

Testování antibakteriální aktivity fotokatalytických a fotoaktivních povrchů moderními metodami

P. Dzik, M. Králová, M. Veselá, **M. Veselý**

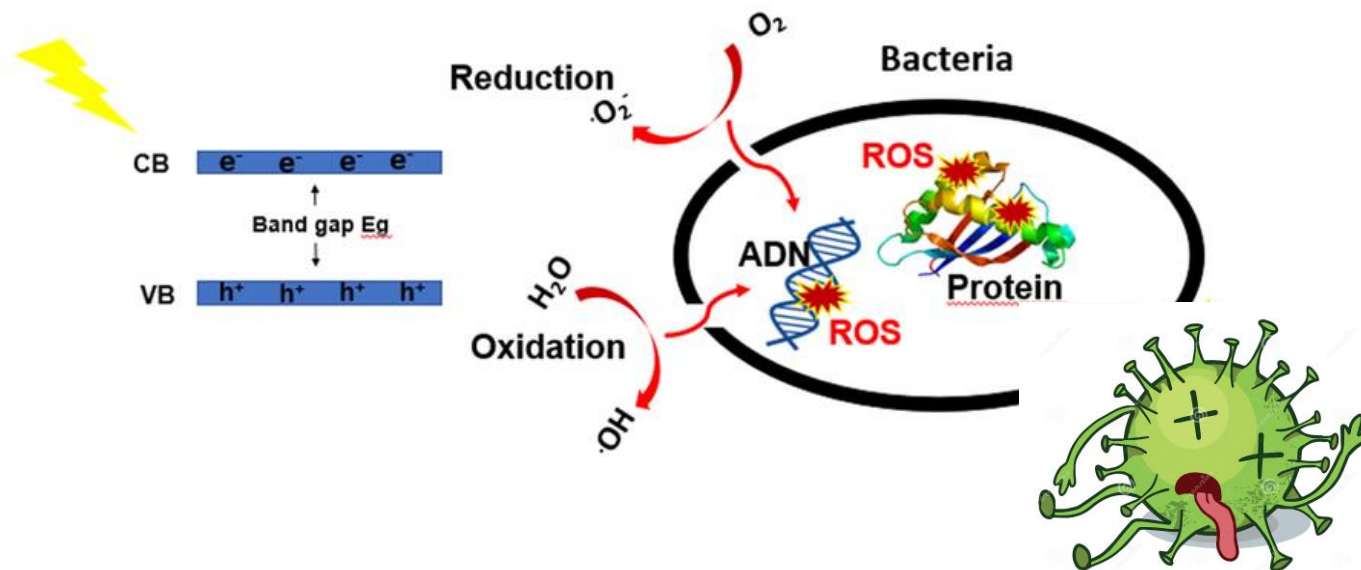
M. Baudys, H. Bartková, J. Viktorová, J. Krýsa



Povrchy s biocidním/antimikrobiálním účinkem

Základní principy

- Uplatňované principy:
 - fotokatalytický – oxidické polovodiče
 - fotochemické – ftalocyaniny, violacein ...
- Aktivní činidla – ROS:
 - $O_2^{\cdot-}$
 - OH^{\cdot}

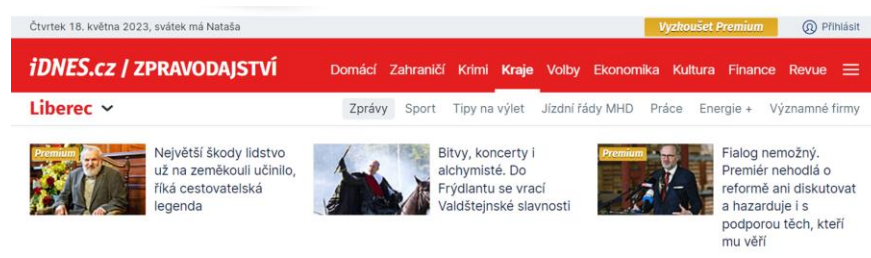


Povrchy s biocidním/antimikrobiálním účinkem COVID

- Mnoho komerčních výrobků deklaruje samočisticí a/nebo samodezinfekční aktivitu.
- Ještě více se jich objevilo s panikou COVID...



- Vystávající otázky... jak jsou tyto produkty účinné?
- Můžeme je otestovat v místě, kde jsou instalovány?
- Můžeme je otestovat po nějaké době používání?



V Liberci nastříkali tramvaje nanočásticemi. Ochrání řidiče před nemocemi

7. února 2016 13:00



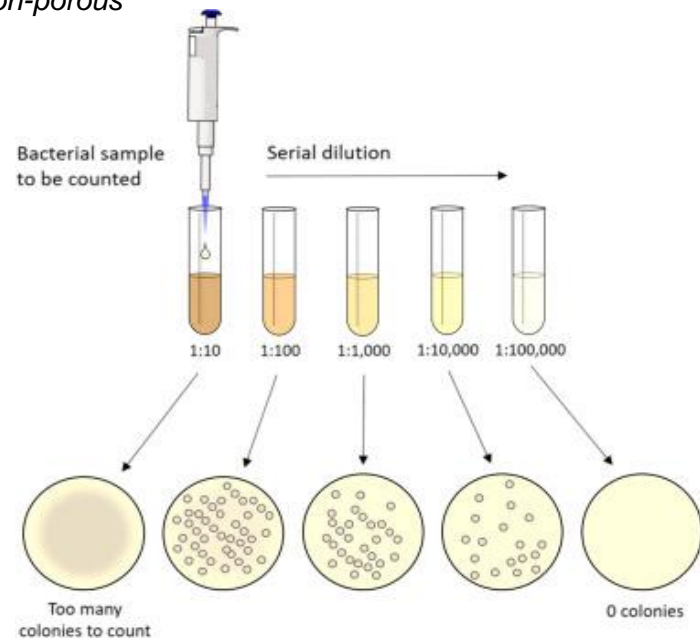
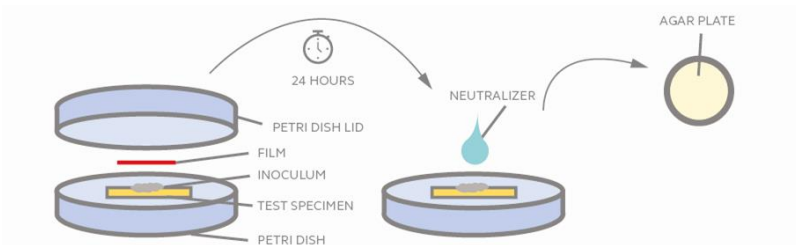
Liberecký dopravní podnik testuje na svých tramvajích speciální látku Nanosterile na bázi nanočástic. Podle výrobce vytvoří látka na povrchu ochranný film a dokáže zničit většinu bakterií nebo virů. Odstraňuje také pachy. Podnik zatím ošetřil jen kabiny řidičů.

