

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИЭМИЗ МЗ РУз,
Д.м.н., проф. ГАДЖИЕВ Б.М.



« 23 » декабря 2019 г.

ПРОТОКОЛ испытаний

Противобактериальной эффективности и эффективности сохранения стерильности медицинского и лабораторного инструментария «Установки для инаktivации вирусов на медицинском инструментарии», разработанной в ООО «New Medical Technologies»

Проведены испытания антибактериальной инаktivирующей эффективности и эффективности сохранения стерильности медицинского и лабораторного инструментария «Установки для инаktivации вирусов на медицинском инструментарии» (далее Установка), разработанной и созданной ООО «New Medical Technologies». Исследования при испытаниях Установка проводились в лаборатории Коллекции микроорганизмов при НИИЭМИЗ.

Цель проведения исследований:

1. Оценить инаktivирующую эффективность на тестовые штаммы бактерий «Установки для инаktivации вирусов на медицинском инструментарии» с монохроматическим излучателем с длиной волны в 660 nm при экспозиции 60 мин и 90 мин без метиленового синего на жизнеспособность бактерий, вызывающих заболевания у человека.
2. Оценить инаktivирующую эффективность на тестовые штаммы бактерий «Установки для инаktivации вирусов на медицинском инструментарии» с монохроматическим излучателем с длиной волны в 590 nm при экспозиции 60 мин и 90 мин без метиленового синего на жизнеспособность бактерий, вызывающих заболевания у человека.
3. Оценить инаktivирующую эффективность на тестовые штаммы бактерий «Установки для инаktivации вирусов на медицинском инструментарии» с монохроматическим излучателем с длиной волны в 660 nm при экспозиции 60 мин и 90 мин без метиленового синего с добавлением

в инкубационную смесь цельной крови человека на жизнеспособность бактерий, вызывающих заболевания у человека.

4. Оценить инактивирующую эффективность на тестовые штаммы бактерий «Установки для инаktivации вирусов на медицинском инструментарии» с монохроматическим излучателем с длиной волны в 590 нм при экспозиции 60 мин и 90 мин без метиленового синего с добавлением в инкубационную смесь цельной крови человека на жизнеспособность бактерий, вызывающих заболевания у человека

5. Оценить инактивирующую эффективность на тестовые штаммы бактерий «Установки для инаktivации вирусов на медицинском инструментарии» с монохроматическим излучателем с длиной волны в 660 нм при экспозиции 60 мин и 90 мин с метиленовым синим без предварительной инкубации с добавлением в инкубационную смесь цельной крови человека на жизнеспособность бактерий, вызывающих заболевания у человека.

6. Оценить инактивирующую эффективность на тестовые штаммы бактерий «Установки для инаktivации вирусов на медицинском инструментарии» с монохроматическим излучателем с длиной волны в 590 нм при экспозиции 60 мин и 90 мин с метиленовым синим без предварительной инкубации с добавлением в инкубационную смесь цельной крови человека на жизнеспособность бактерий, вызывающих заболевания у человека

7. Оценить инактивирующую эффективность на тестовые штаммы бактерий «Установки для инаktivации вирусов на медицинском инструментарии» с монохроматическим излучателем с длиной волны в 660 нм при экспозиции 90 мин и 180 мин без метиленового синего с добавлением в инкубационную смесь цельной крови человека и плазмы крови человека на жизнеспособность *Ps.aeruginosa* и *Bacillus subtilis* (споровая).

8. Оценить эффективность сохранения стерильности инструментария «Установки для инаktivации вирусов на медицинском инструментарии» при облучении стерильного медицинского и лабораторного инструментария монохроматическим излучателем с длиной волны в 590 нм -10 часов, монохроматическим излучателем с длиной волны в 660 нм - 10 часов, ультрафиолетовыми излучателями - 10 часов

Технология проведения исследований

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

Для микробиологического лабораторного исследования использовали:
2 культуры грамотрицательных бактерий (1 штамм *Pseudomonas aeruginosa*, 1 штамм *E. coli*);

2 культуры грамположительных бактерий (*Bacillus cereus* в вегетативной форме, *Staphylococcus aureus*);

1 культура споровой формы *Bacillus cereus*

1 культура дрожжеподобных грибов рода *Candida albicans*

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 12 экспериментальных вариантах с использованием одинакового набора культур микроорганизмов с вариациями воздействия, в 2 экспериментальных вариантах с использованием только «проблемных микроорганизмов» *Ps.aeruginosa* и *Bacillus subtilis* (споровая), 3 экспериментальных вариантах с облучением стерильного лабораторного и медицинского инструментария. Итого проведено 17 экспериментальных исследований. Каждое исследование в обязательном порядке дополнялось контролем.

