

Warschau, 21.02.2020

BERICHT ÜBER DIE UNTERSUCHUNG ZUR ANTIBAKTERIELLEN AKTIVITÄT

Der Auftraggeber	Narine Michał Toczyłowski ul. Świeradowska 47 02-662 Warschau
Untersuchtes Produkt	Narine
Datum der Lieferung an das Labor	21.01.2020
Informationen über das untersuchte Produkt: - Zusammensetzung (aktive Substanz)	Keine Informationen.
- Verpackung	Einzelverpackung: Äußere Verpackung aus Aluminium, innendrin das Produkt (20 g) in einem hermetisch verschlossenen Plastikbeutel; es wurden 7 Verpackungen geliefert – Bild 1 (im Anhang Nr. 1).
- Merkmale nach Angaben vom Auftraggeber	Steriles Produkt. Verdünnungsmittel: Wasser.
- Aussehen	Gelbe, faserige, trockene Substanz, ohne charakteristischen Geruch
- Lagerungsbedingungen	Bei Raumtemperatur.
- Zweck/Verwendung des Produkts	Keine Informationen.
Getestete Produktkonzentrationen	2.5%, 5%, 7.5%, 10%
Forschungsmethodik	Benutzerdefinierte Methodik: - Zuchtmethode in einem flüssigen Medium; - Well-Diffusions-Methode.
Prüfdatum	06.02.2020 – 20.02.2020
Verantwortliche Person für die Durchführung der Untersuchung	Dr. Dorota Chrobak-Chmiel
Person, die die Untersuchungsergebnisse bestätigt hat	Dr. hab. Magdalena Rzewuska, Universitätsprofessorin

1. Beschreibung der Methodik

1.1. Geprüfte Bakterienstämme:

1. Escherichia coli ATCC 25922
2. Salmonella Typhimurium ATCC 14028
3. Klebsiella pneumoniae – klinisches Isolat vom Hund
4. Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
5. Pasteurella multocida – - klinisches Isolat von Rindern
6. Mannheimia haemolytica ATCC 33396
7. Campylobacter jejuni ATCC BAA2151
8. Staphylococcus aureus ATCC 25923
9. Streptococcus agalactiae - klinisches Isolat von Rindern
10. Streptococcus equi subsp. zooepidemicus ATCC 43079
11. Trueperella pyogenes ATCC 19411
12. Bacillus cereus – Umwelt-Isolat

1.2. Zuchtmethode in einem flüssigen Substrat

Das bakterielle Inokulum wurde durch Suspension von Bakterien (gezüchtet auf festem Substrat Columbia-Agar mit Blut) in steriler physiologischer Lösung hergestellt, so dass die Suspensionsdichte nach MacFarlands Standard 0,5 entspricht (entspricht $1,5 \times 10^8$ com/ml).

Es wurden flüssige Medien vorbereitet, die 2,5 %, 5 %, 7,5 % und 10 % des Testprodukts enthielten (das Produkt wurde nach der Sterilisation in ein warmes, etwa 45 °C, Medium gegeben. Anmerkung: nach Zugabe und Auflösung des Testproduktes war das Medium trüb). Für Escherichia coli, Salmonella Typhimurium, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus wurde das flüssige Medium Müller-Hinton-Brühe verwendet, während für Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica, Campylobacter jejuni, Streptococcus agalactiae, Streptococcus equi subsp. zooepidemicus, Trueperella pyogenes flüssiges Medium Trypticase-Sojabrühe (TSB).

Es wurden dem flüssigen Medium (in Röhrchen mit 5 ml Medium), welches das Prüfprodukt in der entsprechenden Konzentration enthielt, 0,1 ml bakterielles Inokulum/5 ml Medium zugesetzt (ergab die Enddichte 3×10^6 com./ml).

Die Kulturen wurden bei 35,5°C unter aeroben Bedingungen inkubiert, mit Ausnahme von *Campylobacter jejuni*, für das mikroaerophile Bedingungen angewendet wurden. Die Inkubation wurde 24 Stunden lang für *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* durchgeführt, 48 Stunden lang für *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Trueperella pyogenes* und für *Campylobacter jejuni* 4 Tage. Nach der Inkubation wurden dann 0,1 ml und 1 ml Flüssigkultur auf Mueller-Hinton-Agar bzw. Columbia-Agar mit Rinderblut ausgesät, um die Bakterienvermehrung zu kontrollieren.

