



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИЭМИЗ МЗ РУз,

АБДУШУКУРОВ А.А.

» октябрь 2016 г.

## ПРОТОКОЛ

испытаний противобактериальной эффективности  
«Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии»,  
разработанной в ООО «New Medical Technologies»

Согласно Договора между ООО «New Medical Technologies» (Генеральный директор – Арифбаев Р.С.) и лабораторией Коллекции микроорганизмов НИИЭМИЗ МЗ РУз (зав. к.м.н. Абдухалилова Г.К.) НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний МЗ РУз (Директор института – Абдушукуров А.А.) в июне-июле месяцах 2016 года проведены испытания инактивирующей бактерий эффективности «Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии» (далее Установка), разработанной и созданной ООО «New Medical Technologies». Исследования при испытаниях Установки проводились в лаборатории Коллекции микроорганизмов при НИИЭМИЗ заведующей лабораторией к.м.н. Абдухалиловой Г.К., старшим научным сотрудником к.м.н. Бектимировым А.М.-Т.

### Цель проведения исследований:

Оценить инактивирующую эффективность на бактерии «Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии» с монохроматическим излучателем с длиной волны в 660 nm и ультрафиолетовым излучателем (далее Установка) на жизнеспособность и патогенность бактерий, вызывающих заболевания у человека.

В соответствии с поставленной задачей было отобрано 6 штаммов микроорганизмов из фонда Национальной коллекции микроорганизмов инфекций человека НИИЭМИЗ МЗ РУз.

Перечень культур бактерий с номерами штаммов и регистрационными номерами прилагаются (Приложение 1, 2).

Для лабораторного исследования использовали:

1 культура штамма *Staphylococcus aureus* ATCC (граммположительная бактерия);

1 культура штамма *E. Coli* ATCC (граммотрицательная бактерия);

1 культура штамма *Bacillus Cereus* 24 (вегетативная форма) (граммотрицательная бактерия);

1 культура штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (граммотрицательная бактерия);

1 культура штамма *Bacillus Cereus* 24 (споровая форма) (граммотрицательная бактерия);

Все культуры микроорганизмов идентифицированы в соответствии с общепринятыми рекомендациями и Определителем бактерий Берджи 8-9 издания 1984,1997 гг.

Для исследования применяли суточную агаровую культуру бактерий, из которых перед опытом готовили суспензию бактерий на стерильном физиологическом растворе с концентрацией 0,5 по Мак Фарланду ( $10^8$  микробных клеток на 1 мл).

#### **Постановка опыта.**

Исследования проведены в четырех вариантах с использованием одинакового набора культур микроорганизмов с вариациями воздействия. Количественный учет проводили по всем четырем вариантам

Для исследования применяли суточную агаровую культуру бактерий, из которых перед опытом готовили суспензию бактерий на стерильном физиологическом растворе с концентрацией 0,5 по Мак Фарланду.

Приготовленную взвесь исследуемых штаммов микроорганизмов вносили по 2,0 мл в лунки стерильного планшета для культур клеток. К опытным лункам добавляли по 2,0 мл 0,02% свежеприготовленного раствора метиленовой сини на стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl). Конечные концентрации в лунках составили: 0,01% метиленовой сини.

После соответствующего воздействия из лунок планшета отбиралось содержимое по 1,0 мл и в пробирках готовился ряд десятикратных разведений тест-микроорганизмов в стерильном физиологическом растворе.

Из всех разведений проводили дозированный высеv тест-микроорганизмов на чашки Петри с пластинчатым агаром Мюллера Хинтона и в пробирки с нейтральным бульоном.

Все посеvы инкубировали в термостате при 37<sup>0</sup>С 24 часа. Также были поставлены контроли ростовых качеств бактерий взятых в эксперимент.

Через 24 часа инкубации производили количественный учет полученных результатов, путем подсчета выросших колоний микроорганизмов. Перерасчет проводился с учетом количества колоний (КОЕ), посевной дозы и разведения.

