

Отчёт о программе исследований биоцидов

Исследуемые препараты представляют собой вещества со стерилизующим действием, основанным на действии свободных радикалов: атомов или молекул с нечётным числом электронов на внешней орбите. Это создаёт состояние нестабильности, побуждающее их забирать электроны у других молекул, с которыми они контактируют, для достижения устойчивого равновесия. Молекулы, отдавшие электроны, становятся нестабильными и ищут другие электроны для восстановления своей стабильности, запуская цепную реакцию отдачи и получения электронов (стабильность-нестабильность). Различные компоненты, участвующие в этой реакции переноса электронов, могут выступать как окислители, то есть акцепторы электронов, или как восстановители, то есть доноры электронов.

Механизм действия свободных радикалов необратим и направлен преимущественно на липидные компоненты (липиды и фосфолипиды) клеточных мембран и белки ядра (поры ядерной мембраны).

Микробиологическим испытаниям будут подвергнуты:

- Свободные радикалы - доноры электронов, обладающие восстановительной активностью в среде со щелочными значениями pH, предназначенные для стерилизации инструментов и медицинских изделий;
- Свободные радикалы - акцепторы электронов с окислительным действием, предназначенные для деконтаминации поверхностей.

Цель исследования

Целью исследования была оценка стерилизующей активности растворимых порошков DIAL и EC-STER в отношении спор *B. subtilis* ATCC 19695.

Эффективность продукта DIAL оценивали с помощью следующих испытаний:

- 1) Спороцидная активность в отношении *B. subtilis* при концентрации $8 \log_{10}$ (0,8 McF), при рабочей концентрации 0,3%, с временем контакта 2, 5, 60 с.
- 2) Спороцидная активность в отношении *B. subtilis* при концентрации $8 \log_{10}$ (0,8 McF), при рабочей концентрации 0,25%, с временем контакта 5, 10, 30 с.
- 3) Спороцидная активность в отношении *B. subtilis* при концентрации $8 \log_{10}$ (0,8 McF), при рабочей концентрации 0,2%, с временем контакта 60 с, 2, 3 мин.
- 4) Спороцидная активность в отношении *B. subtilis* при концентрации $8 \log_{10}$ (0,8 McF), при рабочей концентрации 0,18%, с временем контакта 60 с, 2, 3 мин.
- 5) Спороцидная активность в отношении *B. subtilis* при концентрации $8 \log_{10}$ (0,8 McF), при рабочей концентрации 0,15%, с временем контакта 60 с, 2, 3 мин.
- 6) Спороцидная активность в отношении *B. subtilis* при концентрации $8 \log_{10}$ (0,8 McF), при рабочей концентрации 0,3% через 6 часов после приготовления, с временем контакта 2, 5, 60 с.
- 7) Спороцидная активность в отношении *B. subtilis* при концентрации $8 \log_{10}$ (0,8 McF), при рабочей концентрации 0,3% через 48 часов после приготовления, с временем контакта 2, 5, 60 с.
- 8) Спороцидная активность в отношении *B. subtilis* при концентрации $8 \log_{10}$ (0,8 McF), при рабочей концентрации 0,25% через 7 дней после приготовления, с временем контакта 60 с, 5 мин.

Эффективность продукта EC-STER оценивали с помощью следующего испытания:

- 1) Спороцидная активность в отношении *B. subtilis* при концентрации $8 \log_{10}$ (0,8 McF), при рабочей концентрации 0,35%, с временем контакта 2, 10, 30 с.

Материалы

Водорастворимый порошок DIAL;
Водорастворимый порошок Ec-Ster;
Споры *B. subtilis* ATCC 19695;
Чашки с агаром с бараньей кровью;
Nutrient Broth (питательный бульон).

Методы

Приготовление стерилизующих растворов

Растворимые порошки продуктов DIAL и Ec-Ster в различных концентрациях растворяли в воде (водопроводной воде комнатной температуры) до полного растворения.

Приготовление спор *B. subtilis* ATCC 19695

Споры *B. subtilis* ATCC 19695 готовили в соответствии с указаниями производителя. Инокулюм для экспериментов готовили так, чтобы получить суспензию с мутностью 0,8 McFarland (около 10^8 колониеобразующих единиц/мл).

Ручной метод

К общему объёму 10 мл каждого стерилизующего раствора (DIAL и EC-STER) добавляли 100 мкл *B. subtilis* ATCC 19695 при 0,8 McF. После каждого исследуемого времени контакта аликвоту суспензии объёмом 100 мкл высевали на чашки с агаром с бараньей кровью и инкубировали при 37 °C в течение 24 часов. По окончании инкубации оценивали рост микроорганизмов.

Вторую аликвоту объёмом 100 мкл переносили в пробирки с Nutrient Broth. После 24 часов инкубации при 37 °C 100 мкл высевали на чашки с агаром с бараньей кровью. По окончании инкубации оценивали рост микроорганизмов.

