

Исследование эффективности воздействия импульсным ультрафиолетовым излучением сплошного спектра на полирезистентные госпитальные штаммы

Сергей Киреев², Сергей Шашковский¹, Татьяна Гренкова³, Яков Гольдштейн², Игорь Гончаренко², Евгения Селькова³

1. Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана», Россия
2. Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственное предприятие «Мелитта», Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10
3. Федеральное бюджетное учреждение науки "Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского", Россия 125212, г. Москва, улица Адмирала Макарова, дом 10.

Abstract

В работе представлены результаты исследования эффективности импульсного ультрафиолетового излучения сплошного спектра в отношении клинических штаммов бактерий с высоким эпидемическим потенциалом, широкой лекарственной устойчивостью и устойчивостью к основным группам химических средств дезинфекции (MRSA, VRE, *Ac.baumannii*, *P.aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *St. aureus*). Исходная контаминация пластмассовых и металлических тест-объектов составляла не менее 10^7 КОЕ/см². Исследуемые образцы располагались на расстоянии от 1,2 до 2 м в горизонтальном и вертикальном положениях и облучались в течение 5, 10, 20 мин. После 5 минут облучения снижение уровня обсемененности составило не менее 4,9 lg для всех микроорганизмов и поверхностей. Загрязнение тест-объектов белковой нагрузкой не влияло на эффективность обеззараживания. Эффективность деконтаминации при использовании металлических пластин снижалась незначительно.

Ключевые слова: MRSA, VRE, обеззараживание, клинические штаммы бактерий, множественная лекарственная устойчивость, эффективность, pulsed light, ultraviolet.

Introduction

В последние десятилетия большое внимание уделяется разработке мероприятий по профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), вызванных клиническими штаммами бактерий, обладающими множественной лекарственной устойчивостью и устойчивостью к различным группам химических средств дезинфекции. Актуальные возбудители ВБИ - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) и Vancomycin Resistant *Enterococcus* (VRE) могут вызывать разнообразные клинические формы инфекций: пневмонию, бактеремию, инфекцию мочевыводящих путей, менингит, остеомиелит и др. Согласно современным данным [1] в Европе MRSA вызывает 170 000 инфекций в год, около 5 тысяч из которых приводят к летальному исходу. Затраты на обслуживание пациентов, подвергшихся инфицированию MRSA, составляют около 380 миллионов евро в год. Аналогичные затраты в США составляют около 9,7 миллиардов долларов в год [2]. Частота выявления ИСМП, вызванных VRE, в европейских странах составляет до 40% [3] в зависимости от страны и методов предупреждения инфекций, принятых в медицинских учреждениях.

Одной из распространенных мер профилактики ИСМП является ручная очистка и дезинфекция поверхностей помещений и объектов госпитальной среды растворами химических средств. Однако данный способ дезинфекции имеет ряд существенных недостатков [4]: невозможность обработать труднодоступные места, в том числе места выше человеческого роста, сильная зависимость эффективности обеззараживания поверхностей от четкого соблюдения персоналом инструкции по приготовлению и применению рабочего раствора дезинфицирующего средства, зависимость эффективности обеззараживания от времени контакта дезинфицирующего средства с поверхностью, трудоемкость дезинфицирующих мероприятий.

В настоящее время для обеззараживания воздуха и поверхностей помещений и объектов госпитальной среды применяют новый метод, основанный облучении объекта высокоинтенсивным импульсом излучения сплошного спектра, формирующимся в ксеноновом газовом промежутке при приложении к нему высокого напряжения. [5-7].

На данный момент существует обширная база микробиологических и клинических исследований, свидетельствующих о высокой эффективности метода, но, в тоже время, отсутствует экспериментальная база бактерицидных доз, требуемых для обеззараживания воздуха и поверхностей от микрофлоры госпитальной среды [5-7].

Работа направлена на определение бактериальных доз УФ излучения сплошного спектра и необходимых условий обеззараживания помещений с эффективностью более 99,9% от актуальных возбудителей ИСМП.

Material and methods

Бактериальные штаммы

Объектами исследований послужили тестовый штамм 907 *S. aureus* и клинические устойчивые к широкому спектру антибиотиков штаммы бактерий: *P. aeruginosa*, MRSA, *Enterococcus faecium* (VRE) , *Acinetobacter baumannii*, а так же эпидемический штамм *Pr. mirabilis*. Выбранные клинические штаммы микроорганизмов были изучены на предмет устойчивости к средствам химической дезинфекции из разных групп. Для контроля эффективности режимов дезинфекции использовали тест-штаммы *E coli* 1257 и *S. aureus* 907. Проведенные исследования выявили устойчивость неферментирующих энтеробактерий (*P. aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*) к дезинфицирующим средствам из всех тестируемых групп.

Суточную взвесь культуры госпитального или тест-штамма готовили по отраслевому стандартному образцу мутности №20 (9lg) на физиологическом растворе и физиологическом растворе с 40% сывороткой крови барана (6 мл. раствора и 4 мл сыворотки). Для выращивания культур использовали кровяной агар. При помощи микропипетки наносили 0.02 мл микробной взвеси на дно стерильной пластиковой чашки Петри или металлическую пластину той же площади. Микрокапли равномерно растирали по поверхности тест-объекта и подсушивали. Испытания проводили не позднее 1 часа после нанесения микрокапель с тест-микроорганизмами.

После воздействия на микробную взвесь, нанесенную на дно чашки Петри, ультрафиолетового излучения в чашку заливали 10 мл стерильного физиологического раствора, тщательно размешивая круговыми движениями, затем добавляли 10 мл расплавленной и остуженной до 45°C плотной питательной среды, закрывали крышками и давали застыть до плотной консистенции. Данная методика является точной, так как позволяет учитывать даже единичные жизнеспособные колонии.

Культуру с металлического тест-объекта после воздействия излучения смывали на стерильную салфетку, которую отбивали в колбе с бусами в 10мл. стерильного физиологического раствора. По 0,1 мл полученной взвеси засеивали на плотные селективные питательные среды.

Источник УФ излучения

Источником УФ излучения была импульсная ксеноновая лампа установки «Уапех-2». Электрическая мощность лампы составляла 1000 Вт.

