



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



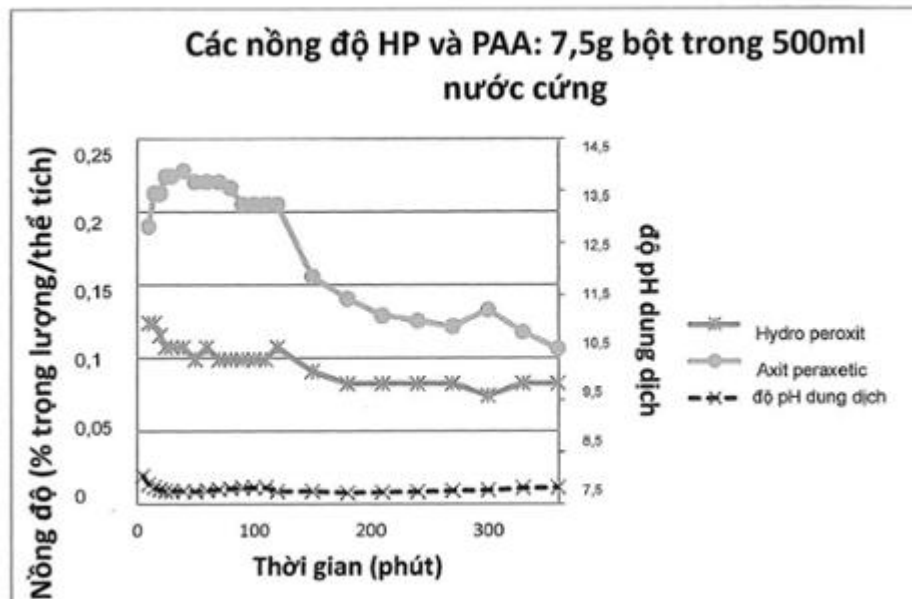
1-0039473

(51)<sup>2020.01</sup> A01N 37/20; A61L 2/18; A01N 59/00; (13) B  
A01N 37/16

(21) 1-2020-03286 (22) 07/11/2018  
(86) PCT/IB2018/001437 07/11/2018 (87) WO2019/097293 23/05/2019  
(30) 62/587,112 16/11/2017 US  
(45) 25/04/2024 433 (43) 25/08/2020 389  
(73) WHITELEY CORPORATION PTY. LTD. (AU)  
12 Mount Street, Suite 501, North Sydney, New South Wales, 2060, Australia  
(72) GLASBEY, Trevor, Owen (AU); WHITELEY, Gregory, Stuart (AU).  
(74) Công ty Luật TNHH ROUSE Việt Nam (ROUSE LEGAL VIETNAM LTD.)

(54) QUY TRÌNH LOẠI BỎ MÀNG SINH HỌC RA KHỎI BỀ MẶT

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô ra khỏi bề mặt. Quy trình này bao gồm các bước: (i) hòa tan chế phẩm dạng bột vào trong nước, trong đó chế phẩm dạng bột bao gồm: a) nguồn hydro peroxit, b) chất cho axetyl, c) tác nhân axit hóa, và d) tác nhân làm ướt; (ii) cho phép dung dịch này tạo ra nồng độ hiệu quả để diệt sinh vật của axit peraxetic; (iii) cho bề mặt bị ô nhiễm có màng sinh học có bề mặt khô tiếp xúc với dung dịch chứa axit peraxetic trong một khoảng thời gian; và (iv) loại bỏ dung dịch.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến quy trình loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô ra khỏi bề mặt.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Nhìn chung, các màng sinh học gồm các vi sinh vật bám trên các bề mặt và được đóng gói trong chất nền polyme ngâm nước có sự tổng hợp của chính chúng. Chất nền gồm các polysaccarit, protein, và axit nucleic mà được gọi chung là “các chất nền polyme ngoại bào” (extracellular polymeric substances - EPS). Chất nền EPS cho phép các tế bào trong màng sinh học dính vào nhau và là yếu tố quan trọng trong sự phát triển của quần thể, các quần xã, ba chiều, được gắn liền. Các kênh nước được phân tán xuyên suốt các màng sinh học, cho phép trao đổi các chất dinh dưỡng, các chất chuyển hóa, và các sản phẩm thải ra.

Các màng sinh học tạo thành hầu như ở bất kỳ chỗ nào có nước. Các vị trí bao gồm các vật liệu tự nhiên và nhân tạo vô cơ ở trên và dưới mặt đất, trên khoáng chất và kim loại, bao gồm các vật liệu cấy ghép y tế, và trên các bề mặt hữu cơ như mô trên cơ thể và mô thực vật. Các bề mặt phát triển màng sinh học có thể đóng vai trò làm nguồn năng lượng, nguồn cacbon hữu cơ, hoặc đơn giản là vật liệu đỡ. Một dấu hiệu chung của các môi trường màng sinh học là chúng được định kỳ hoặc liên tục làm ướt đẫm bằng nước.

Một ví dụ chung về mảng bám nha khoa màng sinh học, sự tích tụ nhầy của vi khuẩn mà tạo thành trên các bề mặt của răng. Một cách tương tự, các lớp nhầy mà thường được tìm thấy trên các hòn đá ở các con sông và các dòng chảy cũng được tạo thành từ màng sinh học.

Các màng sinh học gây ra lượng đáng kể của tất cả việc nhiễm vi sinh vật ở người. Các lây nhiễm bệnh viện (mắc tại bệnh viện) là nguyên nhân đứng thứ tư gây ra tử vong ở Mỹ với 2 triệu trường hợp mỗi năm (hoặc xấp xỉ khoảng 10% số bệnh nhân trong bệnh

viên ở Mỹ) tạo ra hơn 5 tỷ đô la Mỹ chi phí y tế bổ sung cho mỗi năm. Khoảng 60–70% các ca lây nhiễm bệnh viện có liên quan đến một số loại thiết bị y tế cấy ghép. Được ước tính là có trên 5 triệu dụng cụ y tế hoặc mô cấy được sử dụng mỗi năm chỉ riêng ở Mỹ. Các lây nhiễm vi trùng (microbial) được quan sát trên hầu hết, nếu không phải tất cả, như các dụng cụ, bao gồm: các van tim giả, các mô cấy chỉnh hình, các ống thông nội mạch, tim nhân tạo, các dụng cụ hỗ trợ tâm thất trái, các máy tạo nhịp tim, các mạch máu giả, các ống dẫn dịch não tủy, các ống thông tiểu, chân giả và kính áp tròng, và các dụng cụ tránh thai trong tử cung.

Cho đến thời gian gần đây, có sự thống nhất chung rằng màng sinh học cần môi trường ẩm hoặc ướt để phát triển. Thông thường các bề mặt khô được cho là không tạo thành màng sinh học vi khuẩn. Tuy nhiên, nghiên cứu của Vickery *et al* (tài liệu tham khảo 1) chỉ ra rằng màng sinh học có thể được tìm thấy trên các bề mặt khô thông thường. Các màng sinh học này đã được tìm thấy để chứa nhiều vi khuẩn, bao gồm *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, v.v.

Trong nghiên cứu này, Vickery đã lấy mẫu triệt để các vật phẩm trong đơn vị chăm sóc đặc biệt của bệnh viện (intensive care unit - ICU) đã ngừng hoạt động sau khi được khử trùng theo từng quý bằng cách làm sạch ban đầu với chất tẩy rửa trung tính, tiếp đó là khử trùng bằng 500 ppm clo. Sau khi khử trùng, thiết bị và đồ đạc được loại bỏ theo cách vô trùng ra khỏi bệnh nhân và các khu vực sử dụng chung.

Các vật phẩm được loại bỏ sau đó được lấy mẫu triệt để bằng cách sử dụng các găng tay, kẹp, kìm, kéo, hoặc dao phẫu thuật vô trùng, phụ thuộc vào vật liệu được lấy mẫu. Găng tay và dụng cụ được thay đổi giữa mỗi mẫu. Các mẫu sau đó được đặt vào trong các hộp đựng vô trùng để chuyển đến phòng thí nghiệm. Các vật phẩm nhỏ, như hộp thuốc thử cung cấp vô trùng, được chuyển nguyên vẹn đến phòng thí nghiệm; các vật phẩm lớn hơn, như đệm và cửa, có các phần được loại bỏ vào trong các hộp đựng vô trùng. Sau khi chuyển đến phòng thí nghiệm, các mảnh lớn này được chia thành các mảnh nhỏ hơn, sử dụng kỹ thuật vô trùng.

Các mẫu được xét nghiệm bằng kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscopy - SEM). Màng sinh học được tìm thấy trên 5 trong số 6 mẫu được xét

nghiệm. Bốn mẫu có chủ yếu là vi khuẩn hình cầu được đóng gói trong lượng EPS lớn và mẫu từ rèm có ‘chuỗi’ là chứng cứ về EPS được khử nước.

Vi khuẩn được sinh trưởng trên đĩa thạch máu ngựa (Horse Blood Agar) từ bốn trong sáu mẫu, đã chứng minh sự có mặt của các sinh vật có thể nuôi cấy. Các mẫu được lấy từ dây rèm nâng và rèm, mà thể hiện là dương tính đối với màng sinh học bằng SEM, cũng đã phát triển *Staphylococcus aureus* kháng Methixilin (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA).

Việc xét nghiệm lại các mẫu này sau 12 tháng bảo quản trong các điều kiện khô cũng thể hiện vẫn có sự có mặt của vi khuẩn sống (tài liệu tham khảo 2), với nhiều mẫu vẫn cho thấy sự có mặt của các sinh vật kháng thuốc như MRSA, Enterococcus kháng Vancomycin (Vancomycin Resistant Enterococcus - VRE), các sinh vật sản xuất Beta Lactamaza phổ rộng (Extended Spectrum Beta Lactamase - ESBL) v.v...

Thực tế là sự hiện diện của các màng sinh học có bề mặt khô trong môi trường bệnh viện được đề xuất một cách mạnh mẽ là chúng có vai trò như bể chứa các sinh vật kháng này, do đó có vai trò trong sự lây lan của các lây nhiễm trong bệnh viện còn được đề xuất trong nghiên cứu của Whiteley *et al* (tài liệu tham khảo 3), trong đó vị trí của màng sinh học có bề mặt khô tiềm năng được xác định bằng cách sử dụng gạc ATP, và sự có mặt của các sinh vật kháng được xác nhận bằng cách nuôi cấy vi trùng. Một nghiên cứu khác, như chưa được công bố, đã có thể chứng minh được rằng các sinh vật được tìm thấy trong màng sinh học có bề mặt khô ở môi trường ICU có liên hệ chặt chẽ với các phân lập được lấy ra từ bệnh nhân được tìm thấy được cư trú với các sinh vật đa kháng (Multiply Resistant Organism - MRO).

Đã được đưa ra giả thiết rằng (xem tài liệu tham khảo 1) màng sinh học có bề mặt khô có thể phát triển ở nơi mà sự ngưng tụ bề mặt xảy ra, tạo ra màng mỏng của nước, hoặc độ ẩm tương đối trong ICU là đủ cao để cho phép các màng sinh học phát triển trên các bề mặt ICU. Một khi được tạo thành, EPS có thể bảo vệ vi khuẩn khỏi sự hút ẩm và làm cho chúng khó để loại bỏ hơn.

Đã được đưa thêm giả thiết rằng các sinh vật đa kháng tiếp tục tồn tại trong môi trường, trong bối cảnh việc làm sạch được tăng cường, đối với các màng sinh học. Mặc

dù các chất tẩy rửa là tốt để loại bỏ chất bẩn ở bệnh nhân và vi khuẩn phù du, chúng kém hiệu quả hơn trong việc loại bỏ màng sinh học, làm cho các quy trình làm sạch hiện tại kém hiệu quả.

Một cách tiềm năng khác đối với sự phát triển của màng sinh học có bề mặt khô trên các bề mặt cảm ứng cao ở môi trường có thể là sự kết tủa của các dung dịch có protein phát sinh từ các dịch thể khác nhau (mồ hôi, nước bọt, máu) lên trên bề mặt môi trường, do đó, cho phép cư trú sớm bằng các vi sinh vật tạo thành màng sinh học cơ hội. Việc tiếp xúc lặp đi lặp lại của các bề mặt cảm ứng cao có thể cung cấp các chất dinh dưỡng gián đoạn đến màng sinh học có bề mặt khô.