Во все эксперименты включали отрицательный контроль для выявления возможной контаминации исследуемых растворов и положительный контроль роста микроорганизмов.

Автоматизированный метод Alfred 60, Alifax

Alfred 60, Alifax - полностью автоматизированная система, которая с помощью технологии светорассеяния (Light Scattering) определяет наличие микроорганизмов и выявляет их репликационную активность, отображая кривые роста в реальном времени и предоставляя количественные результаты в колониеобразующих единицах/мл.

К общему объёму 10 мл каждого стерилизующего раствора (DIAL и EC-STER) добавляли 100 мкл *B. subtilis* ATCC 19695 при 0,8 McF. После каждого исследуемого времени контакта аликвоту объёмом 100 мкл переносили в специальные измерительные кюветы (флаконы), содержащие бульон Eugon, который в системе постоянно перемешивается и термостатируется при 37 °C. Для оценки эффективности исследуемых продуктов был установлен период инкубации 24 часа.

Во все эксперименты включали отрицательный контроль для выявления возможной контаминации исследуемых растворов и положительный контроль роста микроорганизмов.

Результаты

Ручной метод

Штамм: *B. subtilis* ATCC 19695 - 0,8 McF (около 10^8 КОЕ/мл)

Время контакта

Продукт	2 с	5 с	10 с	30 с	60 с	2 мин	3 мин	5 мин
T2 Образец № 3 Партия: 74/s/15 Рабочая концентрация: 0,3%	-	-			-			
DESAN Образец № 5 Партия: 82/s/15 Рабочая концентрация: 0,3%	-	-			-			
DIAL Образец № 2 Партия: 6/15 Рабочая концентрация: 0,25%		-	-	-	-			-
T2 Образец № 1 Партия: 74/s/15 Рабочая концентрация: 0,2%					-	-	-	
DESAN Образец № 8 Партия: 83/s/15 Рабочая концентрация: 0,2%					-	-	-	
DIAL Партия: 6/14 Рабочая концентрация: 0,18%					-	-	-	
DESAN Образец № 6 Партия: 82/s/15 Рабочая концентрация: 0,15%					-	-	-	
EC-STER Партия: 07/14 Рабочая концентрация: 0,35%	-		-	-				

Условное обозначение: - отсутствие роста. Пустые ячейки оставлены пустыми, как в оригинале.

Результаты

Автоматизированный метод Alfred 60, Alifax

Штамм: *B. subtilis* ATCC 19695 - 0,8 McF (около 10^8 КОЕ/мл)

Время контакта

Продукт	2 с	5 с	10 с	30 с	60 с	2 мин	3 мин	5 мин
T2 Образец № 3 Партия: 74/s/15 Рабочая концентрация: 0,3%	-	-			-			
DESAN Образец № 5 Партия: 82/s/15 Рабочая концентрация: 0,3%	-	-			-			
DIAL Образец № 2 Партия: 6/15 Рабочая концентрация: 0,25%		-	-	-	-			-
T2 Образец № 1 Партия: 74/s/15 Рабочая концентрация: 0,2%					-	-	-	
DESAN Образец № 8 Партия: 83/s/15 Рабочая концентрация: 0,2%					-	-	-	
DIAL Партия: 6/14 Рабочая концентрация: 0,18%					-	-	-	
DESAN Образец № 6 Партия: 82/s/15 Рабочая концентрация: 0,15%					-	-	-	
EC-STER Партия: 07/14 Рабочая концентрация: 0,35%	-		-	-				

Условное обозначение: - отсутствие роста. Пустые ячейки оставлены пустыми, как в оригинале.

Обсуждение

Эксперименты, проведённые в соответствии со стандартом EN 13704, выявили спороцидную активность продуктов DIAL и EC-STER в отношении спор *B. subtilis* ATCC 19695.

Растворы продемонстрировали эффективность как при ручном, так и при автоматизированном методе в экспериментальных условиях с различным временем контакта и разными концентрациями исследуемых продуктов.

После получения результатов те же растворы использовали для морфологических наблюдений с помощью конфокального микроскопа. Споры *B. subtilis* после контакта с растворами DIAL и Ec-Ster различных концентраций, а также положительный и отрицательный контроли окрашивали акридиновым оранжевым - витальным красителем, связывающим нуклеиновые кислоты. При микроскопических наблюдениях в образцах, контактировавших со стерилизующими растворами, и в отрицательном контроле не обнаруживали ни споровых форм, ни вегетативных клеток, как показано на рисунках 1-8. Напротив, в положительном контроле красная и зелёная флуоресценция выявляла соответственно наличие спор и вегетативных клеток *Bacillus subtilis* (рис. 9-11).

18 декабря 2015 г.

Prof. Alfredo Focà

Примечание к переводу. Перевод на русский язык предоставленного семистраничного итальянского отчёта. Названия продуктов, числовые значения и результаты таблиц сохранены. Рисунки 1-11, упомянутые в тексте, отсутствуют в предоставленном оригинале. Итальянский оригинал остаётся первоисточником.