Импульсная ксеноновая лампа имела U-образную форму и генерировала мощные световые вспышки длительностью на полувывоте 120 мкс с частотой 2,5 Гц. УФ излучение в диапазоне 200-400 нм регистрировалось с помощью оптоволоконного спектрометра просветленного типа с высокой чувствительностью в ультрафиолетовом диапазоне AvaSpec-ULS2048-USB2. Радиационные характеристики лампы контролировались

калиброванным фотоприемником UV Sensor “TOCON-probe”, регистрирующим излучение в диапазоне 220-275 нм с максимумом чувствительности на 255 нм. Спектр излучения лампы представлен на рисунке 1. Средний бактерицидный поток в диапазоне 200-300 нм составил 42 Вт.

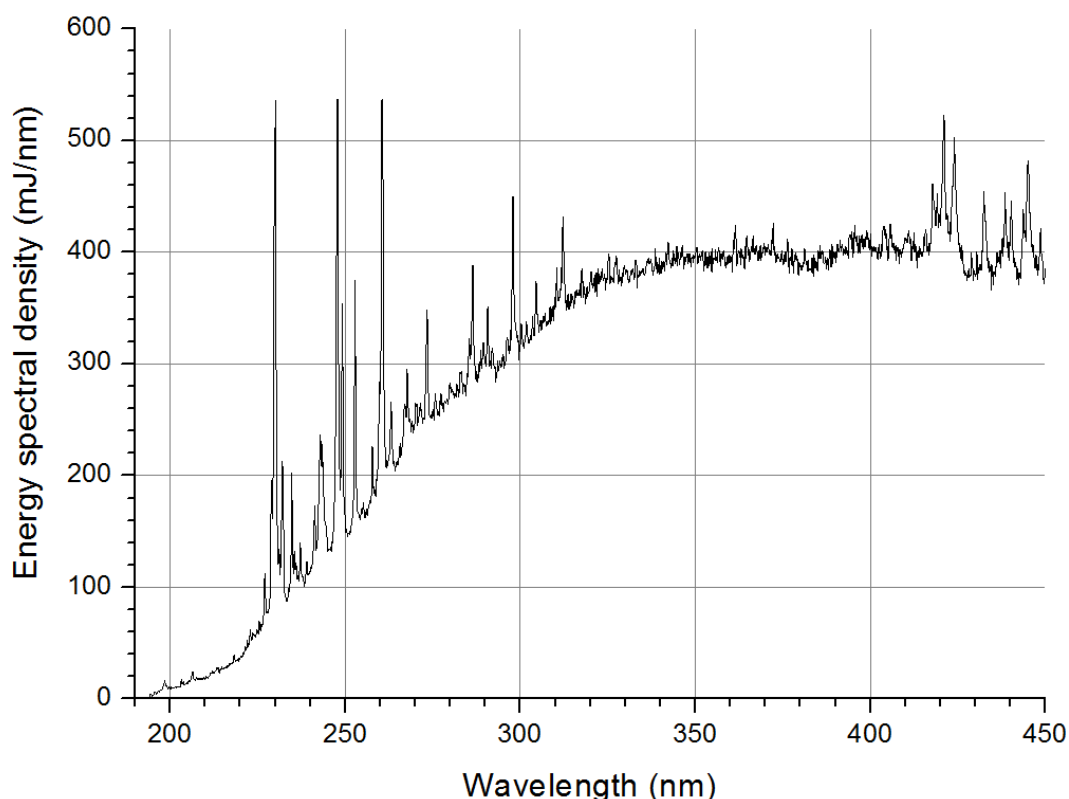


Figure 1. Спектр излучения импульсной ксеноновой установки «Yanex-2»

Таким образом, на расстоянии 2 м облученность составила 1 Вт/м².

Методика проведения исследований

Контаминированные тест-объекты с начальной контаминацией не ниже 10⁷ КОЕ/см² располагались на вертикальной и горизонтальной поверхностях. При облучении тест-объектов на вертикальной поверхности установка «Yanex-2» располагалась на расстоянии 2 м и включалась на 5, 10, 20 минут работы. При облучении горизонтально расположенных металлических пластин тест-объекты размещались на столе высотой 80 см и удалении от лампы 1,2-1,7 м и подвергались облучению в течение 5 и 10 минут. Центр излучающей части лампы находится на высоте 100 см. Исследования проводили в 3-4-х повторностях для каждой экспозиции и сопровождалась контролем жизнеспособности культур

Results and discussion

При облучении установкой «Yanex-2» пластиковых и металлических объектов, расположенных на вертикальной поверхности, за 5 минут экспозиции были получены значения снижения контаминации не менее 5lg (Таблица 1). Воздействие УФ излучения в течение 20 минут привело к полному уничтожению исходной микробной контаминации во всех проведенных экспериментах (данные в таблице не приведены). Результаты облучения импульсной установкой вертикально расположенных тест-объектов при экспозиции 5 минут и расстоянии 2 м риведены на рисунке 2.

Table 1. Результаты исследования эффективности обеззараживания контаминированных тест-объектов, расположенных на расстоянии 2 м на вертикальной поверхности

Условия исследований	Выжившие микроорганизмы (Эффективность), КОЕ/см ² (lg)
----------------------	---

	0 минут	5 минут (336 Дж/м ²)	10 минут (672 Дж/м ²)
<i>MRSA</i>			
Чашка Петри без белковой нагрузки	5x10 ⁸	28 (7.2)	0 (8.7)
Чашка Петри с белковой нагрузкой		50 (7)	1 (8.7)
Металлические пластины без белковой нагрузки		67 (6.8)	-
Металлические пластины с белковой нагрузки		1.83 x10 ³ (5.4)	-
<i>VRE</i>			
Чашка Петри без белковой нагрузки	1.9x10 ⁷	21 (5.9)	15 (6.1)
Чашка Петри с белковой нагрузкой	2.3x10 ⁷	19 (6)	20 (6)
Металлические пластины без белковой нагрузки	1.83x10 ⁷	910 (4.3)	440 (4.6)
Металлические пластины с белковой нагрузки		600 (4.4)	610 (4.4)
<i>P.aeruginosa</i>			
Чашка Петри без белковой нагрузки	1.65x10 ⁷	16 (6)	1 (7.2)
Чашка Петри с белковой нагрузкой		9 (6.2)	1 (7.2)
Металлические пластины без белковой нагрузки	1.5x10 ⁷	100 (5.1)	25 (5.7)
<i>Pr.mirabilis</i>			
Чашка Петри без белковой нагрузки	5x10 ⁸	6 (7.9)	-
Чашка Петри с белковой нагрузкой		2 (8.3)	-
Металлические пластины без белковой нагрузки	6x10 ⁸	730 (5.9)	-
Металлические пластины с белковой нагрузки		730 (5.9)	-
<i>Ac.baumannii</i>			
Чашка Петри без белковой нагрузки	2.32x10 ⁷	20 (6)	15 (6.1)
Чашка Петри с белковой нагрузкой	1.6x10 ⁷	35 (5.6)	27 (5.7)
<i>St.aureus</i>			
Чашка Петри без белковой нагрузки	7x10 ⁸	32 (7.3)	-
Чашка Петри с белковой нагрузкой		48 (7.1)	0 (8.8)