Sau khi đã phát hiện ra loại màng sinh học có bề mặt khô (Dry Surface Biofilm - DSBF), mô hình phòng thí nghiệm đã được phát triển bởi Almatroudi et al (tài liệu tham khảo 4; được kết hợp ở đây như tài liệu tham khảo).

Màng sinh học có bề mặt ướt thông thường thường được phát triển trên bình phản ứng màng sinh học CDC: theo phương pháp chuẩn như được mô tả trong ASTM E2562 (xem tài liệu tham khảo 5). Almatroudi đã thay đổi phương pháp luận sử dụng trong ASTM E2562 để tạo ra màng sinh học có bề mặt khô bằng cách kết hợp thời gian khử nước kéo dài trong khoảng giữa sự tiếp xúc các mẫu thí nghiệm mẫu với môi trường phát triển. Bằng cách này, phương pháp luận của Almatroudi cố tái tạo các điều kiện mà ở đó màng sinh học có bề mặt khô được cho là phát triển (tức là tiếp xúc bề mặt với các chất dinh dưỡng dạng nước thường xuyên (hóa chất làm sạch, chất lỏng sinh học v.v.) sau đó là khoảng thời gian kéo dài để hút ẩm).

Việc kiểm tra các màng sinh học có bề mặt khô dạng mô hình được so sánh với các màng sinh học có bề mặt khô được thu hồi từ các bề mặt môi trường khô và được thể hiện để có hình thái học và thành phần tương tự.

Cả hai màng sinh học có bề mặt khô mô hình và môi trường cũng được phát hiện ra là khác với các màng sinh học có bề mặt ướt thông thường.

Đầu tiên, trong khi EPS của màng sinh học thông thường (chẳng hạn các màng sinh học tìm thấy trong các môi trường ướt, thông thường) có xu hướng được tạo thành

phần lớn từ các polysaccarit, thì EPS của màng sinh học có bề mặt khô (DSBF) lại giàu protein hơn một cách đáng kể.

Thứ hai, trong khi được biết rằng màng sinh học có bề mặt ướt thông thường tạo thành môi trường bảo vệ tốt đối với vi khuẩn nằm sâu trong màng sinh học, mà nhằm bảo vệ vi khuẩn nằm sâu (embedded bacteria) khỏi các chất diệt sinh vật như các chất khử trùng, chất kháng vi trùng v.v. màng sinh học có bề mặt khô tỏ ra là bảo vệ đáng kể hơn.

Ví dụ, Almatroudi *et al* cũng đã chứng minh rằng các sinh vật trong màng có bề mặt khô có khả năng kháng đáng kể để xử lý với clo, với màng sinh học có bề mặt khô có *Staphylococcus aureus* vẫn thể hiện những trường hợp sống sót sau khi tiếp xúc với dung dịch natri hypoclorit chứa sẵn 20.000ppm clo (tài liệu tham khảo 6).

Tương tự, cũng đã được chứng minh rằng việc màng sinh học có bề mặt khô được làm nóng khô (tối đa là 121°C trong 20 phút) có ảnh hưởng tối thiểu đến vi khuẩn nằm sâu trong màng sinh học có bề mặt khô, làm giảm số lượng vi khuẩn chỉ bằng 2 log<sub>10</sub> trong khi nuôi cấy sinh vật phù du và số màng sinh học hydrat hóa cũng bị giảm tương ứng trên 8 log<sub>10</sub> và 7 log<sub>10</sub>. Còn được thể hiện rằng có thể các sinh vật có thể sống sau khi hấp khử trùng ở 121°C trong tối đa 30 phút (tài liệu tham khảo 7).

Gần đây, khi chưa được công bố, các nghiên cứu về các hệ protein của các dạng khác nhau của màng sinh học được tạo ra bởi *Staphylococcus aureus*, sự khác biệt đáng kể trong các protein đã tăng cường điều chỉnh khi tạo thành các màng sinh học khác nhau đã được quan sát so với dạng sinh vật phù du (xem bảng 1 và Fig.4). Sự khác nhau trong cấu trúc protein giữa các dạng khác nhau của màng sinh học có khả năng giải thích cho các quan sát và các sự khác nhau đã được báo cáo về khả năng kháng các chất diệt sinh vật như clo, nhiệt độ và bảo quản kéo dài trong trạng thái được hút ẩm.

Bảng 1: Nghiên cứu hệ protein của màng sinh học khác nhau của *Staphylococcus aureus*

Số lượng các protein khác biệt	Chuyên biệt hoặc thông dụng	Loại màng sinh học
52	Chuyên biệt	Màng sinh học ướt 3 ngày (3 Day wet biofilm - 3DWB))

33	Chuyên biệt	Màng sinh học ướt 12 ngày (12 Day wet biofilm - 12DWB)
26	Chuyên biệt	Màng sinh học khô 12 ngày (12 Day dry biofilm - 12DDB)
15	Thông dụng	3DWB + 12DWB
7	Thông dụng	3DWB + 12DDB
38	Thông dụng	12DWB + 12DDB
47	Thông dụng	3DWB + 12D WB + 12DDB

Do đó, điều hiển nhiên là màng sinh học có bề mặt khô được mô tả trong các tài liệu tham khảo 1, 2, 3, 4, 6 và 7 bộc lộ cơ chế cư trú trên bề mặt cho đến nay vẫn chưa được công nhận mà có sẵn đối với nhiều vi khuẩn, và rằng màng sinh học có bề mặt khô này cung cấp cho vi khuẩn nằm sâu của nó với khả năng bảo vệ được tăng cường sự chống hút ẩm, tiếp xúc với các chất diệt sinh vật và thậm chí là tiếp xúc với nhiệt độ khắc nghiệt so với màng sinh học ướt được công nhận rộng rãi. Sự có mặt của màng sinh học có bề mặt khô trong các cơ sở chăm sóc sức khỏe rõ ràng là cũng làm tăng nguy cơ của các chứng nhiễm trùng bệnh viện bằng cách đóng vai trò làm nguồn chứa các sinh vật gây bệnh, các sinh vật kháng thuốc.

Với sự tăng sức kháng lại của các sinh vật trong màng sinh học có bề mặt khô, rõ ràng là cần có một phương pháp để loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô khỏi bề mặt bị ô nhiễm, và cũng tiêu diệt vi khuẩn nằm sâu. Rõ ràng là các phương pháp chuẩn trong các tổ chức chăm sóc sức khỏe hiện nay là không có hiệu quả chống lại màng sinh học có bề mặt khô, như được chứng minh bởi sự thu hồi của MRO có thể sống sau khi làm sạch giai đoạn cuối.

Đã bất ngờ phát hiện ra rằng sản phẩm chất khử trùng, dựa trên chế phẩm dạng bột mà được hòa tan vào nước trước khi sử dụng đã được chứng minh là có hiệu quả trong cả việc diệt vi khuẩn trong màng sinh học có bề mặt khô, và cũng loại bỏ một cách đáng kể protein có mặt trong màng sinh học có bề mặt khô.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là khắc phục các nhược điểm đã được nêu trong phần tình trạng kỹ thuật sáng chế. Mục đích theo sáng chế là đề xuất quy trình loại bỏ màng sinh học ra khỏi bề mặt.

Như được mô tả ở đây là quy trình loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô từ cả hai bề mặt môi trường (sàn nhà, tường v.v...) cũng như từ các dụng cụ y tế không giới hạn như khung giường, giá đỡ để bơm truyền, băng nút bấm để bơm truyền v.v...).

Theo khía cạnh rộng của sáng chế, ở đây đề xuất quy trình loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô ra khỏi bề mặt, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) hòa tan chế phẩm dạng bột vào trong nước trong đó chế phẩm dạng bột bao gồm:

- a) nguồn hydro peroxit
- b) chất cho axetyl
- c) tác nhân axit hóa, và
- d) tác nhân làm ướt

(ii) cho phép dung dịch này tạo ra nồng độ hiệu quả để diệt sinh vật của axit peraxetic;

(iii) cho bề mặt bị ô nhiễm có màng sinh học có bề mặt khô tiếp xúc với dung dịch chứa axit peraxetic trong một khoảng thời gian; và

(iv) loại bỏ dung dịch.

Trong đó các thuật ngữ “gồm”, “gồm có” hoặc “bao gồm” được sử dụng trong bản mô tả này (bao gồm cả yêu cầu bảo hộ) được hiểu để chỉ sự có mặt của các dấu hiệu được nêu, các số nguyên, các bước hoặc các thành phần, nhưng không loại trừ sự có mặt của một hoặc nhiều các dấu hiệu, số nguyên, bước hoặc thành phần khác, hoặc nhóm của chúng.

Thuật ngữ “hiệu quả diệt sinh vật” được coi như chất mà sẽ có hiệu quả tiêu diệt, bất hoạt hoặc đẩy lùi các sinh vật sống hoặc sinh vật tái bản, bao gồm các bào tử, vi khuẩn, nấm, virus, nấm men và nấm mốc. Dung dịch chứa chế phẩm được mô tả ở đây



có hiệu quả đặc biệt như chất diệt bào tử. Dung dịch chứa chế phẩm được mô tả ở đây cũng có hiệu quả chống lại các loài virus, đặc biệt là các virus lây qua đường máu như HIV, viêm gan A, B và C. Sáng chế cũng có hoạt động chống lại các loài virus khác như filovirus (chẳng hạn như Ebola, Marburg) và arenavirus (Lassa), thậm chí trong sự có mặt ở toàn bộ máu. Thực tế là axit peracetic không bị khử hoạt tính bằng catalaza làm cho chế phẩm đặc biệt hữu dụng để chống lại các loài gây sốt xuất huyết sau này.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi các nồng độ của hydro peroxit và axit peracetic theo thời gian sau khi hòa tan chế phẩm được mô tả ở đây vào nước máy.

Fig.2 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi nồng độ của axit peracetic theo thời gian sau khi hòa tan các trọng lượng khác nhau của chế phẩm được mô tả ở đây vào nước máy.

Fig.3 là biểu đồ thể hiện nồng độ axit peracetic (peracetic acid - PAA) được tạo ra đối với các mẫu khác nhau của các túi chế phẩm được mô tả ở đây, hòa tan vào nước máy, trong 10 phút, 20 phút và 30 phút.

Fig.4 là hình vẽ thể hiện sơ đồ Venn phân loại sự khác nhau giữa số lượng các protein được tăng cường điều chỉnh khác biệt trong các màng sinh học khác nhau của *Staphylococcus aureus*.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện các kết quả của thử nghiệm Crystal Violet để loại bỏ màng sinh học ướt bằng cách sử dụng các sản phẩm làm sạch khác nhau.

Fig.6 là biểu đồ thể hiện mức giảm log thu được từ chất khử trùng theo ví dụ 9, Chlorclean và natri dicloisoxyanurat (sodium dicloroisocyanurate - SDIC) trong cả điều kiện sạch và bẩn.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện việc loại bỏ protein khỏi bề mặt khô đối với chất khử trùng theo ví dụ 9, 1000ppm clo (natri hypoclorit) và 1000pm clo (SDIC).

Fig.8 là biểu đồ thể hiện mức giảm vi khuẩn trong khoảng các chất khử trùng chống lại *Staphylococcus aureus* phù du.

Fig.9 là biểu đồ thể hiện mức giảm vi khuẩn trong khoảng các chất khử trùng chống lại các màng sinh học có bề mặt khô được tạo thành bởi *Staphylococcus aureus*.

**Mô tả chi tiết sáng chế**

Đã bất ngờ phát hiện ra rằng chế phẩm khử trùng được mô tả trong đơn đăng ký sáng chế Mỹ số 15/035,633 (đơn '633) có thể được sử dụng làm chất loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô.

US 15/035,633, nội dung được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn, bộc lộ chế phẩm mà, khi hòa tan trong dung môi, tạo ra dung dịch khử trùng có hiệu quả diệt sinh vật chứa axit peraxetic và hydro peroxit. Chế phẩm bao gồm hệ thống để tạo ra chỉ dẫn về sự tạo thành axit peraxetic. Chỉ dẫn này được tạo ra bằng thuốc nhuộm mà bị mất màu nhanh với sự có mặt của axit peraxetic, trong khi không bị ảnh hưởng đáng kể bởi sự có mặt của hydro peroxit. Thuốc nhuộm thứ hai tùy ý có thể được kết hợp, trong đó thuốc nhuộm thứ hai không bị mất màu đáng kể bằng axit peraxetic hoặc hydro peroxit.

