

Dr. MARCIA OLIVEIRA

Soğuk plazma bipolar iyonizasyon antiseptik aktivite değerlendirilmesi

SOLUCIONES DE AGUA Y AIRE TAYRA S.L.

25/05/2020



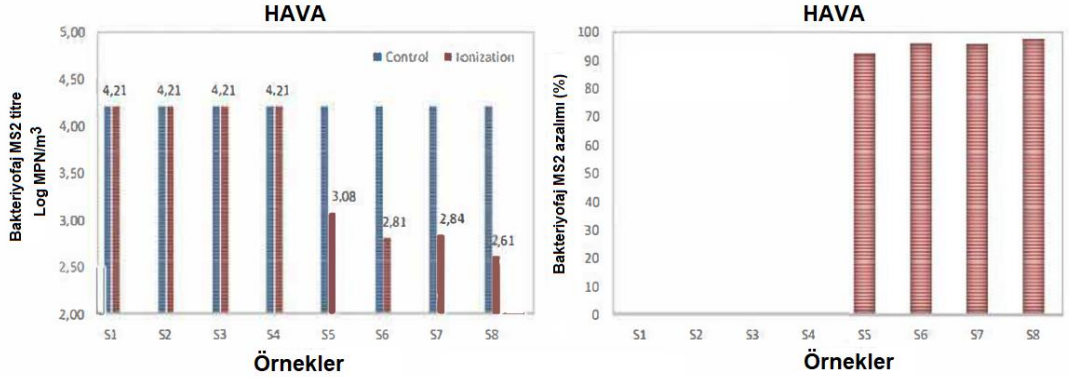
GİZLİLİK BİLDİRİM Bu belgede yer alan bilgiler ve beraberindeki veriler, yalnızca adreslendiği kişi veya kuruluşa yöneliktir ve gizli ve/veya ayrıcalıklı materyal içerebilir. Bu e-postanın hedeflenen alıcısı değilseniz, bu bilgilerin kullanılması veya herhangi bir bildirim, kopyalama veya dağıtım yasaktır ve yasa dışı olabilir. Bunu yanlışlıkla aldınızsa, lütfen gönderenle iletişime geçiniz ve bu mesajın ve eklerinin afl kopyalarını siliniz.

Test Rapor Özeti

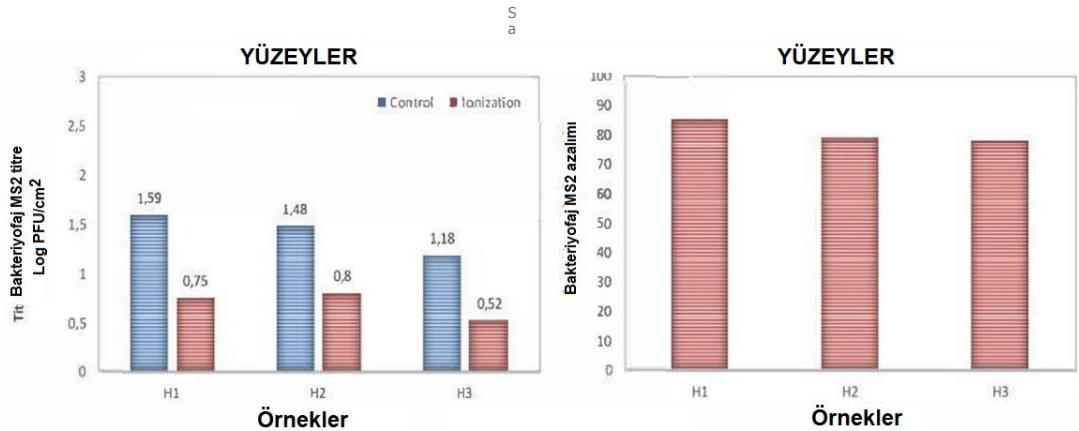
- Test, İspanya Savunma Bakanlığı'ndan INTA Biyolojik Savunma Laboratuvarı işbirliği ile 4-14 Mayıs 2020 tarihleri arasında Madrid'deki T4 havalimanı terminalinin B & B oteli odasında gerçekleştirildi. Test sonuçları, İspanya Savunma Bakanlığı INTA Direktörü tarafından onaylanmıştır.
- Testin amacı, test odasına nebülize edilen SARS-CoV-2 temsili bakteriyofaj MS2'yi azaltmak için etkili bir teknoloji olarak Plazma Hava iyonizasyon tekniğinin etkinliğini ölçmektir. Plazma Hava tipi Plasma Air International ekipmanı, Hava Besleme Kanalı fan coil ünitesinin test alan girişine monte edildi.

Bakteriyofaj MS2, biyolojik risk 1 grubuna ait olduğu için seçilmiştir (birey ve toplum için risksiz veya çok düşük risk) (İspanyol Kraliyet Kararnamesi 664/1997). Ek olarak, bakteriyofaj MS2, genellikle hava yoluyla bulaşan virüs testinde temsili olarak kullanılır ve SARS-CoV-2 gibi bir temsili insan patojenik virüsü olarak kullanım için uygun bir seçimdir.

Havada yaklaşık 2 log birimlik bir bakteriyofaj azalması elde edildi, bu da iyonizasyona sadece 10 dakika maruz kaldıktan sonra neredeyse % 99 azalmaya karşılık geliyor. Lütfen aşağıdaki şekle bakınız.



- Tablo, maske ve ölçüm cihazı yüzeylerinde (H1-H3 numuneleri) 0.70-0.85 log pfu / cm² düzeyinde bir azalma elde edildi, bu da neredeyse % 80 azalmaya karşılık geldi. Lütfen aşağıdaki şekle bakınız.



- Vargı: Elde edilen sonuçlardan, Plazma Hava bipolar soğuk plazma iyonizasyon sisteminin test edilen koşullar altında, odadaki hava bakteriyofaj MS2 konsantrasyonunu yaklaşık % 99 ve masa ve maske gibi test edilen yüzeylerde yaklaşık % 80 azaltmada etkili olduğu sonucuna varılabilir.



Marcia Oliveira, PhD

Nº expediente SDGSISTTER:		Nº Expediente Departamento:	
Código del documento:	Informe de ensayo nº NBQM2020_01		
Título del documento:	ENSAYOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD GERMICIDA DE LA IONIZACIÓN BIPOLAR POR PLASMA FRÍO		

Emisor del documento:

Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial





Subdirección General de Sistemas Terrestres

Departamento de Sistemas de Defensa NBQ

Área de Defensa Biológica

POC de la SDGSISTTER Tcol Juan Carlos Cabria Ramos



	Nombre / Responsabilidad	Firma	Fecha
Realizado por:	Dra Matilde Gil García Dra Marcia Oliveira Sousa	GIL GARCIA MATILDE 26214775L 	Firmado digitalmente por GIL GARCIA MATILDE 26214775L Fecha: 2020.05.18 12:25:17 +02'00'
Director Técnico:	Dra Paloma Lorenzo Lozano	P.A. GIL GARCIA MATILDE 26214775L 	Firmado digitalmente por GIL GARCIA MATILDE 26214775L Fecha: 2020.05.18 12:25:45 +02'00'
Aprobado por:	Tcol Juan Carlos Cabria Ramos	CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z 	Firmado digitalmente por CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z Fecha: 2020.05.18 11:53:59 +02'00'
Revisado por Calidad:	Responsable Calidad Departamento	P.A. CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z 	Firmado digitalmente por CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z Fecha: 2020.05.18 11:54:30 +02'00'

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



ÍNDICE

1. Objeto.....	3
2. Antecedentes	3
3. Muestras, Objetos e ítems recibidos.....	4
4. Procedimientos de ensayo / Normativa	11
4.1. Selección del material biológico	11
4.2. Medios de cultivo y reactivos	12
4.3. Equipos utilizados	15
4.4. Preparación de las suspensiones de ensayo.....	15
4.5. Desarrollo de los ensayos	17
5. Fechas de ejecución de los ensayos	18
6. Plan o procedimiento de muestreo (cuando sea aplicable).....	18
7. Resultado obtenidos.....	18
7.1. Ensayo 1.....	18
7.2. Ensayo 2.....	18
7.3. Ensayo 3.....	19
7.4. Ensayo 4.....	20
8. Declaración de conformidad (cuando proceda)	20
9. Resumen, opiniones, interpretaciones.....	20
10. Anexos	21
10.1. Anexo 1. Bibliografía.....	21



1. Objeto

El objeto del presente informe es la evaluaci6n de la actividad germicida de la tecnologa de ionizaci6n bipolar por plasma trio sobre el bacteri6fago MS2 y la bacteria *Escherichia coli*, aplicada en ambientes interiores (habitaci6n de un hotel).

2. Antecedentes

Con fecha 30 de abril de 2020, por parte de la empresa Soluciones de Aire y Agua Tayra S.L. se solicit6 al Dpto NBQ de la SDGSISTTER el apoyo para la realizaci6n de diferentes ensayos al objeto de evaluar la actividad germicida de la tecnologa de ionizaci6n bipolar por plasma trio para su aplicaci6n en la descontaminaci6n de ambientes interiores.

El desarrollo de los ensayos en su fase de aerosolizaci6n del virus MS2 y recogida posterior de las muestras se realice en una habitaci6n del Hotel B and B T-4 Aeropuerto. El resto de los ensayos se hicieron en el laboratorio de Defensa Biol6gica del INTA-Campus La Maranosa-

El laboratorio del Area de Defensa Biol6gica del Dpto NBQ dispone de elementos de contenci6n, equipos y procedimientos requeridos para el trabajo con agentes biol6gicos pertenecientes al grupo de riesgo 2 o inferior, de acuerdo con las recomendaciones de la O.M.S. en el "Manual de Bioseguridad" y tambien segun la Directiva del Consejo 90/679/CEE, para la protecci6n de los trabajadores expuestos a agentes biol6gicos.

El personal del Area de Defensa Biol6gica del INTA cuenta con un plan de formaci6n y cualificaci6n que los capacita para manipular agentes biol6gicos de forma segura a traves de la realizaci6n de diferentes cursos relacionados con la prevenci6n de riesgos en el laboratorio quimico-biol6gico y han desarrollado su actividad en el campo de la detecci6n y diagn6stico de agresivos biol6gicos.

El laboratorio dispone asimismo de un Sistema de gesti6n de residuos quimicos y biol6gicos, que incluye formaci6n del personal a traves de cursos de Gesti6n de residuos t6xicos y peligrosos, lo que permite una correcta segregaci6n y almacenamiento de los mismos. La eliminaci6n de estos es llevada a cabo por empresas autorizadas que ofrecen toda la garantfa de no contaminar el medio ambiente, segun la Orden de 18 de octubre de 1976 (M. Ind., 8.O.E. 3.12.1976, reel. 23.2.1977), sobre Prevenci6n y Correcci6n de la contaminaci6n atmosferica de origen industrial, y el Real Decreto legislativo 1302/86 de 28.6, (M. Obras Pub., 8.O.E. 30.6.1986) sobre Evaluaci6n de impacto ambiental.

La tecnica de la ionizaci6n bipolar de Plasma air consiste en aplicar un campo electrico al aire de modo que se generen iones positivos y negativos. Los iones atacan la membrana del virus dejando expuesto su ARN a la oxidaci6n, inactivandolo. En diferentes estudios se han probado que el virus es transmisible por el aire y que los sistemas de aire acondicionado pueden favorecer su dispersion.

Se realizaron un total de 4 ensayos, de los cuales dos aportaron inicialmente ninguna conclusi6n, siendo necesario la repetic6n de uno de ellos. A continuaci6n, se explicara con detalle el diseio experimental para cada ensayo y sus resultados.