Nanočástice TiO_2 ochrání řidiče před COVIDem?

Povrchy s biocidními/antimikrobiálními účinky

Metodika hodnocení

- Normované postupy
 - ISO 27447:2019: *Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials*
 - ISO 22196:2011: *Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces*
- Obecné postupy:
 - Depozice definované mikrobiální populace
 - Inertní krytí zabraňující vysychání
 - Zpětné sejmutí populace (oplachem, tzv. “recovery”)
 - Sériové ředění... očkování... inkubace... počítání kolonií



Povrchy s biocidním/antimikrobiálním účinkem

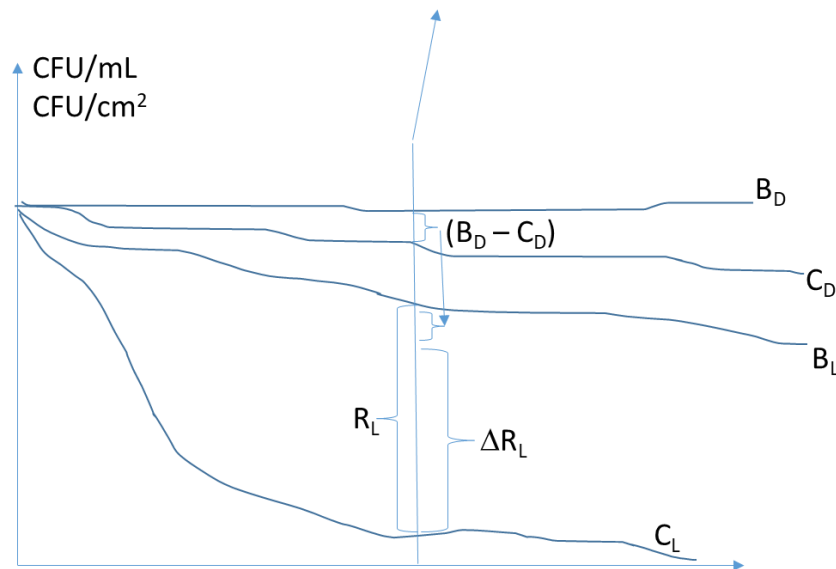
Metodika hodnocení

Obě normy sdílí společný přístup:

- Testování 4 různých vzorků:
 - C_D – aktivní (katalytický) povrch ve tmě
 - C_L – ozářený aktivní povrch
 - B_D – kontrola ve tmě
 - B_L – kontrola na světle
- Výpočet redukčních hodnot
 - R_L = redukce mikrobiální populace na aktivním vzorku (ozářený – neozářený povrch)
 - ΔR_L = jako v předchozím případě, ale s korekcí na tmu

$$R_L = \left[\log \left(\frac{B_L}{A} \right) - \log \left(\frac{C_L}{A} \right) \right] = \log \left(\frac{B_L}{C_L} \right)$$

$$\Delta R_L = \log \left(\frac{B_L}{C_L} \right) - \left[\log \left(\frac{B_D}{A} \right) - \log \left(\frac{C_D}{A} \right) \right] = \log \left(\frac{B_L}{C_L} \right) - \log \left(\frac{B_D}{C_D} \right)$$



Povrchy s biocidním/antimikrobiálním účinkem

Metodika hodnocení

- Nevýhody:
 - Časová a pracovní náročnost
 - Velmi nízké procento výtěžnosti (obvykle v rozmezí 20–50 %), což vede k velkým chybám
 - Velký objem plastového odpadu z jednorázového laboratorního vybavení.
 - Další velmi významnou nevýhodou je omezení testování pouze na površích velmi malých rozměrů a pouze v laboratorních podmínkách.

"Je-li nutnost matkou vynálezů, pak lenost je někdy jejich otcem."

.... Udělejme to rychleji, levněji, ale možná i lépe!

Domníváme se, že existuje prostor pro modifikovanou metodu testování.