Feststoffmedienkulturen wurden 48 Stunden bei 35,5 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert, mit Ausnahme von *Campylobacter jejuni*, für das mikroaerophile Bedingungen und 3 Tage Inkubation verwendet wurden.

Die Kontrolle bestand aus Bakterienkulturen auf geeigneten flüssigen Medien, die das Testprodukt nicht enthielten, die dann auf festen Medien gescreent wurden - das gesamte Verfahren entsprach der ordnungsgemäßen Prüfung des Produkts, aber zusätzlich wurden 0,1 ml der Verdünnungen 10^{-6} und 10^{-7} der flüssigen Kultur auf feste Medien ausgesät. Die Inkubationsbedingungen dieser Kulturen waren die gleichen wie die des Testproduktes.

Für jeden Bakterienstamm wurde der Test in drei Wiederholungen durchgeführt.

1.3 Die Well- Diffusion - Methode

Die Well-Diffusions- Methode wurde nur für *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* durchgeführt. Zu 100 ml sterilisiertem Mueller-Hinton-Agar-Substrat, das auf 45 °C abgekühlt wurde, wurden 4 ml bakterielles Inokulum mit der Dichte 0,5 nach

MacFarland-Standard (entspricht $1,5 \times 10^8$ com/ml) hinzugefügt und das Substrat auf Petrischalen (Plattendurchmesser 90 mm; Dicke de Nährlösung ca. 8 mm) gegossen.

Nachdem das Substrat erstarrt ist, wurden sterile Vertiefungen mit einem Durchmesser von 8 mm (5 auf jeder Platte) in das Substrat eingebracht. Dann wurden 0,2 ml TSB-Lösung von 2,5 %, 5 %, 7,5 % bzw. 10 % in die Vertiefungen gegeben und TSB als Kontrolle in eine Vertiefung gegeben. Die Kulturen wurden bei 35,5 °C, unter Sauerstoffbedingungen 24 Stunden lang inkubiert.

Für jeden Stamm wurde die Untersuchung in drei Wiederholungen durchgeführt.

2. Ergebnisse

2.1. Prüfergebnisse, die nach der Zuchtmethode durchgeführt wurden, in einem flüssigen Substrat. Die gleichen Ergebnisse wurden für jeden Teststamm in drei Wiederholungen erhalten.

Tabelle 1. Ergebnisse, die nach dem Screening von Flüssigkulturen* in feste Medien, die das getestete Produkt nicht enthalten, erzielt wurden - die Anzahl der KBE/ml in den getesteten Proben wurde bestimmt. **

Bakterie	Anzahl KBE/ml				
	Konzentration des Testproduktes (Narine)				Kontrolle (ohne Test-Produkt)
	2,5%	5%	7,5%	10%	
Escherichia coli	0	0	0	0	1×10^9
Salmonella Typhimurium	0	0	0	0	8×10^8
Klebsiella pneumoniae	0	0	0	0	1×10^9
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	0	5×10^8
Pasteurella multocida	0	0	0	0	7×10^8
Mannheimia haemolytica	0	0	0	0	8×10^8
Campylobacter jejuni	0	0	0	0	7×10^8
Staphylococcus aureus	0	0	0	0	1×10^9
Streptococcus agalactiae	0	0	0	0	8×10^8
Streptococcus equi subsp. zooepidemicus	0	0	0	0	8×10^8
Trueperella pyogenes	0	0	0	0	9×10^8
Bacillus cereus	0	0	0	0	6×10^8

* Die anfängliche Bakteriendichte (vor der Inkubation) in der Flüssigkultur nach Zugabe des bakteriellen Inokulums betrug 3×10^6 com/ml.

** Beispiele von Ergebnissen für mehrere Bakterien sind auf den Bild 2-4 zu sehen (im Anhang 1).

2.2 Ergebnisse für die Untersuchung mit der Well- Diffusion - Methode durchgeführt wurden.

Tabelle 2. Ergebnisse für die Untersuchung der Well- Diffusion- Methode. Die Aktivität des getesteten Produkts wurde durch Messung des Durchmessers der Wachstumsstoppzone (zusammen mit dem Well-Durchmesser -8mm gemessen) bewertet. *

Bakterie	Wiederholung	Durchmesser der Wachstumsstoppzone (mm)				
		Konzentration des Testproduktes (Narine)				Kontrolle (ohne Test-Produkt)
		2,5%	5%	7,5%	10%	
Escherichia coli	I	8	8	11	13	8
	II	8	9	12	13	8
	III	8	11	13	14	8
Staphylococcus aureus	I	8	8	12	13	8
	II	8	8	12	14	8
	III	8	8	12	14	8

* Die Ergebnisse für die Probe sind auf dem Bild 5 dargestellt (Anhang 1).

