

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение науки
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
«Оценка эффективности дезактивации клеток *S. aureus* и спор *A. niger* на поверхностях
и в аэрозольном состоянии с использованием «Генератора морского воздуха
«Аэройод»™» ООО ГК «ИНГАТЕК», Россия.

Руководитель темы,
д.б.н.



В.Д. Потапов

В.Д. Потапов

РЕФЕРАТ

Ключевые слова: «Генератор морского воздуха «Аэройод», аэрозоли, йодистый калий, споры, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus*.

Объекты исследования: Генератор морского воздуха «Аэройод», а также штаммы *Aspergillus niger* Spp и *Staphylococcus aureus* FDA 209-P.

Цель: Оценка эффективности дезактивации клеток штамма *Staphylococcus aureus* FDA 209-P и спор *Aspergillus niger* Spp на поверхностях и в аэрозольном состоянии с использованием генератора морского воздуха «Аэройод», ООО ГК «ИНГАТЕК», Россия.

Задачи:

- Оценка бактерицидной эффективности раствора KI *in vitro*.
- Оценка бактерицидной эффективности аэрозоля KI на поверхностях тест-объектов и поверхностях плотных питательных сред.
- Оценка бактерицидного и фунгицидного действия аэрозоля KI, на аэрозоль бактериальной культуры *S. aureus* и аэрозоль спор культуры *A. niger*.

Методы исследований – микробиологические (наработка биомассы культур *S. aureus* и *A. niger*, посев на питательные среды, микроскопия мазков, определение числа колониеобразующих единиц (КОЕ) на тест-объектах; статистическая обработка результатов экспериментов). Оценка бактерицидного действия растворов KI суспензионным методом в соответствии с руководством по дезинфектологии Р 4.2.2643-10. Исследование бактерицидного эффекта аэрозоля KI против клеток штамма *S. aureus* FDA 209-P, нанесенных на тест-поверхности из пластика, а так же поверхности плотных питательных сред методом «тест-объектов» в соответствии с Р 4.2.2643-10. Получение аэрозолей клеток штамма *S. aureus* FDA 209-P и спор штамма *A. niger* Spp в аэрозольной камере Глас-Кол модели 099С А4224 (GlasColl, США). Обработка аэрозолей культур аэрозолем KI с последующим отбором проб воздуха внутрикамерного пространства с использованием пробоотборника «Sas Super ISO» (PBI International, Италия) для оценки эффективности бактерицидного и фунгицидного действия.

Используемая аппаратура – Генератор морского воздуха «Аэройод» (ГМВ «Аэройод») (ООО ГК «ИНГАТЕК», Россия), установка Глас-Кол модели 099С А4224 (GlasColl, США), пробоотборник «Sas Super ISO» (PBI International, Италия), термостаты, низкотемпературный холодильник, автоклав, бокс биобезопасности 2 класса защиты, компьютеры с программным обеспечением.

Полученные результаты и новизна – показана высокая бактерицидная и фунгицидная активность аэрозоля КІ, создаваемого установкой ГМВ «Аэройод», против бактерий *S. aureus* и спор *A. niger*, находящихся в аэрозольном состоянии.

Область применения – здравоохранение.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	7
1.1 Штаммы микроорганизмов.....	7
1.2 Подготовка суспензии клеток и спор тест-штаммов	7
1.3 Препараты дезинфицирующих средств	7
1.4 Определение бактерицидной и спороцидной активности йодистого калия	7
1.4.1 Оценка бактерицидного действия раствор йодистого калия суспензионным методом...7	
1.4.2 Оценка бактерицидной эффективности аэрозоля KI на поверхностях тест-объектов и поверхностях плотных питательных сред.....	8
1.4.3 Оценка бактерицидного и фунгицидного действия аэрозоля KI, на аэрозоль бактериальной культуры <i>S. aureus</i> и аэрозоль спор культуры <i>A. niger</i>	9
1.5 Регулирующие стандарты.....	9
Глава 2. Полученные результаты.....	10
2.1 Эффективность бактерицидного действия раствора йодистого калия при обеззараживании стафилококковой инфекции in vitro.....	10
2.2 Эффективность бактерицидного действия аэрозоля KI на поверхностях тест-объектов и поверхностях плотных питательных сред.....	10
2.3 Эффективность бактерицидного и фунгицидного действия аэрозоля KI, на аэрозоль бактериальной культуры <i>S. aureus</i> и аэрозоль спор культуры <i>A. niger</i>	11
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	12

