

## Metoda badania i oceny skuteczności inaktywacji drobnoustrojów przez urządzenia do dezynfekcji UV-C

Dezynfekcja i odkażanie z wykorzystaniem promienników UV-C to sprawdzona technologia stosowana do inaktywacji patogenów wirusowych, bakteryjnych i grzybiczych zanieczyszczających zarówno powierzchnie, jak i powietrze. Opisana poniżej metoda badania i oceny skuteczności inaktywacji drobnoustrojów przez urządzenia do dezynfekcji UV-C została sprawdzona empirycznie i może być z powodzeniem stosowana do testów klasycznych promienników świetłówkowych oraz nowoczesnych promienników LED UV-C. Wszystkie opisane poniżej badania należy prowadzić w warunkach komory laminarnej zapewniającej bezpieczeństwo biologiczne na co najmniej 2 poziomie (BSL-2).

### Badane drobnoustroje

W tego rodzaju badaniach zaleca się stosowanie szczepów drobnoustrojów z kolekcji ATCC (American Type Culture Collection). Szczepy ATCC są w pełni scharakteryzowane fenotypowo i genotypowo, co umożliwia ich wykorzystanie jako **standardów porównawczych** w kontroli jakości, walidacjach oraz testach skuteczności. Ze względu na różne wielkości skutecznych dawek promieniowania UV-C w odniesieniu do różnych grup i gatunków drobnoustrojów, badania oceny skuteczności ich inaktywacji należy prowadzić z wykorzystaniem szczepów reprezentujących trzy najbardziej rozpowszechnione grupy patogenów tj. bakterie, grzyby i wirusy. Jako modelowe drobnoustroje proponuje się wykorzystać – spośród bakterii szczepy wzorcowe: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 260; spośród wirusów szczep wzorcowy bakteriofaga PhiX174 ATCC 13706-B1; spośród grzybów pleśń *Aspergillus versicolor* ATCC 9577. Ziarniak Gram-dodatni *Staphylococcus aureus* jest patogenem ludzkim zaklasyfikowanym do grupy 2. zagrożenia zarówno w Dyrektywie Komisji (UE) 2019/1833 z dnia 24 października 2019r. (zmieniającej m.in. Załącznik III do Dyrektywy Parlamentu Europejskiego 2000/54/WE oraz Rady w sprawie wykazu czynników biologicznych o znanej zakaźności dla człowieka), jak i w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 11 grudnia 2020r. (w sprawie czynników biologicznych szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy i ochrona zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki). Właściwości patogenne *S. aureus* są związane głównie z jego aktywnością biochemiczną oraz produkcją kilku enzymów i toksyn. Do zakażenia człowieka dochodzi zwykle poprzez bezpośredni kontakt i/lub wdychanie cząstek *S. aureus*. Bakteria *Bacillus subtilis* jest Gram-dodatnią łaseczką tworzącą endospory. Bakteria ta nie jest obecnie uważana za patogen ludzki, jest jednak powszechna w produktach roślinnych i zwierzęcych. Ze względu na zdolność do wytwarzania enzymów proteolitycznych (subtylizyn) u osób narażonych na działanie pyłu zawierającego te bakterie może rozwinąć się alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych, mogą też wystąpić objawy astmy lub zapalenie skóry. Z kolei pałeczka Gram-ujemna *Pseudomonas aeruginosa* jest szeroko rozpowszechniona w środowisku od gleby, poprzez wodę, roślinną materię organiczną, po środowisko szpitalne. Szczepy *P. aeruginosa* dysponują licznymi czynnikami wirulencji, takimi jak struktury powierzchniowe (adhezyny), toksyny (egzotoksyna A) i enzymy (proteazy serynowa i alkaliczna, metaloproteaza cynkowa, fosfolipaza C). Pałeczki te są patogenami oportunistycznymi o minimalnych wymaganiach odżywczych, tolerujących szeroki zakres temperatur środowiska (4–42°C), odpornymi na wiele antybiotyków i środków dezynfekcyjnych. Bakteriofaga PhiX174 jest wirusem modelowym w badaniach laboratoryjnych wymagających żywych nanocząstek biologicznych. Jego budowa o kształcie kuli z wypustkami sprawia, że przypomina on wirus SARS-CoV-2 co czyni go dobrym substytutem

patogenów wirusowych w badaniach związanych z infekcjami dróg oddechowych. Grzyb pleśniowy *Aspergillus versicolor* to kserofilny gatunek powszechnie występujący w środowisku wewnątrz i glebie. *A. versicolor* jest źródłem mykotoksyn, a inhalacja jego konidiów może u narażonych osób skutkować wystąpieniem reakcji alergicznych.

