



27 kwietnia 2020 r

Ministerstwo Obrony Federacji Rosyjskiej
FEDERALNA INSTYTUCJA PUBLICZNA
„48. CENTRALNY INSTYTUT BADAWCZY” MINISTERSTWA OBRONY FEDERACJI ROSYJSKIEJ.
(FSBI „48. CRI” rosyjskiego Ministerstwa Obrony)

ZAAKCEPTOWANE PRZEZ
Szef FSBI „48. CRI”
rosyjskiego Ministerstwa Obrony
Doktor nauk biologicznych, profesor, członek korespondent RAS

S.V. Borisewicz

PROTOKÓŁ Z BADANIA w sprawie skuteczności dezynfekcji urządzeń „Yanex 2M” i „Yanex 5” na powierzchniach metalowych zanieczyszczonych koronawirusem SARS-CoV-2

1 OBIEKT BADAŃ

1.1 Obiektami testowymi są jednostki „Yanex 2M” i „Yanex 5”.

2 ZAŁOŻENIA I CEL BADANIA

2.1 CEL BADANIA

Celem testu jest określenie skuteczności dezynfekcji na powierzchniach metalowych zanieczyszczonych koronawirusem SARS – CoV-2 (zwanym dalej „koronawirusem”) za pomocą jednostek „Yanex 2M” i „Yanex 5”.

2.2 ZAŁOŻENIA:

2.2.1 Określenie początkowego poziomu zanieczyszczenia powierzchni testowych przed napromieniowaniem ich urządzeniami „Yanex 2M” i „Yanex 5”.

2.2.2 Określanie poziomu resztkowego zanieczyszczenia powierzchni testowych po napromieniowaniu ich za pomocą urządzenia „Yanex 2M” (próbka nr 1);

2.2.3 Określanie poziomu resztkowego zanieczyszczenia powierzchni testowych po napromieniowaniu ich za pomocą urządzenia „Yanex 5”. (próbka nr 2).

3 WARUNKI OGÓLNE

3.1 Testy przeprowadzono zgodnie z głównymi wymaganiami Wytycznych Sanitarno-Epidemiologicznych SP 1.3.3118-13 „Bezpieczeństwo pracy z mikroorganizmami z grup ryzyka I-II” oraz Wytycznej R 3.5.1904-04 „Działanie bakteriobójcze w świetle ultrafioletowym do dezynfekcji powietrza w pomieszczeniach ”.

3.2 Szacowane czynniki i współczynniki projektowe

3.2.1 Do badań użyto powierzchni ze stali nierdzewnej 5 × 5 cm (gatunek 12X18H10T). Badane obiekty zostały umieszczone na wysokości 1 metra od podłogi i 2 metrów od urządzenia „Yanex 2M” lub 1,5 metra od urządzenia „Yanex 5”.



Jednostki zostały umieszczone zgodnie ze schematami dostarczonymi przez zamawiającego.

3.3.2 Biologiczną amplifikację koronawirusa (siła biologiczna, poziomy zanieczyszczenia) określono za pomocą matryc z monowarstwą jednodniowych komórek Vero C1008 (powierzchnia 25 cm²) z podłożem agarowym metodą selekcji negatywnej.

3.3.3 Siła biologiczna została obliczona zgodnie ze wzorem 1:

$$A = \frac{a_{cp} \cdot b_n}{c} \quad (1)$$

gdzie A jest siłą biologiczną, PFU · ml⁻¹;

a_{cp} - średnia ważona ujemnych liczebności kolonii na matrycy obliczona zgodnie ze wzorem 2, PFU;

b_n - najwyższy stopień rozcieńczenia;

c - zaszczipiona objętość, ml.

$$A_{cp} = \frac{a_1 + a_2 + \dots + a_n}{b_n \left(\frac{1}{b_1} + \frac{1}{b_2} + \dots + \frac{1}{b_n} \right)}, \quad (2)$$

gdzie a₁-a_n jest średnią ujemną liczbą kolonii dla rozcieńczeń materiału badanego od 1 do n; b₁-b_n - stopień rozcieńczenia badanego materiału.

3.3.4 Poziomy zanieczyszczenia obiektów testowych odpowiednio dla początkowego i wtórnego zanieczyszczenia obliczono zgodnie ze wzorem 3:

$$A_s = \frac{A \cdot V}{S}, \quad (3)$$

gdzie A_s jest poziomem zanieczyszczenia, PFU · cm⁻²;

V - objętość cieczy sorpcyjnej użytej do naniesienia próbki materiału biologicznego na powierzchnię, ml;

S - obszar zanieczyszczenia badanego obiektu, cm².