De una manera general, el diseio experimental elaborado inicialmente se muestra en la figura 1.

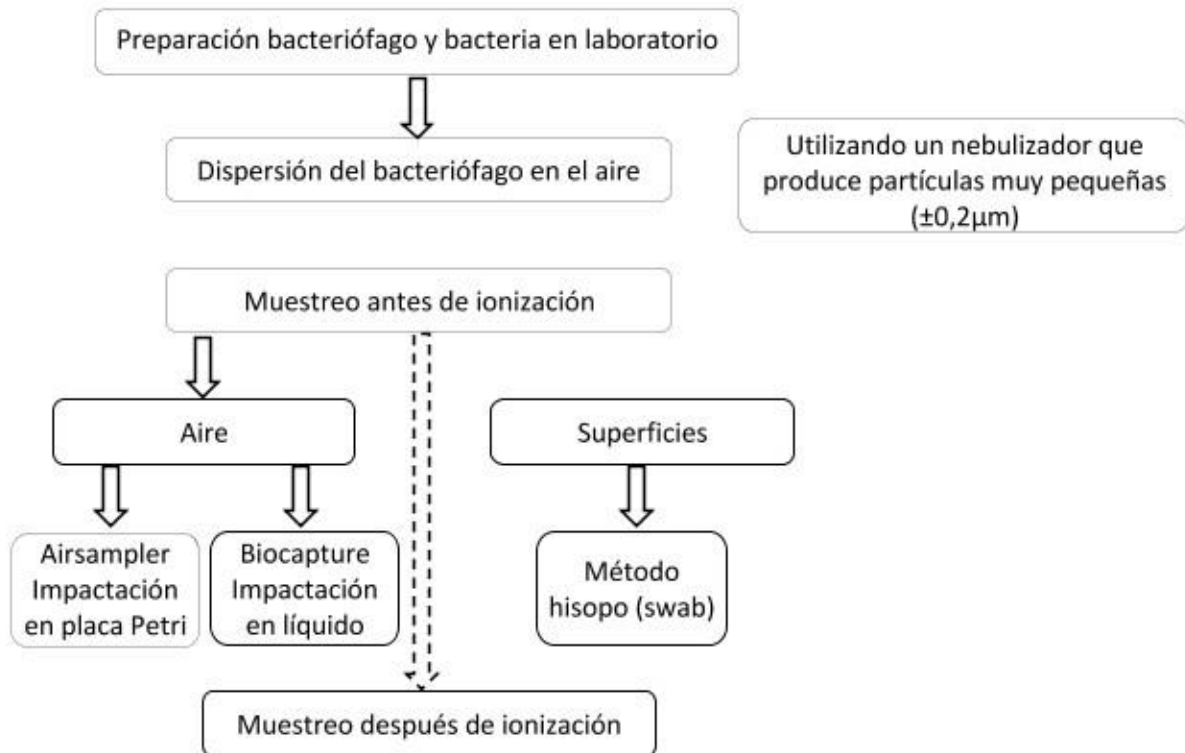


Figura 1. Esquema general del proyecto de ionización.

3. Muestras, Objetos e ítems recibidos

En todos los ensayos realizados se tomaron muestras líquidas mediante un biolector o impactador en medio líquido (Biocapture); muestras sólidas mediante biolector o impactador en medio sólido (AirSampler), y muestras de superficies mediante hisopo humectado en tampón SM, en diferentes posiciones de la habitación a ensayar y en diferentes tiempos.

En las siguientes tablas (tabla I – tabla IV) se exponen las muestras recogidas en cada uno de los ensayos realizados.

Tabla I. Muestras recogidas en el ensayo 1 (control positivo, ensayo con bacteriófago MS2)

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_001	LA	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_002	LB	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_003	S1	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_004	S2	Muestra de aire recogida en posición 2, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1



NBQM2020_005	S3	Muestra de aire recogida en posición 3, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_006	S4	Muestra de aire recogida en posición 4, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_007	S5	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_008	S6	Muestra de aire recogida en posición 2, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_009	S7	Muestra de aire recogida en posición 3, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_010	S8	Muestra de aire recogida en posición 4, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_011	H1A	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_012	H1B	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_013	H2A	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_014	H2B	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_015	H3A	Muestra de la superficie de la pared sobre el cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_016	H3B	Muestra de la superficie de la pared sobre el cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_017	H4A	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_018	H4B	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1

En la figura siguiente (figura 2) se muestra un esquema de la habitación y de los puntos de muestreo del ensayo 1.

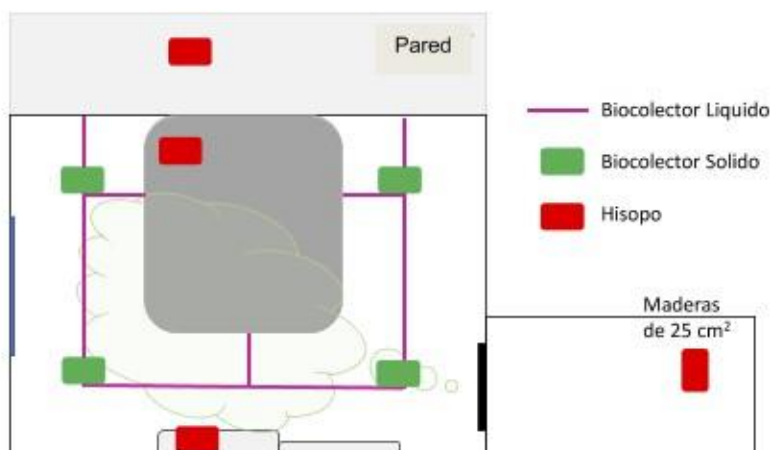


Figura 2. Esquema de la habitación y puntos de muestreo del ensayo 1.

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



Tabla II. Muestras recogidas en el ensayo 2 (**control positivo**, variando posición y tiempo de recogida de muestras respecto al ensayo 1, ensayo con bacteriófago MS2)

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_019	LA	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo durante la nebulización.	1
NBQM2020_020	LB	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo después de la nebulización.	1
NBQM2020_021	S1	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 0 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_022	S2	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 1,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_023	S3	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 2,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_024	S4	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 4.2 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_025	S5	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5,6 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_026	S6	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 7 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_027	S7	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 8,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_028	S8	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 9,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_029	H1	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_030	H2	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_031	H3	Muestra de una superficie situada cerca del cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_032	H4	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_033	H5	Muestra de la superficie del interior de una primera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_034	H6	Muestra de la superficie del interior de una segunda columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_035	H7	Muestra de la superficie del interior de una tercera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



NBQM2020_036	H8	Muestra de la superficie del interior de una cuarta columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
--------------	----	--	---

En la figura siguiente (figura 3) se muestra un esquema de la habitación y de los puntos de muestreo del ensayo 2.

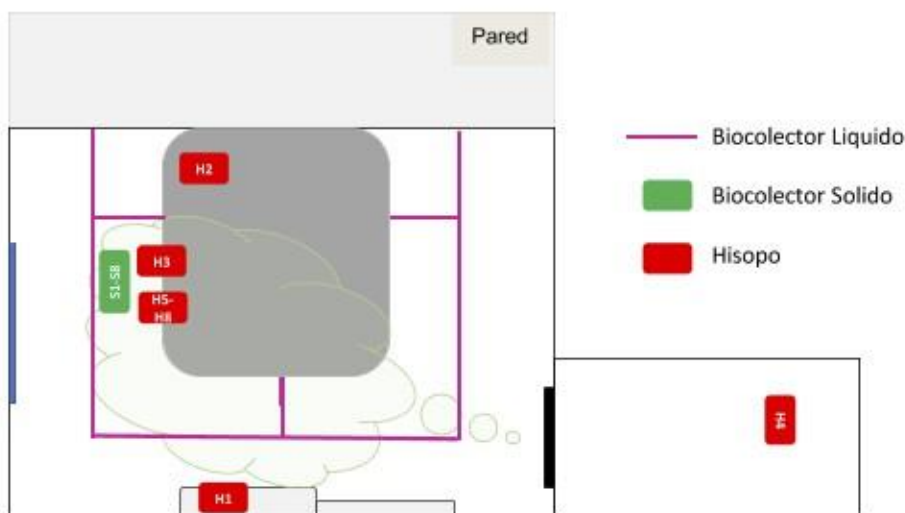


Figura 3. Esquema de la habitación y puntos de muestreo del ensayo 2.

Tabla III. Muestras recogidas en el ensayo 3 (**Ensayo de descontaminación aplicando la tecnología de ionización bipolar por plasma frío**, misma posición y tiempo de recogida de muestras respecto al ensayo 2, ensayo con bacteriófago MS2).

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_037	LA	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo durante la nebulización.	1
NBQM2020_038	LB	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo después de la nebulización.	1
NBQM2020_039	S1	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 0 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_040	S2	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 1,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_041	S3	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 2,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_042	S4	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 4.2 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_043	S5	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5,6 minutos después de la nebulización.	1



NBQM2020_044	S6	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 7 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_045	S7	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 8,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_046	S8	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 9,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_047	H1	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_048	H2	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_049	H3	Muestra de una superficie situada cerca del cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_050	H4	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_051	H5	Muestra de la superficie del interior de una primera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_052	H6	Muestra de la superficie del interior de una segunda columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_053	H7	Muestra de la superficie del interior de una tercera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_054	H8	Muestra de la superficie del interior de una cuarta columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1

Tabla IV. Muestras recogidas en el ensayo 4 (ensayo de descontaminación aplicando la tecnología de ionización bipolar por plasma frío, ensayo con bacteria *Escherichia coli*).

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_055	SA1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_056	SA2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_057	SA3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



NBQM2020_058	SA4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_059	SB1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_060	SB2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_061	SB3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_062	SB4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_063	SC1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_064	SC2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_065	SC3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_066	SC4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_067	SD1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_068	SD2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_069	SD3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_070	SD4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_071	A1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_072	A2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_073	A3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



NBQM2020_074	A4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_075	B1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_076	B2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_077	B3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	11
NBQM2020_078	B4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_079	C1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_080	C2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_081	C3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_082	C4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_083	D1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_084	D2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_085	D3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	11
NBQM2020_086	D4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



En la figura siguiente (figura 4) se muestra un esquema de la habitación y de los puntos de muestreo del ensayo 4.

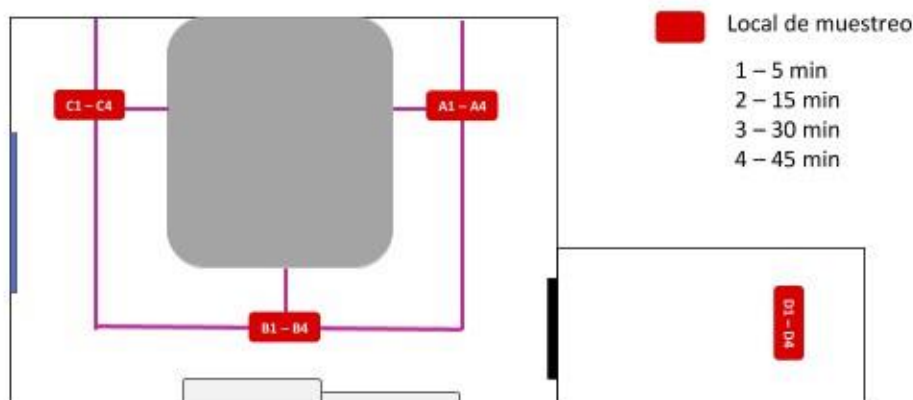


Figura 4. Esquema de la habitación y puntos de muestreo del ensayo 4.