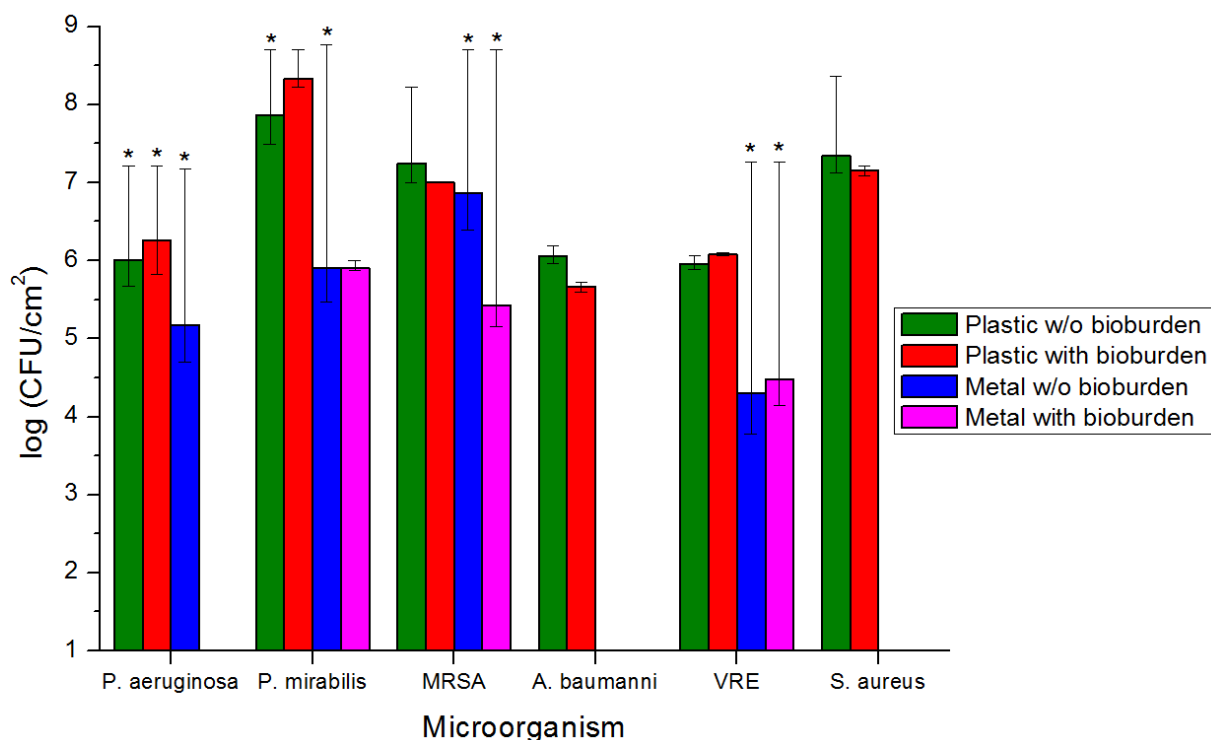


Figure 2. Эффективность обеззараживания импульсным излучением сплошного спектра контаминированных образцов с белковой защитой (б/з) и без нее. * - показывает 100%-ную деконтаминацию как минимум одного из тест-объектов

Облучение горизонтально расположенных металлических объектов обеспечило эффективность обеззараживания 4,9-7,6 lg, в зависимости от бактериального штамма и расстояния до источника излучения (таблица 2).

Table 2. Результаты исследования эффективности обеззараживания горизонтально расположенных металлических пластин, контаминированных клиническими штаммами микроорганизмов

Среднее расстояние до тест-объекта, м	Наличие биологической нагрузки	Время облучения (Доза), мин (Дж/м²)	Контроль, КОЕ/см²	Выжившие микроорганизмы (Эффективность), КОЕ/см² (lg)
<i>MRSA</i>				
1,6	без нагрузки	5 (62,6)	1,15 x10 ⁷	100 (5)
1,7	с нагрузкой	5 (52,5)	1,4 x10 ⁷	160 (4,9)
1,4	без нагрузки	10 (184)	1,15 x10 ⁷	100 (5)
1,5	с нагрузкой	10 (151)	1,4 x10 ⁷	83 (5,2)
<i>P.aeruginosa</i>				
1,4	без нагрузки	5 (92)	4,6 x10 ⁷	0 (7,6)
1,5	с нагрузкой	5 (75,5)	4,7 x10 ⁷	33 (6,1)
1,2	без нагрузки	10 (286)	4,6 x10 ⁷	0 (7,6)
1,3	с нагрузкой	10 (228)	4,7 x10 ⁷	0 (7,6)

Вне зависимости от ориентации объектов относительно источника излучения эффективность обеззараживания практически не зависит от присутствия биологической нагрузки и слабо зависит от типа материала поверхности. Сравнение с установками на основе ртутьсодержащих ламп показывает значительно большую эффективность обеззараживания импульсного источника излучения при одинаковых дозах [8-10]. Так, обеззараживание объектов, контаминированных *S. aureus* с белковой нагрузкой, с эффективностью 99,9% потребует дозы не более 32 Дж/м² импульсной ксеноновой лампы и более 1500 Дж/м² ртутной лампы [9]. Деконтаминация части тест-объектов со 100%-ной эффективностью (рисунок 2) говорит об отсутствии эффекта достижения максимума

эффективности, характерного для источников излучения на основе ртути. Этот эффект выражается в отсутствии увеличения эффективности обеззараживания после снижения начального уровня обсемененности на 2-4 порядка даже при 10-кратном увеличении дозы [9, 10].

