

Перевод на русский з украинского языка

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ
ИМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО

03143, м. Киев, вул. Заболотного, 154; тел. (044) 526 23 11, факс 526 23 79,
E-mail: andrienko@nas.gov.ua

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института
микробиологии и вирусологии им.
Д.К. Заболотного НАНУ
академик НАН Украины
Николай СПИВАК
30.07.2023 г

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
«Исследование бактерицидного, вирулицидного, фунгицидного и туберкулоцидного действия
пероксида водорода 35% производства ООО «ИНТЕР-СИНТЕЗ»
согласно договору 59-2023 от 01 мая 2023 года

Заведующая отделом репродукции вирусов
к.б.н., старший исследователь

Светлана ЗАГОРОДНЯ

Киев – 2023

СПИСОК АВТОРОВ

Руководитель НИР зав. отдела, к.б.н.		С. Загородня
зав. отдела, д.б.н		Л. Авдеева
Ст. Н.С., к.б.н.		Л. Артюх
Ст. н.с., к.б.н.		Н. Рибальченко
Ст. н.с., к.б.н.		О. Юрьева
Н.с., к.б.н.		О. Повница
Вед. Инж.		П. Заремба
Вед. Инж.		Л. Можаява
Старший лаборант		О. Йовенко
лаборант		Н. Ткаченко

Перевод на русский з украинского языка

Цель работы заключалась в исследовании бактерицидного, вирулицидного, фунгицидного и туберкулоцидного действия пероксида водорода 35% по ТУ У 24.1-25548331.002-2001 производства ООО «ИНТЕР-СИНТЕЗ» партия 2,3 дата производства 07.02.2023 г.

БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ СРЕДСТВА ДЕЗИНФЕКЦИОННОГО

«ПЕРЕКИС ВОДОРОДА 35%»

Испытание бактерицидной активности образца дезинфицирующего средства «Перекис водорода 35%» проводили согласно ДСТУ EN 1040:2004 «Средства химические дезинфекционные и антисептические. Основная антибактериальная активность. Методы испытаний и требований (стадия 1) (EN 1040:1997 IDT).

1. Метод испытания

Бактерицидную активность проверяли, используя два штамма бактерий:

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

1.1. Приготовление рабочей бактериальной суспензии. Рабочие культуры бактерий выращивали на скошенном триптон-соевом агаре состава, г/л: триптон -15,0; соевый пептон – 5,0; NaCl – 5,0; агар – 15,0; дистиллированная вода – 1000 см³. После застывания засеянные пробирки помещали в термостат при температуре (37±1)°С на 24 часа. Через 24 часа инкубирования готовили испытательные суспензии бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* с концентрацией клеток 1,5-5×10⁸ КОЕ/см³ используя раствор для разведения состава, г/л: триптон - 1,0; NaCl – 8,5; дистиллированная вода – 1000 см³.

Дополнительно контролировали содержание жизнеспособных бактерий путем разведения испытательных суспензий в 10⁶ и 10⁷ раз раствором для разбавления. Полученные разведения в двукратной повторности вносили в чашку Петри и добавляли 12-15 см³ расплавленного и охлажденного до 45±1 С триптон-соевого агара. После застывания засеянные чашки помещали в термостат при температуре (37±1)°С на 24 часа.

1.2. Валидация метода с нейтрализацией разбавленного раствора

В качестве нейтрализующего вещества использовали водный раствор полисорбата 80 (30 г/дм³).

Испытательную суспензию разбавляли в 10⁶ и 10⁵ раз раствором для разбавления. Для контроля содержания жизнеспособных бактерий из полученной суспензии отбирали по 1 см³, переносили в стерильную пробирку и разбавляли раствором для разбавления в 10 раз. Полученные разведения в двукратной повторности вносили в чашку Петри и добавляли 12-15 см³ расплавленного и охлажденного до 45±1 С триптоп-соевого агара. После застывания засеянные чашки помещали в термостат при температуре (37±1)°С на 24 часа.

Водный раствор полисорбата 80 (30 г/дм³) отбирали пипеткой 8,0 см³ и вносили в две пробирки. Первую использовали для контроля токсичности, вторую – для контроля эффективности нейтрализования разбавленного раствора. После этого в первую пробирку добавляли 1 см³ дистиллированной стерильной воды, а во вторую испытательный раствор. Затем в каждую из пробирок вносили по 1 см³ разбавленной в 10⁵ - 10⁶ испытательной суспензии, перемешивали и оставляли на 30±1 мин. Из каждой пробирки в двукратной повторности отбирали по 1 см³, вносили в чашку Петри и добавляли 12-15 см³ расплавленного и охлажденного до 45±1 °С триптон-соевого агара. После застывания засеянные чашки помещали в термостат при температуре (37±1)°С на 24 часа.

1.3. Испытание антибактериальной активности.

Готовили испытательные растворы дезинфекционного средства «Перекис водорода 35%» с концентрацией действующего вещества 0,54; 1,09; 2,18 %. Отбирали пипеткой 8,0 см³ испытательного раствора и вносили в пробирку, после чего вносили 1,0 см³ дистиллированной стерильной воды и 1,0 см³ испытательной суспензии с концентрацией клеток 1,5-5×10⁸ КОЕ/см³. Затем немедленно включали таймер и смесь перемешивали. Активность продуктов определяли за время взаимодействия компонентов, выбравших равным 30 мин±10 с.

Непосредственно перед окончанием выбранного периода взаимодействия компонентов смесь перемешивали, отбирали пипеткой 1,0 см³ и переносили в пробирку, содержащую 8,0 см³ нейтрализующего вещества (полисорбата 80 (30 г/дм³)) и 1,0 см³

Перевод на русский з украинского языка

стерильной дистиллированной воды. Через 5 мин ± 10 с немедленно отбирали две пробы по $1,0 \text{ см}^3$ смеси и переносили каждую пробу в отдельную чашку Петри и добавляли $12-15 \text{ см}^3$ расплавленного и охлажденного до $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ триптоп-соевого агара. После застывания засеянные чашки помещали в термостат при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 24 часа.

Эффективной считали концентрацию биоцида, которая снижала содержание жизнеспособных клеток бактерий в 10^5 раз.