Количественный учет проводили по всем вариантам. Результаты представлены в Приложениях (1, 2, 3, 4, 5).

Схема испытаний эффективности Установки для инактивации вирусов на тест-штаммы микроорганизмов

1. Контроль (культура клеток)
2. Облучение сверху и снизу без метиленового синего (тест штаммы)
3. Облучение сверху и снизу без метиленового синего (тест штаммы + цельная кровь)
4. Облучение сверху и снизу (тест штаммы + цельная кровь + метиленовый синий без предварительной инкубации)

Приготовленную взвесь исследуемых штаммов микроорганизмов вносили по 1,0 мл в лунки планшета для культур клеток. К опытным лункам добавляли по 1,0 мл 0,02% водного раствора метиленовой сини. Конечные концентрации в лунках составили: 0,01% метиленовой сини. В контрольных исследованиях, если по протоколу не использовался раствор метиленовой

сини, добавляли стерильный изотонический раствор хлорида натрия (0,9% раствор NaCl-физ.раствор).

Готовили ряд десятикратных разведений тест-микроорганизмов в стерильном физиологическом растворе.

После соответствующего воздействия проводили высев на чашки Петри с пластинчатым агаром Мюллера Хинтона по 0,1 мл и в пробирки с 9,0 мл нейтрального бульона по 1,0 мл. Все посевы инкубировали в термостате при 37⁰ С 24 часа. Также были поставлены контроли ростовых качеств бактерий, взятых в эксперимент.

Через 24 часа инкубации производили количественный учет полученных результатов. Перерасчет проводился с учетом посевной дозы и разведения. Результат количества микроорганизмов представлялся в КОЕ\мл (колониеобразующие единицы на 1 мл).

Схема испытаний эффективности Установки для инаktivации вирусов на эффективность сохранения стерильности медицинского и лабораторного инструментария

1. Облучение стерильного инструментария монохроматическим излучателем с длиной волны в 590 нм -10 часов
2. Облучение стерильного инструментария монохроматическим излучателем с длиной волны в 660 нм - 10 часов,
3. Облучение стерильного инструментария ультрафиолетовыми излучателями - 10 часов

После облучения с поверхности медицинского (металлические ножницы, скальпели, пинцеты по 2 штуки) и лабораторного (одноразовые стерильные пластиковые бактериологические петли и ватные тампоны на деревянной палочке по 2 штуки) брались смывы на тиогликолевую среду (среда для контроля стерильности). Смывы инкубировались при температуре 37 ° С в течение 5 суток с высевом на плотную питательную среду (питательный агар) на 1, 3, 5 сутки.

Использовалось 2 контроля: 1. Смывы с инструментария до облучения (контроль исходной стерильности) и 2. Смывы с инструментария при экспозиции 10 часов в установке без включения излучателя.

1. Облучение сверху и снизу без метиленового синего (тест штаммы)

#	Ингибирующее действие на микроорганизмы в % по отношению к контрольным величинам						Контроль, КОЕ\мл
	Желтый – 590 нм		Красный – 660 нм				
	60 мин	90 мин	60 мин	90 мин			
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	97,890%	98,999%	99,899%	99,999%	7x10 ⁷	
2	<i>E.coli</i> ATCC	98,955%	98,996%	99,926%	99,986%	6x10 ⁷	
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	97,879%	98,999%	99,899%	99,999%	4x10 ⁷	
4	<i>Bacillus cereus</i> 24 (вегетативная)	99,995%	99,878%	99,915%	99,998%	7x10 ⁶	
5	<i>Bacillus cereus</i> 24 (споровая)	97,999%	98,899%	98,959%	99,99%	4x 10 ⁷	
6	<i>Candida albicans</i> 10	97,988%	98,996%	98,986%	99,986%	2x 10 ⁷	

2. Облучение сверху и снизу без метиленового синего (тест штаммы + цельная кровь)