W badaniach oceny skuteczności inaktywacji drobnoustrojów zaleca się stosowanie ich wodnych zawiesin, a inokula badanych drobnoustrojów powinny mieć stężenia w granicach  $10^5$ – $10^7$  jednostek tworzących kolonie, jtk (w przypadku bakterii i grzybów) lub jednostek tworzących tysinki, jtł (w przypadku wirusa) czyli takie jak rutynowo wykorzystywanych biologicznych indykatorów [1].

### **Badane powierzchnie**

Do badań oceny skuteczności inaktywacji drobnoustrojów zaleca się testowanie powierzchni wykonanych z metalu, tworzyw lub szkła o gładkiej i szorstkiej strukturze powierzchni. Przedmioty wyposażenia wewnątrz najczęściej produkuje się z tych właśnie materiałów ze względu na ich właściwości, które decydują o trwałości, wytrzymałości, możliwości tworzenia lekkich, a jednocześnie stabilnych konstrukcji, walorach użytkowych i atrakcyjności kosztów ich zastosowania. Dotychczasowe badania przeżywalności drobnoustrojów na tego rodzaju powierzchniach wykazują, że stopień ich szorstkości będący wynikiem charakteru obróbki danego materiału i narzędzi użytych do tego celu może mieć wpływ na przeżywalność drobnoustrojów na nich zdeponowanych zazwyczaj w przypadku znaczących różnic w nierówności powierzchni. Zatem by uwzględnić wpływ szorstkości na przeżywalność drobnoustrojów zaleca się wykonanie tego typu rozpoznania za pomocą profilometru lub z wykorzystaniem technik optycznych, np. mikroskopowych. Badane próbki powinny mieć wymiary umożliwiające ich umieszczenie w probówkach typu Falcon (np. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Niemcy), które pozwolą na ich późniejszą obróbkę laboratoryjną.

### **Badane promienniki UV-C**

W tego rodzaju badaniach można sprawdzić skuteczność inaktywacji drobnoustrojów pod wpływem promieniowania UV-C emitowanego przez promienniki elektryczne takie jak lampy rtęciowe nisko- (świełówki) i średnioprężne, lampy ksenonowe oraz diody LED.

### **Badanie inaktywacji drobnoustrojów zdeponowanych na powierzchni pod wpływem promieniowania UV-C**

Gęstość dawki promieniowania (napromienienie wyrażone w  $J/m^2$ ) jest to iloczyn natężenia napromienienia na płaszczyźnie badanej (wyrażone w  $W/m^2$ ) przez czas ekspozycji (wyrażony w sekundach). Aby obliczyć minimalny czas dezynfekcji płaszczyzny, w której dokonujemy pomiaru natężenia napromienienia inaktywującego drobnoustroje, należy wymagane napromienienie wyrażone w dżulach na metr kwadratowy podzielić przez zmierzoną wartość natężenia napromienienia wyrażoną w watach na metr kwadratowy. Wynik otrzymamy w sekundach.

W zależności od rodzaju drobnoustroju minimalna dawka promieniowania UV-C niezbędna do jego inaktywacji jest różna. Najczęściej określana jest ona na podstawie badań doświadczalnych wykonywanych w ściśle kontrolowanych warunkach laboratoryjnych (z zachowaniem ścisłych procedur bezpieczeństwa, sterylności stanowiska badawczego, stałej temperatury i wilgotności otoczenia itp.), a podłoża (najczęściej wypełnione nimi płytki Petriego) z naniesionym na nie drobnoustrojem o określonym stężeniu pozbawione są wszelkich innych zanieczyszczeń. Wyznaczona w ten sposób dawka promieniowania UV-C niezbędna do uzyskania określonego stopnia inaktywacji patogenu określana jest albo w procentach inaktywacji (np. 90%, 99%, 99,9 %, 99,99%, 99,999%) albo poprzez