Результат количества микроорганизмов представлялся в КОЕ\мл (колониеобразующие единицы на 1 мл).

Дополнительно проводилось вычисление, путем перевода абсолютных показателей (КОЕ\мл) в десятичные логарифмы ( $\lg$  КОЕ\мл).

#### **Подготовка раствора метиленового синего.**

В каждом эпиндорфе содержится 100,0 мг (0,1 г) метиленового синего (МС). Содержимое 1 эпиндорфа (100,0 мг МС) растворить в 100 мл физиологического раствора, получится 0,1% раствор МС.

2,0 мл 0,1% раствора метиленового синего долить физраствором до 10,0 мл, получится 0,02% раствор МС.

При смешивании с равным объемом суспензии возбудителя и 0,02% раствора МС рабочая концентрация МС составит 0,01%.

## План изучения антибактериальной эффективности Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии

Микроорганизмы, подлежащие изучению эффективности Установки

№ п/п	Микроорганизмы
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC
2	<i>E.coli</i> ATCC
3	<i>Bacillus cereus</i> 24 (вегетативная)
4	<i>Pseudomonas aeruginosae</i> ATCC
5	<i>Candida albicans</i> 10
6	<i>Bacillus cereus</i> 24 (споровая)

### План проведения испытаний Установки:

#### Схема 1

1 Суспензия возбудителя	2 Суспензия возбудителя + добавить в равном количестве физраствор+ облучение 30 минут (Излучатель с длиной волны 660 нм.)	3 Суспензия возбудителя + метиленовый синий 30 минут (замачивание при комнатной температуре без облучения)	4 Суспензия возбудителя + метиленовый синий 30 минут (замачивание при комнатной температуре) + облучение 30 минут в установке (Излучатель с длиной волны 660 нм.)
----------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

#### Схема 2.

1 Суспензия возбудителя	2 Суспензия возбудителя + добавить в равном количестве физраствор+ облучение 30 минут (Ультрафиолетовый облучатель)	3 Суспензия возбудителя + метиленовый синий 30 минут (замачивание при комнатной температуре без облучения)	4 Суспензия возбудителя + метиленовый синий 30 минут (замачивание при комнатной температуре) + облучение 30 минут в установке (Ультрафиолетовый облучатель)
----------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

#### Схема 3.

1 Суспензия возбудителя	2 Суспензия возбудителя + добавить в равном количестве физраствор+ облучение 30 минут Комбинированное облучение (Излучатель с длиной волны 660 нм +Ультрафиолетовый облучатель).	3 Суспензия возбудителя + метиленовый синий 30 минут (замачивание при комнатной температуре без облучения)	4 Суспензия возбудителя + метиленовый синий 30 минут (замачивание при комнатной температуре) + облучение 30 минут в установке Комбинированное облучение (Излучатель с длиной волны 660 нм +Ультрафиолетовый облучатель).
----------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## Результаты изучения антибактериальной эффективности «Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии»

### Исследование №1 - монохроматический излучатель с длиной волны в 660 nm

Проведенными исследованиями установлено.

Воздействие на тест-культуры микроорганизмов установки с длиной волны 660 nm в течении 30 мин оказывает слабое инактивирующее действие на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Процент инактивации составил: *Staphylococcus aureus* -75,0%; *E.coli* -90,0%; *Bacillus cereus* (споровая) – 0; *Pseudomonas aeruginosae* -84,0%; *Candida albicans* -97,0%; *Bacillus cereus* (вегетативная)- 80,0%.

Воздействие 0,01% раствора (в конечной концентрации) метиленового синего уменьшает количество тест микробов более выражено. Процент инактивации составил: *Staphylococcus aureus* -98,25%; *E.coli* -96,0%; *Bacillus cereus* (споровая) – 60,0%; *Pseudomonas aeruginosae* -96,0%; *Candida albicans* - 99,1%; *Bacillus cereus* (вегетативная)- 95,0%.