Tốt hơn là chế phẩm theo đơn '633 là được bộc lộ ở dạng bột. Tốt hơn là chế phẩm theo đơn '633 được hòa tan vào nước.

Khi chế phẩm theo đơn '633 được thể hiện ở dạng bột, nó cũng có thể chứa chất thay đổi dòng chảy để ngăn sự kết nhóm của bột trước khi phân tán và hòa tan vào dung môi, và tác nhân làm ướt để hỗ trợ phân tán và hòa tan nhanh của nguồn axetyl vào dung dịch, tốt hơn là ở nhiệt độ môi trường.

Chế phẩm theo đơn '633 cũng có thể được đóng gói vào trong túi hòa tan trong đó toàn bộ gói và hàm lượng được đặt vào trong dung môi, tốt hơn là nước, để tạo ra chất khử trùng, do đó, giảm thiểu sự tiếp xúc nghề nghiệp với tiền chất bột có hại tiềm năng.

Trong phương án được ưu tiên của đơn '633, đã bộc lộ chế phẩm bao gồm nguồn hydro peroxit, chất cho axetyl, tác nhân axit hóa, và thuốc nhuộm thứ nhất mà bị mất màu với sự có mặt của axit peraxetic, nhưng không phải là hydro peroxit. Trong một phương án khác, thuốc nhuộm thứ hai mà về cơ bản là ổn định đối với việc mất màu cũng có thể được bao gồm trong chế phẩm theo đơn '633.

Trong phương án đặc biệt ưu tiên của đơn '633, thuốc nhuộm thứ nhất là thuốc nhuộm mà bị mất màu với sự có mặt của nồng độ diệt sinh vật của axit peraxetic, và thuốc nhuộm thứ hai là thuốc nhuộm mà bị mất màu sau một vài giờ với sự có mặt của

nồng độ diệt sinh vật của axit peraxetic. Sự có mặt của thuốc nhuộm thứ nhất trong dung dịch đóng vai trò như chỉ dẫn rằng dung dịch chưa thu được nồng độ diệt sinh vật mong muốn của axit peraxetic. Một khi màu do thuốc nhuộm thứ nhất được thải ra, màu do thuốc nhuộm thứ hai được để lại để tạo ra sự nhuộm màu đẹp về mặt thẩm mỹ. Khi chế phẩm theo đơn '633 là ở dạng bột, chế phẩm này được hòa tan vào dung môi, để tạo thành dung dịch chứa axit peraxetic.

Chế phẩm theo đơn '633 cũng có thể tùy ý chứa các tác nhân làm ướt, các tác nhân cation hóa và chelat hóa, và các thành phần khác, như chất thơm ổn định đối với việc mất màu, các chất ức chế ăn mòn, các chất thay đổi dòng chảy dạng bột, các chất thay đổi lưu biến v.v...

Chế phẩm theo đơn '633 được điều chế bằng cách kết hợp các thành phần với nhau. Trong phương án ưu tiên, chế phẩm theo đơn '633 là ở dạng bột.

Trong phương án thay thế, chế phẩm theo đơn '633 có thể được thể hiện ở dạng kit, trong đó nguồn hydro peroxit, phần (a), được bảo quản riêng biệt với hỗn hợp của nguồn axetyl và thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic, các phần (b) và (c). Khi sử dụng, nguồn hydro peroxit được trộn với hỗn hợp nguồn axetyl /thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic, trong dung dịch.

Khi sử dụng, chế phẩm theo đơn '633 được hòa tan vào trong dung môi và để sản xuất dung dịch khử trùng phổ rộng mà có hiệu quả chống lại bào tử, nấm, vi khuẩn, virut, nấm men và nấm mốc. Dung dịch khử trùng có hiệu quả đặc biệt chống lại bào tử tạo thành vi khuẩn như *Clostridium difficile*. Chất khử trùng có thể được sử dụng để khử trùng các bề mặt, bao gồm các bề mặt cứng, và các dụng cụ.

Bất ngờ phát hiện ra rằng chế phẩm khử trùng được mô tả theo đơn '633 có thể được sử dụng như chất loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô.

Khi bề mặt phủ trong màng sinh học có bề mặt khô được cho tiếp xúc với dung dịch chứa axit peraxetic được tạo ra bằng cách hòa tan chế phẩm được nêu trong đơn '633, đã quan sát thấy rằng có sự giảm đáng kể vi khuẩn có thể sống, cùng với việc loại bỏ gần như các protein thường kết hợp với màng sinh học có bề mặt khô.

Việc quan sát được này là điều đáng lưu ý hơn cả khi các dung dịch chất tẩy rửa, mà đã được chứng minh việc loại bỏ màng sinh học có bề mặt ướt thông thường, có hiệu quả rất ít trong việc loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô (xem ví dụ 10). Trong thử nghiệm sàng lọc này, cũng quan sát thấy rằng các chất khử trùng trên cơ sở clo cũng có hiệu quả trong việc loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô trong các điều kiện làm sạch. Tuy nhiên, việc thử nghiệm thêm chỉ ra rằng sự có mặt của chất bản có protein hữu cơ nhanh làm vô hiệu clo, và do đó dẫn đến ít hoặc không có vi khuẩn bị tiêu diệt (xem Fig.6). Cũng được quan sát thấy rằng các chất khử trùng trên cơ sở clo đã loại bỏ protein ít hơn từ các bề mặt được phủ màng sinh học có bề mặt khô so với dung dịch theo đơn '633 (xem Fig.7). Các quan sát này là phù hợp với việc quan sát màng sinh học có bề mặt khô được tìm thấy trên các mẫu được loại bỏ khỏi đơn vị chăm sóc đặc biệt của bệnh viện đã ngừng hoạt động, thậm chí là sau khi làm sạch đầu cuối bằng chất khử trùng trên cơ sở clo (xem tài liệu tham khảo 1).

Chế phẩm khử trùng được mô tả trong tài liệu '633 là chế phẩm dạng bột bao gồm chất cho hydro peroxit, và chất cho axetyl, cùng với các tác nhân axit hóa, các tác nhân làm ướt, cùng với các thành phần tùy ý như các chất cation hóa và các chất tạo hương bổ sung.

Chế phẩm theo đơn '633 cũng chứa thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic (peracetic acid - PAA) để làm chất chỉ thị khi nồng độ hoạt tính diệt sinh vật của axit peraxetic được tạo ra. Để tránh nhầm lẫn, nồng độ hoạt tính diệt sinh vật của axit peraxetic được xác định là nồng độ của axit peraxetic trên 1300ppm.

Trong khi các phần bộc lộ trong đơn '633 hướng tới các chế phẩm tạo ra axit peraxetic chứa hệ thống chỉ thị bao gồm thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng việc có mặt hoặc không có mặt của chất chỉ thị này sẽ không ảnh hưởng đến hiệu suất diệt sinh vật của các chế phẩm tạo ra axit peraxetic.

Sáng chế đề cập đến quy trình loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô ra khỏi bề mặt.

Theo sáng chế, đề cập quy trình loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô ra khỏi bề mặt, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) hòa tan chế phẩm dạng bột vào trong nước trong đó chế phẩm dạng bột bao gồm:

- a) nguồn hydro peroxit
- b) chất cho axetyl
- c) tác nhân axit hóa, và
- d) tác nhân làm ướt

(ii) cho phép dung dịch này tạo ra nồng độ hiệu quả để diệt sinh vật của axit peraxetic;

(iii) cho bề mặt bị ô nhiễm có màng sinh học có bề mặt khô tiếp xúc với dung dịch chứa axit peraxetic trong một khoảng thời gian; và

(iv) loại bỏ dung dịch.

Trong phương án được ưu tiên khác, chế phẩm dạng bột có thể là ở dạng viên nén. Trong trường hợp này, chế phẩm cũng có thể chứa các chất gây rã. Ví dụ về chế phẩm được tạo viên nén được đưa ra trong ví dụ 16 của đơn '633.

Thông thường, chế phẩm theo đơn '633, như được sử dụng trong quy trình của sáng chế, chứa các thành phần sau đây:

#### Nguồn Hydro Peroxit

Các ví dụ về nguồn hydro peroxit mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo đơn '633 và trong sáng chế, nhưng không giới hạn ở, natri perborat, natri percacbonat, urea peroxit, povidon-hydro peroxit, canxi peroxit, và các tổ hợp của chúng.

Dung dịch loãng chứa hydro peroxit trong nước cũng có thể được sử dụng làm nguồn hydro peroxit, nếu sản phẩm hai phần được dự định. Trong trường hợp này, tốt hơn là dung dịch hydro peroxit chứa ít hơn 8% hydro peroxit, do đó, phân loại phủ định như nhóm Hàng hóa nguy hiểm 5.1. Dung dịch loãng chứa hydro peroxit cũng có thể chứa các thành phần ổn định bổ sung, như axit 1-hydroxyetylidene-1,1,-, (được bán trên thị trường dưới tên Dequest 2010), hoặc các chất phụ gia chelat hóa mạnh khác, như

axit etylendiamin tetraaxetic (ethylenediamine tetraacetic acid - EDTA). Dung dịch peroxit có thể tùy ý chứa các tác nhân đệm pH.

Các chất cho axetyl

Các ví dụ về các chất cho axetyl mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo đơn '633 và trong sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tetraaxetyletylendiamin (tetraacetyletylenediamine - TAED), N-axetyl caprolactam, N-axetyl succinimit, N-axetyl phtalimit, N-axetyl maleimit, penta-axetyl glucozơ, octaaxetyl sucrozơ, axit axetylsalicylic, tetraaxetyl glycouril, và các tổ hợp của chúng. Tốt hơn là chất cho axetyl là chất rắn. Chất cho axetyl được hiểu là vật liệu không được phủ trừ khi có quy định khác đi.

Chất cho axetyl được ưu tiên là TAED, tốt hơn nữa là, loại TAED được micron hóa, như B675, có thể thu được từ Warwick Chemicals (UK).

Các tác nhân axit hóa

Các ví dụ về các tác nhân axit hóa mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo đơn '633 và trong sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit xitric, mononatri xitrat, dinatri xitrat, axit tartaric, mononatri tartrat, axit sulfamic, natri hydro sulphat, mononatri phosphat, axit oxalic, axit benzoic, axit benzensulfonic, axit toluensulfonic và các tổ hợp của chúng. Tốt hơn là tác nhân axit hóa là chất rắn.

Thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic

Cụm từ 'thuốc nhuộm thứ nhất' là thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic. Các ví dụ về các thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo đơn '633 và trong sáng chế bao gồm Amaranth (C.I. 16185), Ponceau 4R (C.I. 16255), FD&C Yellow 6 (C.I. 15985), thuốc nhuộm chứa 1-arylazo-2-hydroxynaphtyl bất kỳ khác, và các tổ hợp của chúng.

Tốt hơn là các thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic bị mất màu tương đối nhanh với sự có mặt của axit peraxetic, nhưng không mất màu với sự có mặt của hydro peroxit. Cụm từ "tương đối nhanh" có nghĩa là màu của thuốc nhuộm bị mất màu trong vòng khoảng 10 phút. Khi màu được tạo ra bởi dung dịch thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic về cơ bản là được thải ra, axit peraxetic đạt đến nồng độ hiệu quả

để diệt sinh vật trong dung dịch. Cụm từ “về cơ bản là được thải ra” có nghĩa là màu trong dung dịch, được tạo ra bằng thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic, là được thải ra toàn bộ, hoặc gần như toàn bộ.