ВВЕДЕНИЕ

Существующая в настоящее время сложная эпидемиологическая ситуация обосновывает повышенное внимание к профилактике инфекционных заболеваний и рост требований к качеству дезинфекционных мероприятий, направленных на уничтожение возбудителей инфекций в воздушной среде, являющейся фактором их передачи. Повышенное внимание нужно уделить наиболее распространенным бактериям, таким как *S. aureus* и спорообразующим микроорганизмам.

Приблизительно 25—40 % населения являются постоянными носителями бактерии *S. aureus*, которая может сохраняться на кожных покровах и слизистых оболочках верхних дыхательных путей.

Стафилококк может вызывать широкий диапазон заболеваний, начиная с лёгких кожных инфекций: угри, импетиго, фурункул, флегмона, карбункул, стафилококковый ожогоподобный кожный синдром и абсцесс – до смертельно опасных заболеваний: пневмония, менингит, остеомиелит, эндокардит, инфекционно-токсический шок и сепсис. Диапазон заболеваний простирается от кожных, мягких тканей, респираторных, костных, суставных и эндоваскулярных до раневых инфекций. Он до сих пор является одной из четырёх наиболее частых причин внутрибольничных инфекций, часто вызывая послеоперационные раневые инфекции.

Плесневые грибы распространены практически всюду. Плесень и её споры обнаруживаются в воздухе любого помещения, но, только в разной концентрации. А именно от концентрации зависит степень опасности для организма человека. При наличии благоприятных условий (повышенная влажность) немногочисленные споры плесневых грибов начинают массово размножаться, субстратом для них служит широкий круг материалов, в том числе строительные и отделочные материалы, ткани, древесина, некоторые полимеры и т. д. Использование ультрафиолетовых ламп достаточно опасно для здоровья человека, т.к. приводит к образованию свободных радикалов в воздухе. Применение УФ-облучателей резонно для медицинских учреждений, но никак не для постоянного применения в жилых и производственных помещениях.

Актуальной задачей в настоящее время является поиск новых дезинфицирующих препаратов и методик их использования для обеззараживания воздуха помещений от бактерий и спор плесневых грибов.

Несомненный приоритет перед другими принадлежит аэрозольному способу обработки воздушного пространства. При аэрозольной дезинфекции прерывается эпидемиологическая цепь и предотвращается аэрогенное заражение. Для получения аэрозольного состояния дезинфицирующее средство переводят в мелкодисперсное состояние

и потому его удобно вводить в воздушную среду помещения, боксы, емкости и т.д. при этом дезинфицируется весь объем помещения. Аэрозольная обработка экономически выгодна, поскольку происходит одновременное и равномерное обеззараживание всего воздуха. Для данного метода характерны экономичность, высокая производительность обработки и низкая трудоемкость (обработка больших помещений силами одного оператора).

Установлено, что бактерицидные аэрозоли в малых концентрациях активно воздействуют на взвешенные в воздухе микроорганизмы в виде отдельных клеток или находящихся в капельках слизи или в высохших пылевых частицах. В последнем случае бактерицидное действие аэрозоля определяется не непосредственным столкновением его частиц с микрофлорой, а диффузией паров дезинфицирующего раствора в пылевую частицу, содержащую конгломераты бактерий и являющуюся ядром конденсации. Такое эффективное действие аэрозоля проявляется в воздушной среде при минимальных размерах его частиц, содержащих небольшие концентрации обеззараживающего средства.

В данной работе проведена оценка бактерицидной и спороцидной активности аэрозоля йодистого калия, получаемого при помощи генератора морского воздуха «Аэройод», ООО ГК «ИНГАТЕК», Россия.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1 Штаммы микроорганизмов

В работе использованы: клетки штамма *Staphylococcus aureus* FDA 209-P (клинический, метициллин резистентный MRSA штамм) и споры *Aspergillus niger* Spp, полученные из ГКПМ ФБУН ГНЦ ПМБ.