Достигнутые в работе высокие значения эффективностей обеззараживания различных объектов, контаминированных клиническими штаммами микроорганизмов с высоким эпидемическим потенциалом, обусловлены одновременным воздействием УФ излучения широкого спектрального состава практически на все структуры клетки. Такое многоканальное воздействие на клетку обеспечивает резкое снижение бактерицидных доз [11-22]. Репарационные процессы при этом либо протекают с значительно меньшей скоростью [23], либо отсутствуют полностью [15, 24]. Исследования воздействия импульсного излучения сплошного спектра на мембрану клетки показывают ее разрушение с потерей барьерной и регуляторной функций и вытеканием цитоплазмы [25, 26].

Conclusions

Проведенные исследования показали высокую бактерицидную эффективность импульсного ультрафиолетового излучения сплошного спектра в отношении клинических штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью и устойчивостью к различным группам химических средств дезинфекции. Эффективность обеззараживания как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов слабо зависит от присутствия биологической нагрузки и составляет 4-8 log. Тип материала облучаемой поверхности незначительно влияет на эффективность обеззараживания. Сравнительные исследования, проведенные с тестовым и клиническим штаммами *S. aureus*(907) и *MRSA*, показали идентичные значения эффективности обеззараживания образцов $\approx 7-7,5$ lg. Полученные пороговые бактерицидные дозы значительно ниже аналогичных значений для ртутных бактерицидных облучателей, что позволяет значительно сократить время проведения дезинфекционных процедур мероприятий. Результаты экспериментальных исследований позволяют утверждать, что установка «Уапех-2» является высокоэффективным и простым в эксплуатации устройством экспресс обеззараживания поверхностей помещений и объектов больничной среды.

References

1. Köck R., Becker K., Cookson B. et al., Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe, *Euro Surveill*, 15 (41), (2010).
2. Mark Stibich, Julie Stachowiak et. al, Evaluation of a pulsed-xenon ultraviolet room disinfection device for impact on hospital operations and microbial reduction, *Infection control and hospital epidemiology*, vol. 32, no. 3, (march 2011).
3. G Werner, T.M. Coque, A.M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson et al., Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in europe, *Eurosurveillance*, Volume 13 (47), (2008).
4. Otter JA, Yezli S, Perl TM, Barbut F, French GL, The role of 'no-touch' automated room disinfection systems in infection prevention and control, *Journal of Hospital Infection*, 83, pages 1–13 (2013).
5. С.Г. Шашковский, Т.А. Калинчук, Н.А. Поликарпов, Я.А. Гольдштейн, И.В. Гончаренко, Оборудование для обеззараживания помещений в ЛПУ на основе импульсной ультрафиолетовой технологии, *Поликлиника*, №3, pages 42-46 (2009).
6. Chetan Jinadatha, Ricardo Quezada, Thomas W Huber et al., Evaluation of a pulsed-xenon ultraviolet room disinfection device for impact on contamination levels of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *BMC Infectious Diseases*, 14:187 (2014).
7. Chan-Ick Cheigh, Mi-Hyun Park, Myong-Soo Chung, Jung-Kue Shin, Young-Seo Park, Comparison of intense pulsed light- and ultraviolet (UVC)-induced cell damage in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7, *Food Control*, 25, pages 654-659 (2012).
8. Anderson DJ, Gergen MF, Smathers E., Sexton DJ., et al, Decontamination of Targeted Pathogens from Patient Rooms Using an Automated Ultraviolet-C-Emitting Device, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, vol. (34), No 5, pp. 466-471 (2013).
9. А.И. Васильев, С.В. Костюченко и др. Применение УФ-излучения с целью уменьшения риска заражения внутрибольничными инфекциями, *Медицинский алфавит*, Эпидемиология и гигиена №2. С. 50-54 (2014)

10. Marie U. Owens, David R. Deal, Michael O. Shoemaker et al., High-Dose Ultraviolet C Light Inactivates Spores of *Bacillus Atrophaeus* and *Bacillus Anthracis* Sterne on Nonreflective Surfaces, *Applied Biosafety*, 10(4). Pp. 240-247 (2005).
11. Kowalski W., Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook. UVGI for Air and Surface Disinfection, New York.: *Springer*, 501 p. (2009).
12. Varghese A.J., 5-thymine-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light, *Biochemical and biophysical research communications*, Volume 38, N 3, p. 484-490 (1970).
13. Рубин А.Б., Биофизика. Том 2. Биофизика клеточных процессов, p. 464 (1997).
14. Munataka N., Rupert C.S., Dark repair of DNA containing "Spore photoproduct" in *Bacillus subtilis*, *Molecular and General Genetics*, vol. 130, Issue 3, pp. 239-250 (1974).
15. Zimmer J.L., Slawson R.M., Potential Repair of *Escherichia coli* DNA following Exposure to UV Radiation from Both Medium and Low-Pressure UV Sources Used in Drinking Water Treatment, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. (68), No 7, pp. 3293-3299 (2002).
16. Fajardo-Cavazos P, Nicholson W.L., Molecular dissection of mutations in the *Bacillus subtilis* spore photoproduct lyase gene which affect repair of spore DNA damage caused by UV radiation, *Journal of Bacteriology*, vol. (177), No 15, pp. 4402-4409 (1995).
17. Chen R.Z., Stephen A.C., James R.B., Comparison of the action spectra and relative DNA absorbance spectra of microorganisms: Information important for the determination of germicidal fluence (UV dose) in an ultraviolet disinfection of water, *Water research*, vol. (43), issue 20, pp. 5087-5096 (2009).
18. Nerandzic M.M., Cadnum J.L., Eckart K.E., Donskey C.J., Evaluation of a hand-held far-ultraviolet radiation device for decontamination of *Clostridium difficile* and other healthcare-associated pathogens, *BMC Infectious Diseases*, 12:120 (2012).
19. Владимиров Ю.А. Физико-химические основы фотобиологических процессов. p. 285 (1983)
20. Vermeulen N, Keeler WJ, Nandakumar K, Leung KT., The bactericidal effect of ultraviolet and visible light on *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. (99), No 3, pp. 550-556 (2008).
21. Tyrell RM., Induction of pyrimidine dimers in bacterial dna by 365 nm radiation, *Photochemistry and Photobiology*, vol. (17), pp. 69-73 (1973).
22. Beer JZ, Olvey KM, Miller SA, Thomas DP, Godar DE, Non-nuclear damage and cell lysis are induced by UVA, but not UVB or UVC, radiation in three strains of L5178Y cells, *Photochemistry and Photobiology*, vol. (58), No5, pp. 676-681 (1993).
23. Gomez-Lopez V.M., Ragaert P., Debevere J., Devlieghere F., Pulsed light for food decontamination: a review, *Trends in Food Science & Technology*, vol. (18), pp. 464-473 (2007).
24. Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A., Federighi, M., Elmnasser, N., Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review, *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 53, Issue 7, pp. 813-821 (2007).
25. Chan-Ick Cheigh, Mi-Hyun Park, Myong-Soo Chung, Jung-Kue Shin, Young-Seo Park, Comparison of intense pulsed light- and ultraviolet (UVC)-induced cell damage in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7, *Food Control*, vol. (25), No 2, pp. 654-659 (2012).
26. Takeshita K, Shibatoa J., Sameshimaa T, Fukunagab S., Isobec S, Ariharad K., Itoh M., Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation, *International Journal of Food Microbiology*, vol. (85), Issue 1-2, pp. 151-158 (2003).