Trong phương án được ưu tiên của chế phẩm theo đơn ‘633, như được sử dụng theo sáng chế, thuốc nhuộm thứ nhất là Amaranth Red (C.I. 16185) và thuốc nhuộm thứ hai là C.I. Acid Blue 182. Ngạc nhiên là, đã phát hiện ra rằng trong phương án này, Amaranth Red bị mất màu nhanh chỉ bằng axit peraxetic, trong khi nó có khả năng chống mất màu bằng hydro peroxit một cách tương đối. Đây là phát hiện đặc biệt bất ngờ, vì Amaranth Red được sử dụng là chất chỉ thị trong chất tẩy rửa dạng bột đã được bán sẵn trên thị trường với tên là Virkon, sản phẩm được sản xuất và bán bởi Antec Ltd. Trong trường hợp Virkon, miễn là sự nhuộm màu đỏ do sự có mặt của Amaranth, dung dịch Virkon là có hoạt tính diệt sinh vật. Theo tài liệu giới thiệu về Virkon, “các dung dịch VIRKON 1% là ổn định trong 7 ngày nhưng nên loại bỏ khi màu hồng nhạt dần”.

Virkon được bao gồm hỗn hợp của kali monoperoxysulfat, natri clorua, axit sulfamic, với các thành phần khác như các chất hoạt động bề mặt, chất tạo hương, cũng như Amaranth. Theo tài liệu cơ bản được xuất bản bởi Antec, khi hòa tan vào nước, hỗn hợp pha trộn bột Virkon trải qua phản ứng Haber-Willstatter, tạo ra hỗn hợp của các chất diệt sinh vật bao gồm kali monoperoxysulfat, clo, axit N-closulfamic, axit hypoclous. Tài liệu này nêu rõ rằng Virkon chứa “*thuốc nhuộm màu hồng (màu rau dền, EEC No. 123). Bên cạnh việc mang tính thẩm mỹ, thuốc nhuộm này còn phục vụ cho mục đích mang tính thực tế - nó biểu thị liệu dung dịch VIRKON có hoạt tính hay không. Ở dạng oxy hóa, thuốc nhuộm này màu hồng nhưng khi dung dịch bắt đầu mất hoạt tính của nó thì thuốc nhuộm trở thành dạng khử không màu. Các dung dịch VIRKON luôn phải được thay thế nếu màu của nó bắt đầu mờ dần*”. Nói cách khác, hiện tượng màu hồng đỏ do sự có mặt của Amaranth trong khi các loài diệt sinh vật oxy hóa hoạt động cũng có mặt, với màu sắc chỉ nhạt dần khi các chất diệt sinh vật oxy hóa bị cạn dần.

Ngược lại, trong đơn ‘633, sự phai màu của dung dịch khử trùng biểu thị rằng nồng độ diệt sinh vật hiệu quả của axit peraxetic đã đạt được.

Các thuốc nhuộm ổn định đáng kể sự mất màu

Thuốc nhuộm thứ hai mà có thể tùy ý được bao gồm trong chế phẩm theo đơn '633, như được sử dụng theo sáng chế, là thuốc nhuộm ổn định đáng kể sự mất màu đáng kể. Được công nhận rằng axit peraxetic sẽ có khả năng gây mất màu hầu hết các thuốc nhuộm, và do đó việc tham khảo đến thuốc nhuộm “ổn định đáng kể sự mất màu” có nghĩa là thuốc nhuộm có khả năng truyền màu cho dung dịch axit peraxetic/hydro peroxit trong ít nhất 2 giờ, tốt hơn là khoảng từ 4 đến 6 giờ, ở nhiệt độ trong phòng.

Các ví dụ về các thuốc nhuộm ổn định đáng kể sự mất màu mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo đơn '633 và trong sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Acid Blue 182, Acid Blue 80, Direct Blue 86, Acid Green 25 (C.I. 61570) và các tổ hợp của chúng.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên của chế phẩm theo đơn '633, như được sử dụng theo sáng chế, thuốc nhuộm thứ nhất là Amaranth Red (C.I. 16185) và thuốc nhuộm thứ hai là C.I. Acid Blue 182. Trong phương án này, màu của dung dịch khi hòa tan chế phẩm là màu đỏ, được tạo ra bởi Amaranth. Màu đỏ xả ra ở khoảng từ 5-7 phút, mà là thời điểm axit peraxetic ở nồng độ hiệu quả để diệt sinh vật, để lại màu xanh lam, được tạo ra bởi Acid Blue 182. Màu xanh lam có tính thẩm mỹ, và có lợi ích được bổ sung để làm cho dung dịch rõ hơn khi khử trùng bề mặt hoặc đối tượng.

Tác nhân làm ướt

Khi chế phẩm theo đơn '633, như được sử dụng theo sáng chế, ở dạng chế phẩm dạng bột, tác nhân làm ướt có thể được bao gồm trong chế phẩm để tạo điều kiện thuận lợi cho sự phân tán của nguồn axetyl vào dung dịch pha loãng ban đầu, do đó, hỗ trợ trong việc hòa tan của nó. Tốt hơn là tác nhân làm ướt bao gồm chất hoạt động bề mặt rắn có khả năng làm giảm sức căng bề mặt của dung môi, tốt hơn là nước, do đó, cho phép nguồn axetyl được làm ướt và phân tán. Tốt hơn là, nguồn axetyl là TAED và, khi không có mặt của tác nhân làm ướt, loại TAED được micron hóa cao như B675 sẽ có xu hướng nổi trên bề mặt của dung môi, và do đó, được hòa tan chậm, dẫn đến việc sản xuất axit peraxetic. Các ví dụ về các tác nhân làm ướt thích hợp mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, natri dodecexyl sulphat,



natri alkylbenzensulphonat, Pluronic PE6800, Hyamin 1620 v.v. và các tổ hợp của chúng.

#### Các tác nhân đệm pH

Một cách tùy ý, chất đệm pH có thể được bao gồm trong chế phẩm theo đơn '633, như được sử dụng theo sáng chế, để làm giảm sự thay đổi độ pH theo thời gian. Do sự tạo thành axit peraxetic trong nguồn axetyl, tốt hơn là TAED, đòi hỏi độ pH phải bằng, hoặc cao hơn, độ pKa của axit peraxetic (8,2), độ pH của dung dịch nên được tạo đệm giữa 8,00 và 9,00, tốt hơn là giữa 8,00 và 8,40. Các đệm pH thích hợp mà có thể được bao gồm trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phosphat, borat, bicacbonat, TAPS (axit 3-{[tris(hydroxymetyl)metyl]amino}propansulfonic), Bixin (N,N-bis(2-hydroxyetyl)glyxin), Tris (tris(hydroxymetyl)metylamin), Trixin (N-tris(hydroxymetyl)metyl glyxin) và các tổ hợp của chúng.

#### Các tác nhân càng hóa

Một cách tùy ý, chế phẩm theo đơn '633, như được sử dụng theo sáng chế, có thể bao gồm các thành phần có khả năng tạo phức các ion kim loại như canxi và magie, do đó, phủ nhận tác dụng bất lợi bất kỳ ra khỏi việc sử dụng nước cứng, cũng như các ion kim loại như sắt, mangan, đồng v.v... mà có khả năng xúc tác cho sự phân hủy các peroxit, và mà cũng có thể có mặt trong nước máy. Các ví dụ về các tác nhân chelat hóa và tác nhân càng hóa mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, natri xitrat, axit xitric, axit phosphoric, natri tripolyphosphat, EDTA, NTA, v.v... và các tổ hợp của chúng.

#### Các chất thay đổi dòng chảy

Chất thay đổi dòng chảy có thể được bổ sung vào để cải thiện các đặc tính dòng chảy của chế phẩm theo đơn '633, như sử dụng trong sáng chế, khi ở trong chế phẩm dạng bột. Điều này đặc biệt hữu dụng nếu dạng bột dự định cung cấp trong dạng đóng gói liều đơn (ví dụ, gói riêng lẻ hoặc túi hòa tan trong nước), vì dòng chảy bột tốt sẽ cho phép định liều chính xác của bột được trộn vào trong các dạng đóng gói riêng lẻ. Các ví dụ về các chất thay đổi dòng chảy dạng bột mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo đơn '633 và trong sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, silica khói, silica kết

tủa, polyetylen glycol 6000 được micron hóa, lactozơ được micron hóa, đá tan, magie stearat v.v... và các tổ hợp của chúng.

Trong ví dụ được ưu tiên, chất thay đổi dòng chảy là silica khói ưa nước, ví dụ Aerosil 200 (Evonik Industries).

Cũng có thể đạt được sự cải thiện dòng chảy tốt bằng cách sử dụng silica kết tủa như Tixosil 38, mặc dù các loại silica kết tủa ít được ưa thích hơn vì chúng tạo ra khói mù mạnh trong dung dịch khử trùng cuối cùng, nhờ kích thước hạt lớn hơn của dạng kết tủa trên dạng bốc khói.

Các chất tạo hương

Một cách tùy ý, chế phẩm theo đơn '633, như được sử dụng trong sáng chế, cũng có thể chứa các chất tạo hương để che giấu mùi của axit peraxetic. Tốt hơn là chất tạo hương được sử dụng là ổn định với hydro peroxit và axit peraxetic.

Trong phương án được ưu tiên của chế phẩm theo đơn '633 và như được sử dụng trong quy trình theo sáng chế, chất cho axetyl là TAED, nguồn hydro peroxit là natri percacbonat, thuốc nhuộm thứ nhất là Amaranth Red, và chế phẩm là ở dạng chế phẩm dạng bột, mà được hòa tan vào nước. Khi trộn hỗn hợp ban đầu của chế phẩm dạng bột với nước máy, ở nhiệt độ môi trường, dung dịch vẫn đục màu đỏ đậm được tạo thành bằng cách hòa tan nhanh thuốc nhuộm Amaranth Red và huyền phù của TAED không hòa tan. Trong khoảng thời gian từ 5-10 phút, TAED hòa tan vào nước, và màu đỏ được xả ra khi axit peraxetic được tạo ra bởi phản ứng của TAED với hydro peroxit được tạo ra bằng cách hòa tan natri percacbonat. Sau khoảng 7-10 phút, dung dịch sẽ trở nên trong, và tất cả màu đỏ được xả ra.

Trong phương án được ưu tiên khác, thuốc nhuộm thứ hai mà ổn định đáng kể sự mất màu cũng có thể được bao gồm trong chế phẩm theo đơn '633, như được sử dụng trong quy trình theo sáng chế. Tốt hơn là thuốc nhuộm ổn định đáng kể sự mất màu mất màu trong vòng 4-6 giờ, cùng với Amaranth. Thuốc nhuộm thứ hai được ưu tiên, mà mất màu chậm, là C.I. Acid Blue 182.

**Ví dụ thực hiện sáng chế**

Ví dụ 1

Hỗn hợp sơ chế thuốc nhuộm: Hỗn hợp chứa 78,00g TAED B675 (Warwick Chemicals), 17,00g thuốc nhuộm Amaranth và 5,00g thuốc nhuộm C.I. Acid Blue 182 được trộn và nghiền với nhau bằng cách sử dụng chày và vữa để tạo ra bột màu nâu đồng nhất. Sau khi trộn, hỗn hợp sơ chế thuốc nhuộm được bảo quản trong hộp kín trước khi sử dụng.

54,55g TAED B675, 1,00g hỗn hợp sơ chế TAED, 1,32g natri dodexyl sulphat bột và 0,60g Aerosil 200 (silica khói ưa nước có sẵn của Evonik) được trộn với nhau, và đi qua sàng 125 micron để loại bỏ và phá vỡ vật liệu kết tụ bất kỳ. Sau khi sàng, hỗn hợp được tiếp tục trộn để tạo ra bột đồng nhất.

Bổ sung 0,49g tetranatri EDTA, 28,00g axit xitric khan, 99,32g natri percacbonat, 15,50g natri tripolyphosphat và 1,80g mononatri phosphat khan vào vật liệu đã được sàng. Sau đó bột được trộn kỹ để tạo ra bột chảy tự do, đồng nhất. Toàn bộ thành phần chế phẩm của hỗn hợp pha trộn bột được thể hiện trong Bảng 2, theo chức năng của mỗi thành phần.

Đã phát hiện ra rằng chỉ cần bổ sung 1% trọng lượng TAED của Aerosil 200 vào hỗn hợp pha trộn bột. Điều này tương đương với 0,3% trọng lượng của toàn bộ hỗn hợp. Ở mức độ này, Aerosil sẽ chỉ tạo ra một ít vẩn đục nhẹ trong dung dịch khử trùng cuối cùng.