logarytmiczny współczynnik redukcji ( $\log_{10}\text{reduction}$  - określany jako logarytm dziesiętny z ilorazu liczby mikroorganizmów przed naświetlaniem promieniowaniem UV-C do liczby mikroorganizmów po naświetlaniu), który przyjmuje wartości od 1 do 5 (wartość 1 odpowiada 90% inaktywacji, a wartość 5 - 99,999% inaktywacji). należy jednak pamiętać, że uzyskane w ten sposób dawki promieniowania UV-C, które są wystarczające do określonego stopnia inaktywacji w warunkach laboratoryjnych, nie zawsze odnoszą się do warunków rzeczywistych, ponieważ:

- dezynfekowane powierzchnie mają różne faktury (np. porowatość zazwyczaj może powodować trudniejszy dostęp dla promieniowania w celu inaktywacji mikroorganizmów występujących we wgłębieniach/porach danego materiału),
- dezynfekowane powierzchnie mogą być w różnym stopniu zanieczyszczone przez substancje chemiczne lub organiczne,
- może wystąpić przesłanianie dostępu promieniowania UV-C do naświetlanej powierzchni przez różne elementy wyposażenia wnętrza,
- występują różne temperatury i wilgotności powietrza.

Wymienione powyżej czynniki wpływają znacząco na skuteczność inaktywacji mikroorganizmów w warunkach rzeczywistych, a w rezultacie powodują, że dawka skuteczna do inaktywacji powinna być odpowiednio większa, w zależności od konkretnego przypadku. Niemniej jednak wartości te stanowią swego rodzaju punkt odniesienia, który może ułatwić w praktyce określenie wielkości dawki skutecznej promieniowania UV-C.

Natężenie napromienienia na powierzchni naświetlanej deklarowane jest w przypadku promiennika zazwyczaj w odległości 1m od źródła. Wraz z oddalaniem się powierzchni od źródła promieniowania wartość natężenia maleje wraz z kwadratem odległości, a wraz z przybliżaniem – rośnie (tzn. dwukrotnie większa odległość od miejsca gdzie pada wiązka to czterokrotnie mniejsza dawka). Ponieważ warunki rzeczywiste w przypadku stosowania promienników UV-C mogą uniemożliwiać utrzymanie takiej właśnie odległości naświetlania, w tego rodzaju testach należy zainokulowane próbki powierzchni poddawać badaniu w trzech odległościach tj. 0,5m, 1m i 1,5m od źródła promieniowania UV-C, by zweryfikować skuteczność danego promiennika w inaktywacji drobnoustrojów w zależności od odległości źródła promieniowania od skażonej powierzchni.

Po naświetleniu, próbki na badanych powierzchniach są umieszczane w probówkach typu Falcon z 10ml roztworu ekstrahującego 0,9% soli fizjologicznej (np. Baxter Manufacturing Sp. z o.o., Lublin) z 0,05% dodatkiem Tween 80 (np. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy), a następnie drobnoustroje są z nich wmywane za pomocą wytrząsarki (np. Multi RS-60, Biosan, Riga, Łotwa), a otrzymane w ten sposób zawiesiny są opracowywane mikrobiologicznie metodą seryjnych rozcieńczeń w sterylnej wodzie wysiewając każdorazowo po 0,1ml na płytki Petriego wypełnione odpowiednimi dla danego drobnoustroju podłożami mikrobiologicznymi tj. TSA (bakterie), MEA (grzyby) i agarem odżywczym z murawą *E. coli* (bakteriofag) (np. Becton Dickinson & Co., Sparks, USA). Po 24h inkubacji zlicza się wyrosłe kolonie bakterii i grzybów (jako jednostki tworzące kolonie, jtk) lub w przypadku bakteriofaga przejaśnienia w murawie bakteryjnej (jako jednostki tworzące łysinki, jtt) i określa się liczbę drobnoustrojów w próbce kontrolnej,  $C_{\text{kont}}$ , lub na badanej powierzchni,  $C_{\text{jtk/jtt}}$ , według wzoru:

$$C_{\text{kont}} \text{ lub } C_{\text{jtk/jtt}} = (N/10^{-D})(V_1/V_2)$$

gdzie:

$N$  – średnia liczba wyrosłych kolonii na podłożu [jtk] lub średnia liczba przejaśnień w murawie bakteryjnej [jtt],

$D$  – współczynnik rozcieńczenia,

$V_1$  – objętość roztworu ekstrahującego [ml],

$V_2$  – objętość posianej na agar próbki [ml].