- Rychlejší a jednodušší práce v laboratoři (*ex-situ*)
- Možnost testování *in-situ*:
 - potvrdit fotokatalytickou účinnost již instalovaného povrchu
 - sledovat její změny v čase

Povrchy s biocidním/antimikrobiálním účinkem

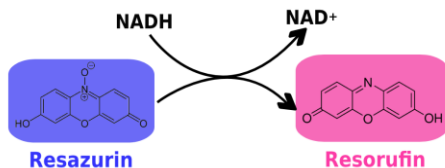
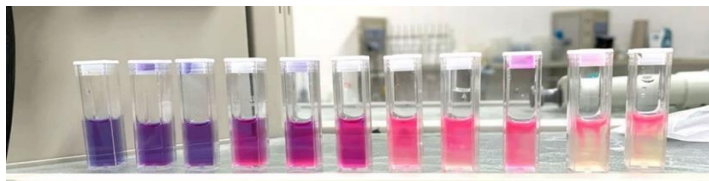
Klíčové návrhy a opatření pro zlepšení testování

- Zrychlit!
... Nahradíme postup sériového ředění a kultivace počítání barvicím postupem.
- Minimalizovat chyby zlepšením recovery testů!
... Vyhneme se zakrývání a oplachování, fixujeme testovací bakterie na bloček hydrogelu.
- Lepší kontrola nad ozařováním!
... Pořídíme si vhodnou lampu
- Ujistit se, že populace testovacích bakterií je živá a spokojená
... Před každým testem zkontrolujeme stav inokula.
... Zkontrolujeme skutečný výtěžek sejmutých bakterií z testovaného povrchu.



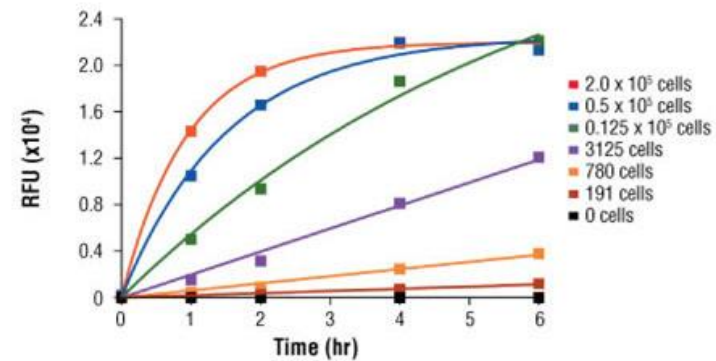
Čtyři opatření ke zlepšení testování...

1. Barvení resazurinem



Konverze resazurinu (neboli produkce resorufinu) je úměrná metabolické aktivitě:

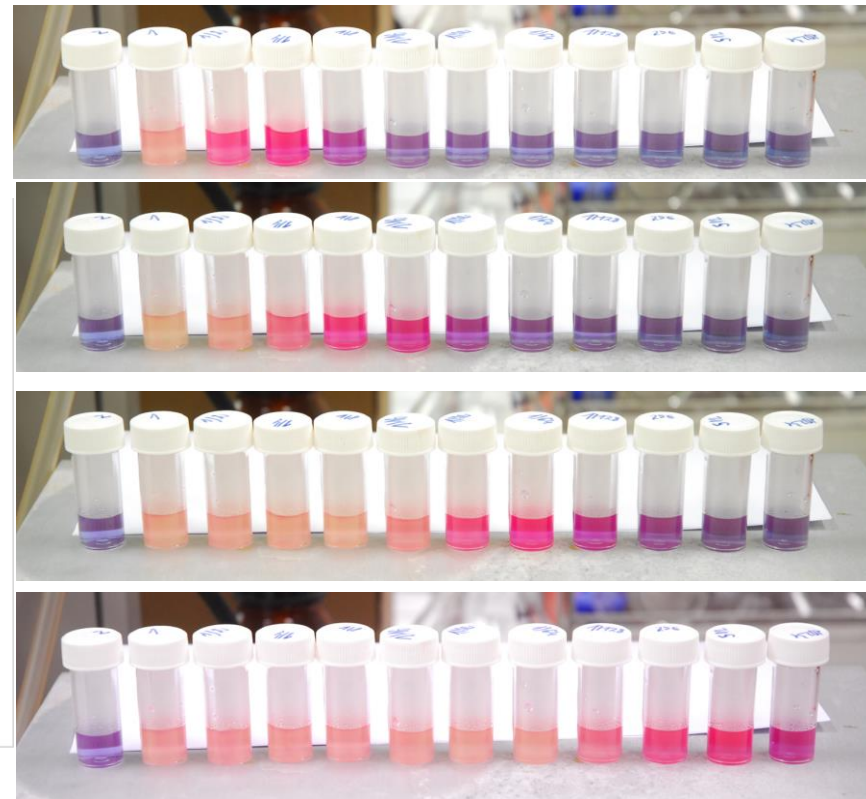
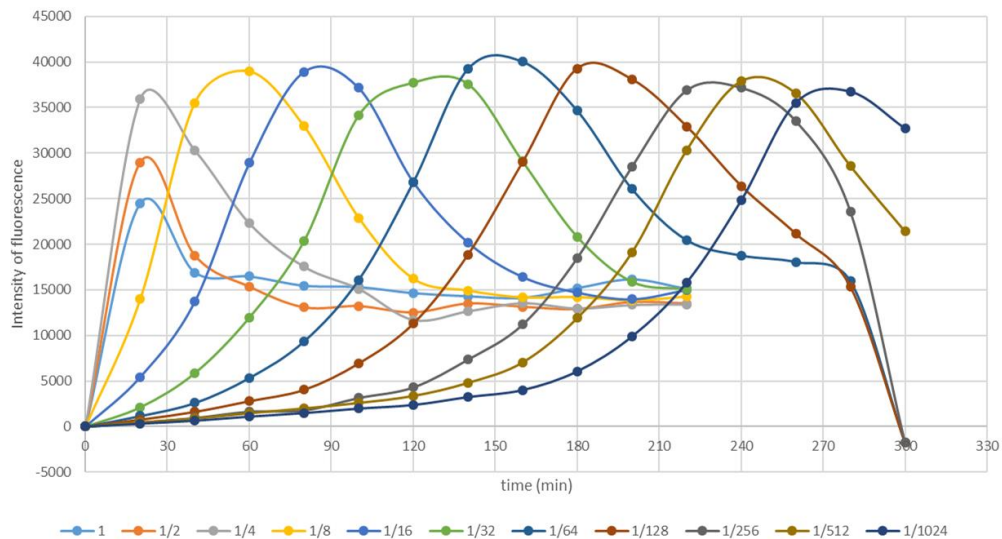
- Konstantní počet buněk + antimikrobiální látka
- Stanovení počtu buněk



Buňky HeLa byly v různé hustotě nasazeny do 96jamkové destičky a inkubovány přes noc. Do destičky byl přidán roztok resazurinu (10 % objemu buněčné kultury) a relativní fluorescenční jednotky byly měřeny v 0, 1, 2, 4 a 6 hod.