3.3.5 Analizę statystyczną uzyskanych danych przeprowadzono obliczając odchylenie standardowe po wykonaniu 5 testów.

4 MATERIAŁY I METODY

4.1 Urządzenia i sprzęt wymagany do badań:

- jednostka „Yanex 2M”;

- jednostka „Yanex 5”;

- termostat MIR 254-PE, 240 L, wyprodukowany przez Panasonic;

- sterylizator elektrycznych instrumentów medycznych, GOST 19596-89E;

- lodówka użytkowa „Samsung”, 2 komory, model RL44ECPS;



- automatyczny termostat „Binder”, kontrola temperatury 20-60 stopni, objętość 53 dm³, wyprodukowany w USA;
- szafka bezpieczeństwa biologicznego II klasy, typ A2, BAVp-01 „Laminar-S” (220.150) „Lamsystems”, ZAO „Laminarnye sistemy”;
- elektryczna płyta grzewcza typu GOST 14919-83E;
- próbki bakteriologiczne, GOST 23932-82E;
- korki z gumowym stożkiem, GOST 7852-76;
- pipety pomiarowe 1,0, 5,0 i 10 cm³, klasa dokładności 2, GOST 20292-74E;
- szklane naczynia stożkowe, 100 i 250 cm³, odporne termicznie i chemicznie, GOST 25336-82;
- szklane bagietki, FSBI „48. CRI” Ministerstwa Obrony RF;
- szpiczaste nożyczki okulistyczne, Interrepublicańskie przepisy techniczne 42-64-66;
- kleszcze medyczne, GOST 21241-75;
- laboratoryjna lampa alkoholowa, GOST 25336-82E;
- laboratoryjny stojak zaciskowy typu SILB, Przepisy techniczne 79 RF 265-72-5;
- gumowa strzykawka z kulką, przepisy techniczne 38.106-141-80;

Sprzęt i urządzenia pomiarowe używane do testów są metrologicznie sprawdzane i akredytowane zgodnie z GOST 8,576-2000 i GOST 008,002-2013.

4.2 Materiały eksploatacyjne i odczynniki chemiczne wymagane do badań:

- referencyjna kultura wirusa SARS-CoV-2 (izolat) z dnia 16 marca 2020 r. o sile biologicznej $5,8 \cdot 10^6$ PFU · ml⁻¹;
- hodowla komórek Vero 1008;
- bio agar (wyprodukowany przez Difco);
- płodowa surowica cielęca (wyprodukowana przez HyClone);
- antybiotyki do hodowli komórkowych (produkowane przez HyClone);
- neutralna czerwien (żywnota czerwien dla kultur komórkowych);
- roztwory Hanksa, Earle'a, VKA, wodorowęglanu sodu, glutaminianu (wytwarzane zgodnie z procedurą FSBI „48. CRI” Ministerstwa Obrony RF);
- roztwór soli zgodnie z PR-07-320-35, zalecenie FSBI „48. CRI” Ministerstwa Obrony RF;
- rektyfikowany alkohol etylowy, GOST 18300-72;
- woda destylowana, GOST 6709-72;
- ołówek szklany, Przepisy techniczne 46-22-904-78;
- lecznicza wata, GOST 5556-81;
- gaza medyczna, przepisy techniczne 388-23-501-79;
- rękawiczki chirurgiczne, GOST 3-88;
- nadtlenuk wodoru klasy A, przepisy techniczne 2123-002-25665344-2008.

4.3 Personel przeprowadzający badania na mikroorganizmach z grup ryzyka I-II musi posiadać odzież roboczą i ochronną, osobiste wyposażenie ochronne i środki higieny osobistej zgodnie ze znormalizowanymi przepisami.

4.4 Testy przeprowadzono w obszarze „zakaźnym” w maksymalnie odizolowanych warunkach laboratoryjnych.



5 WARUNKI I PROCEDURA BADAŃ

5.1 Testy przeprowadzono w „zakaźnym” obszarze roboczym w temperaturze otoczenia (24 ± 1) ° C i wilgotności względnej (42 ± 3)%.

Początkowa siła biologiczna hodowli wirusa SARS-CoV-2 (izolat z dnia 16 marca 2020 r.) Wynosiła $5,8 \cdot 10^6$ PFU · ml⁻¹.