2. Результаты испытания

Таблица 2.1. Проверка методологии и валидации метода с нейтрализацией разбавленного раствора

Испытательный штамм бактерий	Водержание жизнеспособных бактерий, КОЕ/см ³			
	Испытательная бактериальная суспензия (N)	Разведенная бактериальная суспензия (N _v)	Контроль токсичности нейтрализующего вещества (N _x)	Контроль эффективности нейтрализования разбавленного раствора (N _y)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2,8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$
Для двух испытательных штаммов: значение N- в диапазоне $1,5 \times 10^8 - 5 \times 10^8$ КОЕ/см ³ ; значение N _v - в диапазоне $6,0 \times 10^2 - 3,0 \times 10^3$ КОЕ/см ³ ; значение N _x > 0,05 N _v значение N _y > 0,05 N _v				
Отсутствие токсичности и эффективность нейтрализования подтверждено при проверке нейтрализующего вещества в условиях испытания продукта с испытательной концентрацией 2,18%.				

Таблица 2.2. Определение содержания жизнеспособных бактерий в пробной смеси

Испытательный штамм бактерий	Содержание жизнеспособных бактерий N _a , КОЕ/см ³ в испытательной смеси при указанных испытательных концентрациях продукта			Показатель снижения уровня жизнеспособности бактерий при указанных испытательных концентрациях продукта		
	0,54%	1,09%	2,18%	0,54%	1,09%	2,18%
<i>Staphylococcus aureus</i>	$4,0 \times 10^2$	28,6	2,4	$0,7 \times 10^5$	$9,8 \times 10^5$	$7,3 \times 10^6$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3,2 \times 10^2$	20,2	1,6	$0,9 \times 10^5$	$9,7 \times 10^5$	$8,8 \times 10^6$

Таблица 2.3. Расчет неопределенности испытания

Испытательный штамм бактерий	Содержание жизнеспособных бактерий N _a , КОЕ/см ³ в испытательной смеси (0,54%)										Среднее значение	Средне-квадратическое отклонение δ	Расширенная неопределенность испытания, $U=2 \times \delta$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
<i>Staphylococcus aureus</i>	394	376	435	385	415	423	355	362	410	450	400,5	9,3	18,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	330	300	345	338	352	341	298	284	328	335	325,1	7,0	14,0
	Содержание жизнеспособных бактерий N _a , КОЕ/см ³ в испытательной смеси (1,09%)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	23	22	34	26	31	30	32	29	29	28,6	1,1	2,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26	35	20	31	38	29	37	27	28	37	30,8	1,5	3,0
	Содержание жизнеспособных бактерий N _a , КОЕ/см ³ в испытательной смеси (2,18%)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	3	5	4	2	2	7	6	3	4	3,8	0,5	1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	2	7	3	3	2	5	2	2	4	3,4	0,3	0,6

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованный образец дезинфицирующего средства «Перекис водорода 35%» является эффективным относительно *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в концентрации не менее 1,09%.

Определение основной фунгицидной активности перекиси водорода согласно ДСТУ EN 1275:2004 «Средства химические дезинфицирующие и антисептические. Основная фунгицидная активность. Методы испытаний и требований (стадия 1) (EN 1275:1997 IDT).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований были перекись водорода и его разведение (0,27%, 0,54%, 1,09% и 2,18%).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИСПЫТАНИЯ

Приготовление суспензий спор грибов.

В исследованиях использовали тестовые культуры *Candida albicans* ATCC 885-653 и *Aspergillus niger* ATCC 16404. Готовили испытательные суспензии *Candida albicans* и *Aspergillus niger* с концентрацией клеток $1,5 \cdot 10^7$ КОЕ/см³. Концентрацию проверяли с помощью камеры Горяева - 200 КОЕ в 5 случайных квадратах камеры соответствуют концентрации $1 \cdot 10^7$ КОЕ/см³.

Дополнительно контролировали содержание жизнеспособных микроорганизмов путем разведения испытательных взвесей в 10^5 и 10^6 раз раствором для разведения состава, г/л: триптон - 1,0; NaCl - 8,5; дистиллированная вода - 1000 см³. Полученные разбавления в двухкратной повторности вносили в чашку Петри и добавляли 12-15 см³ расплавленной и охлажденной до $45 \pm 1^\circ\text{C}$ среды состава, г/л: солодовый экстракт - 30,0; соевый пептон - 3,0; агар - 15,0; свежая дистиллированная вода - 1000 см³. Микроорганизмы культивировали при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 часов.

Валидация метода с нейтрализацией разбавленного раствора.

Нейтрализующим веществом был выбран водный раствор полисорбата 80 (30 г/дм³).

Испытательные суспензии клеток (спор) *Candida albicans* и *Aspergillus niger* разбавляли в 10^5 и 10^4 раз раствором для разбавления состава, г/л: триптон - 1,0; NaCl - 8,5; дистиллированная вода - 1000 см³. Для контроля содержания жизнеспособных микроорганизмов из полученной суспензии отбирали по 1 см³, переносили стерильно в пробирку и разбавляли раствором для разведения в 10 раз. Полученные разбавления в двухкратной повторности вносили в чашку Петри и добавляли 12-15 см³ расплавленной и

Перевод на русский з украинского языка

охлажденной до $45\pm 1^\circ\text{C}$ среды состава, г/л: солодовый экстракт -30,0; соевый пептон -3,0; агар - 15,0; дистиллированная вода - 1000 см³. Микроорганизмы культивировали при температуре $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 часов.

Водный раствор полисорбата 80 (30 г/дм³) отбирали пипеткой в количестве 8,0 см³ и вносили в две пробирки. Первую использовали для контроля токсичности, вторую - для контроля эффективности нейтрализования разбавленного раствора. После этого в первую пробирку добавляли 1 см³ дистиллированной стерильной воды, а во вторую 2,18% раствора перекиси водорода. Затем в каждую из пробирок вносили 1 см³ разбавленной в $10^4 - 10^5$ испытуемой суспензии, перемешивают и оставляют в течение (30 ± 1) мин. Из каждой пробирки в двухкратной повторности отбирали по 1 см³, вносили в чашку Петри и добавляли 12-15 см³ расплавленного и охлажденного до $45\pm 1^\circ\text{C}$ среды состава, г/л: солодовый экстракт -30,0; соевый пептон -3,0; агар - 15,0; дистиллированная вода - 1000 см³. Микроорганизмы культивировали при температуре $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 часов.

Испытание фунгицидной активности.

Готовили испытательные растворы перекиси водорода с концентрациями (2,18%, 1,09%, 0,54%, 0,27% и 0,13%). вносили 1,0 см³ стерильной дистиллированной воды и 1,0 см³ испытуемой суспензии с концентрацией клеток $1,5-5\times 10^7$ КОЕ/см³, затем немедленно включали таймер и перемешивали смесь. мин ± 10 с.