Bảng 2

Thành phần	% trọng lượng/trọng lượng	Chức năng
Natri percacbonat	49,03	Nguồn hydro peroxit
TAED B675	27,31	Chất cho axetyl
Axit xitric	13,82	Chất axit hóa
Natri tripolyphosphat	7,65	Chất càn hóa và chất thay đổi độ pH
Mononatri phosphat	0,89	Chất thay đổi độ pH
Natri dodexyl sulfat	0,65	Chất hoạt động bề mặt và tác nhân làm ướt

Aerosil 200	0,30	Chất thay đổi dòng chảy
Tetranatri EDTA	0,24	Tác nhân chelat hóa
Amaranth	0,084	Chất màu có thể mất màu do PAA
Acid Blue 182	0,025	Chất màu ổn định với PAA

Dung dịch chứa chất khử trùng được điều chế bằng cách hòa tan 7,50g hỗn hợp pha trộn bột vào trong 500ml nước cứng nhân tạo chứa 340ppm CaCO<sub>3</sub> (được điều chế như mô tả trong số SOP: MB-22-00: Standard Operating Procedure for Disinfectant Sample Preparation, được công bố bởi US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs, và sau đây được viện dẫn đến như nước cứng AOAC). Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Màu đỏ do Amaranth được quan sát là được xả ra trong khoảng 5-7 phút, để lại dung dịch màu xanh lam.

Phần phân ước 10ml được dùng trong khoảng thời gian đều đặn sau 10 phút, và độ pH được ghi nhận. Các phần phân ước được chuẩn độ để xác định nồng độ hydro peroxit và axit peraxetic.

Như có thể thấy trong Fig.1, nồng độ của axit peraxetic tăng nhanh, đạt đến giá trị tối đa trong khoảng 20 phút. Sau thời điểm này, sự phân rã chậm của nồng độ axit peraxetic trong vài giờ có thể quan sát thấy.

Điều thú vị là, nếu nồng độ của bột hòa tan vào nước được tăng lên, trong khi nồng độ axit peraxetic tối đa tăng là được mong đợi, cũng có thể quan sát thấy rằng tốc độ phân hủy của nó cũng tăng lên (xem Fig.1). Cũng được quan sát thấy rằng nồng độ tối đa của axit peraxetic từ mỗi nồng độ bột đã đạt được tại mốc 20 phút.

#### Ví dụ 2

4 dung dịch khử trùng trong nước cứng AOAC được điều chế bằng cách sử dụng các nồng độ khác nhau của hỗn hợp pha trộn bột từ ví dụ 1, và khuấy trong vòng 20 phút. Các phần phân ước được thực hiện và chuẩn độ đối với nồng độ hydro peroxit và axit peraxetic, trong khi các phần phân ước khác được tiêm truyền với các huyền phù của dạng bào tử và dạng thực vật của *Clostridium sporogenes* (ATCC 3584), với sự có mặt của huyết thanh ngựa 5%. Các sinh vật được tiếp xúc trong 3, 5 và 10 phút. Mỗi

mẫu được thử nghiệm ba lần, và mỗi mẫu cho giảm hơn 6 log trong các sinh vật có thể sống ở mỗi thời điểm.

Bảng 3 thể hiện nồng độ của các dung dịch được sử dụng, các nồng độ của cả hydro peroxit và axit peraxetic, cùng với việc giảm log được ghi nhận.

Bảng 3

Các tế bào thực vật					
	Nồng độ (ppm)		Thời gian tiếp xúc		
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PAA	3 phút	5 phút	10 phút
Mẫu 1 (20g/L)	1382	2964	>6 log	>6 log	>6 log
Mẫu 2 (16g/L)	1330	2550	>6 log	>6 log	>6 log
Mẫu 3 (12g/L)	980	1980	>6 log	>6 log	>6 log
Mẫu 4 (8g/L)	569	1349	>6 log	>6 log	>6 log
Bào tử vi khuẩn					
	Nồng độ (ppm)		Thời gian tiếp xúc		
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PAA	3 phút	5 phút	10 phút
Mẫu 1 (20g/L)	1382	2964	>6 log	>6 log	>6 log
Mẫu 2 (16g/L)	1330	2550	>6 log	>6 log	>6 log
Mẫu 3 (12g/L)	980	1980	>6 log	>6 log	>6 log
Mẫu 4 (8g/L)	569	1349	>6 log	>6 log	>6 log

### Ví dụ 3

7,50g hỗn hợp pha trộn bột từ ví dụ 1 được lấy ra, và bổ sung vào 500ml nước máy, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Thời gian màu đỏ được xả ra được lưu lại, và phần phân ước 5ml được lấy ra và chuẩn độ. Phần phân ước 5ml khác được loại bỏ và chuẩn độ sau 20 phút.

Như có thể thấy trong bảng 4, màu do Amaranth bị loại bỏ giữa khoảng 7 và 8 phút, với hàm lượng axit peraxetic tại thời điểm này là giữa 0,14 và 0,16%.

Bảng 4

Ví dụ	Thời gian để mất màu thuốc nhuộm Amaranth	Thời gian mất màu thuốc nhuộm		20 phút	
		HP	PAA	HP	PAA
1	8 phút	0,13%	0,14%	0,11%	0,21%
2	7 phút 50 giây	0,141	0,155	0,124	0,22%
3	7 phút	0,13%	0,16%	0,11%	0,23%

Như có thể thấy trong bảng 3, các dung dịch chứa ít nhất là 1,35% (1349ppm) axit peraxetic thể hiện hoạt tính diệt bào tử, do đó, có thể giả định một cách an toàn rằng một khi màu đỏ do Amaranth được xả ra, hàm lượng axit peraxetic sẽ là nồng độ hoạt tính diệt bào tử nêu trên.

#### Ví dụ 4

Các trọng lượng khác nhau của hỗn hợp pha trộn bột từ ví dụ 1 được lấy ra, và bổ sung vào 500ml nước máy, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Thời gian để màu đỏ được xả ra đối với mỗi dung dịch được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5

Trọng lượng bột (g)	Trọng lượng của nước cứng AOAC (g)	Thời gian để xả màu đỏ ra (phút)
6,00	500	7,5
7,02	500,02	7
8,02	500,01	6,5
9,00	500	6
10,03	499,99	5,25

#### Ví dụ 5

Lượng hỗn hợp pha trộn bột từ ví dụ 1 được lấy ra, và bọc trong các gói riêng biệt được làm từ màng hòa tan nước PVA kín nhiệt. Các gói được điều chế bằng cách làm kín nhiệt hai tấm màng PVA dày 50 micron (chiều rộng 4,65cm, chiều dài 8cm),

cùng nhau tạo thành vỏ mỏng, phân tán khoảng 8,2g bột vào mỗi vỏ mỏng và sau đó làm kín phía mở để thu được gói được làm đầy hoàn thiện. Gói đơn sau đó được lấy ra và bổ sung vào lượng được khuấy của nước máy (500ml). Gói được quan sát để tạo nếp nhăn trong nước, và sau đó làm vỡ ra, phân giải bột được chứa vào trong nước để thu được dung dịch màu đỏ đậm. Sau khoảng 8 phút, màu đỏ được xả ra, để lại dung dịch màu xanh lam nhạt với mùi nhẹ của axit peraxetic. Các phần phân ước của dung dịch thu được được lấy ra ở thời điểm 10 và 20 phút và được chuẩn độ đối với hàm lượng hydro peroxit và axit peraxetic.

Việc đánh giá hoạt động sản xuất ban đầu để sản xuất các gói được thể hiện trong bảng 6, và bảng 7 thể hiện kết quả đánh giá sự hình thành axit peraxetic từ một vài gói mẫu hòa tan vào trong 500ml nước máy.

Bảng 6

Trọng lượng gói trung bình	8,29
Độ lệch chuẩn	0,514
% RSD	6,2
Trọng lượng tối đa	9,59
Trọng lượng tối thiểu	7,48
Kích cỡ mẫu	70

Bảng 7

	Trọng lượng gói (g)	10 phút			20 phút		
		pH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> %	PAA %	pH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> %	PAA %
1	8,3	8,39	0,146	0,145	8,26	0,121	0,223
2	8,48	8,12	0,138	0,171	8,07	0,127	0,215
3	8,74	8,54	0,163	0,175	8,23	0,127	0,229
4	7,78	8,23	0,125	0,175	8,16	0,107	0,208
5	8,16	8,2	0,14	0,109	8,1	0,124	0,2

6	9,1	8,33	0,161	0,214	8,23	0,148	0,198
7	7,67	8,21	0,133	0,192	8,12	0,116	0,16
8	8,11	8,12	0,132	0,078	7,99	0,118	0,205
Trung bình	8,29	8,27	0,14	0,16	8,15	0,12	0,20

#### Ví dụ 6

Lượng hỗn hợp pha trộn bột theo ví dụ 1 được lấy ra, và bọc trong các gói riêng biệt được làm từ PET-giấy-nhôm-PP laminat kín nhiệt. Các gói được điều chế bằng cách làm kín nhiệt tấm laminat rộng 6cm để tạo thành ống hình trụ, và sau đó làm kín từ bên này sang bên kia ống để tạo thành hình que, mà sau đó được chia liều với hỗn hợp pha trộn bột qua dụng cụ đo dạng khoan. Đầu mở ra của ống được làm đầy sau đó được làm kín để thu được bao gói dạng que.

Trọng lượng tổng trung bình của mỗi bao gói dạng que được tìm thấy là 8,88g, với độ lệch chuẩn 0,27 (xem Bảng 8). Vật liệu bao gói có trọng lượng là 0,88g, do đó thu được trọng lượng tịnh trung bình của bột là 8,00g.

Bảng 8

Trọng lượng gói trung bình	8,88
Độ lệch chuẩn	0,27
% RSD	3,06
Trọng lượng tối đa	9,66
Trọng lượng tối thiểu	8,13
Kích cỡ mẫu	500

Để chứng minh tính đồng nhất của hỗn hợp, các gói mẫu được lấy ra từ các phần khác nhau của dây chuyền sản xuất và bổ sung vào 500ml nước máy. Hàm lượng hydro peroxit và axit peraxetic ở thời điểm 10, 20 và 30 phút đối với mỗi dung dịch sau đó được xác định.



Như có thể thấy trong Fig.3, hàm lượng hydro peroxit và axit peraxetic ở thời điểm 10 phút là rất khác nhau, và được phát hiện là phụ thuộc vào tốc độ khuấy v.v. Trong một vài trường hợp, các dung dịch được quan sát vẫn có màu đỏ ở thời điểm đánh dấu là 10 phút (được biểu thị bằng chữ R trong Fig.3), và tất cả các dung dịch này đều liên quan đến hàm lượng axit peraxetic thấp. Cần lưu ý rằng sau 20 phút, sự thay đổi về các nồng độ của hydro peroxit và axit peraxetic là giảm đáng kể.

Ví dụ này chứng minh sự tiện dụng của hệ thống thuốc nhuộm làm chất chỉ thị đối với sự có mặt của nồng độ diệt sinh vật hiệu quả của axit peraxetic.

Điều này được minh họa bằng cách bổ sung 7,50g hỗn hợp pha trộn bột theo bảng 9 vào 500ml nước cứng AOAC và thử nghiệm hoạt tính diệt sinh vật của nó chống lại các vi sinh vật gắn kết bề mặt trong thử nghiệm chất mang bề mặt cứng AOAC 991.47, 48 và 49, được tiến hành với sự có mặt của huyết thanh ngựa 5% kháng lại *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella choleraesuis*. Phương pháp luận của thử nghiệm được biến đổi để sử dụng thời gian tiếp xúc 5 phút thay vì thời gian tiếp xúc 10 phút theo quy định trước đây.

Bảng 9

Sinh vật thử nghiệm	Số chất mang thử nghiệm	Số chất mang âm tính	Số chất mang dương tính	Kết quả
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	60	57	3	Thông qua
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	60	58	2	Thông qua
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	60	60	0	Thông qua

Chế phẩm dạng bột cũng có thể được thay đổi để sản xuất các viên nén có khả năng tạo ra axit peraxetic khi hòa tan vào trong nước. Tốt hơn là, cách để tạo điều kiện thuận lợi cho sự phân rã của viên nén được kết hợp vào trong chế phẩm viên nén. Điều

này cũng hỗ trợ cho sự hòa tan chậm hơn của viên nén do quá trình nén đòi hỏi để tạo ra viên nén.