Čtyři opatření ke zlepšení testování...

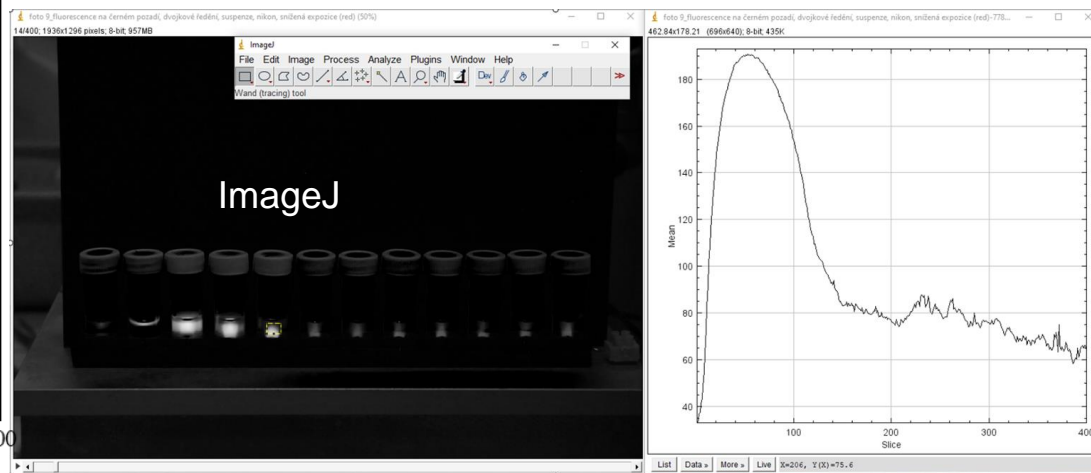
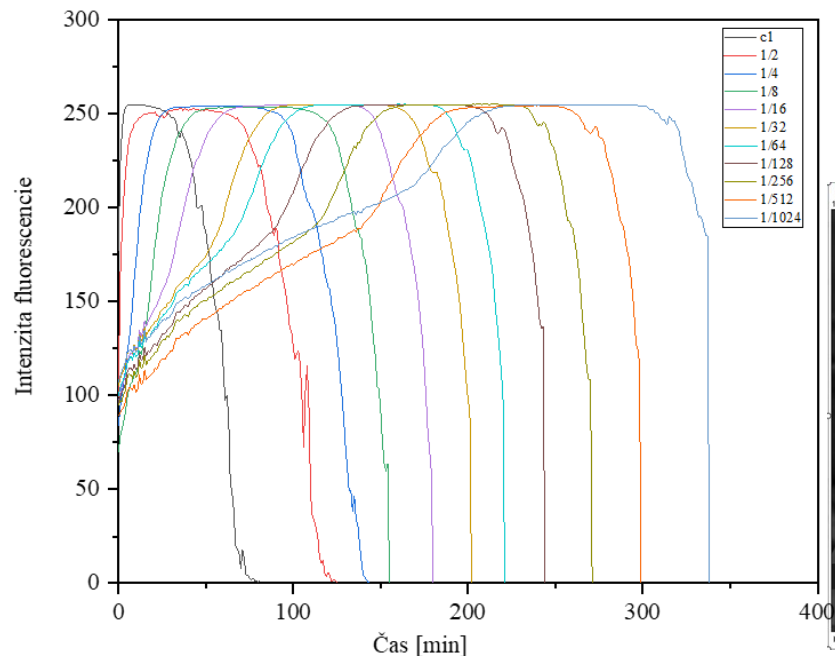
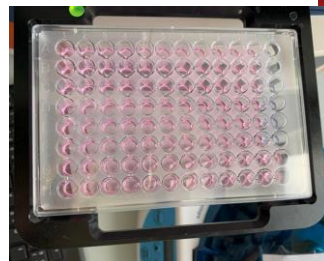
1. Barvení resazurinem



Čtyři opatření ke zlepšení testování...