5.2 Do testów użyto płytek testowych 5 × 5 cm zanieczyszczonych koronawirusem.

5.3 Jednostki zostały przydzielone w następujący sposób:

- „Yanex 2M ”: urządzenie było umieszczone bokiem, w odległości 2 metrów od badanych obiektów umieszczonych pionowo na wysokości 1 metra. Tryby „powierzchniowy / bakteriobójczy” (zwany dalej „trybem nr 1”), „powierzchniowy / sporobójczy” (dalej „trybem nr 2”) i „powierzchniowy / gruźliczny” (zwany dalej „trybem nr 3”) zastosowano kolejno ;

- „Yanex 5”: urządzenie było umieszczone bokiem, w odległości 1,5 metra od testowanych obiektów umieszczonych pionowo na wysokości 1 metra. Tryby „powierzchniowy / bakteriobójczy” (dalej „tryb nr 4”), „powierzchniowy / sporobójczy” (dalej „tryb nr 5”) i „powierzchniowy / guzowaty” (dalej „tryb nr 6”) zostały użyte kolejno .

Dla każdej jednostki zastosowano kolejno każdy tryb dezynfekcji.

5.3 Testy przeprowadzono zgodnie ze standardową procedurą opracowaną przez FSBI „48. CRI” Ministerstwa Obrony RF i zgodnie z wytyczną R 4.2.2643-10.

5.5 Podczas pierwszego etapu testów monowarstwę jednodniowej hodowli komórek Vero przygotowano na matrycy. Pożywkę wzrostową wylano następnie z matrycy z monowarstwą komórek, wybrano do testowania, i matryce znakowano.

5.6 0,1 ml wyjściowej kultury koronawirusa o sile biologicznej $1,0 \times 10^6$ PFU x ml⁻¹ nałożono na badane objekty. Ilość równomiernie rozprowadzono na powierzchni badanego obiektu za pomocą szklanego urządzenia do powlekania.

5.7 Objekty testowe podzielono na grupy testową i kontrolną. Kontrolne objekty testowe wykorzystano do kontroli w momencie zastosowania koronawirusa i podczas odkażania. W tym celu pobrano 5 obiektów testowych.

5.8 Próbkę pobrano z badanych obiektów przez wymaz z dwóch tamponów z gazy (zwilżonych i suchych). Każdą próbkę wytrząsano ręcznie przez 3 minuty w 10 ml sorbującej cieczy.

5.9 Aby określić siłę biologiczną koronawirusa, do każdej matrycy z monowarstwą dodano 0,5 ml odpowiednio rozcieńczonej cieczy sorpcyjnej. Inokulat rozprowadzono równomiernie na monowarstwie, kołysząc matrycę.

5.10 Matryce umieszczono poziomo z zakażoną komórką monowarstwą skierowaną w dół. Matryce inkubowano przez 60 minut w termostacie w ($37,0 \pm 0,5$) CC.

5.11 Po inkubacji inokulację usunięto pipetą i do każdej matrycy dodano 10 ml pierwotnego podłoża z agarem, doprowadzonego do temperatury ($42,0 \pm 0,5$) ° C. Następnie matryce umieszczono poziomo z zakażoną komórką monowarstwą skierowaną w dół.

5.12 Po zestaleniu się nakładki (10-15 min) matryce odwrócono monowarstwą do góry i umieszczono w termostacie w temperaturze ($37,0 \pm 0,5$) ° C na 48 godzin.

5.13 Po inkubacji do matrycy dodano 10 ml wtórnego podłoża agarowego z obojętną czerwienią w celu wybarwienia monowarstwy. Następnie matryce inkubowano przez kolejne 24 godziny w ($37,0 \pm 0,5$) CC. Następnie obliczono ujemną liczbę kolonii.

5.14 Testy przeprowadzono pod następującymi kontrolami:

- kontrola początkowej mocy biologicznej koronawirusa;
- kontrola rozcieńczającej (sorbującej) cieczy;
- kontrola hodowli komórek Vero 1008.



6 WYNIKI BADAŃ

6.1 Wyniki określania początkowego i resztkowego poziomu zanieczyszczenia koronawirusem badanych obiektów, a także skuteczność ich dezynfekcji przez jednostkę „Yanex 2M” dla trybów nr 1-3 podano w tabeli 1.

Czas ekspozycji wynosił odpowiednio :

- 2,0 minuty dla trybu nr 1;
- 3,0 minuty dla trybu nr 2;
- 6,5 minuty dla trybu nr 3.