Рабочие культуры выращивали на питательных средах, соответствующих их культуральным свойствам (стафилококк-агар, агар Сабура производства ФБУН ГНЦ ПМБ) в течение 24/48 часов при температуре 37 °С.

Для получения бактериальной взвеси культуру смывали с поверхности питательных сред и разводили в физ. растворе до концентрации по стандарту мутности, соответствующей миллион микробных тел в 1 мл.

1.2 Подготовка суспензии клеток и спор тест-штаммов

Суспензию клеток микроорганизмов, замороженную при температуре минус 70 °С, размораживали при комнатной температуре и гомогенизировали инсулиновым шприцем в асептических условиях с соблюдением правил техники безопасности. Готовили десятикратные разведения суспензии в забуференном физиологическом растворе (ЗФР). Часть приготовленной суспензии использовали для контрольного высева на плотные питательные.

1.3 Препараты дезинфицирующих средств

В работе использовали рабочие растворы йодистого калия с концентрациями 1,0; 0,5; 0,05; 0,005; 0,0005; 0,00005; 0,000005; 0,0000005; 0,00000005%, а так же аэрозоль KI, получаемый с использованием генератора морского воздуха «Аэройод» (ООО ГК «Ингатек», Россия), концентрация которого составляет 0,029 мг/м³ (в соответствии с экспертным заключением № 77.01.06.П.006959.08.12 от 03.08.2012 г.).

1.4 Определение бактерицидной и спороцидной активности йодистого калия

Оценку проводили в соответствии с методами, описанными в руководстве Р 4.2.2643-10 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности».

1.4.1 Оценка бактерицидного действия раствор йодистого калия суспензионным методом

Рабочие растворы KI готовили из сухого вещества путем разведения в стерильной питьевой воде, далее разливали в стерильные пробирки по 4,5 мл. К рабочим растворам добавляли по 0,5 мл взвеси тестируемой культуры микроорганизма, содержащей 1×10⁶ КОЕ/мл и тщательно перемешивали. Через определенные интервалы времени (60, 90, 120

минут) добавляли по 0,5 мл взвеси (тест-микроорганизм + дезинфектант) к 4,5 мл универсального нейтрализатора, включающего Твин-80 – 3,0 %, цистеин – 0,1 %, лецитин – 0,1 %, гистидин – 0,1 %, сапонин – 0,3 %, тиосульфат натрия – 0,5 %, снова тщательно перемешивали и оставляли на 5 мин. Далее по 0,5 мл этой суспензии вносили в 4,5 мл стерильной питьевой воды для ослабления действия нейтрализатора и затем наносили по 0,1 мл последней пробы на поверхности плотной питательной среды стафилококк агар. Инкубировали посеvy при температуре 37 °С в течение 24 - 48 часов и учитывали наличие роста бактерий высеянных из тестовых пробирок относительно контрольных. В контрольных опытах для обработки вместо раствора йодистого калия использовали стерильную воду того же объема.

1.4.2 Оценка бактерицидной эффективности аэрозоля KI на поверхностях тест-объектов и поверхностях плотных питательных сред.

В качестве тест-объектов использовали круглые кусочки пластика диаметром 10 см, помещенные в чашки Петри, которые перед использованием тщательно мыли водой с мылом и щеткой, затем стерилизовали в паровом стерилизаторе, а так же стерильные чашки Петри с плотной питательной средой стафилококк агар. На подготовленную поверхность тест-объекта наносили бактериальную суспензию *Staphylococcus aureus* FDA 209-P, содержащую 1×10^6 КОЕ/мл. Суспензию равномерно распределяли по поверхности тест-объекта стерильным стеклянным шпателем. Контаминированные тест-объекты подсушивали при комнатной температуре до полного высыхания в течение 30-120 мин и расставляли горизонтально в чашках Петри на различные поверхности (на полу, в вытяжном шкафу, в раковине) в аэрозольном боксе объемом 3 м^3 .

