2,5 \times 10^3$ cfu/ml već 1. dana. U usporedbi s brojem bakterija od $7,9 \times 10^4$ cfu/ml kod stanica suspendiranim u hranjivoj podlozi (Slika 3)



Slika 3. Koncentracija stanica *Listeria monocytogenes* dodanih na premazane pločice tijekom vremena. Stupci pogrešaka ukazuju na standardno odstupanje.

Materijali i metode

Bakterijski sojevi

U ovom je pokusu korišteno sedam bakterijskih vrsta koje su korištene i u Odjeljku A.

Priprema daščica

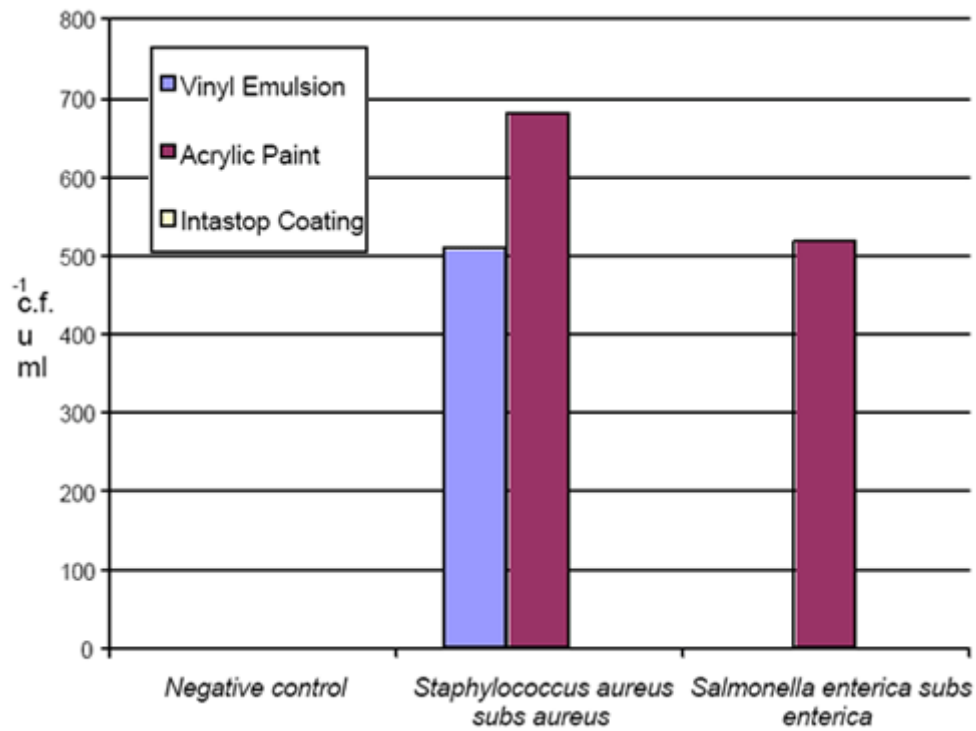
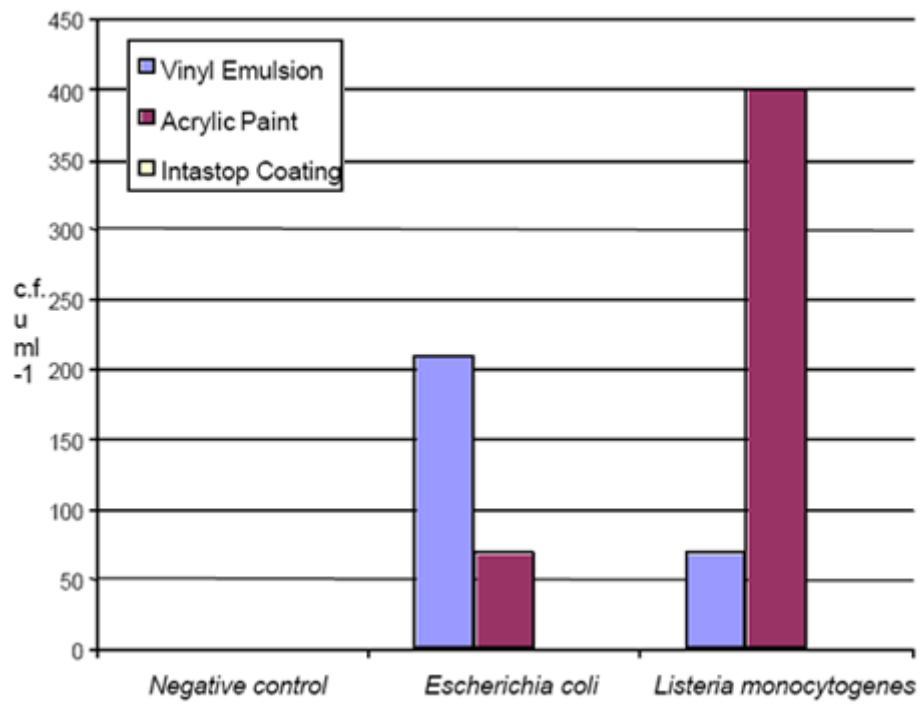
Drvene daščice su premazane vinilskom mat emulzijom, vinilskom mat emulzijom pa pokrivene premazom easy-on™, odnosno akrilnom bojom. Daščice su očišćene s 1000 ppm otopine Presept prije dodavanja bakterijskih kultura.