4. Procedimientos de ensayo / Normativa

Para evaluar la actividad virocida del sistema se calculó la reducción de la infectividad del bacteriófago a partir de las diferencias de los logaritmos de los títulos virales (unidades formadoras de placas de lisis (ufp)), antes y después del proceso de descontaminación. Esto se llevó a cabo mediante cultivo por el método de la doble capa de agar, teniendo en cuenta que cuando el bacteriófago infecta a una célula huésped, de una cepa adecuada, se producen placas de lisis de tamaño y morfología muy diversa, permitiendo la detección y recuento de las mismas (norma UNE-EN ISO 10705-1).

La actividad bactericida del sistema se evaluó calculando la reducción de la viabilidad bacteriana a partir de las diferencias de los logaritmos de la concentración bacteriana (unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL), antes y después del proceso de descontaminación, mediante la siembra de diluciones seriadas en placas de LBA y contaje directo del número de ufc en cada una de ellas. Además, dicha actividad también se evaluó de manera cualitativa, en función de la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, en las placas sometidas al sistema de descontaminación respecto a un control positivo (sin someter a descontaminación).

4.1. Selección del material biológico

Para dar cumplimiento al trabajo solicitado se ha seleccionado el bacteriófago MS2 y la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597, ambos pertenecientes al grupo de riesgo biológico 1 (sin riesgo o riesgo muy bajo para el individuo y la comunidad) (Real Decreto 664/1997). Para asegurar un sistema cerrado de conservación, todos los microorganismos que se van a utilizar en los ensayos proceden de una colección de cultivos tipo, minimizando su actividad genética y fisiológica, y evitando así su potencial mutación.

El bacteriófago MS2 es un virus icosaédrico, que tiene como material genético ARN de cadena sencilla, de sentido positivo que infecta a la bacteria *Escherichia coli* y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae. MS2 es miembro de una familia de virus bacterianos estrechamente relacionados entre los que se encuentran los bacteriófagos f2 y R17. MS2 infecta a bacterias entéricas portadoras del factor de fertilidad (F), que codifica para un "pili" el cual sirve de receptor viral. MS2 se une al "pili" a través de su proteína de maduración sencilla. Se desconoce el mecanismo preciso por el cual el fago ARN se introduce en la bacteria. Las células hospedadoras del fago son lisadas (destruidas) tras la replicación y encapsulación de



las partículas virales, de forma que los nuevos virus quedan libres para llevar a cabo una nueva infección, produciendo placas de lisis de tamaño y morfología muy diversa.

El bacteriófago MS2 es muy resistente a la desecación, por lo que ha sido utilizado en diferentes ensayos para evaluación de descontaminantes: "Ensayos cuantitativos de suspensión para la evaluación de la actividad virocida frente a bacteriófagos de los desinfectantes químicos utilizados en el ámbito agroalimentario y en industria" (UNE_EN 13610:2003). "Actividad virocida para superficies inertes" (ASTM-1053:97).

Escherichia coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae y forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de animales homeotermos, como por ejemplo el ser humano. Es hospedador del bacteriófago MS2 que infecta a bacterias entéricas portadoras del factor de fertilidad (F). Ha sido utilizada en diferentes ensayos para evaluación de descontaminantes: "Ensayos cuantitativos de suspensión para la evaluación de la actividad virocida frente a bacteriófagos de los desinfectantes químicos utilizados en el ámbito agroalimentario y en industria" (UNE_EN 13610:2003). "Actividad virocida para superficies inertes" (ASTM-1053:97).

La actividad germicida se va a evaluar utilizando como microorganismos de ensayo el bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1 en cloroformo al 0,3% conservado a 4°C y la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 conservada en glicerol al 15% a -80°C en el cepario del Área de Defensa Biológica (figura 5).

Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 15597™)

ATCC® Number: 15597™
 Strain Designations: *C-3000*
 Type Strain: *no*
 Biosafety Level: *1*
 Product Format: *freeze-dried*

Escherichia coli bacteriophage MS2 (ATCC® 15597-B1™)

ATCC® Number: 15597-B1™
 Deposited As *MS2*
 Strain Designations: *MS2*
 Type Strain: *no*
 Biosafety Level: *1*
 Product Format: *freeze-dried*

Figura 5. Especificaciones del bacteriófago y cepa bacteriana utilizada como cepa huésped.

4.2. Medios de cultivo y reactivos

Para la preparación de los medios y la uniformidad de los resultados se utilizaron componentes de calidad homologada y productos químicos de calidad analítica reconocida, o un medio completo deshidratado. Se utilizó únicamente agua destilada o agua de pureza equivalente.

Los medios utilizados fueron los siguientes:

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
 El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



Luria Bertani Agar (LBA)

Fórmula (en g/L):

Triptona	-----10,0
Extracto de levadura	-----5,0
Cloruro sódico	-----10,0
Agar	-----15,0

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 +/- 3°C durante 15 minutos.

Luria Bertani Agar Semisólido (LBAss)

Fórmula (en g/L):

Triptona	-----10,0
Extracto de levadura	-----5,0
Cloruro sódico	-----10,0
Agar	-----6,0

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 +/- 3°C durante 15 minutos.

Caldo de Luria Bertani (LB)

Fórmula (en g/L):

Triptona	-----10,0
Extracto de levadura	-----5,0
Cloruro sódico	-----10,0

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 +/- 3°C durante 15 minutos.

Solución SM

Fórmula (en g/L):

Cloruro sódico	-----5,8
Sulfato magnésico	-----2,0

Se añade 5 mL de Tris-Cl 1M (pH 7,3 ± 0,2). Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Buffer Tris-Mg-Ca

10mM Tris-HCl
10mM MgSO ₄
5mM CaCl ₂

pH final aproximado: 7,5 ± 0,3. Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



Cloruro Cálcico 0,5M

Fórmula (en g/100mL):

CaCl₂ 2H₂O ----- 5,5

Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Sulfato Magnésico 1M

Fórmula (en g/100mL):

MgSO₄-----24,6

Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Tris-ClH 0,5M

Fórmula (en g/500mL):

Tris -----60,57 g

Preparar 400 mL de agua destilada en una botella.

Añadir 60,57 g de Tris base

Ajustar el pH a 7,5 usando HCl

Añadir agua destilada hasta un volumen de 500 mL

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 ± 3°C durante 15 minutos.

Tampón fosfato salino 1X (PBS)

Fórmula (en g/L):

Cloruro sódico 10,0 g

Cloruro potásico 0,25 g

Fosfato disódico monohidrato 1,12 g

Fosfato potásico 0,25 g

pH final aproximado: 7,2 ± 0,2. Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Cultivos bacterianos

Se utilizará una suspensión del bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1 en SM y un cultivo de la bacteria *Escherichia coli*, ATCC 15597, crecido hasta fase exponencial para los ensayos de infectividad y bactericida.



4.3. Equipos utilizados

Estufa de cultivo a $36 \pm 2^\circ\text{C}$
Incubador termostático a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación
Microondas
pH-metro
McFarlómetro
Tubos, para medir en McFarlómetro
Vortex
Baño termostático
Cabina de seguridad biológica nivel II
Placas de Petri, ventiladas de 9 cm de diámetro
Pipetas graduadas de 0,1 mL, 1 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL de capacidad
Pipetas Pasteur
Frascos de vidrio, de volúmenes adecuados
Tubos de cultivo, con tapa
Probetas graduadas
Refrigerador, ajustado a una temperatura de $5 \pm 3^\circ\text{C}$
Congelador, con control termostático a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$
Micropipetas de diferente volumen
Puntas para micropipetas de volumen adecuado
Hisopos de algodón estériles en tubo
Agitador orbital de placas
Generador de aerosol biológico o nebulizador
Sistema de impactación de partículas, suministrado por Victor Archilla (INTA)
Biocolector de aerosoles sobre medio líquido (Biocapture)
Biocolector de aerosoles sobre medio sólido (suministrado por el cliente)
Sistema de ionización bipolar por plasma frío (suministrado por el cliente)

4.4. Preparación de las suspensiones de ensayo

Se partió de una suspensión del bacteriófago, conservado a 4°C en cloroformo al 0,3%, preparado según las instrucciones que se describen en la norma UNE-EN ISO 10705-1 y de una suspensión de *Escherichia coli*, ATCC 15597 conservado a -80°C en glicerol al 15%. Antes de iniciar los ensayos se calculó el título viral del bacteriófago a utilizar. Para determinar el título viral se añadieron 20 ± 2 mL de medio LB a una botella con una capacidad de 50 mL, precalentada a 37°C , y se inoculó con 200 μL de un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 crecido "overnight" (inóculo 1:100). Se incubó a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 ± 1 horas en un incubador, con agitación suave (150 rpm) hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 10^8 ufc/mL). Para ello cada 30 minutos se sacó del incubador el cultivo

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



y se midió turbidez en un McFarlómetro, extrapolándose el número de unidades formadoras de colonias correspondientes a las unidades de McFarland teóricas (Tabla V).

Tabla V. Correspondencia entre Concentración Bacteriana y Unidades de McFarland teóricas

Concentración Bacteriana x10 ⁸ /ml	Unidades de McFarland
1,5	0,5
3	1
6	2
9	3
12	4
15	5
18	6
21	7

Cuando el cultivo bacteriano llegó a la fase de crecimiento exponencial se enfrió rápidamente transfiriendo la botella a un recipiente con hielo. Se hicieron diluciones seriadas, añadiendo 50 µL de una suspensión de fago conservado a 4°C en presencia de cloroformo al 0,3%, a 450 µL del tampón Tris-Mg-Ca. Se mezclaron 120 µL de cada dilución con 120 µL de la cepa hospedadora crecida hasta fase exponencial, mantenida en hielo hasta el momento de la infección, por duplicado. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para que los virus se unieran a las células hospedadoras. A continuación, se cogieron 200 µL de la mezcla, virus/célula hospedadora, y se añadieron a un tubo que contenía 3 mL de medio LBAss precalentado (45°C). Se mezcló cuidadosamente mediante inversión y se vertió el contenido sobre la superficie de una placa de Petri que contenía LBA. Se dejó solidificar y se incubó en una estufa de cultivo a 36 ± 2°C durante 18 ± 2 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el número de placas de lisis o virales aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Título} = (N/d) \times 10 \text{ ufp/mL} \quad (\text{ecuación 1})$$

Siendo $N = (n_1 + 0,1n_2)/2$

n_1 : Número de placas de lisis en la dilución más alta que se puede contar

n_2 : Número de placas de lisis en la dilución anterior a la más alta que se puede contar

d : dilución más alta que se puede contar

Los títulos virales de la suspensión inicial del bacteriófago utilizado para la nebulización del mismo en los ensayos fueron:

Ensayo 2 (control positivo): 2,25x10⁵ ufp/mL.

Ensayo 3: 2,47x10⁵ ufp/mL.

Para la realización de los ensayos con células bacterianas se revitalizó la cepa *Escherichia coli*, ATCC 15597 conservada a -80 °C en glicerol al 15%, en caldo de Luria Bertani (LB), a 36 ± 2°C, 150 rpm, durante 20 ± 4 horas. Transcurrido este período de incubación se añadieron 20 ± 2 mL de medio LB a una botella con una capacidad de 50 mL, precalentada a 37°C, y se inoculó con 200 µL de un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 crecido "overnight" (inóculo 1:100). Se incubó a 37 ± 2°C durante 3 ± 1 horas en un incubador, con agitación suave (150 rpm) hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 10⁸ ufc/mL). Para ello cada 30 minutos se sacó del incubador el cultivo y se



midió turbidez en un McFarlómetro, extrapolándose el número de unidades formadoras de colonias correspondientes a las unidades de McFarland teóricas (Tabla V).