The International Ozone Association
is pleased to present the

22nd World Congress & Exhibition

28 June – 3 July 2015, Barcelona, Spain

Ozone and Advanced Oxidation Leading-edge science and technologies

PROCEEDINGS

No. ISBN: 979-10-92607-02-4

Water Treatment
Science and Technology
Research Development Events Members
Knowledge Advances
Standards Awards
Fundamentals Industry News
Field application Engineering
Food Processing Worldwide
Ozone Therapy Publications
Agriculture



Evaluation of pulsed xenon ultraviolet irradiation of continuous spectrum for efficacy against multidrug-resistant nosocomial strains

Sergey Kireev², Sergey Shashkovskiy¹, Tatiana Grenkova³, Yakov Goldshteyn², Igor Goncharenko², Evgeniya Selkova³

1. Federal State Budgetary Institution of Higher Professional Education "Bauman Moscow State Technical University", 2nd Baumanskaya Street 5/1, 105005 Moscow, Russia
2. "Scientific and Industrial Enterprise "Melitta", Ltd., Miklukho-Maklaya Street 16/10, 117997 Moscow, Russia
3. Federal Budgetary Scientific Institution "G.N. Gabrichevsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology", Admirala Makarova Street 10, 125212 Moscow, Russia

ABSTRACT

The present study demonstrated the evaluation results of pulsed xenon ultraviolet irradiation of continuous spectrum for efficacy against multi-drug resistant strains with high epidemic potential and resistance against main groups of chemical disinfectants (MRSA, VRE, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *S. aureus*). Microbial concentration on plastic and metal surfaces was at least 10^7 CFU/cm². The samples were placed horizontally and vertically at 1.2-2 meters' distance from the irradiation source and treated for 5, 10 or 20 minutes. After 5 minutes' treatment the microbial reduction was at least 4.9 lg for all the pathogens and surface materials. The presence of bioburden on samples did not affect the disinfection efficacy. The decontamination efficacy for metal plates reduced insignificantly.

Keywords: MRSA, VRE, bacteria, decontamination, hospital strains, multi-drug resistance, efficacy, pulsed light, ultraviolet

INTRODUCTION

In recent decades increasing attention is paid to the development of prevention measures against Healthcare-associated infections (HAIs), caused by nosocomial bacterial strains with multiple drug resistance and resistance against main groups of chemical disinfectants. Most important current infectious agents of HAIs – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) – are able to induce various clinical forms of infections: pneumonia, bacteremia, urinary tract infection, meningitis, osteomyelitis and others. According to present knowledge [1] MRSA induces yearly 170,000 infections in Europe, about 5,000 of them with fatal outcome. The additional cost of treating patients with MRSA is about €380 million yearly. In the USA this value reaches about \$9.7 billion a year [2]. The detection frequency of VRE caused HAIs is about 40% in European countries [3] depending on the country and measures of infection prevention used at hospitals.

One of most common measures of HAIs prevention is manual cleaning and surfaces disinfection of hospital rooms and surfaces using chemical disinfectants solutions. However this disinfection method has a number of major drawbacks [4]: impossibility to clean the hard-to-reach spots, including places higher than human reach, strong dependence of the disinfection efficacy on the personnel strictly following the procedure of solution preparation and use, strong dependence of the disinfection efficacy on the exposure time of surfaces to the disinfectant, manpower input.

Presently is used an advanced method of air and surfaces decontamination of hospital rooms and objects, based on exposing the objects to high-intensity continuous spectrum pulses generated in xenon gas gap by high voltage application [5-7].

At the moment exists a vast database of microbiological and clinical studies, speaking for the high efficiency of the method; however there is no experimental base of bactericidal doses required for air and surfaces decontamination from hospital pathogens [5-7].

This study's purpose is to determine the bactericidal doses of pulsed UV irradiation as well as conditions required for rooms' decontamination with at least 99.9% efficiency for all current HAI pathogens.

MATERIAL AND METHODS

BACTERIAL STRAINS

S. aureus strain 907 and the following multi-drug resistant strains: *P. aeruginosa*, MRSA, vancomycin-resistant *E. faecium* (VRE), *A. baumannii*, as well as epidemic *P. mirabilis* were used throughout this study. The chosen pathogen strains were studied for resistance against chemical disinfectants of different groups. For controlling the decontamination efficacy were used *E. coli* strain 1257 and *S. aureus* strain 907. The tests demonstrated the resistance of non-fermenting enterobacteria (*P. aeruginosa* and *A. baumannii*) against disinfectants of all groups.

24-hours' suspension of the chosen strain was prepared as per industry-specific opacity standard No. 20 (9 lg) on the basis of normal saline or saline with 40% of sheep blood serum (6 ml of saline, 4 ml of blood serum). The cultures were incubated in blood agar. With a micropipette 0.02 ml of bacterial suspension were applied to the bottom of a sterile Petri dish or metal plate of equal size. Microdrops were evenly distributed throughout the surface of the samples and dried. The testing was performed within 1 hour since the application of microdrops with pathogens.