1. Barvení resazurinem - přístrojové vybavení

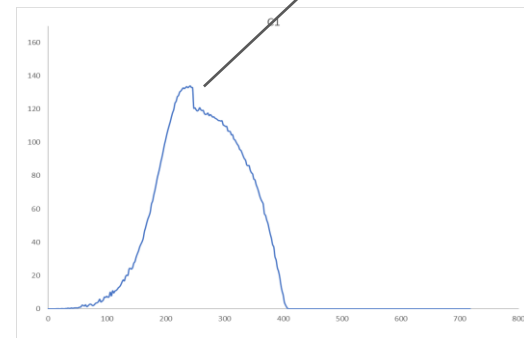
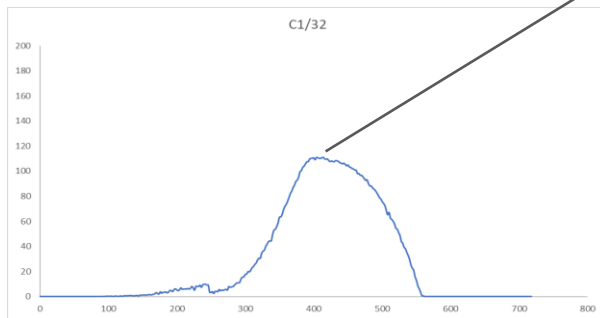
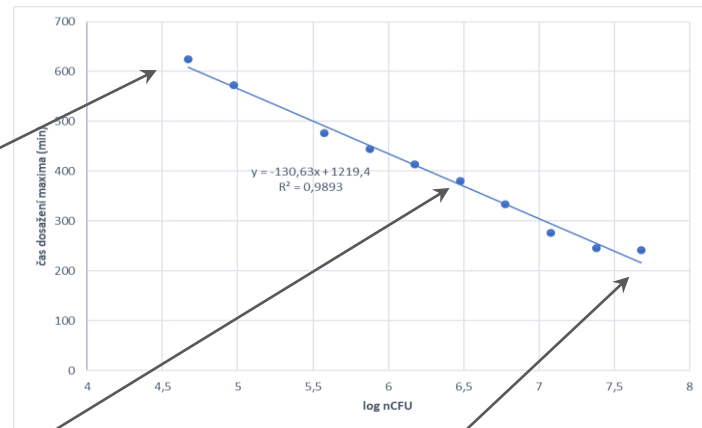
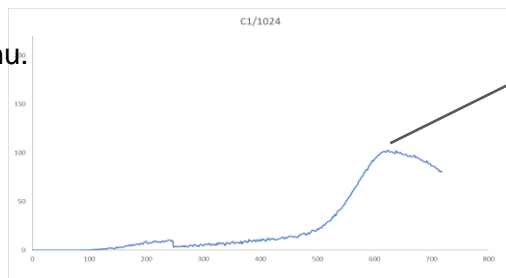
- Spektrometr s jamkovou deskou a fluorescenčním odečtem
- Digitální fotoaparát + analýza obrazu



Čtyři opatření ke zlepšení testování...

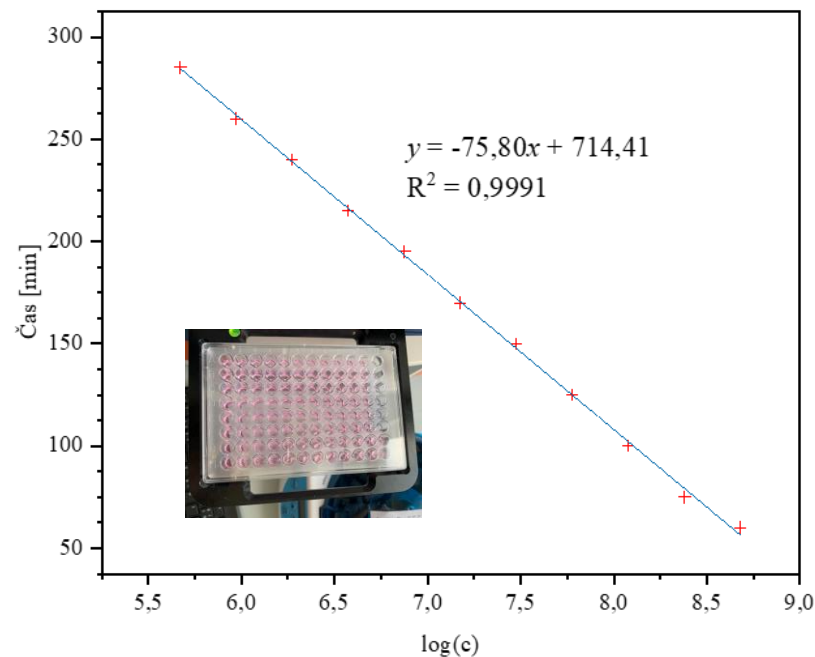
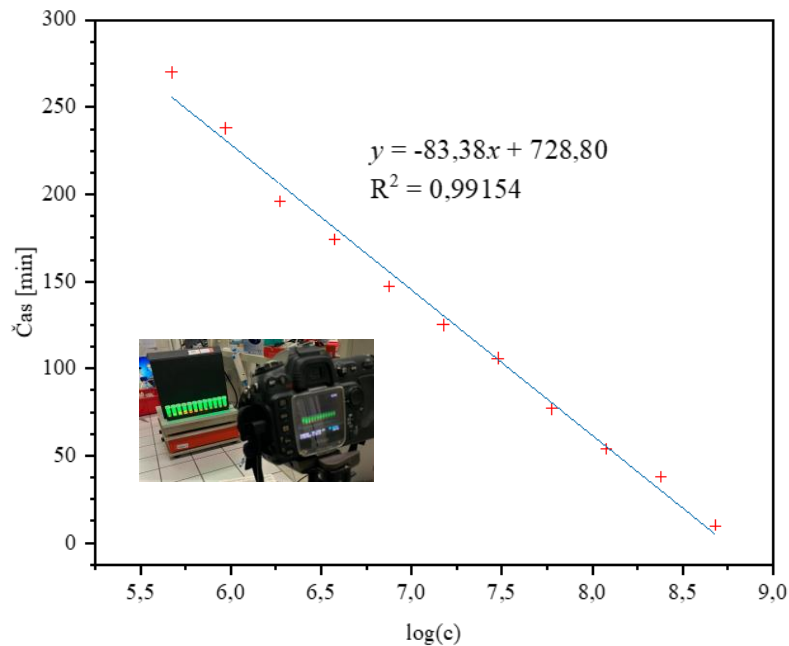
1. Barvení resazurinem - konstrukce kalibrační křivky

Čím je nižší počet živých buněk ve vzorku, tím později nastane fluorescenční maximum resorufinu.



Čtyři opatření ke zlepšení testování...