Непосредственно перед окончанием выбранного периода взаимодействия компонентов смесь перемешивали, отбирали пипеткой 1,0 см³ и переносили в пробирку, содержащую 8,0 см³ нейтрализующего вещества (полисорбата 80 (30 г/дм³)) и 1,0 см³ стерильной дистиллированной воды. Через 5 мин ± 10 с отбирали две пробы по 1,0 см³ смеси и переносили каждую пробу 1,0 см³ в отдельную чашку Петри и добавляли 12-15 см³ расплавленной и охлажденной до $45\pm 1^\circ\text{C}$ среды состава, г/л: солодовый. экстракт -30,0; соевый пептон -3,0; агар - 15,0; дистиллированная вода - 1000 см³. Микроорганизмы культивировали при температуре $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 часов.

Эффективной считали концентрацию биоцида, которая снижала содержание жизнеспособных клеток грибов в 10^4 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ
ПРОВЕРКА МЕТОДОЛОГИИ И ВАЛИДАЦИИ МЕТОДА С
НЕЙТРАЛИЗАЦИЕЙ РАЗВЕДЕННОГО РАСТВОРА

Испытательный микроорганизм	Содержание жизнеспособных микроорганизмов, КОЕ/см ³ ,			
	Испытательная грибковая суспензия (N)	Разведенная грибковая суспензия (N _v)	Контроль токсичности нейтрализующего вещества (N _x)	Контроль эффективности нейтрализования разбавленного раствора (N _y)
<i>Candida albicans</i>	2,4×10 ⁷	1,5×10 ³	1,0×10 ²	1.1×10 ²
<i>Aspergillus niger</i>	1,9×10 ⁷	1,2×10 ³	9,1×10 ¹	8,5×10 ¹
Для двух испытательных штаммов: значение N- в диапазоне 1,5×10 ⁸ - 5×10 ⁸ КОЕ/см ³ ; значение N _v - в диапазоне 6,0×10 ² - 1,5×10 ³ КОЕ/см ³ ; значение N _x > 0,05 N _v значение N _y > 0,05 N _v				
Отсутствие токсичности и эффективность нейтрализования подтверждено при проверке нейтрализующего вещества в условиях испытания продукта с испытательной концентрацией				

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ

Микроорганизм	Содержание жизнеспособных микроорганизмов N _a , КОЕ/см ³ в испытательной смеси при указанных испытательных концентрациях продукта			Показатель снижения уровня жизнеспособности микроорганизмов при указанных испытательных концентрациях продукта		
	0,27%	0,54%	1,09%	0,27%	0,54%	1,09%
<i>Candida albicans</i>	2,7×10 ²	75	5	0,89×10 ⁴	3,2×10 ⁴	4,8×10 ⁵
Эффективной считали ту концентрацию биоцида, которая снижала содержание жизнеспособных клеток грибов в 10 ⁴ раз – 0,54 и 1,09%.						

Микроорганизм	Содержание жизнеспособных микроорганизмов N _a , КОЕ/см ³ в испытательной смеси при указанных испытательных концентрациях продукта			Показатель снижения уровня жизнеспособности микроорганизмов при указанных испытательных концентрациях продукта		
	0,54%	1,09%	2,18%	0,54%	1,09%	2,18%
<i>Aspergillus niger</i>	5,5×10 ²	91	14	0,34×10 ⁴	2,1×10 ⁴	1,36×10 ⁵
Эффективной считали ту концентрацию биоцида, которая снижала содержание жизнеспособных клеток грибов в 10 ⁴ раз – 1,09 и 2,18%.						

Перевод на русский з украинского языка

Расчет неопределенности испытания

Микроорганизм	Содержание жизнеспособных микроорганизмов N _a , КОЕ/см ³ в испытательной смеси (0,27%)										Среднее значение	Среднеквадратичное отклонение, δ	Расширенная неопределенность испытания, U = 2×δ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
<i>Candida albicans</i>	259	245	285	247	290	291	275	281	256	270	269,9	5,75	11,5
	Вміст життєздатних мікроорганізмів N _a , КУО/см ³ у випробній суміші (0,54%)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
<i>Candida albicans</i>	85	67	80	79	82	74	65	71	98	77	74,8	3,02	6,04
	Содержание жизнеспособных микроорганизмов N _a , КОЕ/см ³ в испытательной смеси (1,09%)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
<i>Candida albicans</i>	3	7	4	5	5	4	4	7	4	7	5,0	0,46	0,91

Микроорганизм	Содержание жизнеспособных микроорганизмов N _a , КОЕ/см ³ в испытательной смеси (0,54%)										Среднее значение	Среднеквадратичное отклонение, δ	Расширенная неопределенность испытания, U = 2×δ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
<i>Aspergillus niger</i>	534	578	540	573	564	550	529	525	562	547	550,2	6,2	12,4
	Содержание жизнеспособных микроорганизмов N _a , КОЕ/см ³ в испытательной смеси (1,09%)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
<i>Aspergillus niger</i>	96	105	84	76	110	95	82	89	93	84	91,4	3,6	7,2
	Содержание жизнеспособных микроорганизмов N _a , КОЕ/см ³ в испытательной смеси (2,18%)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
<i>Aspergillus niger</i>	13	16	12	17	11	14	15	18	12	14	14,2	0,7	1,4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованный образец перекиси водорода является эффективным в отношении *Candida albicans* в концентрации не менее 0,54% и *Aspergillus niger* в концентрации не менее 1,09%..

ВИРУЛИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ СРЕДСТВА ДЕЗИНФЕКЦИОННОГО

«Перекис водорода 35%»

Испытание вирулицидной активности образца дезинфицирующего средства «Перекис водорода 35%» проводили согласно Методическим рекомендациям «Определение вирулицидного действия дезинфицирующих средств» утвержденных МОЗ Украины № 231 от 08.04.2009 года.

1. Метод испытания

Культивирование клеток и их подготовка к экспериментам

Vero – клетки почки африканской зеленой обезьяны, полученную из Банка клеток Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины (Киев, Украина).

MDCK – клетки почки собаки, полученную из ДУ Института эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского АМН Украины (Киев, Украина).

Клетки выращивали в стерильных пластиковых флаконах (Sarstedt, Германия) в питательной среде, состоявшей из 45% ДМЭМ (Sigma, США), 45% RPMI 1640 (Sigma, США) и 10% инактивированной прогревом в течение 30 мин. при 56 С эмбриональной телячьей сыворотки (ЕТС) (Sigma, США), антибиотике гентамицина (100 мкг/мл). Клетки пересаживали при образовании монослоя, а именно дезагрегировали их с поверхности флаконов с помощью 0,02% раствора Версена (Sigma, США) и 0,025% раствора трипсин-EDTA (Sigma, США), ресуспендировали в питательной среде и доводили их концентрацию в суспензии. 2×10^5 клеток/мл. Кратность посева устанавливали после подсчета количества клеток в камере Горяева с помощью инвертированного микроскопа (Carl Zeiss Jena, Германия) с увеличением 70х. Суспензию клеток в объеме 200 мкл вносили в лунки 96 луночного планшета (Sarstedt, Германия). Планшеты с клетками культивировали в термостате при 37 С и 5% CO₂ в атмосфере. Через 24 часа культивирования проводили контроль состояния монослоя клеток в планшетах с использованием светового инвертированного микроскопа (с увеличением 70×). К исследованиям клетки включали при формировании ими около 90% монослоя и при отсутствии бактериального и грибкового пророста.