Các chất gây ra gốc poly-NVP như Disintex 200 (ISP Technologies Inc) được tìm thấy được cho là không thực tế khi sử dụng, như polyme liên kết ngang đã hấp thụ mạnh thuốc nhuộm, và do đó thu được vật liệu hạt có màu đậm trong dung dịch cuối. Các cách ưu tiên để phân rã là bao gồm việc bổ sung natri cacbonat vào dạng chế phẩm, cùng với việc bổ sung tác nhân axit hóa. Trong phương án được ưu tiên hơn, axit sulfamic được sử dụng làm tác nhân axit hóa vì tác nhân này thiếu độ pKa trên 2. Nếu axit xitric được dùng làm tác nhân axit hóa trong chế phẩm viên nén, sau đó tạo thành khí, do đó sự phân rã của viên nén được làm chậm lại khi dung dịch đạt độ pH khoảng 6 do độ pKa thứ ba của axit xitric.

#### Ví dụ 7

Hỗn hợp pha trộn bột theo bảng 10 được tạo ra bằng cách trộn các thành phần với nhau để tạo ra hỗn hợp đồng nhất. Để đạt được chế phẩm viên nén thích hợp, hỗn hợp không được rây, và lưu ý không làm giảm kích cỡ hạt của soda khan (soda ash), natri percarbonat và axit sulfamic.

Bảng 10

TAED	13,54
natri percarbonat	37,15
axit sulfamic	30,82
Soda khan đặc	18,06
Natri dodexyl sulfat	0,23
Tetranatri EDTA	0,15
Amaranth	0,038
CI Acid Blue 182	0,011

Sau khi pha trộn, vật liệu được tạo viên nén bằng cách sử dụng máy ép viên nén dập đơn, được trang bị bộ khuôn 20mm để cung cấp các viên nén với trọng lượng trung

bình là 3,72g. Độ dày trung bình của các viên nén là 9,1mm, với tỉ lệ độ dày và trọng lượng là 0,41.

Hai viên nén, với trọng lượng kết hợp là 8,34g sau đó được hòa tan vào 200ml nước máy. Sau khi khuấy trong 25 phút ở nhiệt độ trong phòng, ba phần phân ước 10ml được loại bỏ và chuẩn độ. Các nồng độ trung bình của hydro peroxit và axit peraxetic được tìm thấy lần lượt là 0,293% và 0,258%.

Viên nén bổ sung được lấy ra và hòa tan vào nước cứng AOAC, và sau đó thử nghiệm hoạt tính kháng vi trùng chống lại *Clostridium difficile* với sự có mặt của huyết thanh ngựa 5% ở 20°C, sử dụng phương pháp của BS EN 1276 (1997). Kết quả được quan sát các mức giảm log được thể hiện trong Bảng 11.

Bảng 11

Sinh vật thử nghiệm: <i>Clostridium difficile</i> ATCC70992	Thời gian tiếp xúc (nhiệt độ = 20°C)		
	1	5	10
Mức giảm log (mức độ chất để tiêm ban đầu $4,8 \times 10^6$ )	2,77	>5,86	>5,86

Ví dụ 8: Sản xuất các mẫu màng sinh học có bề mặt khô dạng mô hình

Màng sinh học có bề mặt khô được tạo ra trên các bề mặt của các mẫu thí nghiệm theo phương pháp được mô tả bởi Almatroudi et al. trong tài liệu tham khảo 4.

Màng sinh học *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 được phát triển trên 24 mẫu thí nghiệm Pyrex vô trùng có thể loại bỏ được trong bình phản ứng màng sinh học CDC đã được làm sạch, cọ và tiệt trùng bằng hơi (121°C trong 20 phút) (BioSurface Technologies Corp, Bozeman, USA).

Màng sinh học bán khử nước được phát triển trong hơn 12 ngày với chu kỳ tăng trưởng theo đợt trong suốt thời gian mà canh trường đậu nành trypton 5% (Tryptone soya broth - TSB) được cung cấp xen kẽ với các giai đoạn khử nước được kéo dài ở

hiệt độ trong phòng (22–25°C) như mô tả trong bảng 12, với TSB được loại bỏ khỏi bình phản ứng màng sinh học ở cuối mỗi giai đoạn theo đợt.

Máy tạo màng sinh học được đặt trong phòng thí nghiệm có điều hòa không khí và không khí trong phòng được tiệt trùng bằng bộ lọc (độ ẩm tương đối trung bình 66%) được bơm trên bề mặt môi trường ở tốc độ luồng không khí là 3 l/phút sử dụng máy bơm sục không khí bể nuôi cá.

Sự phát triển màng sinh học được bắt đầu bằng cách tiêm khoảng  $10^8$  đơn vị hình thành khuẩn lạc (colony forming unit - CFU) của *S. aureus* vào đầu giai đoạn theo đợt thứ nhất. Trong suốt các giai đoạn theo đợt, tất cả các màng sinh học được phát triển trong TSB 5% ở 35°C và được đặt để cắt bằng cách quay vách ngăn ở 130 vòng/phút tạo ra dòng chảy xoáy.

Bảng 12

Giai đoạn	Các điều kiện nuôi cấy	Thời gian tích lũy
1	48 giờ giai đoạn theo đợt trong TSB 5% tiếp đó 48 giờ khử nước	96 giờ
2	6 giờ giai đoạn theo đợt trong TSB 5% tiếp đó 66 giờ khử nước	168 giờ
3	6 giờ giai đoạn theo đợt trong TSB 5% tiếp đó 42 giờ khử nước	216 giờ
4	6 giờ giai đoạn theo đợt trong TSB 5% tiếp đó 66 giờ khử nước	288 giờ

Sau sự phát triển của màng sinh học, các que giữ các mẫu thí nghiệm được phủ màng sinh học được loại bỏ khỏi nơi nuôi cấy, và được đặt trong 1 lít nước muối đệm (phosphate buffered saline - PBS) trong 5 phút. Ba mẫu thí nghiệm trên mỗi que sau đó được loại bỏ, và rửa thêm hai lần bằng cách đặt chúng vào 50ml PBS trước khi đặt vào các bình chứa Bijou tiệt trùng riêng biệt. Số lượng của CFU trên mỗi mẫu thí nghiệm được xác định bằng cách sử dụng khuấy bằng sóng âm đối với mẫu thí nghiệm được

chọn ngẫu nhiên trong bể sóng siêu âm (Soniclean, JMR, Australia) trong 5 phút và lắc mạnh trong 2 phút trong 4ml môi trường tiếp đó pha loãng 10 lần liên tiếp và đếm tằm.

Ví dụ 9: Chất khử trùng trên cơ sở peraxetic (PAA)

Gói chứa 8,5g chế phẩm dạng bột khử trùng tương tự như ví dụ 1. Bột khử trùng bao gồm hỗn hợp pha trộn của nguồn hydro peroxit (natri percacbonat) và nguồn axetyl (tetraaxetyletylendiamin (tetraacetylenethylenediamine - TAED)), cùng với các tác nhân axit hóa (axit xitric) và chất càn hóa (mononatri phosphat, natri tripolyphosphat), cùng với thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic (amaranth). Chế phẩm được sử dụng được đưa ra trong bảng 13.

Bảng 13

Thành phần	% trọng lượng/trọng lượng	Chức năng
Natri percacbonat	49,18	Chất cho hydro peroxit
TAED B675	27,39	Chất cho axetyl
Axit xitric	13,86	Chất axit hóa
Natri tripolyphosphat	7,67	Chất càn hóa
Natri phosphat	0,89	Chất thay đổi độ pH
Natri dodexyl sulfat	0,65	Tác nhân làm ướt
Tetranatri EDTA	0,24	Tác nhân chelat hóa
Amaranth	0,08	Chất màu có thể mất màu do PAA
Acid Blue 182	0,03	Chất màu ổn định với PAA

Gói được bổ sung vào 500ml nước và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10-15 phút, sau khoảng thời gian đó màu được tạo ra bởi thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic được xả ra. Tại thời điểm này dung dịch sẽ chứa giữa 1500 và 2000ppm axit peraxetic, cùng với khoảng 1000-1300ppm hydro peroxit. Dung dịch thu được được tìm thấy là có hoạt tính chống lại vi khuẩn, vi rút, bào tử và nấm trong khoảng 8 giờ sau khi hòa tan.

Ví dụ 10: Nghiên cứu sàng lọc ban đầu sử dụng TOC để đánh giá sự loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô.

Trong nghiên cứu sàng lọc ban đầu, các sản phẩm làm sạch được đánh giá về hiệu quả loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô của chúng bằng cách đánh giá tổng lượng cacbon hữu cơ (Total Organic Carbon - TOC). Các sản phẩm được đánh giá, và các nồng độ sử dụng chúng được thể hiện trong bảng 14.

Bảng 14

Chất tẩy rửa	Nhà cung cấp	Độ pha loãng
Fabrisan	Whiteley Corporation	Sử dụng không pha loãng
Matrix	Whiteley Corporation	1:25
Zip Strip	Whiteley Corporation	1:6
Phensol	Whiteley Corporation	1:50
Ví dụ 9	Whiteley Corporation	17g mỗi lít
Natri hypoclorit	Fronine Pty Ltd,	1000ppm clo có sẵn
Dung dịch natri hydroxit 1M	Chem Supply Ltd	Sử dụng không pha loãng
Đối chứng âm (nước)		Sử dụng không pha loãng

Fabrisan được bán trên thị trường dưới dạng chất chỉ điểm bảo vệ. Các thành phần của chúng bao gồm natri xitrat, natri dodexyl sulfat, và dầu trà trà. Chế phẩm này là theo ví dụ 3 của Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5610189.

Matrix được bán trên thị trường dưới dạng chất loại bỏ màng sinh học có bề mặt ướt. Chế phẩm này là theo Bằng độc quyền sáng chế Úc số AU2001275599B2, và hiệu quả của nó chống lại màng sinh học thông thường (ướt) đã được mô tả bởi Vickery et al (tài liệu tham khảo 8 và tài liệu tham khảo 9), Ren et al (tài liệu tham khảo 10) và Fang et al, (tài liệu tham khảo 11). Các tài liệu tham khảo của Ren và Fang đã được thực hiện bằng cách sử dụng Intercept, mà có chế phẩm giống với Matrix và được sản xuất dưới giấy phép từ Whiteley Corporation bởi Medivators Inc.

Zip Strip là chất tẩy rửa lớp phủ sàn để loại bỏ các chất bịt kín polyme tạo thành các sàn vinyl. Chế phẩm này bao gồm dung dịch chất hoạt động bề mặt có tính kiềm cao, butyl glycol, và etanolamin.

Phensol là chất khử trùng bao gồm hỗn hợp pha trộn của o-phenylphenol và benzyl clophenol với muối natri chứa (C10-16) axit alkylbenzensulfonic.

Mỗi dung dịch làm sạch được pha loãng theo hướng dẫn trên nhãn, như thể hiện trong bảng 14.

Màng sinh học có bề mặt khô 12 ngày được phát triển trên các mẫu thí nghiệm thủy tinh Pyrex như mô tả trong ví dụ 8. Ba mẫu thí nghiệm, được phủ trong màng sinh học có bề mặt khô sau đó được đặt vào trong 25ml của mỗi dung dịch sản phẩm thử nghiệm. Ba mẫu thí nghiệm này cũng được đặt trong 25ml nước MilliQ để có vai trò làm đối chứng âm. Dung dịch 1M của natri hydroxit được sử dụng làm đối chứng dương.

Mỗi mẫu được điều chế và thử nghiệm ba lần.

Các mẫu thí nghiệm trống, trong đó các mẫu thí nghiệm mới, sạch được cho tiếp xúc với các sản phẩm thử nghiệm, để đánh giá sự bám dính của các vật liệu hữu cơ (như các chất hoạt động bề mặt) đối với các mẫu thí nghiệm, cũng được phân tích.

Sau khi tiếp xúc với sản phẩm thử nghiệm trong thời gian cần thiết, các mẫu thí nghiệm được rửa hai lần trong 25ml nước Milli-Q. Tổng lượng cacbon hữu cơ trên mỗi mẫu thí nghiệm sau đó được đo bằng cách sử dụng máy phân tích Shimadzu-5000A TOC. TOC thu được từ màng sinh học bất kỳ còn sót lại sau khi làm sạch được tính toán bằng cách trừ TOC tìm thấy trên các mẫu thí nghiệm trống từ TOC thu được từ cacbon còn sót lại trên các mẫu thí nghiệm được phủ màng sinh học sau khi làm sạch.