After treating the bacterial suspension at the bottom of Petri dish with UV irradiation, 10 ml of sterile saline were added to the dish and thoroughly stirred in circular motions. Then 10 ml of molten and cooled to 45°C growth medium were added. After that the dishes were covered and left to solidify. This procedure is precise as it allows for accounting occasional viable colonies.

The culture from metal plates was washed to a sterile drape after UV treatment and then shaken in a bottle with beads in 10 ml of sterile saline. 0.1 ml of the resulting suspension was inoculated into thick selective media.

UV IRRADIATION SOURCE

As UV irradiation source was used a pulsed xenon lamp of Yanex-2 unit. The electrical output of the lamp was 1000 W.

The U-shaped pulsed xenon lamp generated high intensity light pulses with 120 µs half-amplitude duration and 2.5 Hz frequency.

Irradiation in 200-400 nm range was registered by a back-thinned type CCD spectrometer with high quantum efficiency and high UV sensitivity "AvaSpec-ULS2048-USB2". Intensity of the lamp irradiation was measured by calibrated UV sensor "TOCON-probe", detecting irradiation in 220...275 nm range (at half-height) with maximum spectral sensitivity at 255 nm. The lamp irradiation spectrum is shown in Figure 1. Average bactericidal flux in 200 – 300 nm range was 42 W.

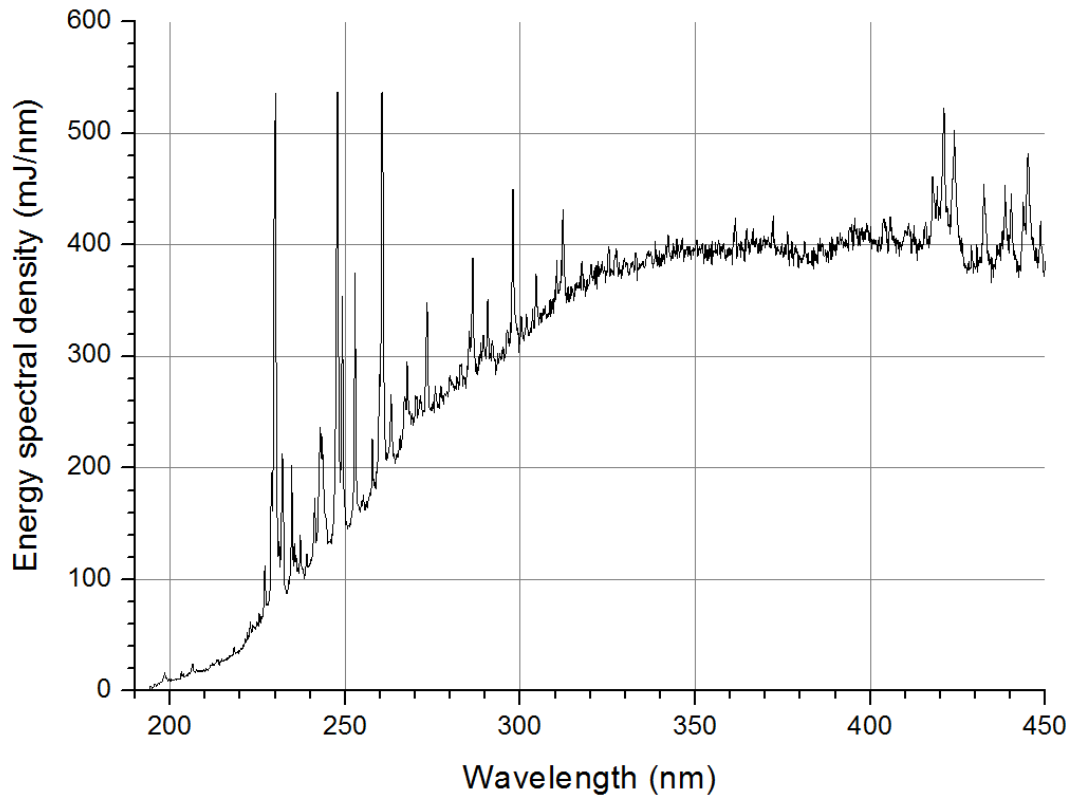


Figure 1. Irradiation spectrum of pulsed xenon unit "Yanex-2"

Thus, the irradiance at 2 meters' distance is 1 W/m^2 .

METHODS

The samples with initial contamination of at least 10^7 CFU/cm^2 were placed vertically and horizontally in respect to irradiation source. For vertically placed samples the distance to Yanex-2 was 2 m, and the exposure time was 5, 10, and 20 minutes. For horizontal treatment the samples were placed on 80 cm high table at 1.2-1.7 meters' distance from the lamp; the exposure time was 5 and 10 minutes. The centre of the light emitting lamp part was at 100 cm height. 3-4 replications of tests were performed for each exposure time, followed by control of cultures' viability.

RESULTS AND DISCUSSION

The 5 minutes' irradiation of vertically placed plastic and metal samples by means of Yanex-2 reduced the contamination level at least 5 lg (Table 1). The 20 minutes' exposure to UV light led to sterilization in all performed tests (data not shown in the table). The results of 5 minutes' irradiation of vertically placed samples with 2 meters' distance are shown in Figure 2.

Table 1. Evaluation of disinfection efficacy of contaminated samples, located vertically at 2 meters' distance from the irradiation source

Test conditions	Surviving pathogens (efficacy), CFU/cm ² (lg)		
	0 min	5 min (336 J/m ²)	10 min (672 J/m ²)
MRSA			
Petri dish w/o bioburden	5 x 10 ⁸	28 (7.2)	0 (8.7)
Petri dish with bioburden		50 (7)	1 (8.7)
Metal plate w/o bioburden		67 (6.8)	-
Metal plate with bioburden		1.83 x 10 ³ (5.4)	-
VRE			
Petri dish w/o bioburden	1.9 x 10 ⁷	21 (5.9)	15 (6.1)
Petri dish with bioburden	2.3 x 10 ⁷	19 (6)	20 (6)
Metal plate w/o bioburden	1.83 x 10 ⁷	910 (4.3)	440 (4.6)
Metal plate with bioburden		600 (4.4)	610 (4.4)
P. aeruginosa			
Petri dish w/o bioburden	1.65 x 10 ⁷	16 (6)	1 (7.2)
Petri dish with bioburden		9 (6.2)	1 (7.2)
Metal plate w/o bioburden	1.5 x 10 ⁷	100 (5.1)	25 (5.7)
P. mirabilis			
Petri dish w/o bioburden	5 x 10 ⁸	6 (7.9)	-
Petri dish with bioburden		2 (8.3)	-
Metal plate w/o bioburden	6 x 10 ⁸	730 (5.9)	-
Metal plate with bioburden		730 (5.9)	-
A. baumannii			
Petri dish w/o bioburden	2.32 x 10 ⁷	20 (6)	15 (6.1)
Petri dish with bioburden	1.6 x 10 ⁷	35 (5.6)	27 (5.7)
S. aureus			
Petri dish w/o bioburden	7 x 10 ⁸	32 (7.3)	-
Petri dish with bioburden		48 (7.1)	0 (8.8)