Przeżywalność drobnoustrojów pod wpływem działania promieniowania UV-C,  $P$ , w stosunku do całkowitej liczby żywych cząstek (komórek wegetatywnych, spor, konidiów, cząstek wirusa) w próbce kontrolnej,  $C_{kont}$ , jest wyznaczana według wzoru:

$$P = C_{jtk/jtl}/C_{kont} \times 100\%$$

### **Badanie inaktywacji drobnoustrojów zawieszonych w powietrzu pod wpływem promieniowania UV-C**

Do badań przeżywalności drobnoustrojów w powietrzu po ich naświetleniu promieniowaniem UV-C można wykorzystać zestaw do skojarzonego badania właściwości aerozoli włóknistych i biologicznych (Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej, patent nr 235437), którego główną częścią jest komora aerosolizacyjna umożliwiającą m.in. różne sposoby generacji bioaerozoli za pomocą HEPA-filtrowanego powietrza. W testach inaktywacji wykorzystuje się cząstki drobnoustrojów generowane z wodnych zawiesin do powietrza za pomocą nebulizatora Collisona (model MRE CN25, BGI Incorporated, Waltham, USA). W komorze aerosolizacyjnej następuje homogenizacja wygenerowanych cząstek poprzez ich wymieszanie za pomocą mieszadła o prędkości obrotowej śmigła kontrolowanej anemometrem (model Testo 435-4 z sondą IAQ, Testo Sp. z o.o., Pruszków) dla uzyskania prędkości strugi powietrza w obrębie komory aerosolizacyjnej o wartości 0,3m/s, czyli typowej dla środowiska wewnątrz. W komorze aerosolizacyjnej należy również kontrolować parametry mikroklimatu tj. temperatura i wilgotność względna powietrza (np. za pomocą termohigrometru).

Metoda badania i oceny stopnia inaktywacji mikroorganizmów zawieszonych w powietrzu polega na tym, że przed rozpoczęciem pomiaru z każdym z badanych drobnoustrojów, komora aerosolizacyjna jest czyszczona mechanicznie i chemicznie przy zastosowaniu alkoholowego środka do dezynfekcji powierzchni o bójczych właściwościach (Desprej, BOCHEMIE, s.r.o., Bohumín, Czechy). Każdy właściwy pomiar stężenia bioaerozolu jest poprzedzany pomiarem sprawdzającym czystość komory aerosolizacyjnej. W tym celu, na początku każdej sesji pomiarowej, zestaw badawczy pracuje przy braku materiału mikrobiologicznego w nebulizatorze (tj. generowany jest wyłącznie aerosol wodny), a próbka powietrza jest pobierana w trzech odległościach (0,5m, 1m i 1,5m) od źródła promieniowania UV-C za pomocą pobornika guzikowego (Button Aerosol Sampler, SKC Inc., Eighty Four, USA) z filtrem poliwęglanowym o średnicy porów 1,2µm (np. Merck Millipore, Tullagreen, Irlandia) przy prędkości przepływu strugi 5l/min przez 5 minut w 2 powtórzeniach. Każdorazowo, laboratoryjne opracowanie pobranej w ten sposób próbki powietrza (patrz poniżej) powinno wykazać brak wzrostu drobnoustrojów.