В качестве поддерживающей среды для клеток использовали смесь 50% ДМЭМ (Sigma, США) и 50% RPMI 1640 (Sigma, США) без сыворотки.

Вирус и его подготовка для исследований

Эталонный штамм аденовирус человека 2 типа (Ад-2) получен из музея вирусов Института микробиологии Будапештского университета медицинских наук (Будапешт, Венгрия).

Вирус гриппа типа А (H1N1) штамм A/FM/1/47, полученный из коллекции ГУ Института эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины. Использовали пул вируса с титром $6,5 \lg_{10}$ ТЦД₅₀/мл.

Через 1 сутки роста клеток в 650 мл пластиковых флаконах и формирование ими монослоя, клетки промывали раствором Хенкса (Sigma, США) и вносили в небольшом количестве среды (достаточный для покрытия монослоя) вирус с множественностью 0,01 - 0,001 БУО/кл. Адсорбировали в течение 1 час. при комнатной температуре затем добавляли необходимое количество поддерживающей среды и инкубировали клетки при 37°C в течение 4 - 5 суток до появления интенсивной ЦПД вируса на клетках. Для выделения вируса из клеточного материала проводили 3 кратную заморозку - размораживание до полного разрушения клеток, клеточный дентрит удаляли центрифугированием при 2000 об/мин. в течение 10 мин. Определяли титры вируса в надосадке, используя МТТ-метод, разливали заготовки в криопробирки по 1-5 мл и хранили при -70 °С. В исследованиях использовались заготовки с титром вируса $7,65 \log_{10}$ ТЦД₅₀ на мл.

Исследование цитотоксического действия пероксида водорода 35% с использованием красителя МТТ

МТТ метод основан на функционировании дигидрогеназной системы митохондрий интактных клеток, которые в нормальных условиях перерабатывают искусственный субстрат МТТ (3,(4,5-диметилтриазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) в формазан. Продукты реакции можно определить количественным спектрофотометрическим методом. Превращение МТТ в формазан в зависимости от дозы уменьшается при гибели клеток под действием исследуемых токсических для клеток веществ или вируса.

Клетки выращивали в 96-луночных планшетах. Через 24 часа роста клеток проводили замену питательной среды на среду, содержащую десятикратные разведения исследуемого средства (от 1% до 0,0001%). В контрольных клетках производили замену среды на свежую без добавления средства. На каждую концентрацию средства использовать не менее 3-4 лунок с клетками. Планшеты с клетками выдерживали в термостате при 37°C в 5% CO₂ в атмосфере в течение 3 суток. Контролировали состояние монослоя клеток с использованием инвертированного светового микроскопа (увеличение ×70).

Субстрат МТТ (Sigma, США) растворяли в стерильном фосфатном буфере (рН 7,2) при комнатной температуре до 5 мг/мл. Фильтрованный раствор МТТ в объеме 20 мкл вносили в лунку 96-луночной планшеты и инкубировали с клетками в течение 2-4 часов при 37°C. После инкубации удаляли среду, к клеткам добавляли по 150 мкл 96° этанола для растворения кристаллов формазана. Результаты анализировали спектрофотометрически на ридере Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 538 нм.

На основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения Microsoft Excel определяли значение разведения/концентрации пероксида, что вызывает 50% ингибирование роста популяции клеток (показатель CC₅₀).

Исследование вирулицидного действия пероксида водорода 35%

Цель исследования – определить непосредственное действие средства на внеклеточный вирус.

Не разбавленный аденовирус (с титром 7,65 log₁₀ ТЦД₅₀ на мл) смешивали с равным объемом пероксида водорода в концентрации 0,7 и 0,35% (соответственно концентрация пероксида водорода с вирусом 0,35 и 0,175%) и инкубировали смесь при 20°C в течение 15, 30 и 60 мин. Для предотвращения проявления цитотоксического действия дезинфектанта на клетки, которое используется для определения остаточной инфекционной активности вируса по его цитопатическому действию, перед внесением в монослой клеток дезинфицирующее средство должно быть нейтрализовано. Для нейтрализации пероксида водорода использован 5% раствор тиосульфата натрия (Sigma, США). После завершения экспозиции к смеси вирус-пероксид водорода добавляли равное количество 5% раствора тиосульфата натрия и выдерживали 5 мин., после чего готовили последовательные десятикратные серийные

разведения полученных опытных проб и контролей вируса в поддерживающей питательной среде. Клетки Vero инфицировали десятикратными серийными разведениями вирусосодержащего материала (суспензия перексид водорода – вирус – нейтрализатор) по 50 мкл на лунку.

В качестве контроля использованы:

1. Контроль клеточной культуры – неинфицированные клетки (минимум 10 лунок планшета) с поддерживающей средой;
2. Контроль вируса – вместо пероксида водорода использована поддерживающая среда без ЕТС;
3. Контроль вируса в смеси с белковой нагрузкой – вместо пероксида водорода использована поддерживающая среда с ЕТС;
4. Контроль токсичности смеси дезинфектанта с нейтрализатором;
5. Контроль полноты нейтрализации дезинфектанта – как референс-дезинфектант использован формальдегид (для выполнения этого контроля одну часть вирусосодержащей жидкости смешивали с 4 частицами раствора Хэнкса и 5 частицами 1,4% раствора формальдегида).

Адсорбцию аденовируса на клетках проводили при 37 С в течение 1,5 ч, после чего в вирусосодержащий материал вносили по 150 мкл поддерживающей среды. Плашку выдерживали в 5% CO₂ при 37 °С до появления выраженного цитопатического действия вируса (4 суток).

Анализ проводился с использованием МТТ метода. Результаты анализировали спектрофотометрически на ридере Multiskan FC (Thermo Scientific, США) при длине волн 538 нм. Используя полученные оптические плотности определяли % угнетения жизнеспособности клеток под действием вируса (% ЦПД вируса на клетки) по формуле:

$$\% \text{ угнетения жизнеспособности или } \% \text{ ЦПД} = 100 - (A \times 100 / B) \quad (1),$$

где А – среднее значение оптической плотности образца, а В – среднее значение оптической плотности контроля клеток.