Para la cuantificación del número de unidades formadoras de colonias (ufc)/mL viables en los cultivos bacterianos se prepararon diluciones seriadas del cultivo añadiendo 100 µL del cultivo a 900 µL del tampón PBS y se inocularon 100 µL de cada una de las diluciones en una placa con medio LBA, por duplicado. Se incubaron a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 20 ± 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificó el número de bacterias viables por contaje directo de las colonias crecidas sobre la placa de LBA. Para el cálculo del número de ufc/ml viables se aplicó la siguiente ecuación:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2)d} \times 10 \quad (\text{ecuación 2})$$

Siendo:

c: la suma de las colonias contadas en todas las placas que se pueden contar.

n_1 : el número de placas contadas en la dilución más baja.

n_2 : el número de placas contadas en la dilución más alta.

d: el factor de dilución correspondiente a la dilución más baja.

4.5. Desarrollo de los ensayos

Para cada uno de los ensayos con el bacteriófago MS2 se prepararon 500 mL de una suspensión de dicho bacteriófago en tampón SM, para generar el aerosol de dicho bacteriófago y dispersarlo en la habitación de ensayo y, posteriormente, recoger tanto muestras de aire, por impactación en medio sólido y en medio líquido, como de superficies mediante hisopo.

Para recuperar el bacteriófago de las muestras tomadas con hisopo de los controles positivos así como de las muestras sometidas al proceso de descontaminación, se añadieron al tubo estéril que contenía cada uno de los hisopos, 2 mL de solución SM y se sometieron a agitación (en un agitador orbital) durante 1 hora a 4°C . El líquido de lavado se recogió en un tubo estéril, que se guardó a 4°C hasta que se llevó a cabo el proceso de infección.

A partir de la suspensión del bacteriófago, recuperado de las probetas, así como las muestras líquidas recogidas por impactación sobre medio líquido, se hicieron diluciones seriadas, siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.4. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el número de placas de lisis o virales en la dilución más alta que se pudo contar y en la inmediatamente anterior aplicando la ecuación 1.

Las muestras recogidas por impactación sobre medio sólido se incubaron directamente en una estufa de cultivo a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas. El medio sólido consistió en un inóculo de 100 µL de la bacteria *Escherichia coli* en fase exponencial sobre medio sólido LBA, para el caso del ensayo 1, y un inóculo de 200 µL de la bacteria *Escherichia coli* en fase exponencial que se añadieron a un tubo que contenía 4 mL de medio LBAs precalentado (45°C), que se mezcló cuidadosamente mediante inversión y se vertió sobre la superficie de una placa de Petri con medio LBA, para los ensayos 2 y 3.

El ensayo con el cultivo bacteriano se realizó aplicando directamente la ionización bipolar por plasma frío sobre cultivos sólidos y líquidos en fase exponencial, de dicha cepa.

Las muestras sólidas se incubaron directamente en una estufa de cultivo a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas.

De las muestras líquidas se prepararon diluciones seriadas del cultivo siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.4. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificó el número de bacterias viables por contaje directo de las colonias crecidas sobre la placa de LBA. Para el cálculo del número de ufc/ml viables se aplicó la ecuación 2.

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



5. Fechas de ejecución de los ensayos

Los ensayos se realizaron entre los días 4 y 14 de mayo de 2020.

6. Plan o procedimiento de muestreo (cuando sea aplicable)

No aplica.

7. Resultado obtenidos

Los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos realizados fueron los siguientes:

7.1. Ensayo 1

Este ensayo se trata de un control positivo puesto que no se ha aplicado la ionización bipolar.

No se ha obtenido valores significativos del bacteriófago en el aire ni en las superficies. Además, la metodología utilizada para el biocolector sobre medio sólido no ha funcionado.

Se planteó otra repetición del control positivo con cambios en el diseño experimental para poder comparar con el ensayo de ionización bipolar.

7.2. Ensayo 2

Este ensayo es la repetición del control positivo anterior (ensayo 1), puesto que en el primer ensayo se obtuvo una concentración bastante baja del bacteriófago, variando posición y tiempo de toma de muestras así como la técnica de biocolección sobre medio sólido.

La concentración del bacteriófago en la solución utilizada para nebulización fue de $2,25 \times 10^5$ ufp/mL.

Los resultados obtenidos en el ensayo control se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Resultados obtenidos en el ensayo control (ensayo 2).

Muestras biocolector liquido	Recuento medio (log ufp/mL)
A – Tiempo 1 (5 min de muestreo durante la nebulización)	4,16
B – Tiempo 2 (5 min de muestreo después de la nebulización)	3,46
Muestras biocolector solido	Recuento medio (log ufp/L)
S1 – min 0	(>265 ufp) – >4,21
S2 – min 1,4	(>265 ufp) – >4,21
S3 – min 2,8	(>265 ufp) – >4,21
S4 – min 4,2	(>265 ufp) – >4,21
S5 – min 5,6	(>265 ufp) – >4,21
S6 – min 7	(>265 ufp) – >4,21
S7 – min 8,4	(>265 ufp) – >4,21
S8 – min 9,8	(>265 ufp) – >4,21
Muestras superficies	Recuento medio (log ufp/cm ²)
H1 – mesa	1,60
H2 – mascarilla	1,48
H3 – superficie equipo ELPI (INTA)	1,18
H4 – retorno aire	0
H5 – columna impactación	0

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



H6 – columna impactación	0
H7 – columna impactación	0
H8 – columna impactación	0,49

Se puede observar una disminución de la concentración de bacteriófago al tiempo 1 (5 minutos de muestreo durante la nebulización) y 2 (5 minutos de muestreo después de la nebulización) en el muestreo con el biocolector líquido. La posible razón es que las partículas de virus se caen al suelo cuando están asociadas a partículas de agua grandes. Esto sería justificado si en el muestreo de la columna de impactación hubiéramos encontrado valores del bacteriófago. Sería necesario muestrear más superficies de la columna para poder visualizar en qué tamaño de partículas se puede encontrar el bacteriófago.

Respecto a las muestras del impactador sólido, se obtuvo valores incontables lo que corresponde a números superiores a 1000 partículas de bacteriófagos. Debido a que se ha utilizado un equipo que requiere un ajuste del número total de partículas por placa Petri, se ha tenido que fijar el número máximo como 265 ufp/L. La transformación de estos datos nos lleva a un recuento medio de 4,21 log ufp/L.

Se ha obtenido resultados en el orden de 1-1,6 log ufp/cm² en las superficies muestreadas mediante hisopo. Como se ha comentado anteriormente, no se encontró valores del bacteriófago en la columna de impactación y lo mismo en el área del retorno de aire.

7.3. Ensayo 3

Este ensayo se realizó de la misma manera que el ensayo 2 (control positivo), aplicando la tecnología de ionización bipolar por plasma frío como tratamiento del aire de la habitación.

La concentración del bacteriófago en la solución utilizada para nebulización fue de $2,47 \times 10^5$ ufp/mL.

Los resultados obtenidos en el ensayo con ionización se muestran en la tabla VII.

Tabla VII. Resultados obtenidos en el ensayo 3.

Muestras biocolector líquido	Recuento medio (log ufp/mL)
A – Tiempo 1 (5 min de muestreo durante la nebulización)	4,00
B – Tiempo 2 (5 min de muestreo después de la nebulización)	3,04
Muestras biocolector sólido	Recuento medio (log ufp/L)
S1 – min 0	(>265 ufp) – >4,21
S2 – min 1,4	(>265 ufp) – >4,21
S3 – min 2,8	(>265 ufp) – >4,21
S4 – min 4,2	(>265 ufp) – >4,21
S5 – min 5,6	(97 ufp) – 3,08
S6 – min 7	(57 ufp) – 2,81
S7 – min 8,4	(61 ufp) – 2,84
S8 – min 9,8	(38 ufp) – 2,61
Muestras superficies	Recuento medio (log ufp/cm ²)
H1 – mesa	0,75
H2 – mascarilla	0,80
H3 – superficie equipo ELPI (INTA)	0,52
H4 – retorno aire	0
H5 – columna impactación	0
H6 – columna impactación	0

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



H7 – columna impactación	0
H8 – columna impactación	0,23

Se puede observar una ligera disminución de la concentración de bacteriófagos al tiempo 1 (5 minutos de muestreo durante la nebulización) y 2 (5 minutos de muestreo después de la nebulización) en el muestreo con el biocolector líquido cuando comparamos con el ensayo control (ensayo 2). No obstante, esta reducción no es significativa.

Se ha observado una reducción bastante significativa en las muestras del impactador sólido recogidas entre los 5 y 10 minutos después de la nebulización (muestras S5-S8). Aunque se obtuvo valores incontables durante los primeros 5 minutos de muestreo, que corresponden al tiempo de nebulización, lo que es justificable ya que la cantidad de bacteriófagos que se está dispersado en el aire es bastante alta. Es de gran importancia destacar que se obtuvo una reducción de más de 2 log del bacteriófago solo con un tiempo de exposición a la ionización bipolar de 10 min.

Respecto a las superficies analizadas muestreadas mediante hisopo, se obtuvo una reducción en el orden de 0,70-0,85 log ufp/cm². Al igual que en el ensayo control, no se encontró valores del bacteriófago en la columna de impactación ni en el área del retorno de aire.

7.4. Ensayo 4

No se ha obtenido resultados concluyentes sobre la eficacia de la ionización frente a la bacteria *Escherichia coli* ya que la metodología utilizada en el laboratorio no ha funcionado. Sería de interés volver a repetir este ensayo.

8. Declaración de conformidad (cuando proceda)

No aplica

9. Resumen, opiniones, interpretaciones

Se han realizado un total de 4 ensayos. Dos de ellos no han aportado ninguna conclusión (ensayos 1 y 4), siendo necesario la repetición de los mismos.

De los resultados obtenidos en los ensayos 2 y 3, se puede concluir que el sistema de ionización bipolar por plasma frío ha sido eficaz, en las condiciones testadas en esta habitación de hotel, para reducir aproximadamente 2 log la concentración del bacteriófago MS2 en el aire.



10. Anexos

10.1. Anexo 1. Bibliografía

- Adams M.H. Agar overlay methods for routine phage production. Interscience Publishers Inc., New York, 1959.
- American Type Culture Collection (ATCC) PO Box 1549. Manassas, VA 20108 USA. www.atcc.org.
- ASTM-1053:97. Actividad virocida para superficies inertes.
- Cormier J. and Janes M. A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS". J Virol Methods. 2014, 196:86-92.
- Joseph Sambrook and David W. Russell. Molecular Cloning a Laboratory Manual. (Third Edition). 2001 by Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. ISBN 0-87969-576-5 (cloth) -- ISBN 0-87969-577-3 (pbk).
- Laura S. and Jan Manchak, Microbiology (1998), 144: 2579-2587.
- O.M.S. en el "Manual de Bioseguridad" y también según la Directiva del Consejo 90/679/CEE, para la protección de los trabajadores expuestos a agentes biológicos.
- Orden de 18 de octubre de 1976 (M. Ind., B.O.E. 3.12.1976, rect. 23.2.1977), sobre Prevención y Corrección de la contaminación atmosférica de origen industrial.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- Real Decreto legislativo 1302/86 de 28.6, (M. Obras Púb., B.O.E. 30.6.1986) sobre Evaluación de impacto ambiental.
- UNE_EN 13610:2003. Ensayo cuantitativo para evaluación de la actividad viricida frente a bacteriofagos.
- UNE-EN ISO 10705-1. Calidad del agua. Detección y recuento de bacteriófagos. Parte 1: recuento de bacteriófagos ARN F específicos.
- UNE-EN 1040:2006 "Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos. Método de ensayo y requisitos (fase 1).