Обработку контаминированных тест-объектов йодистым калием проводили распылением при помощи генератора морского воздуха «Аэройод» (генератор включали в сеть за 4, 6, 12, 24 часа до начала эксперимента). Через определенные промежутки времени – 60, 120, 180 и 240 мин делали смывы с поверхностей тест-объектов путем тщательного протирания стерильной марлевой салфеткой, увлажненной стерильной водой. Салфетку погружали на 5 мин в стерильную воду со стеклянными бусами и встряхивали в течение 5 мин. Полученную смывную жидкость вносили по 0,1 мл на пять стерильных чашек Петри с питательной средой стафилококк агар, тщательно распределяя ее по всей поверхности агара. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24-48 часов.

В контрольных опытах для обработки аналогично контаминированных поверхностей тест-объекты расставляли в бокс без распыления аэрозоля KI. Эффективность обеззараживания определяли, принимая количество КОЕ бактерий в контроле за 100 %.

1.4.3 Оценка бактерицидного и фунгицидного действия аэрозоля KI, на аэрозоль бактериальной культуры *S. aureus* и аэрозоль спор культуры *A.niger*.

Оценку эффективности действия аэрозоля йодистого калия на аэрозоль тест-культур осуществляли в аэрозольной установке модели 099C A4224 фирмы GlasCol (США), для отбора проб применяли пробоотборник «Sas Super ISO» (PBI International, Италия). Для этого использовали метод активной седиментации (принудительное осаждение взвешенных в воздушной среде микроорганизмов на поверхность питательной среды), обеспечивающий безопасность работ и достоверность получаемых результатов. Данный метод обладает преимуществами по сравнению с аспирационным методом (пропускание деконтаминированного воздуха через жидкость), поскольку не требует сложных в производстве стеклянных изделий, подбора жидкостей для аспирации, исключая гибель бактерий во время эксперимента, и обеспечивает большую достоверность результатов. Для получения аэрозоля йодистого калия генератор морского воздуха «Аэройод» предварительно устанавливали в рабочую полость камеры и включали в сеть. Пробоотборник так же устанавливали в аэрозольную камеру перед началом ее работы. Аэрозоль тест-микроорганизмов создавали в камере GlasCol, распыляя 5 мл бактериальной суспензии *S. aureus* (1×10^8 КОЕ/мл) или спор культуры *A.niger* (1×10^6 спор/мл). Спустя 60 мин проводили отбор проб аэрозоля из рабочей полости при помощи устройства «Sas Super ISO» на чашку Петри с соответствующей тест-культуре питательной средой. Далее извлекали чашку Петри из пробоотборника, инкубировали при температуре 37 °С в течение 24-48 часов.

В контрольных опытах генератор морского воздуха «Аэройод» в рабочую полость камеры не устанавливали. Эффективность обеззараживания определяли, принимая количество КОЕ в контроле за 100 %.

1.5 Регулирующие стандарты

Работы проводили в соответствии с рекомендациями документов:

1) Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». – М., 2008.

2) Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 19.07.2007 г. № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок»

3) Р 4.2.2643-10. 3.5. Дезинфектология. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. Руководство. (утв. Роспотребнадзором 01.06.2010)

Глава 2. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗАКТИВАЦИИ КЛЕТОК *S. AUREUS* И СПОР *A. NIGER* НА ПОВЕРХНОСТЯХ И В АЭРОЗОЛЬНОМ СОСТОЯНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕРАТОРА МОРСКОГО ВОЗДУХА «АЭРОЙОД»

2.1 Эффективность бактерицидного действия раствора йодистого калия при обеззараживании стафилококковой инфекции *in vitro*

Для уточнения действующей концентрации и времени обеззараживания стафилококковой инфекции препаратом йодистого калия применяли суспензионный метод.

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что рабочие растворы йодистого калия с концентрациями 1,0; 0,5; 0,05; 0,005; 0,0005; 0,00005; 0,000005; 0,0000005% оказывали бактериостатический эффект при времени экспозиции 60 минут, меньшие концентрации не проявляли ингибирующего действия на клетки штамма *S. aureus* FDA 209-P; концентрация микроорганизмов в суспензии снижалась от 3 до 6 раз относительно контроля (контроль 321 ± 12 КОЕ). В пересчете на объемную, минимальная ингибирующая концентрация составила 50 мг/м^3 .

2.2 Эффективность бактерицидного действия аэрозоля KI на поверхностях тест-объектов и поверхностях плотных питательных сред.