Определяли разведение вируса, которое уменьшает оптическую плотность образца по сравнению с оптической плотностью контроля клеток на 50%, что и является титром вируса

и выражается в ТЦД₅₀/мл.

Определяли вирулицидное действие средства по снижению титра вируса и его инфекционности по формуле:

Общая вирулицидная эффективность = $A - B$, где A – титр вируса в контроле, а B – титр вируса в опыте.

Суспензию вируса гриппа типа А (H1N1) штамм А/ФМ/1/47 (с титром 6×10^5 ТЦД₅₀/мл) смешивали с равным объемом исследуемого средства и инкубировали при 20°C в течение 15 и 30 мин. Клетки MDCK инфицировали десятикратными серийными разведениями вирусосодержащего материала (взвесь дезинфекционного средства-вирус) по 50 мкл на лунку. В качестве контроля использовали суспензию вируса, в которую добавили равный объем среды без средства и инкубировали в тех же условиях. Адсорбцию проводили при 37 °С в течение 1,5 ч, после чего в вирусосодержащий материал вносили по 150 мкл поддерживающей среды. В качестве контроля клеток использовали не инфицированные вирусом клетки. Плашку выдерживали в 5% CO₂ при 37°C до появления выраженного цитопатического действия вируса (3 суток).

Анализ проводили с использованием кристаллического фиолетового. Результаты анализировали спектрофотометрически на ридере Multiskan FC (Thermo Scientific, США) при длине волн 538 нм. Используя полученные оптические плотности, определяли % нарушения монослоя и жизнеспособности клеток под действием вируса по формуле: % угнетения жизнеспособности = $100 - (A \times 100 / B)$, где A - оптическая плотность образца, а B - оптическая плотность контроля клеток. Определяли разведение вируса, которое уменьшает оптическую плотность.

Для исследования цитотоксического действия пероксида водорода использована чувствительная к аденовирусу человека 2 типа линия клеток. Токсичность средства в культуре клеток определяли при внесении его в поддерживающую среду в концентрациях 0,0001 - 1%, каждую концентрацию анализировали в трех повторах с обязательным включением контрольных образцов без добавления вещества. Плашки с культурой клеток и пероксидом водорода инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. После 72 часовой экспозиции в клетки вносили раствор МТТ и спектрофотометрическим методом определяли

оптическую плотность в лунках. Значение оптической плотности в лунках с контрольными клетками, не обработанными средством, принимали за 100% и определяли процент жизнеспособных клеток для каждой концентрации средства (рис.1). Пероксид водорода проявляет высокую токсичность для культуры клеток Vero, поскольку в концентрациях 0,001-1% снижает их митохондриальную активность на 79-100% по сравнению с контролем клеток. Только при использовании 0,0001% раствора средства жизнеспособность клеток была в пределах 54%.

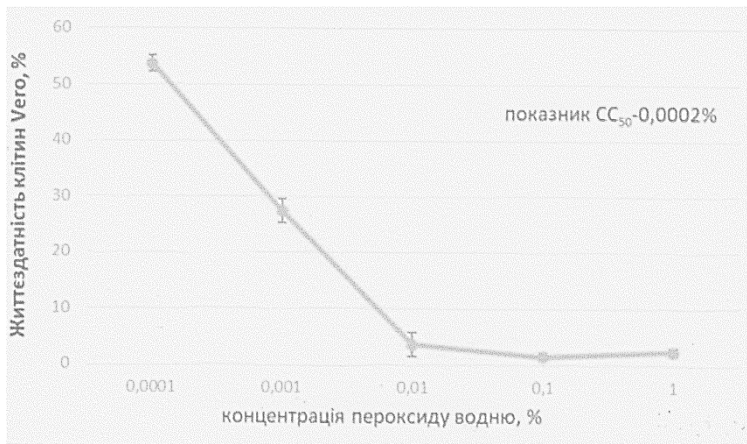


Рисунок 1 Цитотоксическое действие пероксида водорода в культуре клеток Vero

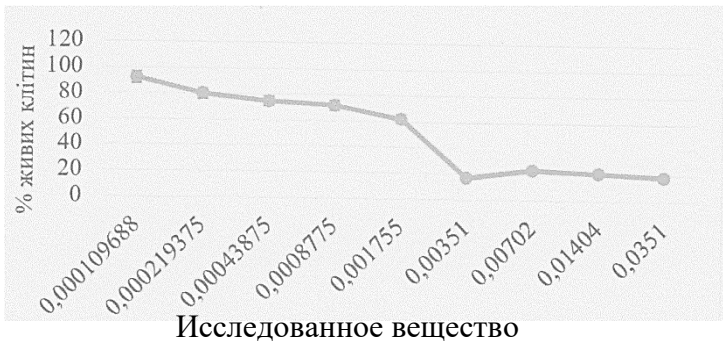


Рисунок 2 Цитотоксическое действие пероксида водорода в культуре клеток МОСК

Определено, что показатель CC_{50} для пероксида водорода производства ООО «ИНТЕР-СИНТЕЗ» в культуре клеток Vero составляет 0,0002%, в МОСК – 0,002%

Исследование вирулицидного действия пероксида водорода

Основным показателем эффективности антисептических и дезинфицирующих средств в заданных концентрациях и длительности экспозиции при оценивающих (сертификационных) исследованиях является полное отсутствие признаков репродукции вируса при соблюдении необходимого титра (4-7 в \log_{10} ТЦД₅₀/мл), или снижение инфекционного титра тест-вируса не менее чем на 4 \log_{10} ТЦД₅₀/мл по сравнению с контролем. В скрининговых исследованиях (при поиске новых антисептиков) или расширении свойств уже существующих антисептиков минимальной величиной снижения инфекционного титра тест-вируса за время экспозиции, свидетельствующей о наличии вирулицидного действия, считают 2 \log_{10} ТЦД₅₀/мл.

Общепринятым при проведении анализа вирулицидной активности дезинфекционного средства суспензионным методом является его растворение в поддерживающей среде для культур клеток или смешивание с соответствующим объемом среды так, чтобы конечная концентрация средства в растворе была в 2 раза больше, чем рекомендована в инструкции по применению. Это обусловлено тем, что при проведении испытаний раствор исследуемого антисептика смешивается с вирусосодержащей суспензией в равных соотношениях, при этом его концентрация уменьшается в 2 раза. Однако учитывая обнаруженную очень высокую токсичность пероксида водорода на культуре клеток Vero, и неспособность нейтрализатора повлиять на губительное для клеток действие высоких концентраций средства, была исследована вирулицидная активность 0,7 и 0,35% раствора пероксида водорода (т.е. с вирусом 0,35 и 0,175% соответственно). Определяли инфекционный титр аденовируса человека 2 типа после воздействия средства по его цитопатическому действию на клетки Vero. Анализ результатов по использованию красителя МТТ проводили через 4 суток при максимальном проявлении ЦПД вируса.