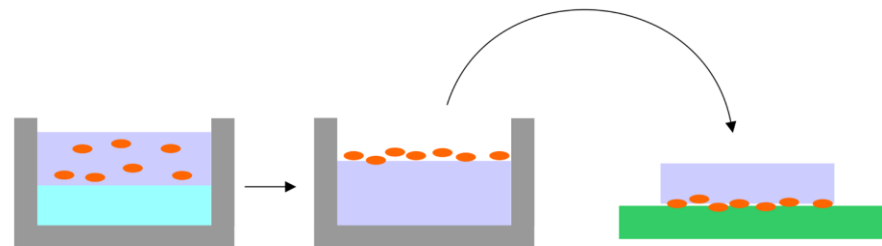
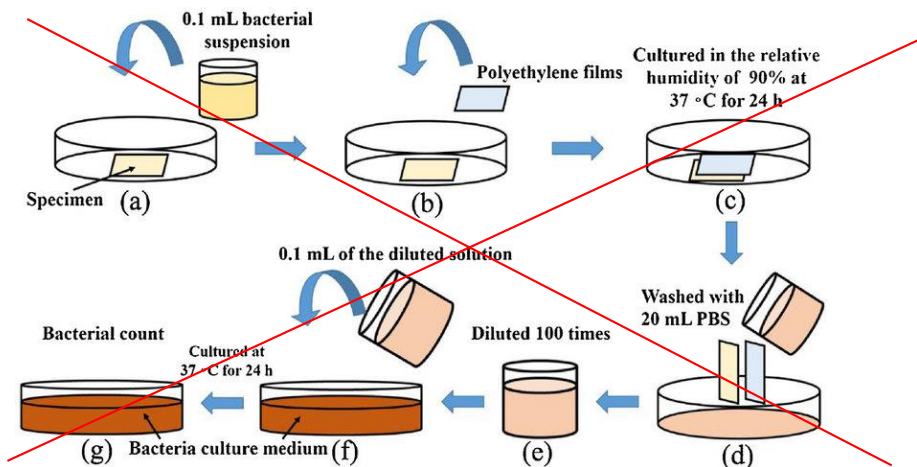
1. Barvení resazurinem - konstrukce kalibrační křivky



Čtyři opatření ke zlepšení testování...

2. Fixace bakterií na hydrogel

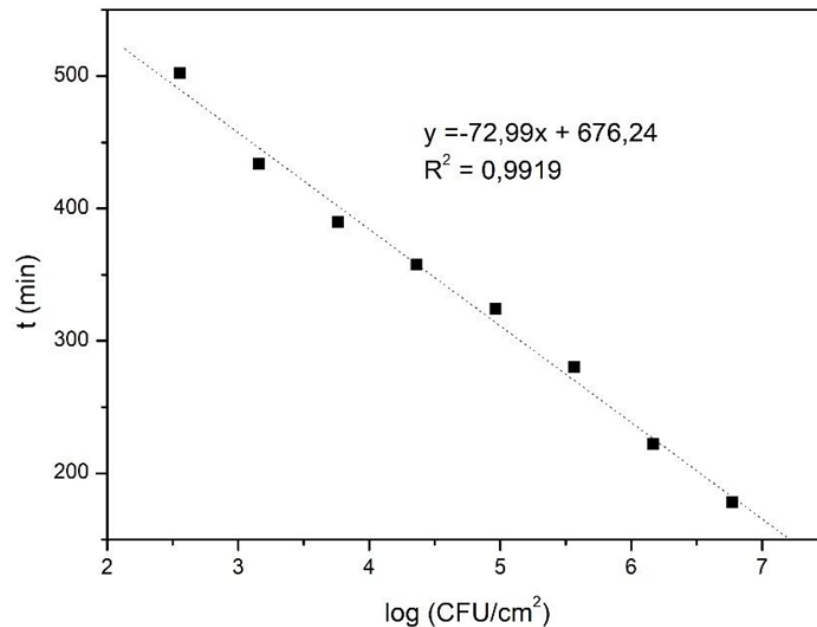
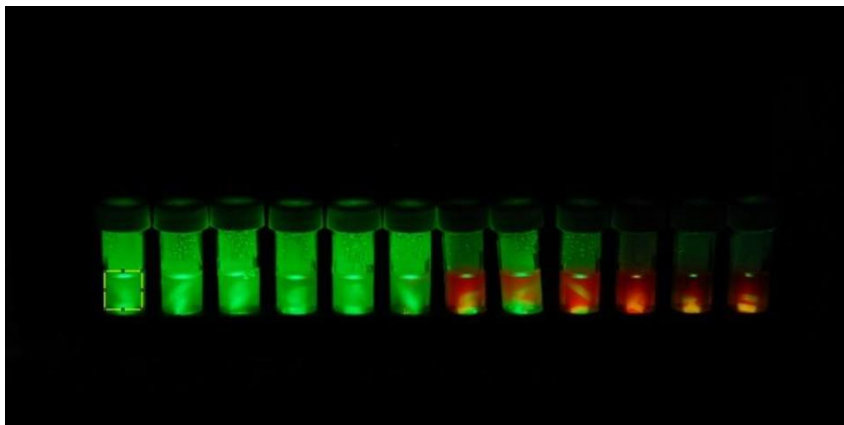
- Eliminace usazování bakterií na testovaném povrchu, na jeho krytu a chyby při oplachu.
- Bakterie se nasadí na disk hydrogelu, přivedou se do kontaktu s testovaným povrchem. Po ukončení testu se hydrogel s populací přenesou do vialky a stanoví se počet přeživších buněk.



Čtyři opatření ke zlepšení testování...