Для определения бактерицидной эффективности аэрозоля йодистого калия на поверхностях использовали тест-объекты (пластик, поверхность пит. среды), которые обрабатывали аэрозолем KI в течение заданных промежутков времени (60, 120, 180 и 240 мин).

Было отмечено лишь незначительное снижение обсемененности поверхностей обработанных тест-объектов (контроль 309 ± 23 КОЕ, обработка KI 292 ± 18 КОЕ). Для пластика и поверхностей твердых питательных сред эксперименты по обеззараживанию имели аналогичные результаты.

Данные, полученные из опытов, выявили отсутствие бактерицидного и бактериостатического действия аэрозоля на поверхностях в отношении *S. aureus*, что объясняется гораздо меньшей концентрацией аэрозоля в воздушном пространстве – $0,029 \text{ мг/м}^3$, чем минимальная ингибирующая концентрация – 50 мг/м^3 .

2.3 Эффективность бактерицидного и фунгицидного действия аэрозоля KI₂ на аэрозоль бактериальной культуры *S. aureus* и аэрозоль спор культуры *A.niger*.

Для определения эффективности действия аэрозоля йодистого калия на аэрозоль тест-культур использовали аэрозольную установку модели 099С А4224. В данном эксперименте был смоделирован процесс обработки генератором морского воздуха «Аэройод» воздушного пространства помещений с высокой концентрацией спор черной плесени и клеток золотистого стафилококка.

Результаты экспериментов по обеззараживанию воздушного пространства аэрозольной камеры представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективность обеззараживания воздушного пространства аэрозольной камеры аэрозодем KI от бактерий *S. Aureus* FDA 209-Р и спор культуры *A.niger* SPP.

Штамм микроорганизма	КОЕ, № эксперимента			Среднее КОЕ	Контроль	Снижение обсемененности
	1	2	3			
<i>S. Aureus</i> FDA 209-Р	12	18	17	15,6	174±14	11,1 раза
<i>A. niger</i> SPP	2	2	3	2,3	19±6	8,2 раза

Из результатов, приведенных в таблице 1 видно, что аэрозоль йодистого калия получаемый с помощью генератора морского воздуха «Аэройод» обеспечивает снижение обсемененности воздушного пространства помещений, контаминированного бактериями штамма *S. Aureus* FDA 209-Р в 11 раз и спорами культуры *A. niger* SPP в 8 раз.

Более высокая эффективность бактерицидного действия аэрозоля в воздушной среде обуславливается нахождением в воздухе меньшего числа микроорганизмов, чем на поверхности твердых тел, вследствие чего обеспечивается более эффективное воздействие аэрозоля на микроорганизмы при меньших концентрациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка новых методов и аппаратуры для обеззараживания воздушной среды помещений является актуальной задачей, поскольку основной средой распространения спор черной плесени является воздушная, а основными путями проникновения стафилококка в организм человека: воздушно-капельный и воздушно-пылевой.

В связи с этим особый интерес представляет использование генератора морского воздуха «Аэройод» (ГМВ «Аэройод»), разработанного российскими производителями ООО ГК «ИнгатеК», так как он позволяет генерировать высокоэффективные биоцидные аэрозоли йодистого калия для обеззараживания воздушного пространства помещений, достаточно компактен и удобен в применении.

В данной работе исследована бактерицидная и спороцидная активность аэрозоля йодистого калия, создаваемого ГМВ «Аэройод». На основании ее можно сделать следующие выводы:

1. Минимальная ингибирующая концентрация растворов йодистого калия на бактерии штамма *S. Aureus* FDA 209-P составляет 50 мг/м³.

2. Аэрозоль KI не обеспечивает бактерицидного и бактериостатического действия на золотистый стафилококк, находящийся на твердых поверхностях вследствие недостаточной его концентрации в воздушной среде помещения (0,029 мг/м³).

3. Обработка помещений аэрозолем йодистого калия обеспечивает снижение обсемененности воздуха золотистым стафилококком в 11 раз, а спорами черной плесени в 8 раз.

Исходя из выше изложенного следует, что аэрозоль йодистого калия, создаваемый генератором морского воздуха «Аэройод» является достаточно эффективным средством для обеззараживания воздуха в помещениях от стафилококков и плесени при проведении профилактической дезинфекции в присутствии людей и животных.