Các kết quả được đưa ra trong bảng 15. Phần trăm TOC còn lại do màng sinh học được thể hiện trong ngoặc đơn được tính toán tương ứng với đối chứng âm (nước Milli-Q).

Bảng 15

	TOC ( $\mu\text{g}$ )			% Giảm
	Các mẫu thí nghiệm trống	Các mẫu thí nghiệm với màng sinh học	TOC do màng sinh học	
Fabrisan	1,13	4,77	3,64	51
Matrix	0,82	6,87	6,05	18
Zip Strip	1,16	5,33	4,17	43
Phensol	0,76	3,45	2,69	64
Ví dụ 9	0	0,47	0,47	94
Clo 100ppm	0,34	1,87	1,53	79
NaOH 1M	0,17	0,16	-0,01	100
Đối chứng âm	0,06	7,43	7,37	0

Từ nghiên cứu sàng lọc này, có thể thấy rõ ràng rằng các sản phẩm được chứng minh là có hiệu quả trong việc loại bỏ màng sinh học có bề mặt ướt, thông thường (chẳng hạn Matrix) không thể hiện độ tương đồng của hiệu quả chống lại màng sinh học có bề mặt khô. Ngoài dung dịch natri hydroxit 1M, hai dung dịch làm sạch hiệu quả nhất là ví dụ 9 và clo.

#### Ví dụ 11

Hiệu quả của việc loại bỏ màng sinh học ướt được đánh giá đối với cả ví dụ 9 và Matrix, sản phẩm được chứng minh là loại bỏ màng sinh học có bề mặt ướt.

Màng sinh học *Staphylococcus aureus* ướt được phát triển trên các viên ngói nhựa được đỡ bởi các thanh biến đổi trong bình phản ứng màng sinh học CDC trong hơn 48 giờ, sau đó phương pháp luận của Goeres et al (tài liệu tham khảo 12).

Các viên ngói nhựa sau đó được đặt vào ống Falcon chứa Matrix (ở độ pha loãng 1:25 trong nước), ví dụ 9 (17g/L trong nước) và nước Milli-Q. Các viên ngói được để ngâm trong các dung dịch làm sạch trong 10 phút. Sau 10 phút, các viên ngói được loại bỏ, rửa hai lần với nước Milli-Q, và sau đó đặt vào trong 40ml dung dịch 0,3% của



Crystal Violet, (sự biến màu đối với màng sinh học). Sau đó, các viên ngói được đặt trong dung dịch Crystal Violet trong 90 phút. Sau 90 phút, các viên ngói được loại bỏ, rửa ba lần trong vòng 1 phút trong nước Milli-Q. Sau đó, các viên ngói đã được rửa được cạo, và rửa giải với 5ml etanol 95% trong lọ nhỏ 28ml, mà sau đó được đậy lại và được đặt đứng qua đêm để rửa giải Crystal Violet đã được hấp thụ. Sau đó, độ hấp thụ của các dung dịch được đọc bằng máy đo quang phổ.

Bảng 16

Sản phẩm làm sạch	Độ hấp thụ
Ví dụ 9	0,128
Matrix	0,120
Nước Milli-Q	0,191

Như có thể thấy trong bảng 16, Matrix đã loại bỏ hầu hết màng sinh học từ viên ngói như được thể hiện bằng độ hấp thụ thấp hơn do Crystal Violet.

## Ví dụ 12

Hiệu quả của việc loại bỏ protein của ví dụ 9 và Matrix được chứng minh như sau:

Màng sinh học 12 ngày được phát triển trên các mẫu thí nghiệm PET theo phương pháp luận của ví dụ 8. Sau đó, các thanh chứa các mẫu thí nghiệm được phủ màng sinh học được loại bỏ và màng sinh học gắn kết lỏng được rửa sạch bằng nước Milli-Q như được mô tả trong ví dụ 8.

Sau đó, một thanh giữ ba mẫu thí nghiệm được phủ màng sinh học được đặt vào trong 30ml dung dịch của ví dụ 9 (17g/lit) trong 10 phút. Thanh thứ hai được đặt vào trong 30ml dung dịch Matrix (độ pha loãng 1:50), và thanh thứ ba được đặt vào trong 30ml nước Milli-Q để đóng vai trò như đối chứng dương. Thanh bổ sung, giữ 3 mẫu thí nghiệm không được phủ được tiệt trùng và sử dụng như đối chứng âm.

Sau 10 phút, mỗi thanh được đặt vào trong 30ml dung dịch natri hydroxit 1M để rửa giải sạch tất cả protein còn lại. Sau đó, các phân phân ước từ mỗi dung dịch được

lấy ra và thử nghiệm protein sử dụng xét nghiệm Axit Bixinchronic (Bixinchronic Acid - BCA), sử dụng kit thử nghiệm vi BCA (Sigma Aldrich).

Để tiến hành thử nghiệm BCA, loạt các dung dịch chuẩn của albumin huyết thanh bò được điều chế để tạo ra đường cong chuẩn. 1ml của mỗi dung dịch trong số các dung dịch BCA chuẩn, cùng với 1ml các phần phân ước được lấy từ các dung dịch làm sạch sau đó được xử lý bằng 1ml dung dịch BCA hoạt động được điều chế bằng cách trộn 50ml axit Bixinchronic (Sigma Aldrich cat. B9643) vào trong cốc mỏ, và bổ sung 1ml dung dịch đồng (II) sulfat 4% (Sigma Aldrich cat. No. C2284). Sau đó, các mẫu được ủ trong 60 phút ở 60°C, và độ hấp thụ ở 562nm được đọc bằng cách sử dụng máy đo quang phổ (xem bảng 17).

Bảng 17

Mẫu	Độ hấp thụ	Nồng độ thu được (ppm)	Phần trăm giảm protein
Nồng độ BSA (ppm)			
0	0		
0,5	0,027		
1	0,042		
2,5	0,085		
5	0,144		
10	0,32		
20	0,682		
40	1,209		
Các mẫu thử nghiệm			
Ví dụ 9	0,249	0,249	66,4
Matrix	0,362	0,362	50,5
Nước	0,721	0,721	0,0

Như có thể thấy, ví dụ 9 cho phép mức giảm cao hơn đáng kể của protein so với Matrix khi được thử nghiệm với màng sinh học có bề mặt khô 12 ngày.

#### Ví dụ 13

Hiệu quả của việc loại bỏ protein ra khỏi các mẫu thí nghiệm được phủ trong màng sinh học có bề mặt khô 12 ngày bằng cách sử dụng ví dụ 9, dung dịch natri hypoclorit 1000ppm và Chlorclean, (viên nén chứa natri diisoxyanurat (sodium diisocyanurate - SDIC) được phối chế với axit adipic và natri toluensulfonat và được bán trên thị trường như chất khử trùng với chất tẩy rửa loại dùng cho bệnh viện 2-trong-1 có tác dụng bởi các dung dịch Helix (Canning Vale South, Western Australia) được đánh giá như được mô tả trong ví dụ 11. Cả hai dung dịch được thể hiện để thu được 1000ppm, clo có sẵn. Trong thử nghiệm này, thời gian tiếp xúc 10 phút được sử dụng. Các mức giảm theo phần trăm được tính toán từ đối chứng dương (nước Milli-Q).

Như có thể thấy trong bảng 18, ví dụ 9 cho thấy độ giảm protein cao nhất. Chlorclean, viên nén SDIC được phối chế đã bán trên thị trường như sản phẩm làm sạch/khử trùng 2-trong-1 cũng được quan sát là có hiệu quả hơn so với dung dịch natri hypoclorit.

#### Bảng 18

Các chất tẩy rửa được thử nghiệm	Mức giảm protein theo phần trăm
1000ppm Clo (natri hypoclorit)	11,50
1000ppm Clo (Chlorclean viên nén)	39,26
Ví dụ 9 (17g/L)	63,65

#### Ví dụ 14

Để xác định xem liệu sự có mặt của các gốc tẩy rửa trong các sản phẩm làm sạch có chịu trách nhiệm cho sự khác nhau trong việc thực hiện giữa natri hypoclorit và viên nén Chlorclean độc quyền, phương pháp luận của ví dụ 13 được lặp đi lặp lại, chỉ với dung dịch natri hypoclorit được thay thế bằng dung dịch natri diisoxyanurat, thu được 1000ppm clo có sẵn.

#### Bảng 19

Các chất tẩy rửa được thử nghiệm	Mức giảm theo phần trăm
1000ppm Clo (SDIC)	17,65
1000ppm Clo (viên nén Chlorclean)	13,12
Ví dụ 9 (17g/L)	64,69

Lưu ý ở đây là sự giảm rõ rệt trong hiệu quả của Chlorclean với thời gian tiếp xúc ngắn hơn. Việc giảm protein quan sát với ví dụ 9 được quan sát là về cơ bản là giống nhau mặc dù có sự khác biệt về thời gian tiếp xúc.

#### Ví dụ 15

Mức giảm vi khuẩn thu được từ màng sinh học có bề mặt khô 12 ngày được đánh giá dưới các điều kiện làm sạch bằng cách sử dụng ví dụ 9, các viên nén Chlorclean và viên nén SDIC generic.

Mỗi sản phẩm thử nghiệm được hòa tan trong nước.

Các mẫu thí nghiệm được phủ trong màng sinh học có bề mặt khô 12 ngày được tạo ra theo ví dụ 8. 2ml mỗi dung dịch thử nghiệm, tiếp đó 2ml nước được bổ sung vào các giếng trong đĩa nuôi cấy mô.

Sau thời gian tiếp xúc 5 phút, các mẫu thí nghiệm được loại bỏ khỏi các dung dịch khử trùng, rửa hai lần bằng cách sử dụng 30ml nước muối đệm phosphat trong 5 giây, và sau đó đặt vào trong các ống 5ml chứa 2ml dung dịch chất trung hòa chứa Tween 80 6% với natri thiosulfat 1% với huyết thanh bò 5% với Albumin huyết thanh bò 10%.

Các ống được khuấy bằng sóng âm trong 20 phút và sau đó xoáy trong 2 phút. Sau đó, các dung dịch pha loãng 10 lần liên tiếp được thực hiện và 100ul nguyên chất, các dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  và  $10^{-4}$  được mạ trên đĩa thạch máu ngựa. Các đĩa được ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  qua đêm và sau đó được liệt kê.

Các mẫu thí nghiệm đối chứng, không tiếp xúc với chất khử trùng hoạt động tương tự để cho phép mức giảm log được tính toán.

Như có thể thấy trong bảng 20, chất khử trùng theo ví dụ 9 thu được mức giảm log lớn nhất của màng sinh học.

Bảng 20

	Mức giảm log	Đối chứng chất trung hòa
Ví dụ 9	6,556	0,0437
Chlorclean (1000ppm Cl)	4,411	0,017
SDIC (1000ppm Cl)	6,55	0,045

## Ví dụ 16

Mức giảm vi khuẩn thu được từ màng sinh học có bề mặt khô 12 ngày được đánh giá dưới các điều kiện bản bằng cách sử dụng ví dụ 9, các viên nén Chlorclean và các viên nén SDIC generic. Mỗi sản phẩm thử nghiệm được hòa tan trong nước cứng nhân tạo chứa 340ppm  $\text{CaCO}_3$  mà được bổ sung huyết thanh bê 5%.

Các mẫu thí nghiệm được phủ trong màng sinh học có bề mặt khô 12 ngày được tạo ra theo ví dụ 8. 2ml của mỗi dung dịch thử nghiệm, tiếp đó 2ml nước cứng được bổ sung vào huyết thanh bê 5% rồi được bổ sung vào các giếng trong đĩa nuôi cấy mô.

Sau thời gian tiếp xúc 5 phút, các mẫu thí nghiệm được loại bỏ khỏi các dung dịch khử trùng, rửa hai lần bằng cách sử dụng 30ml nước muối đệm phosphat trong 5 giây, và sau đó đặt vào trong ống 5ml chứa 2ml dung dịch chất trung hòa chứa Tween 80 6% với natri thiosulfat 1% với huyết thanh bê 5% với Albumin huyết thanh bê 10%.