2. Fixace bakterií na hydrogel

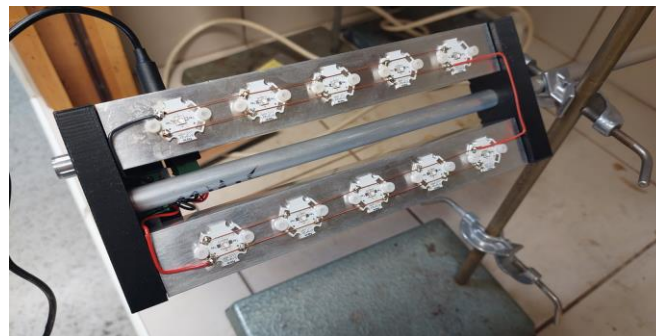
- Metoda barvení funguje dobře i pro hydrogelové disky
- Žádná reakce s hydrogelovou maticí
- Lineární závislost napříč 5 řády velikosti CFU!!!



Čtyři opatření ke zlepšení testování...

3. Pořídte si vhodnou lampu

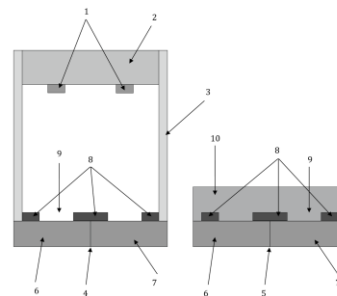
- Vlastní zdroj UV-LED záření
- Přesné elektronické řízení a regulace
- Vstup 12 V – možnost provozu na baterie
- Vysoký vyzařovací výkon – až 30 mW/cm²



Čtyři opatření ke zlepšení testování...

3. Pořídte si vhodnou lampu

- Vlastní zdroj UV-LED záření
- Přesné elektronické řízení a regulace
- Vstup 12 V - možnost provozu na baterie
- Vysoký vyzařovací výkon - až 30 mW/cm²
- Plastový kryt a základní deska pro ozařované i neozařené testování
 - C_D – aktivní povrch ve tmě
 - C_L – aktivní povrch na světle
 - B_D – kontrola ve tmě
 - B_L – kontrola na světle
- Český užitný vzor č. 36395 udělený 7. října. 2022



Úřad průmyslového vlastnictví
zapsal podle § 11 odst. 1 zákona č. 478/1992 Sb., v platném znění, do rejstříku

UŽITNÝ VZOR

číslo

36395

na technické řešení uvedené v příloženém popisu.

V Praze dne: 07.10.2022

Za správnost:

Jiří Voraček
oddělení rejstříků

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení neobjímá, zda představitel úřadu splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

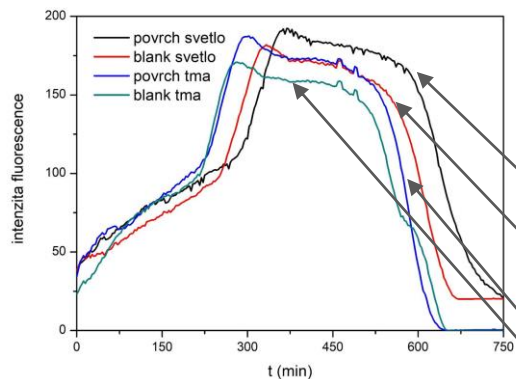
Čtyři opatření ke zlepšení testování...

4. Kontrola výtěžnosti a počtu přeživších bakterií

- Před každým testem zkontrolujeme stav inokula, porovnáme
 - teoretickou koncentraci CFU stanovenou spektrometricky (OD = 0,6 při 600 nm)
 - skutečnou koncentraci živých CFU stanovenou barvením resazurinem
- Zkontrolujte % výtěžnosti, abyste se ujistili, že z testovaného povrchu odebíráte dostatečné množství bakterií.
- Tabulka ukazuje průměrné hodnoty výtěžku pro různé povrchy testované v projektu MEFAS

vzorek	Čas	log CFU/cm ²	CFU/cm ²	průměr log CFU/mL	chyba	Recovery %
C _{výsevu} výpočet	-	6,398	2,50E+06	-		
c ₁ (výsevu)	278	5,452	2,83E+05	5,63	0,13	
	266	5,616	4,13E+05			
	258	5,726	5,32E+05			
	258	5,726	5,32E+05			
povrch A	290	5,288	1,94E+05	5,41	0,10	60
	272	5,534	3,42E+05			
	282	5,397	2,50E+05			
	280	5,425	2,66E+05			
povrch Z	298	5,178	1,51E+05	5,27	0,15	45
	280	5,425	2,66E+05			
	284	5,370	2,34E+05			
	302	5,123	1,33E+05			
folie	318	4,904	8,02E+04	5,40	0,34	68
	272	5,534	3,42E+05			
	266	5,616	4,13E+05			
	270	5,562	3,64E+05			
D ₀	268	5,589	3,88E+05	5,62	0,08	96
	272	5,534	3,42E+05			
	262	5,671	4,69E+05			
	260	5,699	5,00E+05			
D ₅₀	250	5,836	6,85E+05	5,47	0,28	79
	288	5,315	2,07E+05			
	272	5,534	3,42E+05			
	296	5,205	1,61E+05			