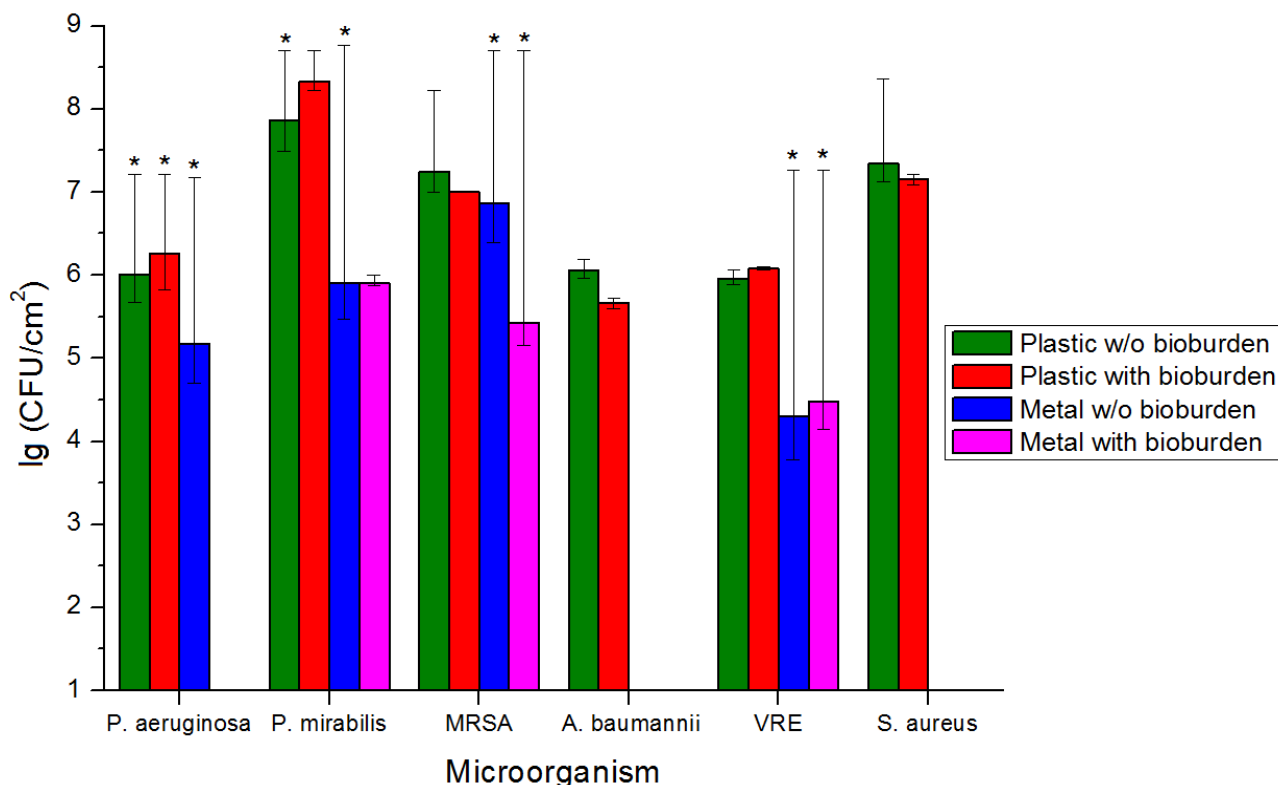


Figure 2. Evaluation of disinfection efficacy of contaminated samples with and without bioburden
 (*) – demonstrates 100% decontamination of at least one sample

The irradiation of horizontally placed metal plates provided 4.9-7.6 lg disinfection efficacy depending on the bacterial strain and distance to the irradiation source (Table 2).

Table 2. Evaluation of disinfection efficacy of horizontally placed metal plates, contaminated with hospital pathogens strains

Mean distance to sample, m	Presence of bioburden	Treatment time (UV dose), min (J/m ²)	Control, CFU/cm ²	Surviving pathogens (efficacy), CFU/cm ² (lg)
<i>MRSA</i>				
1.6	w/o bioburden	5 (62,6)	1.15 x 10 ⁷	100 (5)
1.7	with bioburden	5 (52,5)	1.4 x 10 ⁷	160 (4.9)
1.4	w/o bioburden	10 (184)	1.15 x 10 ⁷	100 (5)
1.5	with bioburden	10 (151)	1.4 x 10 ⁷	83 (5.2)
<i>P. aeruginosa</i>				
1.4	w/o bioburden	5 (92)	4.6 x 10 ⁷	0 (7.6)
1.5	with bioburden	5 (75,5)	4.7 x 10 ⁷	33 (6.1)
1.2	w/o bioburden	10 (286)	4.6 x 10 ⁷	0 (7.6)
1.3	with bioburden	10 (228)	4.7 x 10 ⁷	0 (7.6)

Regardless of the samples orientation against the irradiation source, the disinfection efficacy is essentially independent of the bioburden presence and only slightly dependent on the surface material. The comparison with mercury based units shows a significantly higher decontamination efficacy of pulsed irradiation sources for equal doses [8-10]. Thus, the 99.9% efficient disinfection of the surfaces contaminated by *S. aureus* with bioburden shall require a dose of at the most 32 J/m² for a pulsed xenon lamp, and of 1,500 J/m² for a mercury vapor lamp [9]. Disinfection of a number of samples with 100% efficacy (Fig. 2) shows the absence of the effect of maximum efficiency achievement, characteristic of mercury based irradiation sources. This effect means that the disinfection efficacy does not grow once the initial microbial load reduces by 2-4 lg even if the UV dose is increased by 10 times [9, 10].