3. Ergebnisse

Auf der Grundlage der erzielten Ergebnisse kann der Schluss gezogen werden, dass das getestete Produkt (Narine) *in vitro* eine antibakterielle Aktivität gegen die getesteten Bakterienstämme aufweist, die deren Vermehrung in mikrobiologischen Medien hemmt, und wahrscheinlich auch eine bakterientötende Aktivität hat, die noch durch eine andere Methode bestätigt werden sollte.

Die, in diesem Bericht, vorgestellten Ergebnisse beziehen sich nur auf die getestete Probe.

Unterschrift

Dr. Dorota Chrobak-Chmiel

Unterschrift

Dr. hab. Magdalena Rzewuska

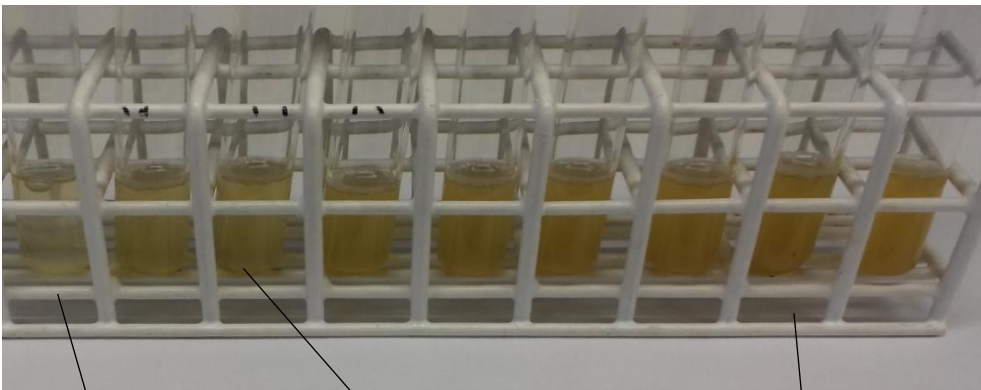
Universitätsprofessorin

Anhang Nr. 1



Bild 1. Geliefertes Produkt zum Testen.

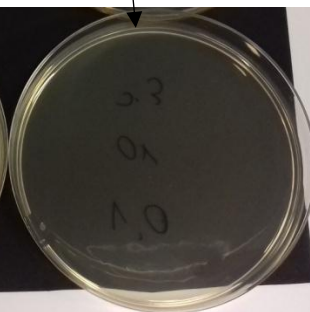
K	2,5%	2,5%	5%	5%	7,5%	7,5%	10%	10%
---	------	------	----	----	------	------	-----	-----



Kontrolle



2,5%



10%

Bild 2. A - 24-Stunden-Züchtung von *Escherichia coli* auf Mueller-Hinton-Broth Substrat mit entsprechenden Narine-Konzentrat; K - Substrat Kontrolle ohne Testprodukt. B - Screening auf Mueller-Hinton-Agar Substrat (bei Konzentrat 2,5% und 10%, 1 ml ausgesät und bei der Kontrolle 0,1 ml mit einer Verdünnung von 10^{-6} ausgesät)