Některé příklady: povrch s nízkou aktivitou

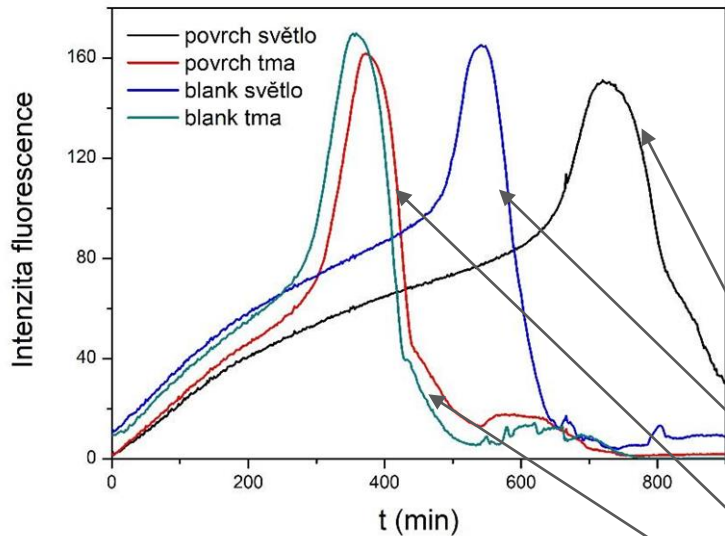


Sample	Time (min)	log CFU/cm2	CFU/cm2		mean log CFU/cm2	st. Deviation			
inoculum by OD	-	4,398	2,50E+04		-	-			
inoculum by resazurin 1	398	3,808	6,43E+03	A	4,33	0,46			
inoculum by resazurin 2	346	4,521	3,32E+04						
inoculum by resazurin 3	336	4,658	4,55E+04						
recovery of C 1	336	4,658	4,55E+04						
recovery of C 2	356	4,384	2,42E+04	Rec(C)	4,37	0,30	95	Recovery/Recovery	
recovery of C 3	380	4,055	1,13E+04						
recovery of B 1	358	4,356	2,27E+04						
recovery of B 2	360	4,329	2,13E+04	Rec(B)	4,29	0,09	70	Recovery/Recovery	
recovery of B 3	370	4,192	1,56E+04						
C _L 1	416	3,562	3,64E+03	C _L	3,86	0,27	0,56	R _L	
C _L 2	378	4,082	1,21E+04						
C _L 3	388	3,945	8,81E+03						
B _L 1	358	4,356	2,27E+04	B _L	4,42	0,06			
B _L 2	350	4,466	2,92E+04						
B _L 3	352	4,438	2,74E+04						
C _D 1	368	4,219	1,66E+04	C _D	4,24	0,13	0,14	log (BD/CD)	
C _D 2	356	4,384	2,42E+04						
C _D 3	375	4,123	1,33E+04						
B _D 1	356	4,384	2,42E+04	B _D	4,38	0,03			
B _D 2	358	4,356	2,27E+04						
B _D 3	354	4,411	2,58E+04						
							0,42 = ΔR		

$$R_L = \left[\log \left(\frac{B_L}{A} \right) - \log \left(\frac{C_L}{A} \right) \right] = \log \left(\frac{B_L}{C_L} \right)$$

$$\Delta R_L = \log \left(\frac{B_L}{C_L} \right) - \left[\log \left(\frac{B_D}{A} \right) - \log \left(\frac{C_D}{A} \right) \right] = \log \left(\frac{B_L}{C_L} \right) - \log \left(\frac{B_D}{C_D} \right)$$

Některé příklady: povrch s vysokou aktivitou



Sample	Time (min)	log CFU/cm2	CFU/cm2		mean log CFU/cm2	st. Deviation				
inoculum by OD	-	4,398	2,50E+04		-	-				
inoculum by resazurin 1	406	3,699	5,00E+03	A	3,68	0,08				
inoculum by resazurin 2	414	3,589	3,88E+03							
inoculum by resazurin 3	402	3,753	5,67E+03							
recovery of C 1	416	3,562	3,64E+03	Rec(C)	3,53	0,19	74	Recovery		
recovery of C 2	434	3,315	2,07E+03							
recovery of C 3	406	3,699	5,00E+03							
recovery of B 1	400	3,781	6,04E+03	Rec(B)	3,52	0,35	81	Recovery		
recovery of B 2	410	3,644	4,40E+03							
recovery of B 3	448	3,123	1,33E+03							
C _l 1	672	0,055	1,13E+00	C _l	0,20	0,15	1,41	R _l		
C _l 2	650	0,356	2,27E+00							
C _l 3	662	0,192	1,56E+00							
B _l 1	594	1,123	1,33E+01	B _l	1,61	0,45				
B _l 2	552	1,699	5,00E+01							
B _l 3	530	2,000	1,00E+02							
C _D 1	374	4,137	1,37E+04	C _D	4,04	0,10				
C _D 2	382	4,027	1,07E+04							
C _D 3	388	3,945	8,81E+03							
B _D 1	368	4,219	1,66E+04	B _D	4,05	0,24	0,01	log (BD/CD)		
B _D 2	393	3,877	7,53E+03							
B _D 3										
							1,39	= ΔR		

$$R_l = \left[\log \left(\frac{B_l}{A} \right) - \log \left(\frac{C_l}{A} \right) \right] = \log \left(\frac{B_l}{C_l} \right)$$

$$\Delta R_l = \log \left(\frac{B_l}{C_l} \right) - \left[\log \left(\frac{B_D}{A} \right) - \log \left(\frac{C_D}{A} \right) \right] = \log \left(\frac{B_l}{C_l} \right) - \log \left(\frac{B_D}{C_D} \right)$$

Shrnutí a závěry

- Navrhovaná metodika vychází z obecně uznávaných zásad hodnocení antimikrobiálních účinků zakotvených v platných mezinárodních normách – porovnání 4 situací (C_D , C_L , B_D , B_L).
- Zjednodušení a zlepšení oproti zavedeným postupům je dosaženo čtyřmi způsoby:
 - Urychlení: stanovení přeživších MO technikou barvení.
 - Zlepšení výsledků testu výtěžnosti a možnost použití *in situ* ukotvením testované populace MO na přenosové gelové podložce.
 - Standardizované ozáření vzorku a referenčního neaktivního povrchu.
 - Ověření koncentrace inokula a životaschopnosti před každým testem, testování výtěžnosti na aktivním i kontrolním povrchu.
- Navržená metodika byla porovnána se standardním postupem ISO 27447:2019 a bylo dosaženo uspokojivé shody mezi oběma postupy a několika různými typy fotokatalytických povrchů.