Воздействие установки с длиной волны 660 nm 30 мин плюс 0,01% раствора (в конечной концентрации) метиленового синего резко уменьшает количество тест-микроорганизмов. Процент инактивации составил: *Staphylococcus aureus* -99,99%; *E.coli* -100,0%; *Bacillus cereus* (споровая) – 99,999%; *Pseudomonas aeruginosae* -99,999%; *Candida albicans* -99,9%; *Bacillus cereus* (вегетативная)- 99,99% (Таблица 1).

Таким образом, из полученных результатов видно, что наиболее выраженным ингибирующим воздействием (инактивация, уменьшение количества) на тест-культуры микроорганизмов обладает установка с длиной волны 660 nm 30 мин. плюс 0,01% раствора (в конечной концентрации) метиленового синего.

Таблица 1.

№ п\п	Микроорганизмы	Концентрация микроорганизмов, КОЕ\мл						
		Исходная суспензия	Исходная суспензия - Облучение (660 нм), 30 мин		Исходная суспензия - Метиленовый синий, 30 мин		Исходная суспензия - Облучение (660 нм) + Метиленовый синий, 30 мин	
		абс	абс	% инактивации	абс	% инактивации	абс	% инактивации
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	$8 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	75,0%	$1,4 \times 10^6$	98,25%	<10	99,99%
2	<i>E.coli</i> ATCC	$10^8$	$10^7$	90,0%	$4 \times 10^6$	96,0%	0	100,0%
3	<i>Bacillus cereus</i> 24 (споровая)	$10^7$	$10^7$	0	$4 \times 10^6$	60,0%	<10 0	99,999%
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	$2,5 \times 10^8$	$4 \times 10^7$	84,0%	$10^7$	96,0%	$2 \times 10^3$	99,999%
5	<i>Candida albicans</i> 10	$2 \times 10^8$	$6 \times 10^6$	97,0%	$1,8 \times 10^6$	99,1%	$2 \times 10^5$	99,9%
6	<i>Bacillus cereus</i> 24 (вегетативная)	$10^8$	$2 \times 10^7$	80,0%	$5 \times 10^6$	95,0%	<10 0	99,9%

## Исследование №2. Воздействие ультрафиолетового излучения.

Проведенными исследованиями установлено.

Воздействие на тест-культуры микроорганизмов установки с УФ-излучением в течении 30 мин оказывает слабое инактивирующее действие на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Процент инаktivации составил: *Staphylococcus aureus* -95,0%; *E.coli* - 97,62%; *Bacillus cereus* (вегетативная) – 93,34%; *Pseudomonas aeruginosae* -0%; *Candida albicans* -50,0%; *Bacillus cereus* (споровая)- 80,0%.

Воздействие 0,01% раствора (в конечной концентрации) метиленового синего уменьшает количество тест микробов вариабельно и слабо. Процент инаktivации составил: *Staphylococcus aureus* - 92,0%; *E.coli* -95,24%; *Bacillus cereus* (вегетативная) – 90,0%; *Pseudomonas aeruginosae* -95,0%; *Candida albicans* -95,0%; *Bacillus cereus* (споровая)- 50,0%.

Воздействие установки с УФ-излучением 30 мин плюс 0,01% раствора (в конечной концентрации) метиленового синего резко уменьшает количество тест-микроорганизмов. Процент инаktivации составил: *Staphylococcus aureus* - 99,999%; *E.coli* -99,05%; *Bacillus cereus* (вегетативная) – 93,34%; *Pseudomonas aeruginosae* -50,0%; *Candida albicans* -97,5%; *Bacillus cereus* (споровая)- 90,0% (Таблица 2).