DR. MRCIA OLIVEIRA

Soğuk plazma bipolar iyonizasyon antiseptik aktivite değerlendirilmesi

SOLUCIONES DE AGUA Y AIRE TAYRA S.L.

21/05/2020



GİZLİLİK BİLDİRİM Bu belgede yer alan bilgiler ve beraberindeki veriler, yalnızca adreslendiği kişi veya kuruluşa yöneliktir ve gizli ve/veya ayrıcalıklı materyal içerebilir. Bu e-postanın hedeflenen alıcısı değilseniz, bu bilgilerin kullanılması veya herhangi bir bildirim, kopyalama veya dağıtım yasaktır ve yasa dışı olabilir. Bunu yanlışlıkla aldıınızsa, lütfen gönderenle iletişime geçiniz ve bu mesajın ve eklerinin ağl kopyalarını siliniz.

Original Document



USO OFICIAL

SECRETARÍA DE ESTADO DE DEFENSA
 INSTITUTO NACIONAL DE
 TÉCNICA AEROSPAZIAL
 SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SISTEMAS
 TERRESTRES

Nº expediente SDGSISTTER:		Nº Expediente Departamento:	
Código del documento:	Informe de ensayo nº NBQM2020_01		
Título del documento:	ENSAYOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD GERMICIDA DE LA IONIZACIÓN BIPOLAR POR PLASMA FRÍO		

Emisor del documento:

Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial
 Subdirección General de Sistemas Terrestres
 Departamento de Sistemas de Defensa NBQ
 Área de Defensa Biológica
 POC de la SDGSISTTER Tcol Juan Carlos Cabria Ramos



	Nombre / Responsabilidad	Firma	Fecha
Realizado por:	Dra Matilde Gil García Dra Marcia Oliveira Sousa	GIL GARCIA MATILDE 26214775L <i>Firmado digitalmente por GIL GARCIA MATILDE DE 26214775L Fecha: 2020.05.18 12:25:17 +02'00'</i>	<i>Juan Carlos Cabria Ramos</i>
Director Técnico:	Dra Paloma Lorenzo Lozano	P.A. GIL GARCIA MATILDE 26214775L <i>Firmado digitalmente por GIL GARCIA MATILDE DE 26214775L Fecha: 2020.05.18 12:25:45 +02'00'</i>	
Aprobado por:	Tcol Juan Carlos Cabria Ramos	CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z <i>Firmado digitalmente por CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z Fecha: 2020.05.18 11:53:59 +02'00'</i>	
Revisado por Calidad:	Responsable Calidad Departamento	P.A. CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z <i>Firmado digitalmente por CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z Fecha: 2020.05.18 11:54:30 +02'00'</i>	

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres.
 El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo

USO OFICIAL

Página 1 de 21

Ctra. M-301, km 10,5
 28330 San Martín de la Vega
 Madrid (ESPAÑA)
 TEL.: +34 91 174 21 98
 FAX: +34 91 174 21 35

INDEX

DİZİN

- 1.Amaç
- 2.Arka plan
- 3.Örnek tanımı ve dahil malzemeler
- 4.Prosedürler / Düzenlemeler
 - 4.1.Biyolojik materyal seçimi
 - 4.2.Kültür besiyerleri ve miyarlar
 - 4.3.Cihazlar
 - 4.4.Mikrobiyal kültürlerin hazırlanması
 - 4.5.Metodoloji
- 5.Deneme tatbik tarihleri
6. Örnekleme plan ve prosedürü (uygulamada)
- 7.Sonuçlar
 - 7.1.Deneme 1
 - 7.2.Deneme 2
 - 7.3.Deneme 3
 - 7.4.Deneme 4
- 8.Uygunluk Beyanı (uygulamada)
- 9.Özet, Görüşler, Yorumlar
- 10.Ekler
 - 10.1.Ek 1.Kaynakça
- 11.Gizlilik bildirim

1. Amaç

Bu raporun amacı, soğuk plazma bipolar iyonizasyon teknolojisinin iç ortamlarda (otel odası) uygulanan bakteriyofaj MS2 ve Escherichia coli'ye karşı mikrop öldürücü aktivitesini değerlendirmektir

2. Arka plan

30 Nisan 2020'de, Soluciones de Aire y Agua Tayra S.L. şirketi SDGSISTTER şirketinin NBQ Bölümünden, soğuk plazma bipolar iyonizasyon teknolojisinin iç ortamlardaki dekontaminasyon uygulamalarında mikrop öldürücü aktivitesini değerlendirmede farklı denemeler yapmak için destek sağlamasını istedi.

Projenin geliştirilmesi T4 havaalanı terminali B & B otelinin bir odasında gerçekleştirildi. Deneylerin yürütülmesi için, bakteriyofaj MS2, örneklerin daha sonra toplanması için oda içinde aerosol haline getirildi. Analizin geri kalanı INTA-Campus la Maraiosa, Madrid, İspanya Biyolojik Savunma laboratuvarında gerçekleştirildi.

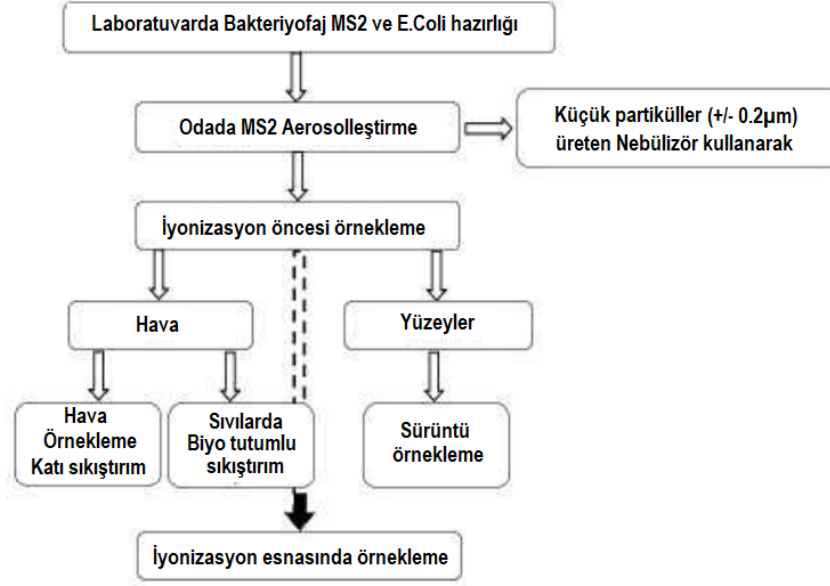
NBQ Departmanı Biyolojik Savunma Laboratuvarı, DSÖ'nün "Biyolojik Güvenlik El Kitabı" ndaki tavsiyeleriyle uyumlu risk grubu 2 veya daha düşük olan biyolojik ajanlarla çalışmak ve ayrıca Konsey Direktif 90/679 / EEC uyumlu biyolojik ajanlara maruz kalma ile ilgili çalışanların risklerden korunmak için gerekli koruyucu unsurlara, ekipmana ve prosedürlere sahiptir.

Biyolojik Savunma laboratuvarında görevli personel, biyolojik etkenleri güvenli bir şekilde kullanmalarını sağlayan kimyasal-biyolojik laboratuvarında risk önleme ile ilgili farklı kursları tamamlayarak eğitim ve yeterlilik planlaması almış; ayrıca biyolojik agresif ajanların tespiti ve teşhisi alanındaki faaliyetlerini geliştirmişlerdir.

Laboratuvarın ayrıca, uygun bir ayırma ve depolamaya izin veren, toksik ve tehlikeli atıkların yönetimi üzerine kurslar yoluyla personelin eğitimini içeren bir kimyasal ve biyolojik atık yönetim sistemi vardır. Atıkların bertarafı, 18 Ekim 1976 (BOE 3.12.1976, revise düzenlemeye) ve İspanya Kraliyet Yasama Kararnamesi 1302/86 28.6, (M. Bayındırlık, BOE 30.6.1986) çevresel etki değerlendirmesi hakkında göre çevre güvenliğini sağlama sertifikasına sahip yetkili şirketler tarafından gerçekleştirilir.

Plasma Air'in bipolar iyonizasyon teknolojisi, havaya bir elektrik alanı uygulayarak pozitif ve negatif iyonların üretilmesini içerir. İyonlar virüs zarına saldırarak RNA'larını oksidasyona maruz bırakarak inaktivasyonlarına neden olur. Farklı çalışmalar, virüsün hava yoluyla bulaşabildiğini ve iklimlendirme sistemlerinin virüsün yayılmasını destekleyebileceğini göstermiştir.

İkisi herhangi bir sonuç vermeyen ve birinin tekrarını gerektiren toplam 4 deneme gerçekleştirildi. Her bir deneme için deneysel tasarım ve sonuçları aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Genel olarak bu proje için hazırlanan deneysel tasarımıdır. Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. İyonizasyon projesi genel görünümü

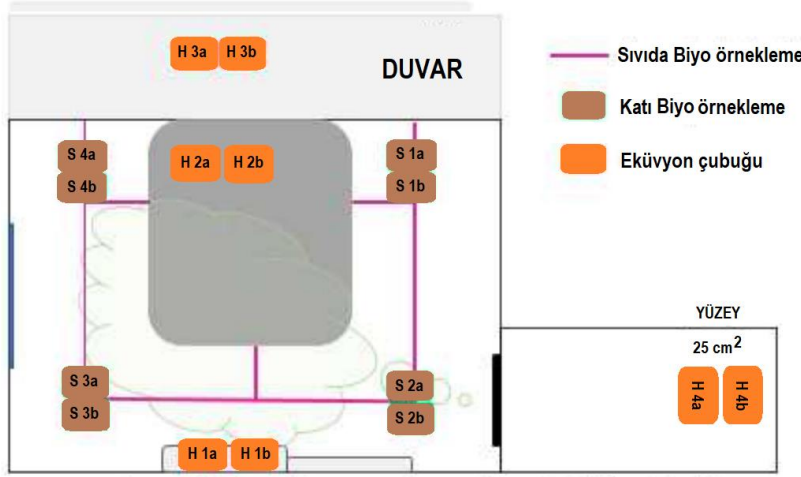
3. Örnek tanımı ve dahil malzemeler

Yapılan bütün denemelerde sıvı örnekler bir Biyo örnekleme şişesinde (Biyo tutumlu) sıvı besiyerlerde toplandı. Katı örnekler bir örnekleme şişesindeki (Hava Örnekleme) katı bir besiyerde toplanırken yüzey analizleri odanın farklı yerlerinden, farklı zamanlarda eküvyon çubuğu ile sürüntü örnekleri alınarak gerçekleştirildi. Aşağıdaki tablolar (Tablo I-Tablo IV) yapılan her bir denemede alınan örnekleri göstermektedir.