Хотя в методических рекомендациях по определению вирулицидного действия дезинфицирующих средств предлагают использовать 0,5 - 1% растворы для нейтрализации токсического действия средств, нами использовано 5% раствор тиосульфата натрия, поскольку низшая концентрация вообще не нейтрализовала лизирующее действие пероксида водорода на клетках (гибель клеток). Даже при использовании 0,7 и 0,35%

пероксида водорода нейтрализатор восстанавливал жизнеспособность клеток Vero на 31-33% (контроль токсичности смеси дезинфектанта с нейтрализатором).

Как видно из рисунка 2, 0,175% раствор пероксида водорода не проявляет значительного вирулицидного действия независимо от времени экспозиции с вирусом, ведь снижение инфекционного титра Ад-2 не превышало 1,5 \log_{10} . За использование пероксида водорода в конечной концентрации 0,35% и времени экспозиции его с вирусом 15 мин, выявлено снижение инфекционного титра аденовируса на 3,0 \log_{10} (рис.3). С повышением времени экспозиции вируса и средства до 1 ч вирулицидное действие увеличивалось до 3,4 \log_{10} . Использование референс-дезинфектанта 0,7% формальдегида, независимо от времени экспозиции с вирусом, приводит к полной инаktivации Ад-2.

Следует отметить, что данные, полученные при исследовании вирулицидного действия пероксида водорода, проведены без белковой нагрузки и при его наличии идентичны, что указывает на то, что белковая нагрузка не влияет на антивирусные свойства и эффективность исследованных концентраций средства.

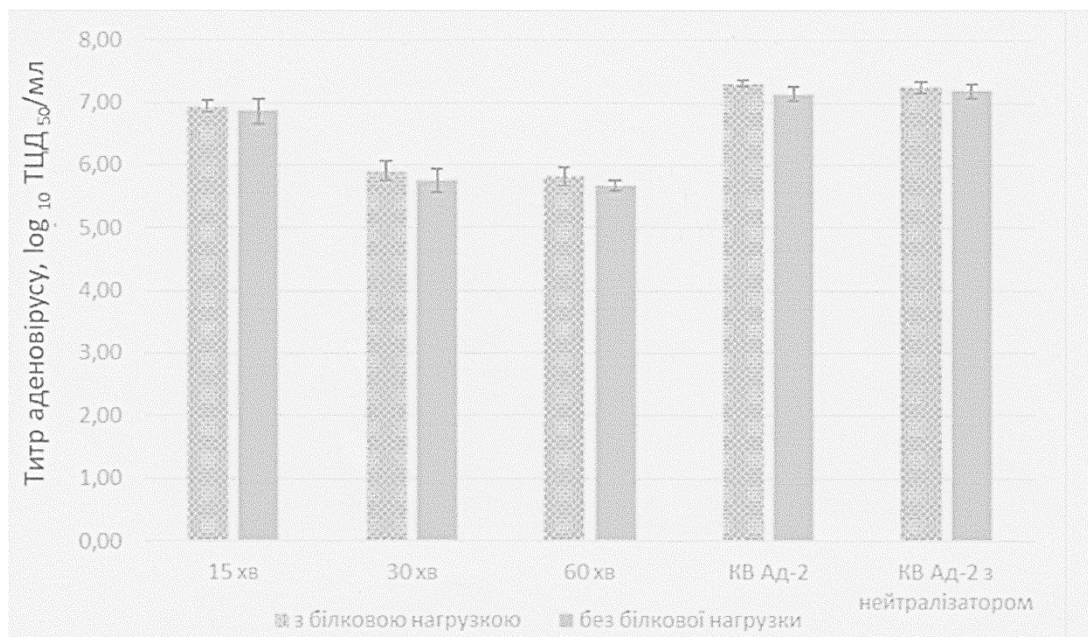


Рисунок 3 Воздействие 0,175% раствора пероксида водорода на инфекционный титр Ад-2 при разном времени экспозиции

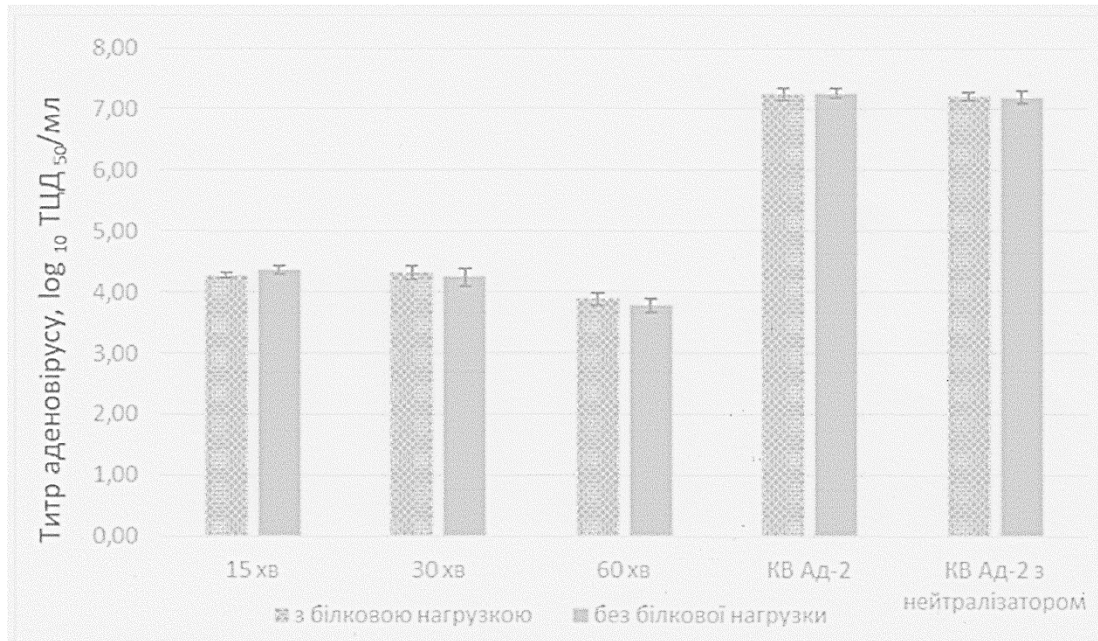


Рисунок 4 Воздействие 0,35% раствора пероксида водорода на инфекционный титр Ад-2 при разном времени экспозиции

Вирулицидная активность в отношении вируса гриппа

50 мкл раствора смешивали с 50 мкл вируса и выдерживали 15/30 мин при 37°C, далее раститровали 10-кратными разведениями и вносили по 40 мкл в клетки. После инкубирования в течение 60 мин надосадов из лунок встряхивали и добавляли 180 мкл R+D+2% FSB.. Плашки инкубировали 48 ч, окрашивали кристаллическим фиолетовым.