The achieved high values of decontamination efficacy for various samples, contaminated by drug-resistant pathogens strains with high epidemic potential, result from simultaneous impact of continuous spectrum UV Irradiation on almost all cell structures. Such multichannel impact ensures a sharp decrease of bactericidal doses [11-19]. Under the influence of pulsed UV light, the cells repair process either runs significantly more slowly [20] or completely stops [14, 21]. The study of the impact of pulsed UV continuous spectrum irradiation on cell membrane shows the complete destruction of the latter, including the loss of regulatory and barrier functions as well as cytoplasm efflux [7, 22].

CONCLUSIONS

The performed tests demonstrated high bactericidal efficacy of pulsed UV irradiation of continuous spectrum against the strains with multiple drug resistance and resistance against main groups of chemical disinfectants. The disinfection efficiency against both gram-negative and gram-positive microorganisms is only slightly dependent on the presence of bioburden and makes 4-8 lg. The material of the treated surface affects the decontamination efficacy in a minor way. The comparative studies with the test and hospital strains of *S. aureus* (907) and MRSA showed identical values of decontamination efficacy ≈7-7.5 lg. The obtained threshold bacterial doses are significantly lower than the corresponding values for devices with mercury based lamps, which allows for dramatically reducing the time of disinfection procedures. The experimental results permit to claim that Yanex-2 is a highly efficient and easy-to-use device for rapid surfaces and objects disinfection in hospital environment.

REFERENCES

1. Köck R., Becker K., Cookson B. et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe, *Euro Surveill*, 15 (41), (2010).
2. Stibich M., Stachowiak J. et al., Evaluation of a pulsed-xenon ultraviolet room disinfection device for impact on hospital operations and microbial reduction, *Infection control and hospital epidemiology*, vol. 32, no. 3 (March 2011).
3. Werner G., Coque T.M., Hammerum A.M., Hope R., Hryniewicz W., Johnson A. et al., Emergence and spread of vancomycin resistance among Enterococci in Europe, *Eurosurveillance*, Volume 13 (47) (2008).
4. Otter J.A., Yezli S., Perl T.M., Barbut F., French G.L., The role of 'no-touch' automated room disinfection systems in infection prevention and control, *Journal of Hospital Infection*, 83, pages 1–13 (2013).
5. Shashkovskiy S.G., Kalinchuk T.A., Polikarpov N.A., Goldshteyn Y.A., Goncharenko I.V., Pulsed UV equipment for air disinfection at medical and preventive treatment facilities // Poliklinika. No. 3. 2009. p. 42-46
6. Jinadatha C., Quezada R., Huber T.W. et al., Evaluation of a pulsed-xenon ultraviolet room disinfection device for impact on contamination levels of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Infectious Diseases*, 14:187 (2014).
7. Chan-Ick Cheigh, Mi-Hyun Park, Myong-Soo Chung, Jung-Kue Shin, Young-Seo Park, Comparison of intense pulsed light- and ultraviolet (UVC)-induced cell damage in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7, *Food Control*, 25, pages 654-659 (2012).
8. Anderson D.J., Gergen M.F., Smathers E., Sexton D.J. et al., Decontamination of targeted pathogens from patient rooms using an automated ultraviolet-C-emitting device, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, vol. (34), No. 5, pp. 466-471 (2013).
9. Vassiliev A.I., Kostyuchenko S.V. et al., Use of UV irradiation for decreasing the risk of nosocomial infections, *Meditsinskiy alfavit*, Epidemiology and hygiene No. 2. pp. 50-54 (2014)
10. Owens M.U., Deal D.R., Shoemaker M.O. et al., High-dose ultraviolet-C light inactivates spores of *Bacillus atrophaeus* and *Bacillus anthracis* Sterne on nonreflective surfaces, *Applied Biosafety*, 10(4). Pp. 240-247 (2005).
11. Kowalski W., Ultraviolet germicidal irradiation handbook. UVGI for air and surface disinfection, New York: Springer, 501 p. (2009).
12. Rubin A.B., Biophysics. Vol. 2. Biophysics of cellular processes, p. 464 (1997).
13. Zimmer J.L., Slawson R.M., Potential Repair of *Escherichia coli* DNA following Exposure to UV Radiation from Both Medium and Low-Pressure UV Sources Used in Drinking Water Treatment, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. (68), No 7, pp. 3293-3299 (2002).
14. Chen R.Z., Stephen A.C., James R.B., Comparison of the action spectra and relative DNA absorbance spectra of microorganisms: Information important for the determination of germicidal fluence (UV dose) in an ultraviolet disinfection of water, *Water research*, vol. (43), issue 20, pp. 5087-5096 (2009).
15. Nerandzic M.M., Cadnum J.L., Eckart K.E., Donskey C.J., Evaluation of a hand-held far-ultraviolet radiation device for decontamination of *Clostridium difficile* and other healthcare-associated pathogens, *BMC Infectious Diseases*, 12:120 (2012).
16. Vladimirov Yu.A., Physics and chemistry of photobiological processes, p. 285 (1983)
17. Vermeulen N., Keeler W.J., Nandakumar K., Leung K.T., The bactericidal effect of ultraviolet and visible light on *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. (99), No 3, pp. 550-556 (2008).
18. Tyrell R.M., Induction of pyrimidine dimers in bacterial DNA by 365 nm radiation, *Photochemistry and Photobiology*, vol. (17), pp. 69-73 (1973).
19. Beer J.Z., Olvey K.M., Miller S.A., Thomas D.P., Godar D.E., Non-nuclear damage and cell lysis are induced by UVA, but not UVB or UVC, radiation in three strains of L5178Y cells, *Photochemistry and Photobiology*, vol. (58), No5, pp. 676-681 (1993).
20. Gomez-Lopez V.M., Ragaert P., Debevere J., Devlieghere F., Pulsed light for food decontamination: a review, *Trends in Food Science & Technology*, vol. (18), pp. 464-473 (2007).
21. Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A., Federighi, M., Elmnasser, N., Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review, *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 53, Issue 7, pp. 813-821 (2007).
22. Takeshita K., Shibatoa J., Sameshimaa T., Fukunagab S., Isobec S, Ariharad K., Itoh M., Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation, *International Journal of Food Microbiology*, vol. (85), Issue 1-2, pp. 151-158 (2003).