Tablo I: Deneme I' de toplanan örnekler (pozitif kontrol, MS2 bakteriyofaj test)

İç Tanım	Kod	Tanım	MIKTAR
NBQM2020_001	LA	Nebülizasyondan 5 dakika sonra yatak çevresinden sıvı besiyerli bir örnekleme şişesi (Biyo tutucu) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_002	LB	Nebülizasyondan 30 dakika sonra yatak çevresinden sıvı besiyerli bir örnekleme şişesi (Biyo tutucu) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_003	S1	Nebülizasyondan 5 dakika sonra pozisyon 1'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_004	S2	Nebülizasyondan 5 dakika sonra pozisyon 2'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_005	S3	Nebülizasyondan 5 dakika sonra pozisyon 3'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_006	S4	Nebülizasyondan 5 dakika sonra pozisyon 4'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_007	S5	Nebülizasyondan 30 dakika sonra pozisyon 1'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_008	S6	Nebülizasyondan 30 dakika sonra pozisyon 2'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_009	S7	Nebülizasyondan 30 dakika sonra pozisyon 3'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_010	S8	Nebülizasyondan 30 dakika sonra pozisyon 4'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_011	H1A	Nebülizasyondan 5 dakika sonra eküvyon çubuğu ile masadan sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_012	H1B	Nebülizasyondan 30 dakika sonra eküvyon çubuğu ile masadan sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_013	H2A	Nebülizasyondan 5 dakika sonra eküvyon çubuğu ile manken maskesinden sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_014	H2B	Nebülizasyondan 30 dakika sonra eküvyon çubuğu ile manken maskesinden sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_015	H3A	Nebülizasyondan 5 dakika sonra eküvyon çubuğu ile yatak arkası duvardan sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_016	H3B	Nebülizasyondan 30 dakika sonra eküvyon çubuğu ile yatak arkası duvardan sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_017	H4A	Nebülizasyondan 5 dakika sonra eküvyon çubuğu ile havanın geri dönüşte yaladığı yerden sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_018	H4B	Nebülizasyondan 5 dakika sonra eküvyon çubuğu ile havanın geri dönüşte yaladığı yerden sürüntü yüzey örneği alındı.	1

Şekil 2.Oda çizimi ve Deneme I örnekleme noktalarını göstermektedir.



Şekil 2.Oda çizimi ve Deneme I örnekleme noktaları

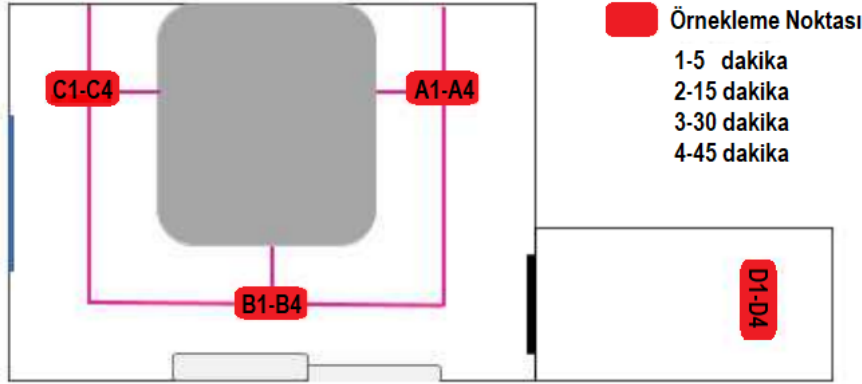
Tablo II. Deneme 2 örnek toplama (pozitif kontrol, değişen pozisyonlar ve örnek toplama süresi
Deneme 1 ile uyumlu, MS2 bakteriyofaj testi)

İç Tanım	Kod	Tanım	MİKTAR
NBQM2020_019	LA	Nebülizasyondan 5 dakika sonra yatak çevresinden sıvı besiyerli bir örnekleme şişesi (Biyο tutucu) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_020	LB	Nebülizasyondan 5 dakika sonra yatak çevresinden sıvı besiyerli bir örnekleme şişesi (Biyο tutucu) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_021	S1	Nebülizasyondan 0 dakika sonra pozisyon 1'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_022	S2	Nebülizasyondan 1,4 dakika sonra pozisyon 2'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_023	S3	Nebülizasyondan 2,8 dakika sonra pozisyon 3'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_024	S4	Nebülizasyondan 4,2 dakika sonra pozisyon 4'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_025	S5	Nebülizasyondan 5,6 dakika sonra pozisyon 1'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_026	S6	Nebülizasyondan 7 dakika sonra pozisyon 2'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_027	S7	Nebülizasyondan 8,4 dakika sonra pozisyon 3'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_028	S8	Nebülizasyondan 9,8 dakika sonra pozisyon 4'den katı besiyerli bir örnekleme şişesi (Hava Örnekleme) kullanarak hava örneği alındı	1
NBQM2020_029	H1	Nebülizasyondan 10 dakika sonra eküvyon çubuğu ile masadan sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_030	H2	Nebülizasyondan 10 dakika sonra eküvyon çubuğu ile manken maskesinden sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_031	H3	Nebülizasyondan 10 dakika sonra eküvyon çubuğu ile yataktan sonra sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_032	H4	Nebülizasyondan 30 dakika sonra eküvyon çubuğu ile manken maskesinden ELP1+ cihazıyla sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_033	H5	Nebülizasyondan 10 dakika sonra eküvyon çubuğu ile havanın geri dönüşte yaladığı yerden sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_034	H6	Nebülizasyondan 10 dakika sonra eküvyon çubuğu ile ELP1+ cihazı kullanarak örnekleme şişesi sütününden partikül boyutu tespiti için sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_035	H7	Nebülizasyondan 10 dakika sonra eküvyon çubuğu ile ELP1+ cihazı kullanarak örnekleme şişesi sütününden partikül boyutu tespiti için sürüntü yüzey örneği alındı.	1
NBQM2020_036	H8	Nebülizasyondan 10 dakika sonra eküvyon çubuğu ile ELP1+ cihazı kullanarak örnekleme şişesi sütününden partikül boyutu tespiti için sürüntü yüzey örneği alındı.	1

Tablo IV. Deneme 4 örnek toplama (Soğuk plazma bipolar iyonizasyon teknoloji uygulamalı dekontaminasyon testi, E.coli testi)

İç Tanım	Kod	Tanım	MİKTAR
NBQM2020_055	SA1	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sağ tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 5 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_056	SA2	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sağ tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 15 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_057	SA3	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sağ tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 30 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_058	SA4	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sağ tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 45 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_059	SB1	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın ön tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 5 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_060	SB2	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın ön tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 15 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_061	SB3	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın ön tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 30 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_062	SB4	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın ön tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 45 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_063	SC1	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sol tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 5 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_064	SC2	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sol tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 15 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_065	SC3	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sol tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 30 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_066	SC4	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sol tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 45 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_067	SD1	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, havanın geri dönüşte yaladığı yerden ve iyonizasyona maruz kaldıktan 5 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_068	SD2	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, havanın geri dönüşte yaladığı yerden ve iyonizasyona maruz kaldıktan 15 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_069	SD3	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, havanın geri dönüşte yaladığı yerden ve iyonizasyona maruz kaldıktan 30 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_070	SD4	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, havanın geri dönüşte yaladığı yerden ve iyonizasyona maruz kaldıktan 45 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_071	A1	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sağ tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 5 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_072	A2	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sağ tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 15 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_073	A3	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sağ tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 30 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_074	A4	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sağ tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 45 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_075	B1	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın ön tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 5 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_076	B2	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın ön tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 15 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_077	B3	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın ön tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 30 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_078	B4	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın ön tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 45 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_079	C1	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sol tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 5 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_080	C2	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sol tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 15 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_081	C3	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sol tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 30 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_082	C4	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, yatağın sol tarafında ve iyonizasyona maruz kaldıktan 45 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_083	D1	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, havanın geri dönüşte yaladığı yerden ve iyonizasyona maruz kaldıktan 5 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_084	D2	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, havanın geri dönüşte yaladığı yerden ve iyonizasyona maruz kaldıktan 15 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_085	D3	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, havanın geri dönüşte yaladığı yerden ve iyonizasyona maruz kaldıktan 30 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1
NBQM2020_086	D4	E. coli ile 10 ⁴ ufc / ml'de aşılansmış, havanın geri dönüşte yaladığı yerden ve iyonizasyona maruz kaldıktan 45 dakika sonra alınan LBA içeren petri kabı	1

Şekil 4.Oda çizimi ve Deneme 4 örnekleme noktalarını göstermektedir.



Şekil 4.Oda çizimi ve Deneme 4 örnekleme noktaları

4.Prosedürler / Düzenlemeler.

Teknolojinin virüsidal aktivitesini değerlendirmek için, bakteriyofaj enfektivitesinin azalması, dekontaminasyon işleminden önce ve sonra viral titrelerin (liziz plak oluşturan birimler) logaritmasındaki farklılıklardan hesaplandı. Bu, bakteriyofaj bir konakçı hücreyi enfekte ettiğinde, uygun bir suştan çok çeşitli boyut ve morfolojiye sahip liziz plakalarının üretildiği ve bunların saptanmasına ve sayımına izin verildiği dikkate alınarak çift katmanlı agar yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (UNE EN ISO 10705 -1).

Teknolojinin bakterisidal aktivitesi, bakteri konsantrasyonunun logaritmalarındaki fark (mililitre başına koloni oluşturan birimler (cfu / mL), LBA plakalarını seri seyreltmeyle kaplayarak ve her birindeki cfu sayısını doğrudan sayarak, dekontaminasyon işleminden önce ve sonra bakteri canlılığındaki azalma hesabı değerlendirildi. Ayrıca, pozitif bir kontrole göre (dekontaminasyona tabi olmaksızın) dekontaminasyon sistemine enjekte edilen plakalarda bakteri üremesinin varlığına veya yokluğuna dayalı olarak aktivite niteliksel olarak da değerlendirildi.

4.1. Biyolojik Materyal seçimi

Bu çalışmayı gerçekleştirmek için, bakteriyofaj MS2 ve bakteri Escherichia Coli ATCC 15597 seçildi, her ikisi de biyolojik risk 1 grubuna (birey ve toplum için risk yok veya çok düşük risk) (İspanyol Kraliyet Kararnamesi 664/1997). Tahlillerde kullanılan tüm mikroorganizmalar, standart kültürlerin bir derlemesidir, genetik ve fizikolojik aktiviteleri en aza indirilmiştir ve böylece potansiyel mutasyonları önlenmiştir.

Bakteriyofaj MS2, pozitif anlamda tek sarmallı RNA genomuna, ikosahedral kapsid simetrisine sahiptir ve Escherichia Coli bakterisini ve Enterobacteriaceae ailesinin diğer üyelerini enfekte eder. MS2, f2 ve R17 bakteriyofajları dahil olmak üzere yakından ilişkili bir bakteri virüs ailesinin bir üyesidir. MS2, viral bir reseptör olarak görev yapan bir "pili" yi kodlayan doğurganlık faktörü (F) taşıyan enterik bakterileri enfekte eder. MS2, benzer olgunlaşan proteini yoluyla "piliye" bağlanır. Faj konakçı hücreleri, virali partiküllerinin replikasyonu ve kapsüllenmesinden sonra lize edilir (yok edilir), böylece yeni virüsler, çok çeşitli boyut ve morfolojiye sahip liziz plakaları üreterek yeni bir enfeksiyon gerçekleştirmekte serbesttir.

Bakteriyofaj MS2 kurumaya karşı çok dirençlidir, bu nedenle dekontaminantları değerlendirmek için farklı testlerde kullanılmıştır. "Gıda ve endüstriyel alanlarda kullanılan kimyasal dezenfektanların bakteriyofajlarına karşı virüsidal aktivite maddesinin değerlendirilmesi için niteliksel süspansiyon testleri" (UNE EN 13610: 2003). Kötü amaçlı çevresel yüzeyler için amaçlanan virüsidal ajanların "çevresel yüzeyleri yok etme etkinliği" (ASTM-1053) : 97)

Escherichia coli, Enterobacteriaceae ailesine aittir ve insanlar gibi homeotermik hayvanların gastrointestinal mikrobiyotasının bir parçasıdır. Doğurganlık faktörü (F) taşıyan enterik bakterileri enfekte eden bakteriyofaj MS2'nin konağıdır. Dekontaminasyon etkinliğini değerlendirmek için birçok testte kullanılmıştır: Kimyasal bakteriyofajlara karşı virüsidal aktivitenin değerlendirilmesi için kantitatif süspansiyon testleri gıda ve endüstriyel alanlarda kullanılan dezenfektanlar "(UNE EN 13610: 2003)." Virüsidal ajanların etkinliği cansız çevresel yüzeyler için" (ASTM-I053: 97).