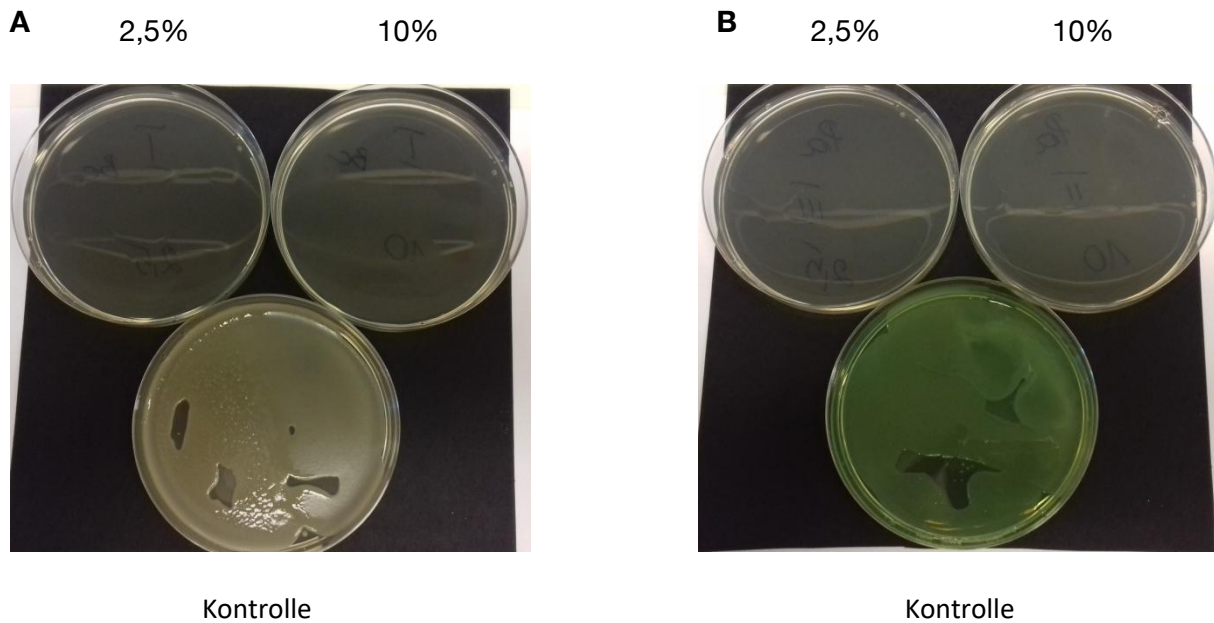


Bild 3. Züchtung auf Mueller-Hinton-Agar - Screening aus Flüssigkultur
(je 1 ml ausgesät).

A - *Bacillus cereus*; B - *Pseudomonas aeruginosa*.

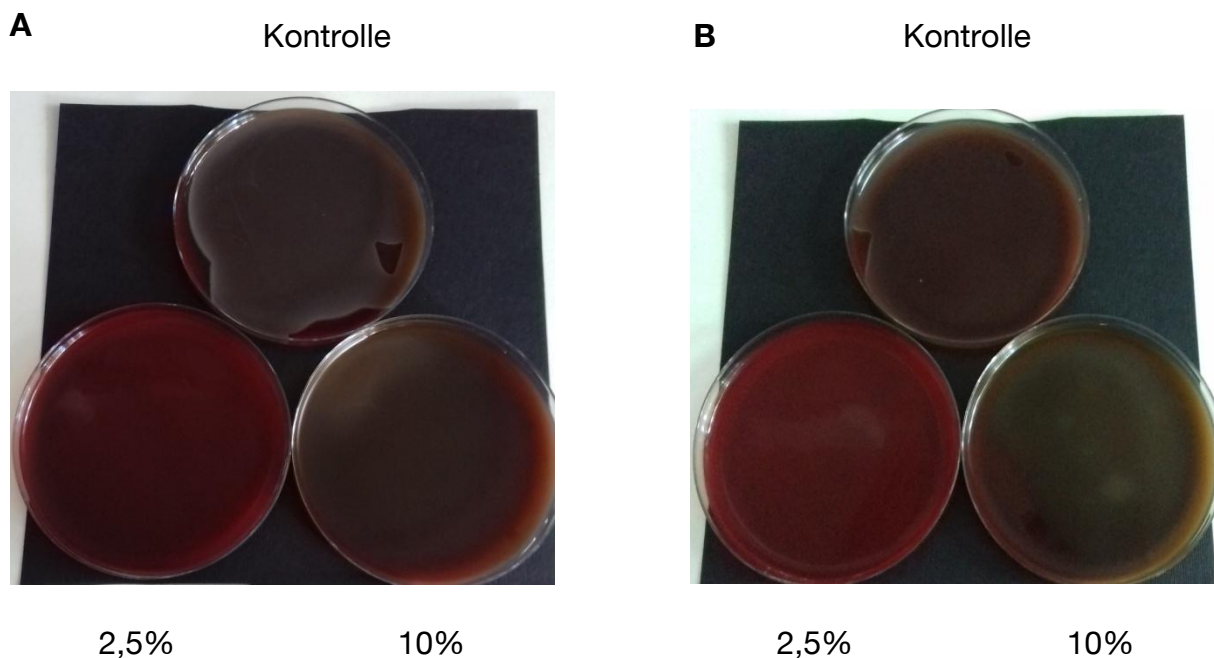
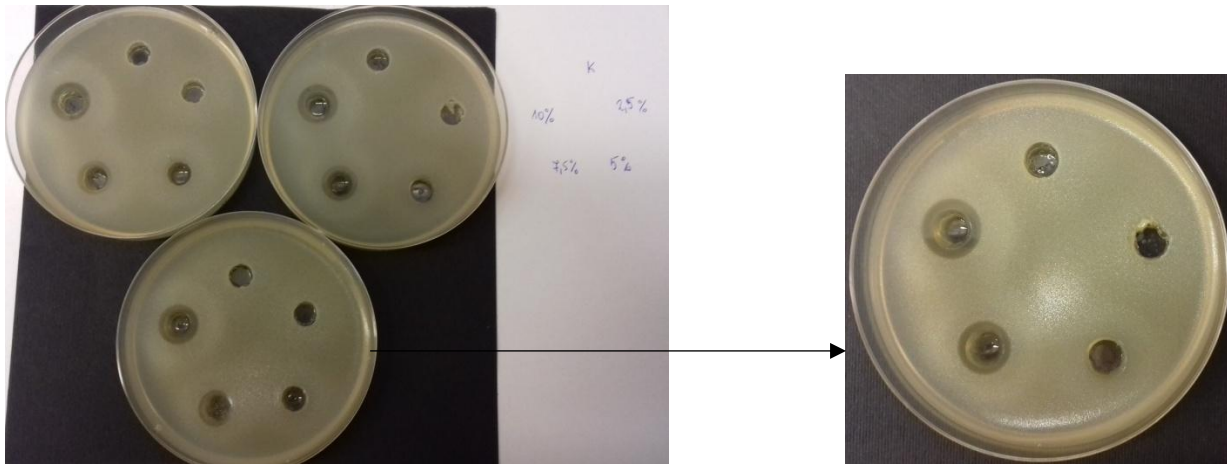