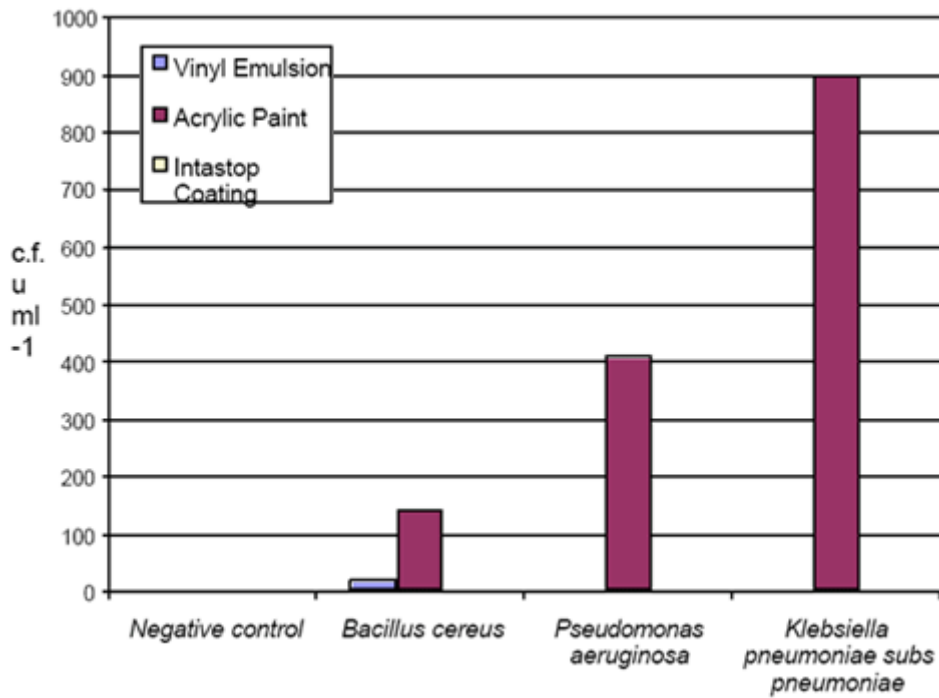
Dodavanje bakterija

Bakterijske kulture su položene u inkubator preko noći na 37°C te razblažene u podlozi kulture kako bi se dobila koncentracija bakterija od 10⁷ stanica ml⁻¹. 100µl bakterijskih kultura je tada dodano svakoj daščici te inkubirano na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije, drvene daščice su dva puta očišćene sterilnom tkaninom umočenom u 1000 ppm otopine Presept. Simulirana je općenita aktivnost čišćenja tako što su daščice u svakom koraku čišćenja prebrisane dva puta okomitim potezima. Daščice su tada okrenute prema dolje postavljene na hranjive agar plitice tijekom 30 minuta kako bi se bakterije preselile na agar podlogu. Daščice su tada maknute, a plitice inkubirane na 37°C preko noći. Prebrojane su kolonije bakterija. Postupak je onda ponovljen s bakterijama inkubiranim na daščicama tijekom 3 dana prije čišćenja.

Rezultati

Pokazalo se da na daščicama premazanima preparatom easy-on™ te naknadno očišćenima otopinom Presept bakterijske vrste nisu preživjele nakon 30 minuta i tri dana inkubacije. Nakon 30 minuta inkubacije te postupka čišćenja, bakterije *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Staph. aureus* i *B. cereus* su sve preživjele na obje očišćene akrilnom bojom i emulzijom premazane daščice (Slika 1). *Salm. enterica*, *K. pneumoniae* i *Ps. aeruginosa* su preživjele samo na površinama premazanima akrilnom bojom. Rezultati nakon 3 dana inkubacije bili su identični, s jednakim uzorkom preživljavanja.





Slika 1. Preživljavanje bakterijskih vrsta na daščicama s različito premazanim površinama, nakon 30 minuta inkubacije te čišćenja.

Zaključci

Nakon osnovnog postupka čišćenja, sve su bakterije odstranjene sa površina premazanih preparatom easy-on™.

Površine premazane akrilnom bojom i testirane nakon čišćenja omogućile su preživljavanje svih sedam vrsta bakterija.

Površine premazane emulzijskom bojom omogućile su preživljavanje bakterija *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes*.

Odlomak C

Ukupni sažetak

Premaz easy-on™ sprječava kolonizaciju nekoliko patogenih bakterijskih vrsta, uključujući *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* i *Pseudomonas aeruginosa* na tretiranim površinama

površine premazane preparatom easy-on™ lakše je čistiti nego nezaštićene površine premazane jednostavnim bojom

trajni premaz omogućuje dekontaminaciju površina korištenjem jednostavnih otopina za čišćenje bez oštećivanja površine

površine premazane preparatom easy-on™ te kontaminirane bakterijama mogu se temeljito očistiti jednostavnim otopinom uz omjer odstranjivanja bakterija od 100%

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia* i *Pseudomonas aeruginosa* su potpuno odstranjene sa premazanih površina nakon čišćenja. Za razliku od površina premazanih jednostavnim bojom na kojima su bakterije ostale na površini i nakon čišćenja.