Bu tahliller için, mikrop öldürücü aktivite, 4 ° C'de saklanan % 0.3 kloroform içinde bakteriyofaj MS2 ATCC 15597 B1 ve test mikroorganizmaları olarak -80 °C'de % 15 gliserol içinde korunan Escherichia coli ATCC 15597 kullanılarak değerlendirildi (şekil 5).

Escherichia Coli (Migula) Castellani ve Chalmers (ATCC® 15597™)

ATCC Numarası: 15597™

Yük tasarımı: C-3000

Yük tipi: yok

Biyo güvenlik seviyesi: 1

Ürün formatı: kuru dondurulmuş

Escherichia Coli bakteriyofaj MS2 (ATCC® 15597-B1™)

ATCC Numarası: 15597-B1™

MS2 olarak tutuldu

Yük tasarımı:MS2

Yük tipi: yok

Biyo güvenlik seviyesi: 1

Ürün formatı: kuru dondurulmuş

Şekil 5. Kullanılan mikroorganizmaların detaylı nitelikleri

4.2. Kültür ortamı ve reaktifler

Besiyerlerin hazırlanması ve sonuçların tekdüzeliği için laboratuvar analitik kalitede tanınan kimyasallar veya tamamen susuz bir besiyer kullandı. Yalnızca damıtılmış su veya eşdeğer saflıkta su kullanıldı.

Kullanılan kültür besiyerleri şunlardı;

Luria Bertani Agar (IBA)

Formül (g / L):

Tripton 10,0

Maya Ekstresi 5,0

Sodyum klorit 10,0

Ağar 15,0

Nihai pH: 7,3 ± 0,2; 15 dakika 121 ± 3 °C'de otoklavlandı.

Luria Bertani Agar Yarı katı (LBAss)

Formül (g / L):

Tripton 10,0

Maya Ekstresi 5,0

Sodyum klorit 10,0

Ağar 6,0

Nihai pH: 7,3 ± 0,2; 15 dakika 121 ± 3 °C'de otoklavlandı.

Luria Bertani Broth (LB)

Formül (g / L):

Tripton	10,0
Maya Ekstresi	5,0
Sodyum klorit	10,0

Nihai pH: 7,3 ± 0,2; 15 dakika 121 ± 3 °C'de otoklavlandı.

Solusyon SM

Formül (g / L):

Sodyum klorit	5,8
Magnezyum sulfat	2,0

5 mL Tris-Cl 1M (pH 7,3 ± 0,2) eklenir ve 0,2 µm membran kullanılarak süzülür.

Tampo Tris-Mg-Ca

10mM	Tris-HCl
10mM	MgSO ₄
5mM	CaCl ₂

Nihai pH: 7,3 ± 0,2; ve 0,2 µm membran kullanılarak steril edilir.

Sodyum klorit	0,5
---------------	-----

Formül (g / 100L):

MgSO ₄	24,6
-------------------	------

0,2 µm membran kullanılarak steril edilir.

Tris-HCl	0,5 M
----------	-------

Formül (g / 500L):

Tris	60,57 g
------	---------

400 mL distile suya 60, 57 g Tris bazı ekleyin ve HCl kullanarak pH'ı 7,5'e ayarlayın. Birimi tamamla

500 mL distile su ile hacmi tamamlayın. Nihai pH: 7,3 ± 0,2; 15 dakika 121 ± 3 °C'de otoklavlandı.

Fosfat Tamponlu Salin (PBS) 1X

Formül (g / L):

Sodyum klorit	10,0 g
Potasyum klorür	0,25 g
Disodyum Hidrojen Fosfat	1,12 g
Potasyum fosfat	0,25 g

Nihai pH: 7,3 ± 0,2; ve 0,2 µm membran kullanılarak steril edilir.

Mikroorganizmalar

Testler için, SM'de bir bakteriyofaj MS2 ATCC 15597-B1 süspansiyonu ve üstel faza büyütülmüş bir Escherichia coli ATCC 15597 kültürü kullanılmıştır.

4.3. Ekipman

36 ± 2 ° C'de inkübatör

36 ± 2 ° C'de çalkalamalı inkübatör

pH ölçer

McFarland dansitometresi

Girdap

Su banyosu

Biyogüvenlik kabini seviye II

Petri kapları

Kültür tüpleri

5 ± 3 ° C'de buzdolabı

Dondurucu -70 ± 10 ° C'de

Mikropipetler ve ipuçları

Steril bezler

Nebulizatör

INTA'dan ELPI + cihazı örnekleme şişesi sütunu

Aerosollerı sıvıda tutan biyo örnekleyci (Biocapture)

Aerosollerı katıda tutan biyo örnekleyci (AirSampler)

Soğuk plazma bipolar iyonizasyon cihazı (PlasmaAir)

4.4. Mikrobiyal kültürlerin hazırlanması

UNE EN ISO 10705-1'de açıklanan talimatlara göre hazırlanan % 0.3 kloroform içinde 4 °C'de saklanan bir bakteriyofaj süspansiyonu ve % 15 gliserol içinde -80 °C'de saklanan bir Escherichia coli süspansiyonu kullanıldı. Testlere başlamadan önce bakteriyofajın viral titresi hesaplandı. Viral titreyi belirlemek için 20 ± 2 mL LB besiyeri 50 mL kapasiteli bir şişeye eklenmiş, önceden 37 °C'ye ısıtılmış ve 200 µL Escherichia coli ile gece boyunca büyütülmüş (aşılama 1: 100) ve ardından 37 ± 2 ° C'de 3 ± 1 saat boyunca hafifçe çalkalama (150 rpm) ile üssel büyüme fazına ulaşılan kadar inkübasyona (yaklaşık 10⁸ cfu / mL) tabi tutulmuştur. Büyümeyi kontrol etmek için bakteri kültürünün bulanıklığı McFarland yöntemini kullanarak her gün 30 dakika, teorik McFarland birimlerine karşılık gelen cfu ekstrapole ederek (Tablo V) ölçüldü.

Tablo V. Bakteri konsantrasyonu ile teorik McFarland birimleri arasındaki korelasyon.

E.Coli konsantrasyonu x 10 ⁸ cfu / mL	McFarland birimleri
1,5	0,5
3	1
6	2
9	3
12	4
15	5
18	6
21	7

Bakteri kültürü üstel büyüme fazına ulaştığında, şişenin buzlu bir kaba aktarılmasıyla hızla soğutuldu. % 0.3 kloroform varlığında 4 °C'de saklanan bir faj süspansiyonundan 50 µL Tris-Mg-Ca tamponuna 4,50 µL ilave edilerek seri seyreltmeler yapıldı. Her seyreltmenin 120 µL'si, çift olarak üslü faza büyütülen 120 µL konakçı suş ile karıştırıldı. Karışım, bakteriyofajın konakçı hücrelere bağlanması için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

Daha sonra 200 µL bakteriyofaj / konakçı hücre karışımı alındı ve 3 mL önceden ısıtılmış LBAss ortamı (48 °C'de) içeren bir tüpe eklendi. Tersine çevirerek dikkatlice karıştırıldıktan sonra içerikler LBA içeren Petri kabının yüzeyine döküldü. Petri kaplarının katılaşmasına izin verildi ve 36 ± 2 °C'de 18 ± 2 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresinden sonra, aşağıdaki formül uygulanarak lizis veya Viral plakların sayısı belirlendi:

$$\text{titre} = \left(\frac{N}{d} \right) \times 10 \text{ pfu/mL}$$

$$N = \frac{(n1 + 0,1n2)}{2}$$

n 1: Sayılabilen en yüksek seyreltmede plak sayısı

n 2: Sayılabilecek en yüksek seviyeden önce seyreltmedeki plak sayısı

d: Sayılabilecek en yüksek seyreltme

Deneme 2 ve 3'te nebulizasyon için kullanılan ilk bakteriyofaj süspansiyonunun viral titresini şunlardı:

Deneme 2 (pozitif kontrol): 2.25x10⁵ pfu/mL.

Deneme 3 (iyonizasyon testi): 2.47x10⁵ pfu/mL.

Bakteri kültürlerindeki canlı cfu / mL sayısını ölçmek için, kültürün seri seyreltmeleri hazırlanmıştır. 900 µL PBS tamponuna 100 µl kültür eklenerek ve her seyreltmeden 100 µl LBA ortamına iki kez ve 36 ± 2 °C'de 20 ± 4 saat inkübasyonun ardından aşılacaktır. İnkübasyon süresinden sonra, canlı bakteri sayısı, LBA plakaları üzerindeki kolonilerin doğrudan sayılmasıyla ölçüldü. cfu/ mL'yi hesaplamak için aşağıdaki denklem uygulandı:

$$N = \frac{c}{(n1 + 0,1n2)} \times 10$$

c: sayılabilen tüm plakalarda sayılan kolonilerin toplamı.

n1: en düşük seyreltmede sayılan plakaların sayısı.

n2: en yüksek seyreltmede sayılan plakaların sayısı.

d: en düşük seyreltmeye karşılık gelen seyreltme faktörü

4.5. Metodoloji

Bakteriyofaj MS2 ile yapılan denemeler için, aerosolü oluşturmak ve bunu, katı ve sıvı ortamda örnekleyerek hava numunelerinin toplanması için test odasına ve çubuklar kullanılarak yüzeylere yaymak üzere SM tamponu içinde 500 ml bir bakteriyofaj süspansiyonu hazırlandı.

Eküvyon örneklerinden bakteriyofajı geri kazanmak için, eküvyon çubuklarından her birini içeren steril tüpe 2 mL SM solüsyonu ilave edildi ve 4 °C'de 1 saat çalkalandı. Yıkama sıvısı, mikrobiyal analiz yapılmaya kadar 4 °C'de tutulan steril bir tüpte toplandı.

Bölüm 4.4'te açıklanan prosedürü takiben, eküvyon çubuklarından ve ayrıca hava sıvısı örneklerinden geri kazanılan bakteriyofaj süspansiyonundan seri seyreltmeler yapılmıştır. İnkübasyondan sonra, plakların sayısı sayılabilecek en yüksek seyreltmede ve hemen öncekinde denklem 1 kullanılarak belirlendi.

Katı besiyerinde çarpma yoluyla toplanan numuneler doğrudan 36 ± 20 'de (18 ± 2 saat) inkübe edildi. Deneme 1 için üslü fazda $100 \mu\text{L}$ 'lik E. coli'nin yayılmış aşılmasından oluşan katı besiyer ve E. coli'nin üssel fazdaki $200 \mu\text{L}$ aşılması, önceden ısıtılmış LBAss besiyeri (48°C) içeren 4 mL 'lik bir tüpe eklenir; bu, ters çevirme yoluyla dikkatlice karıştırılır ve deney 2 ve 3 için bir Petri kabının yüzeyine LBA besiyeri ile dökülür.

Deneme 4, çift kutuplu iyonizasyonun aşılınmış katı ve sıvı kültürlerle üslü fazda E. coli ile doğrudan uygulanmasıyla gerçekleştirildi.