Właściwe pomiary stężenia drobnoustrojów polegają na 20 minutowej nebulizacji badanego bioaerozolu danego drobnoustroju do wnętrza komory aerosolizacyjnej, w której w tej fazie testu jest umieszczony badany promiennik UV-C, który nie jest włączony. W komorze bioaerosol poddawany jest ciągłemu mieszanii (przez strugę powietrza o prędkości 0,3m/s), a po tym okresie następuje pobranie próbki kontrolnej bioaerozolu za pomocą pobornika guzikowego z filtrem poliwęglanowym o średnicy porów 1,2µm przy prędkości przepływu strugi 5l/min przez 5 minut w 2 powtórzeniach. Po wykonaniu pomiaru kontrolnego, w komorze aerosolizacyjnej włączany jest badany promiennik UV-C, który przez kolejne 20 minut napromieniowuje mieszaną w komorze aerosol danego drobnoustroju. Po tym okresie czasu, badany promiennik jest wyłączany i aspirowana jest właściwa próbka bioaerozolu w sposób opisany powyżej (tj. za pomocą pobornika guzikowego z filtrem poliwęglanowym) w trzech odległościach (0,5m, 1m i 1,5m) od źródła promieniowania UV-C.

Każdorazowo bezpośrednio po pobraniu bioaerozolu każdego z badanych mikroorganizmów, każdy z filtrów jest umieszczany w probówce typu Falcon z 10ml roztworu ekstrahującego 0,9% soli fizjologicznej z 0,05% dodatkiem Tween 80 i wytrząsany przez 1h w temperaturze pokojowej na wytrząsarce laboratoryjnej (np. Promax 1020, Heidolph Instruments GmbH&Co., Schwabach, Niemcy). Z uzyskanej zawiesiny drobnoustrojów wykonuje się szereg seryjnych rozcieńczeń (od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ ), a następnie wysiewa się (w 3 powtórzeniach) po 0,1ml badanej próbki na płytki Petriego z następującymi podłożami mikrobiologicznymi: TSA (bakterie), MEA (grzyby) i agarem odżywczym z murawą *E. coli* (bakteriofag). Wszystkie płytki z posianymi zawiesinami drobnoustrojów są inkubowane w temperaturze pokojowej i po okresie inkubacji obliczane jest stężenie (żywych i zdolnych do wzrostu na danym podłożu hodowlanym) mikroorganizmów bakteryjnych i grzybowych (w jednostkach tworzących kolonie,  $C_{jtk}$ ) oraz bakteriofaga (w jednostkach tworzących tysinki,  $C_{jtt}$ ) w 1 litrze powietrza badanej próbki [jtk/l, jtt/l] według wzoru:

$$C_{jtk/jtt} = (N/10^{-D})(V_1/V_2)$$

gdzie:

$N$  – średnia liczba wyrosłych kolonii na podłożu [jtk] lub tysinek na murawie [jtt],

$D$  – współczynnik rozcieńczenia,

$V_1$  – objętość roztworu ekstrahującego [ml],

$V_2$  – objętość posianej na agar próbki [ml].

Tak samo, jak z próbkami właściwymi postępuje się z próbkami kontrolnymi, a przeżywalność drobnoustrojów pod wpływem działania promieniowania UV-C, P, w stosunku do całkowitej liczby żywych cząstek (komórek wegetatywnych, spor, konidiów, cząstek wirusa) w próbce kontrolnej,  $C_{kont}$ , jest wyznaczana według wzoru:

$$P = C_{jtk/jtt}/C_{kont} \times 100\%$$

### Kontrola stężenia ozonu w powietrzu

Ponieważ promienniki oprócz bójczego promieniowania UV-C, emitują też promieniowanie o krótszej długości fali, które tworzy z tlenu zawartego w powietrzu ozon (podwyższone stężenie ozonu w powietrzu może prowadzić do reakcji zapalnych oczu czy chorób dróg oddechowych, w tym nasilenia objawów astmy oraz chorób układu krążenia), kontrola jego stężenia w czasie naświetlania próbek powinna być immanentną częścią badania promienników UV-C. Oznaczanie stężenia ozonu w powietrzu powinno być prowadzone w sposób ciągły z wykorzystaniem odpowiedniego detektora (np. detektora jedno-gazowego Micro 5 G222E, Gesellschaft für Gerätebau mbH, Dortmund, Niemcy, wyposażonego w sensor elektrochemiczny  $O_3$  o zakresie pomiarowym 0–1ppm  $O_3$  (0–2mg/m<sup>3</sup>), granicy oznaczalności 0,01ppm (0,02mg/m<sup>3</sup>) i możliwości rejestrowania poziomu ozonu co 1 minutę).