Bild 4. Züchtung auf Substrat Columbia-Agar mit Blut - Screening aus Flüssigkultur
(je 1 ml ausgesät).

A - *Pasteurella multocida*; B - *Streptococcus agalactiae*.

A



B

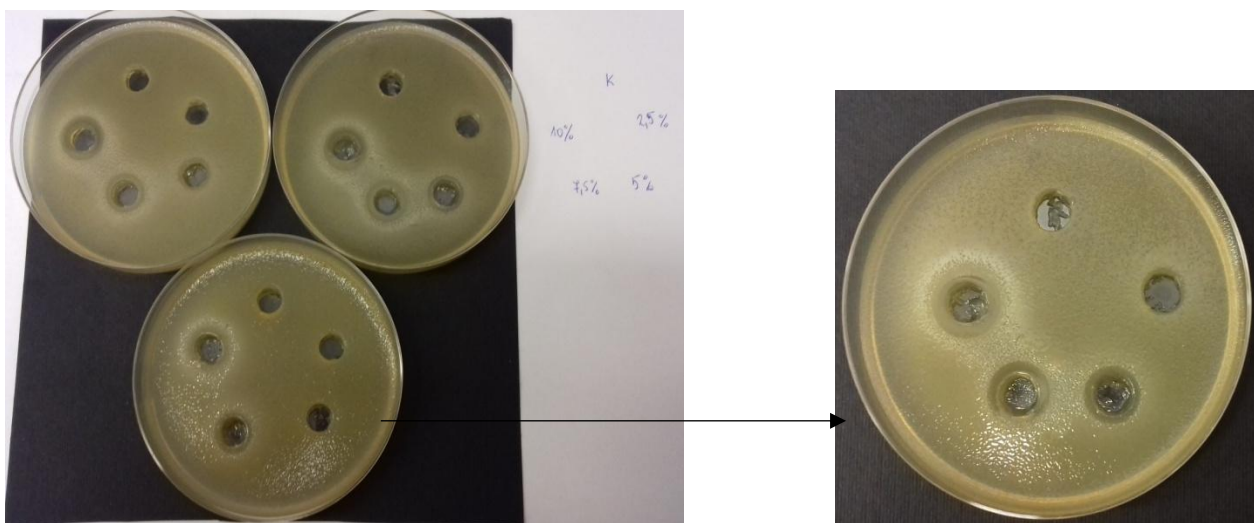


Bild 5. Ergebnis der Well-Diffusions-Methode, mit drei Wiederholungen.

A - *Staphylococcus aureus*; B - *Escherichia coli*.