Кінцева к-ція	Час витримки, хв	TCID50, log10	Зниження титру на, log 10	TCID50 контролю вірусу
0,35 %	15	0	6,98	6,98
	30	0	6,98	
0,035 %	15	5,25	1,73	6,98
	30	5,12	1,86	
0,015 %	15	7,08	3,99	11,08
	30	9,27	1,81	
0,007	15	9,31	1,76	11,08
	30	11,13	-0,05	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Исследование противовирусной активности пероксида водорода производства ООО «ИНТЕР-СИНТЕЗ» показало, что его 0,35% раствор оказывает выраженное вирулицидное действие по отношению к аденовирусу человека 2 типа и вирусу гриппа типа А (H1N1), поскольку при использовании времени экспозиции (15, 30 и 60 мин) снижает титр вируса на $>3 \log_{10}$ по сравнению с контролем вируса.

ТУБЕРКУЛОЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ СРЕДСТВА ДЕЗИНФЕКЦИОННОГО СРЕДСТВА «ПЕРОКСИД ВОДОРОДА 35%»

Испытание туберкулоцидной активности образца дезинфицирующего средства «Пероксид водорода 35%» проводили согласно Методические указания МВ 3.5.2596-10 Методы изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств.

1. Метод испытания

Туберкулоцидную активность проверяли, используя два штамма бактерий:

Mycobacterium terrae (DSM 43227)

Mycobacterium tuberculosis (DSM 43 990).

Тест-микобактерии были приобретены в виде сухой культуры в ампулах (после лиофильной сушки) в Германском музее микроорганизмов и клеточных культур.

1.1. Приготовление пробной бактериальной суспензии.

Для получения культуры штамма тест-микобактерий ампулу с лиофилизированной музейной культурой этого штамма раскрывали в асептических условиях. Суспензию, приготовленную из музейной тест-культуры, рассеивают по $0,1 \text{ см}^3$ в пробирки со скошенной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая» (всего 10 пробирок). Посевы инкубируют в термостате при 37 C в течение 14-21 суток. С выросшими культурами *M. terrae* на питательных средах далее работали следующим образом:

– полученную биомассу снимали стеклянной палочкой с поверхности питательной

среды Левенштейна-Йенсена или «Новая» со всех пробирок;

– помещали в пробирку из 10 см³ бульона Миддлбрука 7Н9 с 10% ADC ростовой добавкой и гомогенизировали;

- объем полученной взвеси доводили до 100 см³ бульоном Миддлбрука 7Н9 и по 0,5 см³ суспензии вносили в микропробирки и подписывали на каждой пробирке наименование штамма и дату;

– замораживали при –70 °С и оставляли в таком состоянии для длительного хранения.

Полученную таким образом культуру тест-микобактерий использовали для получения агаровой культуры тест-микобактерий (первый пассаж) и приготовления из нее рабочей суспензии тест-микобактерий, используемой для проведения испытаний дезинфектанта.

1.2 Определение биологической концентрации тест-микроорганизмов в суспензии.

Для получения первого пассажа культуры тест-штамма микобактерий, используемого при оценке дезинфицирующих свойств, необходимое для исследования количество микропробирок, хранящихся при температуре –70 °С или –20 °С (2 штуки на 1 исследование) с данным штаммом микобактерий размораживали при комнатной температуре переносили по 0,1 см³ содержимого в пробирки со скошенной питательной средой Левенштейна-Йенсена или «Новая» и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 14 - 21 суток. Выросшую на плотной питательной среде в пробирках культуру использовали для приготовления рабочей суспензии тест-микобактерий данного штамма.

Перед использованием культур для исследовательских целей необходимо убедиться, что выросшие на питательной среде тест-штаммы не загрязнены посторонней микрофлорой. Для оценки роста микобактерий тест-штаммов визуально просматривали каждую пробирку и учитывали характер и массивность роста, изменение цвета питательной среды. Проводили микроскопию мазка выросших культур методом окраски по Циль-Нильсену (*M. terrae* представляют собой короткие прямые палочки малиново-красного цвета, располагающиеся в мазке параллельно друг другу).

Рабочую суспензию культуры тест-микобактерий готовили из тест-штамма первого

и/или второго пассажей, выросших на плотной питательной среде.

Для приготовления суспензии культуру микобактерий снимали стеклянной палочкой с плотной питательной среды и помещали в толстостенную стеклянную пробирку. Микробную биомассу тщательно гомогенизировали, постепенно добавляя по каплям дистиллированную стерильную воду. Густую исходную бактериальную суспензию оставляли на 15 мин для осаждения негомогенизированных конгломератов и частиц. Полученную надосадочную жидкость отбирали пастеровской пипеткой, переносили в стерильную пробирку, диаметр которой соответствует диаметру пробирки с оптическим стандартом мутности.

1.3 Определение биологической концентрации тест-микроба в рабочей суспензии.

Из суспензии, приготовленной по оптическому стандарту мутности № 10×10^9 КОЕ/мл), делали разведение с 10-кратным шагом до 10^3 микробных клеток в 1 см^3 (посев $0,1 \text{ см}^3$ суспензии по этому разведению на плотную питательную среду позволяет сделать достаточно точную микобактерий, выросших на среде колоний, количество которых будет находиться в пределах 100 ед.

Первое разведение соответствует 10^8 КОЕ/см³, а шестое – 10^3 КОЕ/см³. С этого разведения проводят посев по 0,1 мл на 5 пробирок со средой Левенштейна-Йенсена или «Новая», инкубируют в термостате при 37 °С в течение 14-21 суток. Подсчитывают количество колоний, выросших на среде в пробирке, рассчитывают среднее значение из 5 и производят перерасчет количества жизнеспособных клеток в исходной суспензии, учитывая коэффициент разбавления. Количество жизнеспособных клеток в рабочей суспензии должно быть 10^9 КОЕ/см³.

1.4 Валидация метода с нейтрализацией разбавленного раствора

В качестве нейтрализующего вещества использовали водный раствор полисорбата 80 (30 г/дм³).

Испытательную суспензию разбавляли в 10^6 раз стерильной дистиллированной водой. Для контроля содержания жизнеспособных бактерий из полученной суспензии (10^3 КОЕ/см³) отбирали по 9 см^3 , переносили в стерильные пробирки и добавляли 1 см^3

дезинфицирующего средства.