İşlemden sonra katı numuneler doğrudan $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 18 ± 2 saat inkübe edildi. Sıvı numunelerden seri dilüsyonlar, bölüm 4.4'te açıklanan işlem izlenerek hazırlandı. İnkübasyondan sonra, canlı bakteri sayısı, LBA plakaları üzerindeki kolonilerin doğrudan sayılmasıyla ölçüldü. Denklem 2, cfu/mL sayısını hesaplamak için uygulandı.

5. Deneme yürütme tarihleri

Projenin tamamı 4 ile 14 Mayıs 2020 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

6. Numune alma planı veya prosedürü (uygulanabilir olduğunda)

Uygulanamaz.

7. Sonuçlar

Her denemede elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir:

7.1. Deneme 1

Bu deneme bipolar iyonizasyon uygulanmadığı için pozitif kontrol olarak adlandırıldı.

Tüm yüzeylerde ve yüzeylerde önemli bir bakteriyofaj sayısı elde edilmemiştir. Dahası, katı besiyerle kullanılarak yapılan biyo örnekleme metodoloji işe yaramadı.

Pozitif kontrolün deneysel tasarımdaki değişikliklerle başka bir tekrarı, bipolar iyonizasyon deneyi ile karşılaştırmaya izin vermek için önerildi.

7.2. Deneme 2

Bu deneme, önceki pozitif kontrolün (deneme 1) tekrarıydı. İlk deneme havadaki bakteriyofajın düşük konsantrasyonunu gösterdiğinden, katı besiyerle biyo örnekleme tekniğinin yanı sıra örnekleme alanlarında ve zamanında bazı değişiklikler yapıldı.

Nebulizasyon için kullanılan solüsyondaki bakteriyofajın konsantrasyonu $2,25 \times 10^5$ pfu/mt idi. Kontrol denemesinde elde edilen sonuçlar Tablo VI'da gösterilmektedir.

Tablo VI. Oda Kontrol denemesinden elde edilen sonuçlar (Deneme 2)

Sıvıda Biyo Örnekleyici Numuneleri	Sayım (log pfu/mL)
LA – zaman noktası 1 (nebülizasyon süresinde 5 dak örnekleme)	4,16
LB – zaman noktası 2 (nebülizasyon süresinde 5 dak örnekleme)	3,46
Katıda Biyo Örnekleyici Numuneleri	Sayım (log pfu/mL)
S1 – dakika 0	(>265 pfu) - >4,21
S2 – dakika 1,4	(>265 pfu) - >4,21
S3 – dakika 2,8	(>265 pfu) - >4,21
S4 – dakika 4,2	(>265 pfu) - >4,21
S5 – dakika 5,6	(>265 pfu) - >4,21
S6 – dakika 7	(>265 pfu) - >4,21
S7 – dakika 8,4	(>265 pfu) - >4,21
S8 – dakika 9,8	(>265 pfu) - >4,21
Yüzey Örnekleme	Sayım (log pfu/mL)
H1 – tablo	1,60
H2 – maske	1,48
H3 – ELP1 + cihaz (INTA)	1,18
H4 – hava dönüş alanı	0
H5 - ELP1 örnekleme şişe kolonu + cihaz	0
H6 - ELP1 örnekleme şişe kolonu + cihaz	0
H7 - ELP1 örnekleme şişe kolonu + cihaz	0
H8 - ELP1 örnekleme şişe kolonu + cihaz	0,49

Sıvı biyo-örnekleyici ile örnekleme zamanı 1’de (nebülizasyon sırasında 5 dakikalık örnekleme) ve örnekleme zamanı 2’de (nebülizasyondan sonra 5 dakikalık örnekleme) bakteriyofaj konsantrasyonunda bir azalma gözlenmiştir.

Muhtemel sebep, virüs parçacıklarının büyük su parçacıklarıyla temas ettiğinde yere inmesidir. Canlı, örnekleme şişe kolonu örneklerinde bakteriyofaj değerleri bulsaydı, bu durum doğru olacaktır. Bakteriyofajın hangi partikül boyutunda bulunabileceğini görselleştirebilmek için örnekleme şişe kolonundan daha fazla yüzey örneği almak gerekli olacaktır.

Katı biyo-örnekleyiciden alınan örneklerle ilgili olarak, 1000 bakteriyofaj partikülünden daha büyük sayılara karşılık gelen sayılamayan değerler elde edildi. Kullanılan ekipman, Petri kabı başına toplam partikül sayısının ayarlanmasını gerektirdiğinden, maksimum sayı 265 pfu/L olarak saptandı. Bu verilerin dönüşümü bizi ortalama 4,21 log pfu / L'ye götürür.

Eküvyon çubuğu ile numune alınan yüzeylerde 1-1.6 log pfu/cm² düzeyinde sonuç elde edilmiştir. Daha önce bahsedildiği gibi, örnekleme şişe kolonunda hiçbir bakteriyofaj değeri bulunamamıştır ve hava dönüş alanı alanında da aynıdır.

7.3. Deneme 3

Bu deneme, deneme 2 (pozitif kontrol) ile aynı şekilde ve oda havasını işlemek için bipolar iyonizasyon teknolojisi uygulanarak gerçekleştirildi.

Nebulizasyon için kullanılan solüsyondaki bakteriyofaj konsantrasyonu 2.47x10⁵ pfu / ml idi.

Bu denemede elde edilen sonuçlar Tablo VII'de gösterilmektedir.

Tablo VII. Oda Kontrol denemesinden elde edilen sonuçlar (Deneme 3)

Sıvıda Biyo Örnekleyici Numuneleri	Sayım (log pfu/mL)
LA – zaman noktası 1 (nebulizasyon süresinde 5 dak örnekleme)	4,00
LB – zaman noktası 2 (nebulizasyon süresinde 5 dak örnekleme)	3,04
Katıda Biyo Örnekleyici Numuneleri	Sayım (log pfu/mL)
S1 – dakika 0	(>265 pfu) - >4,21
S2 – dakika 1,4	(>265 pfu) - >4,21
S3 – dakika 2,8	(>265 pfu) - >4,21
S4 – dakika 4,2	(>265 pfu) - >4,21
S5 – dakika 5,6	(>97 pfu) - >3,08
S6 – dakika 7	(>57 pfu) - >2,81
S7 – dakika 8,4	(>61 pfu) - >2,84
S8 – dakika 9,8	(>38 pfu) - >2,61
Yüzey Örnekleme	Sayım (log pfu/mL)
H1 – tablo	0,75
H2 – maske	0,80
H3 – ELP1 + cihaz (INTA)	0,52
H4 – hava dönüş alanı	0
H5 - ELP1 örnekleme şişe kolonu + cihaz	0
H6 - ELP1 örnekleme şişe kolonu + cihaz	0
H7 - ELP1 örnekleme şişe kolonu + cihaz	0
H8 - ELP1 örnekleme şişe kolonu + cihaz	0,23

Sıvıda biyo-örnekleyici ile örneklemede, kontrol denemesine (deneme 2) kıyasla), zaman noktası 1. (nebulizasyon sırasında 5 dakikalık örnekleme) ve zaman noktası2. (nebulizasyondan sonra 5 dakikalık örnekleme) arasında bakteriyofaj konsantrasyonunda hafif bir azalma gözlemlenebildi. Bu azalma önemli değildi.

Katı biyo-örnekleyici ile örneklemede, havada dağılan bakteriyofaj miktarı oldukça yüksek olduğundan, nebulizasyon süresine karşılık gelen ilk 5 dakikalık örnekleme sırasında sayılamayan değerler elde edilmiştir. Ek olarak, nebulizasyondan 5 ila 10 dakika sonra toplanan örneklerde önemli bir azalma gözlemlendi (örnekler. S5-S8). Bakteriyofajın 2 log'luk bir azalmasının yalnızca 10 dakikalık bir bipolar iyonizasyona maruz kalınması süresinde elde edildiğini vurgulamak büyük önem taşımaktadır.

Eküvyon çubuğu ile örnekleme ile analiz edilen yüzeylerde 0.70 - 0.85 log pfu / cm² düzeyinde bir azalma gözlemlenmiştir. Kontrol denemesinde olduğu gibi, örnekleme şişesi kolonunda veya hava dönüş alanı hiçbir bakteriyofaj değeri bulunamadı.

7.4. Deneme 4

Laboratuvarda kullanılan metodoloji işe yaramadığından, E. coli'ye karşı iyonizasyonun etkinliği konusunda kesin sonuç elde edilmemiştir. Bu işlemi tekrarlamak ilginç olacaktır.

8. Uygunluk beyanı (uygun olduğunda)

Burada tatbik edilemez

9. Özet, görüşler, yorumlar

Toplam 4 deneme yapıldı. Bunlardan ikisi herhangi bir sonuca (Deneme 1 ve 4) katkıda bulunmadı ve tekrarlanmalarını gerektirdi.

Deneme 2 ve 3'te elde edilen sonuçlardan, soğuk plazma bipolar iyonizasyon sisteminin havadaki bakteriyofaj MS2 konsantrasyonunu bu otel odasında test edilen koşullar altında yaklaşık 2 log birim azaltmada etkili olduğu sonucuna varılabilir.

10. Ek

10.1. Kaynakça

- Adams M.H. Agar overlay methods for routine phage production. Interscience Publishers inc., New York, .1959.
- American Type Culture Collection (ATCC) PO Box 1549. Manassas, VA 20108 USA. www.atcc.org
- ASTM-1053;97. Actividad viroclida para superficies inertes.
- Cormier J. and Janes M. A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS". J Virol Methods. 2014, 196:86-92,
- Joseph Sambrook and David W. Russell. Molecular Cloning a laboratory Manual. (Third Edition). 2001 by Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. ISBN 0-87969-576-5 (cloth) .-, ISBN 0-87969-577-3 (pbk). Laura S. and Jan Manchak, Microbiology (1998). 144: 2579-2587.
- O.M.S. en el "Manual de Blosegundad" y tambien segun la Directiva del Consejo 90/679/CEE, para la proteccion de 105 trabajadores expuestos a agentes biologicos.
- Orden de 18 de octubre de 1976 (M. Ind., B.O.E. 3.12.1976, recto 23.2.1977), sobre Prevencion y Correccion de fa contaminacion atmosferica de origen industrial.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mavo, sobre 13 proteccion de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposicion a agentes biologicos durante el trabajo.
- Real Decreta legislativo 1302/86 de 28.6, (M. obras Pub., B.O.E. 30.6.1986) sobre Evaluacion de impacto ambiental.
- UNE_EN 13610:2003. Ensayo cuantitativo para evaluacion de la actividad viricida frente a bacteriofagos.
- UNE-EN ISO 10705-1. Calidad del agua. Deteccion y recuento de bacteriofagos, Parte 1: recuento de bactertotagos ARN F especificos.
- UNE-EN 1040:2006 "Antisepticos y desinfectantes quimicos. Ensayo cuantitativo de suspension para la evaluacion de la actividad bactericida basica de tos antisepticos y desinlectantes quimicos. Metodo de ensavo y requisitos (fase 1).

11. GİZLİLİK BİLDİRİM

Bu belgede yer alan bilgiler ve beraberindeki veriler, yalnızca adreslendiği kişi veya kuruluşa yöneliktir ve gizli ve/veya ayrıcalıklı materyal içerebilir. Bu e-postanın hedeflenen alıcısı değilseniz, bu bilgilerin kullanılması veya herhangi bir bildirimini, kopyalama veya dağıtım yasaktır ve yasa dışı olabilir. Bunu yanlışlıkla aldınızsa, lütfen gönderenle iletişime geçiniz ve bu mesajın ve eklerinin afl kopyalarını siliniz.