#	Ингибирующее действие на микроорганизмы в % по отношению к контрольным величинам						Контроль, КОЕ\мл
	Желтый – 590 нм		Красный – 660 нм				
	60 мин	90 мин	60 мин	90 мин			
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	82,0%	84,25%	83,25%	85,0%		3x10 ⁷
2	<i>E.coli</i> ATCC	77,0%	81,25%	77,67%	81,43%		4x10 ⁷
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	72,56%	72,0%	74,89%	74,0%		2x10 ⁷
4	<i>Bacillus cereus</i> 24 (вегетативная)	80,9%	84,8%	81,55%	80,0%		5x10 ⁶
5	<i>Bacillus cereus</i> 24 (споровая)	70,8%	74,68%	72,65%	75,555%		5x 10 ⁷
6	<i>Candida albicans</i> 10	75,9%	77,8%	77,55%	79,5%		3x 10 ⁷

**3. Облучение сверху и снизу
(тест штаммы + цельная кровь + метиленовый синий без предварительной инкубации)**

#	Ингибирующее действие на микроорганизмы в % по отношению к контрольным величинам						Контроль, КОЕ\мл
	Желтый – 590 нм		Красный – 660 нм				
	60 мин	90 мин	60 мин	90 мин			
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	90,0%	96,0%	92,0%	97,0%		7x10 ⁷
2	<i>E.coli</i> ATCC	88,55%	95,9%	90,45%	98,99%		5x10 ⁷
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	76,55%	85,78%	74,0%	87,98%		7x10 ⁷
4	<i>Bacillus cereus</i> 24 (вегетативная)	91,5%	98,998%	90,0%	99,8%		8x10 ⁶
5	<i>Bacillus cereus</i> 24 (споровая)	80,55%	87,89%	80,0%	89,96%		8x 10 ⁷
6	<i>Candida albicans</i> 10	89,88%	94,99%	90,45%	95,96%		3x 10 ⁷

4. Облучение сверху и снизу без метиленового синего

#	Время облучения	Микроорганизм	Образец	Ингибирующее действие на микроорганизмы в % по отношению к контрольным величинам	
				Красный- 660 нм	Контроль, КОЕ\мл
1	90 мин	<i>Ps.aeruginosa</i>	+ цельная кровь	75,0%	5×10^7
2	90 мин	<i>Bacillus subtilis (спорная)</i>	+ цельная кровь	71,43%	10^7
3	90 мин	<i>Ps.aeruginosa</i>	+ плазма крови	74,0%	5×10^7
4	90 мин	<i>Bacillus subtilis (спорная)</i>	+ плазма крови	70,0%	10^7
5	180 мин	<i>Ps.aeruginosa</i>	+ цельная кровь	77,0%	2×10^7
6	180 мин	<i>Bacillus subtilis (спорная)</i>	+ цельная кровь	78,0%	2×10^7
7	180 мин	<i>Ps.aeruginosa</i>	+ плазма крови	79,0%	2×10^7
8	180 мин	<i>Bacillus subtilis (спорная)</i>	+ плазма крови	79,0%	2×10^7

5. Облучение стерильного инструментария

№	Вид излучателя	Время экспозиции	Стерильность медицинского и лабораторного инструментария					
			Медицинский, n=6		Лабораторный, n=4		Итого, n=10	
			абс	%	абс	%	абс	%
1	Желтый- 590 нм	10 часов	5	83,3	3	75	8	80
2	Красный— 660 нм	10 часов	5	83,3	3	75	8	80
3	Ультрафиолет	10 часов	5	83,3	3	75	8	80
4	Контроль	10 часов	4	66,7	2	50	6	60
5	Контроль исходной стерильности	-	6	100	4	100	10	100

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенными исследованиями установлено.

При облучении тест штаммов монохроматическим излучателем красным и желтым установлен высокий процент инактивации бактерий, который более выражен для грамположительных бактерий.

Процент инактивации тест штаммов микроорганизмов является более низким при добавлении к взвеси микроорганизмов цельной крови и плазмы крови человека.

При 10-ти часовой экспозиции всеми видами излучателей получены одинаковые величины сохранения стерильности медицинского и лабораторного одноразового инструментария. Процент сохранения стерильности во всех случаях излучателей выше, чем сохранение инструментов без облучения, что указывает на положительные эффекты красного, желтого и УФ излучений в течение 10 часов.

Результаты, полученные в ходе данного исследования, являются модельными лабораторными экспериментами и относятся к конкретным эталонным музейным штаммам микроорганизмов в чистой культуре в конкретных экспериментальных исследованиях по заданным параметрам.

Исполнители:

Старший научный сотрудник НИИЭМИЗ,
к.м.н.

А.М.-Т. Бектимиров

Младший научный сотрудник НИИЭМИЗ

И.Ф.Ахмедов

Младший научный сотрудник НИИЭМИЗ

Х.А.Рахматова

Лаборант

Д.Тухтабекова