Водный раствор полисорбата 80 (30 г/дм³) отбирали пипеткой 8,0 см³ и вносили в две пробирки. Первую использовали для контроля токсичности, вторую – для контроля эффективности нейтрализации разбавленного раствора. После этого в первую пробирку добавляли 1 см³ дистиллированной стерильной воды, а во вторую испытательный раствор. Затем в каждую из пробирок вносили по 1 см³ разбавленной испытательной суспензии (10³ КОЕ/см³). Через 5 мин после постановки опыта по каждой из четырех проб проводят посев смеси по 0,1 см³ как минимум на 3 пробирки со скошенной питательной средой, которые инкубируют в термостате при 37°C, после 14-21 суток учитывают результаты исследований.

1.5. Испытание туберкулоцидной активности.

Готовили испытательные растворы опытного дезинфекционного средства «Пероксид водорода 35%» с концентрацией действующего вещества: 1,54, 3,03, 5,98%.

Готовили рабочую суспензию штамма тест-микробактерий с концентрацией не менее 10⁹ КОЕ/см³, что обеспечивает возможность создания в смеси дезинфектанта с суспензией (обоснованной и применяемой для этого метода оценки дезсредства концентрации микроорганизмов порядка 10⁸ КОЕ/см³);

Далее последовательно выполняли следующие операции:

- тщательно перемешивали рабочую суспензию тест-микроорганизма, хранящуюся в пробирке или во флаконе, путем встряхивания ее в течение 2-3 мин;
- проводили контроль реальной на момент проведения опыта биологической концентрации (БК) тест-микроорганизма в суспензии;
- вносили в дезинфицирующий раствор испытываемой рабочей суспензии тест-микроорганизма с обеспечением соотношения ДЗ и суспензии тест-микроорганизма 9 : 1;
- перемешивали смеси и производили отсчет времени по секундомеру начала воздействия ДС на тест-микроорганизм;
- после окончания заданной экспозиции (60 мин) проводили отбор проб в количестве 3 см³, которые по 1 см³ вносили в 3 пробирки, содержащие по 9 см³ стерильного раствора нейтрализатора остаточного действия дезинфицирующего средства на тест-микроорганизм;
- перемешивали пробы путем встряхивания вручную в течение 1-2 мин и высевали посев с них на стерильную поверхность плотной питательной среды в чашках Петри (по 0,1 см³ на каждую чашку, но не менее трех из каждой пробы);

- Инкубировали посеы проб при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 14-21 суток и учитывали результаты.

Эффективной считали концентрацию биоцида, которая обеспечивала при комнатной температуре в течение 60 мин полную гибель микобактерий.

2. Результаты испытания

Таблица 2.1. Проверка методологии и валидации метода с нейтрализацией разбавленного раствора

Испытательный штамм микобактерий	Содержание жизнеспособных микобактерий, КОЕ/см ³			
	Испытательная бактериальная суспензия (N)	Разведенная бактериальная суспензия (N _v)	Контроль токсичности нейтрализующего вещества (N _x)	Контроль токсичности нейтрализующего вещества (N _y)
<i>Mycobacterium terrae</i>	$2,9 \times 10^8$	$3,1 \times 10^3$	$2,7 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	$3,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$
Контроль токсичности нейтрализующего вещества: значение N- в диапазоне $1,5 \times 10^8 - 5 \times 10^8$ КОЕ/см ³ ; значение N _v - в диапазоне $6,0 \times 10^2 - 3,0 \times 10^3$ КОЕ /см ³ ; значение N _x > 0,05 N _v значение N _y > 0,05 N _v				
Отсутствие токсичности и эффективность нейтрализации подтверждено при проверке нейтрализующего вещества в условиях испытания продукта с испытательной концентрацией 5,98%.				

Таблица 2.2. Определение содержания жизнеспособных бактерий в пробной смеси

Испытательный штамм микобактерий	Содержание жизнеспособных микобактерий Na, КОЕ/см ³ в испытательной смеси при указанных испытательных концентрациях продукта			Показатель снижения уровня жизнеспособности микобактерий при указанных испытательных концентрациях продукта		
	1,54%	3,03%	5,98%	1,54%	3,03%	5,98%
<i>Mycobacterium terrae</i>	$5,6 \times 10^2$	43	Отсутствие	$0,5 \times 10^4$	$6,7 \times 10^5$	$> 1,0 \times 10^7$
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	$3,7 \times 10^2$	30	Отсутствие	$0,8 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	$> 1,0 \times 10^7$

Таблица 2.3. Расчет неопределенности испытания

Испытательный штамм микобактерий	Содержание жизнеспособных микобактерий Na, КОЕ/см ³ в испытательной смеси (1,54 %)									Среднее значение	Среднеквадратическое отклонение δ	Расширенная неопределенность испытания, $U=2 \times \delta$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
<i>Mycobacterium terrae</i>	493	591	573	520	615	556	589	503	621	562	47	94
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	355	403	367	343	401	353	328	389	360	367	26	52
Испытательный штамм микобактерий	Содержание жизнеспособных микобактерий Na, КОЕ/см ³ в испытательной смеси (3,03 %)									Среднее значение	Среднеквадратическое отклонение δ	Расширенная неопределенность испытания, $U=2 \times \delta$
	1				5	6	7	8	9			
<i>Mycobacterium terrae</i>	43	41	45	49	46	37	46	38	39	42,7	4,1	8,2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22	35	33	36	29	28	31	30	27	30,1	4,3	8,6
Испытательный штамм микобактерий	Содержание жизнеспособных микобактерий Na, КОЕ/см ³ в испытательной смеси (5,98%)									Среднее значение	Среднеквадратическое отклонение δ	Расширенная неопределенность испытания, $U=2 \times \delta$
	1				5	6	7	8	9			
<i>Mycobacterium terrae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованный образец дезинфицирующего средства «Перекис водорода 35%» эффективен в отношении *Mycobacterium terrae* и *Mycobacterium tuberculosis* в концентрации не менее 5,98%.

ЗАКЛЮЧЕНИЯ

Исследовано бактерицидное, вирулицидное, фунгицидное и туберкулоцидное действие пероксида водорода 35% производства ООО «ИНТЕР-СИНТЕЗ партия 2, дата изготовления 07.02.2023 года.

Установлено, что образец является эффективным относительно

Candida albicans в концентрации не менее 0,54%

Aspergillus niger в концентрации не менее 1,09%.

Staphylococcus aureus и *Pseudomonas aeruginosa* в концентрации не менее 1,09%.

Аденовирус человека 2 типа и вирус гриппа типа А в концентрации не менее 0,35%.

Mycobacterium terrae и *Mycobacterium tuberculosis* в концентрации не менее 5,98%.