Таким образом, из полученных результатов видно, что наиболее выраженным ингибирующим воздействием (инаktivация, уменьшение количества) на тест-культуры микроорганизмов обладает установка с УФ-излучением 30 мин. плюс 0,01% раствора (в конечной концентрации) метиленового синего.

Таблица 2.

№ п\п	Микроорганизмы	Концентрация микроорганизмов, КОЕ\мл							
		Исходная суспензия	Исходная суспензия – УФ-облучение, 30 мин			Исходная суспензия - Метиленовый синий, 30 мин		Исходная суспензия - УФ-облучение + Метиленовый синий, 30 мин	
			абс	абс	% инактивации	абс	% инактивации	абс	% инактивации
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>6</sup>	95,0%	8x10 <sup>6</sup>	92,0%	10 <sup>3</sup>	99,999%	
2	<i>E.coli</i> ATCC	4,2x10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	97,62%	2x10 <sup>6</sup>	95,24%	4x10 <sup>5</sup>	99,05%	
3	<i>Bacillus cereus</i> 24 (вегетативная)	1,5x10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	93,34%	1,5x10 <sup>6</sup>	90,0%	10 <sup>6</sup>	93,34%	
4	<i>Pseudomonas aeruginosae</i> ATCC	2x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>6</sup>	0%	10 <sup>5</sup>	95,0%	10 <sup>6</sup>	50,0%	
5	<i>Candida albicans</i> 10	4x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>6</sup>	50,0%	2x10 <sup>5</sup>	95,0%	10 <sup>5</sup>	97,5%	
6	<i>Bacillus cereus</i> 24 (споровая)	10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>7</sup>	80,0%	5x10 <sup>7</sup>	50,0%	10 <sup>7</sup>	90,0%	

### Исследование №3. Комбинированное воздействие монохроматического излучателя с длиной волны в 660 nm + УФ-излучение)

Проведенными исследованиями установлено.

Воздействие на тест-культуры микроорганизмов установки с комбинированным воздействием монохроматическим излучателем с длиной волны в 660 nm + УФ-излучения в течении 30 мин оказывает слабое инактивирующее действие на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Процент инактивации составил: *Staphylococcus aureus* -95,0%; *E.coli* - 91,43%; *Bacillus cereus* (вегетативная) – 90,0%; *Pseudomonas aeruginosae* -64,0%; *Candida albicans* -90,0%; *Bacillus cereus* (споровая)- 50,0%.

Воздействие 0,01% раствора (в конечной концентрации) метиленового синего уменьшает количество тест микробов вариабельно. Процент инактивации составил: *Staphylococcus aureus* - 98,94%; *E.coli* -95,72%; *Bacillus cereus* (вегетативная) – 96,0%; *Pseudomonas aeruginosae* -96,8%; *Candida albicans* - 95,0%; *Bacillus cereus* (споровая)- 50,0%.

Воздействие установки с комбинированным воздействием монохроматическим излучателем с длиной волны в 660 nm + УФ-излучения 30 мин плюс 0,01% раствора (в конечной концентрации) метиленового синего резко уменьшает количество тест-микроорганизмов. Процент инактивации составил: *Staphylococcus aureus* -99,999%; *E.coli* -99,986%; *Bacillus cereus* (вегетативная) – 99,998%; *Pseudomonas aeruginosae* -99,999%; *Candida albicans* -99,984%; *Bacillus cereus* (споровая)- 99,99% (Таблица 3).

Таким образом, из полученных результатов видно, что наиболее выраженным ингибирующим воздействием (инактивация, уменьшение количества) на тест-культуры микроорганизмов обладает установка с комбинированным воздействием монохроматическим излучателем с длиной волны в 660 nm + УФ-излучения 30 мин. плюс 0,01% раствора (в конечной концентрации) метиленового синего.



Таблица 3.