Tabela 1-Skuteczność dezynfekcji badanych obiektów przez jednostkę „Yanex 2M”,n = 5, $\bar{x}\pm\bar{\sigma}$

Typ powierzchni i rozmiar badanej próbki	Średni początkowy poziom zanieczyszczenia badanego obiektu w punkcie czasowym...n·10 ³ PFU·cm ⁻²		Poziom zanieczyszczenia resztkowego dla trybu..., PFU·cm ⁻²					
			Nr. 1		Nr. 2		Nr. 3	
	0 min	6.5 min	próbka	średnia	próbka	średnia	próbka	średnia
Stal nierdzewna 12X18H10T, 5×5 cm	3.62±0.28	2.95±0.16	0.8	0.72±0.60	0	0	0	0
			1.6		0			
			0		0			
			0.8		0			
			0.4		0			

6.2 Wyniki określania początkowego i resztkowego poziomu zanieczyszczenia koronawirusem badanych obiektów, a także skuteczność ich dezynfekcji przez jednostkę „Yanex 5” dla trybów nr 4-6 podano w tabeli 2.

Czas ekspozycji wynosił odpowiednio :

- 3 minuty 39 sekund dla trybu nr 4;
- 6 minut 45 sekund dla trybu nr 5;
- 14 minut 03 sekund dla trybu nr 6.

Tabela 2 - Skuteczność dezynfekcji badanych obiektów przez jednostkę „Yanex 5”,n =5, $\bar{x}\pm\bar{\sigma}$

Typ powierzchni i rozmiar badanej	Średni początkowy poziom zanieczyszczenia badanego obiektu w punkcie czasowy n·10 ³		Poziom zanieczyszczenia resztkowego dla trybu ..., PFU·cm ⁻²		
			Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6



próbki	PFU·cm ⁻²							
	0 min	14.0 min	próbka	średnia	próbka	średnia	próbka	średnia
Stal nierdzewna 12X18H10T, 5×5 cm	3.62±0.28	2.63±0.21	0.4	0.48±0.44	0	0	0	0
			0.8		0			
			0.4		0			
			0		0			
			0.8		0			

6.3 Wyniki podane w tabeli 1 pokazują, że napromieniowanie generowane przez jednostkę „Yanex 2M” prowadzi do odkażania badanych obiektów metalowych zanieczyszczonych przez koronawirusa ($3,62 \pm 0,28$) PFU · cm⁻². Skuteczność dezynfekcji osiąga 99,98% w trybie „Powierzchniowym / bakteriobójczym”; oraz 100% (całkowite odkażanie) dla trybów „Powierzchniowy / sporobójczy” i „Powierzchniowy / gruzliczny”.

6.3 Wyniki podane w tabeli 2 pokazują, że napromieniowanie generowane przez jednostkę „Yanex 5” prowadzi również do odkażania badanych obiektów metalowych zanieczyszczonych przez koronawirusa ($3,62 \pm 0,28$) PFU · cm⁻². Przy tym skuteczność dezynfekcji osiąga 99,99% dla trybu „Powierzchniowego / bakteriobójczego”; oraz 100% (całkowite odkażanie) dla trybów „Powierzchniowy / sporobójczy” i „Powierzchniowy / gruzliczny”.

7. WNIOSKI

7.1 Jednostka „Yanex 2M” zapewnia dezynfekcję powierzchni metalowych zanieczyszczonych koronawirusem SARS-CoV-2 z wydajnością 99,98%, gdy używany jest tryb „Powierzchniowy / bakteriobójczy”; oraz ze 100% wydajnością przy użyciu trybów „Surface / sporicidal” i „Surface / tubercular”.

7.2 Jednostka „Yanex 5” zapewnia dezynfekcję powierzchni metalowych zanieczyszczonych koronawirusem SARS-CoV-2 z wydajnością 99,99% przy zastosowaniu trybu „Powierzchniowy / bakteriobójczy”; oraz ze 100% wydajnością przy użyciu trybów „Surface / sporicidal” i „Surface / tubercular”.

7.3 Uzyskane wyniki pozwalają na zalecenie zastosowania urządzeń „Yanex 2M” i „Yanex 5” do dezynfekcji powierzchni w ramach reakcji epidemiologicznej w celu zwalczania rozprzestrzeniania się infekcji koronawirusem.

Kierownik jednostki badawczej 10
podpułkownik
A. Zverev

Starszy naukowiec, jednostka badawcza 10 D. Masyakin
Starszy naukowiec, jednostka badawcza 10 N. Chepurenkov
Starszy naukowiec, jednostka badawcza 1 I. Shatokhina
Naukowiec, jednostka badawcza 1 N. Boyarskaya
Naukowiec, jednostka badawcza 10 V. Bykov
Naukowiec, jednostka badawcza 10 I. Androshchuk
Naukowiec, jednostka badawcza 10 E. Kovalchuk
Młodszy naukowiec, jednostka badawcza 10 V. Trufanova