№ п\п	Микроорганизмы	Концентрация микроорганизмов, КОЕ\мл						
		Исходная суспензия	Исходная суспензия – комбинированное воздействие монохроматического излучателя с длиной волны в 660 nm + УФ-излучения, 30 мин			Исходная суспензия - Метиленовый синий, 30 мин		Исходная суспензия - комбинированное воздействие монохроматического излучателя с длиной волны в 660 nm + УФ-излучения + Метиленовый синий, 30 мин
		абс	абс	% инактивации	абс	% инактивации	абс	% инактивации
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	8x10 <sup>7</sup>	4x10 <sup>6</sup>	95,0%	8,5x10 <sup>5</sup>	98,94%	10 <sup>2</sup>	99,999%
2	<i>E.coli</i> ATCC	7x10 <sup>7</sup>	6x10 <sup>6</sup>	91,43%	3x10 <sup>6</sup>	95,72%	10 <sup>4</sup>	99,986%
3	<i>Bacillus cereus</i> 24 (вегетативная)	7x10 <sup>6</sup>	7x10 <sup>5</sup>	90,0%	2,8x10 <sup>5</sup>	96,0%	2x10 <sup>2</sup>	99,998%
4	<i>Pseudomonas aeruginosae</i> ATCC	5x10 <sup>7</sup>	1,8x10 <sup>7</sup>	64,0%	1,6x10 <sup>6</sup>	96,8%	5x10 <sup>2</sup>	99,999%
5	<i>Candida albicans</i> 10	6x10 <sup>6</sup>	6x10 <sup>5</sup>	90,0%	3x10 <sup>5</sup>	95,0%	10 <sup>3</sup>	99,984%
6	<i>Bacillus cereus</i> 24 (споровая)	10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>6</sup>	50,0%	5x10 <sup>6</sup>	50,0%	10 <sup>3</sup>	99,99%

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие «Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии» на культуру микроорганизмов оказало следующий эффект:

- после замачивания микроорганизмов в 0,01% растворе метиленового синего в течение 30 минут с последующим облучением длиной волны 660 nm в течение 30 минут процент инактивации составил: *Staphylococcus aureus* -99,99%; *E.coli* -100,0%; *Bacillus cereus* (споровая) – 99,999%; *Pseudomonas aeruginosae* -99,999%; *Candida albicans* -99,9%; *Bacillus cereus* (вегетативная)- 99,99%.

- после замачивания микроорганизмов в 0,01% растворе метиленового синего в течение 30 минут с последующим облучением УФ-излучением 30 мин процент инактивации составил: *Staphylococcus aureus* -99,999%; *E.coli* -99,05%; *Bacillus cereus* (вегетативная) – 93,34%; *Pseudomonas aeruginosae* -50,0%; *Candida albicans* -97,5%; *Bacillus cereus* (споровая)- 90,0%.

- после замачивания микроорганизмов в 0,01% растворе метиленового синего в течение 30 минут с последующим облучением с комбинированным воздействием монохроматическим излучателем с длиной волны в 660 nm + УФ-излучением в течение 30 мин резко уменьшает количество тест-микроорганизмов. Процент инактивации составил: *Staphylococcus aureus* - 99,999%; *E.coli* -99,986%; *Bacillus cereus* (вегетативная) – 99,998%; *Pseudomonas aeruginosae* -99,999%; *Candida albicans* -99,984%; *Bacillus cereus* (споровая)-99,99%

Таким образом, «Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии» оказывает наиболее выраженный бактериоцидный эффект на микроорганизмы при замачивании минут в течение 30 минут в 0,01% растворе метиленового синего в течение с последующим облучением в течение 30 минут облучением длиной волны 660 nm и комбинированным воздействием монохроматического излучателя с длиной волны в 660 nm + УФ-излучением. Процент инактивации микробиов составляет 99,99%.

**Исполнители:**

Ведущий научный сотрудник  
НИИЭМИЗ, к.м.н.



Абдухалилова Г. К.

Старший научный сотрудник,  
НИИЭМИЗ, к.м.н.



Бектимиров А. М.-Т.