Các ống được khuấy bằng sóng âm trong 20 phút và sau đó xoáy trong 2 phút. Sau đó, các dung dịch pha loãng 10 lần liên tiếp được thực hiện và 100ul nguyên chất, các dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  và  $10^{-4}$  được mạ trên đĩa thạch máu ngựa. Các đĩa được ủ ở  $37^\circ\text{C}$  qua đêm và sau đó được liệt kê.

Các mẫu thí nghiệm đối chứng, không tiếp xúc với chất khử trùng hoạt động tương tự để cho phép mức giảm log được tính toán.

Như có thể thấy trong bảng 21, chất khử trùng theo ví dụ 9 thu được mức giảm log về cơ bản là tương đương với mức được thấy trong các điều kiện làm sạch (xem bảng 20). Được quan sát thấy rằng cả hai viên nén clo về cơ bản là không có mức giảm

log của vi khuẩn, cho thấy sự trung hòa hoàn toàn của chất khử trùng clo bằng chất bản có protein.

Bảng 21

	Mức giảm log	Đối chứng chất trung hòa
Ví dụ 9	6,531	0,010
Chlorclean (1000ppm Cl)	0,002	0,005
SDIC (1000ppm Cl)	0,007	0,018

#### Ví dụ 17

Trong ví dụ này, chất khử trùng theo ví dụ 9 được thử nghiệm chống lại sinh vật phù du *S. Aureus*, và so sánh với hai chất khử trùng oxy hóa thu được có sẵn trên thị trường, Chlorclean và Oxivir Tb (Diversey Australia Pty Ltd, Smithfield, NSW, Australia), sẵn sàng để sử dụng dung dịch chứa hydro peroxit 0,5%, được phối chế với các thành phần độc quyền khác.

Bên cạnh các sản phẩm có sẵn trên thị trường, một số sản phẩm generic tương đương cũng được thử nghiệm. Các sản phẩm này bao gồm Proxitan (Solvay Interox, Botany, NSW, Australia), dung dịch cân bằng của hydro peroxit, axit axetic và axit peraxetic chứa 27% hydro peroxit, 7,5% axit axetic và 5% axit peraxetic, viên nén SDIC không được phối chế (Redox Chemicals, Minto, NSW Australia) mà giải phóng 1000ppm clo khi hòa tan trong 10 lít nước, và dung dịch hydro peroxit 6% (Gold Cross, Biotech Pharmaceuticals Pty Ltd, Laverton North, Victoria, Australia). Các sản phẩm generic này được chọn để cố gắng khớp các thành phần hoạt tính trong sản phẩm được phối chế, do đó đánh giá vai trò của sản phẩm được phối chế.

Khi có thể áp dụng, các sản phẩm chất khử trùng được pha loãng bằng cách sử dụng nước cứng nhân tạo được điều chế bằng hòa tan 0,304g  $\text{CaCl}_2$  khan và 0,065g  $\text{MgCl}_2$  khan vào nước cất để tạo ra một lít nước cứng.

Bảng 22 thể hiện các sản phẩm được thử nghiệm, và các nồng độ của các vật liệu hoạt động trong các mẫu thử nghiệm.

Bảng 22

Sản phẩm	Điều chế mẫu	Nồng độ của các thành phần hoạt tính
Ví dụ 9	8,5g bột hòa tan vào trong 500ml nước cứng	1100ppm hydro peroxit 2200ppm PAA
Chlorclean	1 viên nén hòa tan trong 1 lít nước cứng	1000ppm clo
Oxivir Tb	Sử dụng không pha loãng	0,5% (5000ppm) Accelerated® hydro peroxit
Các sản phẩm generic tương đương		
Proxitan	4ml Proxitan pha loãng thành 100ml với nước cứng	10080ppm hydro peroxit 2200ppm PAA
Các viên nén SDIC 20g	1 viên nén hòa tan trong 10 lít nước cứng	1000ppm clo
hydro peroxit 6%	10ml pha loãng thành 100ml với nước cứng	0,6% (6000ppm) hydro peroxit

Hiệu quả khử trùng với sự không có mặt của chất bản được thử nghiệm bằng cách trộn 1ml chất khử trùng thử nghiệm với 1ml nước cứng và bổ sung ngay 10 $\mu$ l canh trường đậu nành Trypton (Tryptone Soy Broth - TSB) chứa khoảng 10<sup>9</sup> vi khuẩn phù du trong thời gian tiếp xúc 5 phút. Sau đó 1ml chất trung hòa (Na-thiosulphat 1%, Tween 80 6 %, BCS 5% và BSA 10% trong PBS) được bổ sung vào.

Hiệu quả khử trùng với sự có mặt của chất bản được thử nghiệm bằng cách trộn 1ml chất khử trùng thử nghiệm với 1ml huyết thanh bê 5% vào trong nước cứng và bổ sung ngay 10 $\mu$ l canh trường đậu nành (Tryptone Soy Broth - TSB) chứa khoảng 10<sup>9</sup> vi khuẩn phù du trong thời gian tiếp xúc 5 phút trước khi bổ sung 1ml chất trung hòa. Sau

đó 1ml chất trung hòa (Na-thiosulphat 1%, Tween 80 6 %, BCS 5% và BSA 10% trong PBS) được bổ sung vào.

Việc thử nghiệm các hệ khử trùng này chống lại sinh vật phù du *S. aureus* thể hiện rằng mỗi hệ thống có khả năng đạt mức giảm  $7 \log_{10}$  với sự không có mặt của chất bản hữu cơ. Tuy nhiên, khi được thử nghiệm trong các điều kiện bản, chỉ ví dụ 9 giờ được toàn bộ hiệu quả của nó.

Như có thể thấy trong Fig.8, sự có mặt của chất bản hữu cơ đã bất hoạt hoàn toàn hai chất khử trùng trên cơ sở clo và hydro peroxit. Tuy nhiên, Oxivir Tb đã thể hiện một số hoạt tính ( $0,67 \log_{10}$ ). Lưu ý rằng trong nghiên cứu này, Oxivir Tb được thử nghiệm với thời gian tiếp xúc là 5 phút, trong khi các nhà sản xuất chúng khuyến cáo thời gian tiếp xúc với vi khuẩn là 10 phút.

#### Ví dụ 18

Hiệu quả của các chất khử trùng thử nghiệm được thể hiện trong bảng 22 để tiêu diệt các sinh vật trong màng sinh học có bề mặt khô của *S. aureus* đã được xác định trong sự có mặt và sự không có mặt của chất bản sinh học. Mỗi điều kiện được thử nghiệm với năm lần lặp đi lặp lại để xác định số lượng vi khuẩn còn sót lại (các đơn vị hình thành khuẩn lạc – CFU) trong thời gian tiếp xúc là 5-phút.

Hiệu quả khử trùng với sự không có mặt của chất bản được thử nghiệm bằng cách trộn 1ml chất khử trùng thử nghiệm với 1ml nước cứng và bổ sung ngay mẫu thí nghiệm được phủ màng sinh học trong thời gian tiếp xúc là 5 phút. Sau đó 1ml chất trung hòa (Na-thiosulphat 1%, Tween 80 6 %, BCS 5% và BSA 10% trong PBS) được bổ sung vào.

Hiệu quả khử trùng với sự có mặt của chất bản được thử nghiệm bằng cách trộn 1ml chất khử trùng thử nghiệm với 1ml huyết thanh bê 5% trong nước cứng và bổ sung ngay mẫu thí nghiệm được phủ màng sinh học trong thời gian tiếp xúc là 5 phút trước khi bổ sung 1ml chất trung hòa.

Đối chứng dương (các mẫu thí nghiệm được phủ màng sinh học) và đối chứng âm (các mẫu thí nghiệm tiệt trùng sạch) được dùng các cách xử lý giống như được mô tả ở trên nhưng các chất khử trùng thử nghiệm được thay thế bằng nước cứng. Xác nhận



rằng hoạt tính khử trùng đã được bất hoạt hoàn toàn bằng cách bổ sung 1ml chất trung hòa vào hỗn hợp thử nghiệm (1ml chất khử trùng với 1ml chất bản hoặc nước cứng), bổ sung ngay mẫu thí nghiệm được phủ màng sinh học và phản ứng trong 5 phút (các kết quả không được thể hiện).

Xác định khả năng tồn tại của màng sinh học còn lại được xác định bằng cách dùng các mẫu thí nghiệm thử nghiệm và kiểm soát để khuấy bằng sóng âm ở 80 kHz trong 20 phút trước khi pha loãng 10 lần liên tiếp và nuôi cấy đĩa qua đêm ở 37°C và xác định CFU.

#### Các kết quả

Mẫu thí nghiệm đối chứng dương có giá trị trung bình là  $2,6 \times 10^6$  CFU/ mẫu thí nghiệm.

Với sự không có mặt của chất bản sinh học, và trong thời gian tiếp xúc là năm phút, ví dụ 9 được quan sát để thu được mức giảm  $6,42 \log_{10}$ , trong khi mẫu Proxitan được pha loãng chỉ thu được mức giảm  $2,04 \log_{10}$ . Các chất khử trùng trên cơ sở clo, SDIC và Chlorclean làm giảm khả năng tồn tại của màng sinh học lần lượt là  $2,85 \log_{10}$  và  $2,82 \log_{10}$ . Oxivir được phát hiện ra là thu được mức giảm  $\log_{10}$  khoảng 1 trong khi hydro peroxit không phối chế thu được mức giảm  $\log_{10}$  về cơ bản là không trong cả các điều kiện sạch và điều kiện bẩn.

Trong các điều kiện bẩn (ví dụ, với sự có mặt của chất bản hữu cơ), ví dụ 9 lại thu được mức giảm  $6,42 \log_{10}$ . Hiệu quả của cả chất khử trùng SDIC và Chlorclean giảm đáng kể với sự có mặt của chất bản, thu được các mức giảm  $\log_{10}$  lần lượt là 0,03 và 0,02. Oxivir Tb cũng thu được hiệu quả bị giảm, thu được mức giảm  $0,24 \log_{10}$  của khả năng tồn tại của màng sinh học (xem Fig.9).

#### Các kết luận

Các dung dịch khử trùng theo ví dụ 9, cùng với hai hệ khử trùng có sẵn trên thị trường được phối chế khác, mỗi trong số chúng chứa chất diệt sinh vật oxy hóa, cùng với các thành phần khác như chất hoạt động bề mặt. Hiệu quả của việc bổ sung các thành phần độc quyền vào hiệu quả khử trùng được đánh giá bằng cách so sánh các chất khử trùng được phối chế và các sản phẩm generic tương đương trong nỗ lực để xác định xem

nếu loại bỏ màng sinh học là do riêng thành phần hoạt tính hoặc do các thành phần độc quyền hoạt động hiệp đồng với thành phần hoạt tính.

Hiệu quả nổi bật trong nghiên cứu này là ví dụ 9 mà bất hoạt hoàn toàn. Màng sinh học có bề mặt khô với sự có mặt hoặc không có mặt của chất bản.

Sản phẩm trên cơ sở clo được phối chế Chlorclean, cũng như các viên nén SIDC không được phối chế là những sản phẩm có hiệu suất tốt nhất tiếp theo, mặc dù chúng đã tiêu diệt màng sinh học vi khuẩn ít hơn đáng kể ( $3 \text{ Log}_{10}$ ) so với ví dụ 9, và chỉ với sự có mặt của chất bản.

Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng, các chất hóa học như hypoclorit đã được sử dụng bởi các lớp bề mặt của màng sinh học làm suy giảm khả năng trung hòa trước khi chất khử trùng có thể xâm nhập vào trong các lớp sâu hơn (xem tài liệu tham khảo 13) tạo ra màng sinh học hydrat hóa truyền thống có khả năng chống chịu tốt hơn so với các tế bào sinh vật phù du đối với các chất khử trùng này. Tuy nhiên, nghiên cứu về hiệu quả của hypoclorit chống lại màng sinh học có bề mặt khô cho thấy màng sinh học bán khử nước có khả năng chống chịu với hypoclorit lớn hơn so với màng sinh học hydrat hóa truyền thống (xem tài liệu tham khảo 6).

Thậm chí khi không có mặt chất bản, các chất khử trùng trên cơ sở hydro peroxit đã tiêu diệt màng sinh học vi khuẩn ít hơn đáng kể so với các chất khử trùng trên cơ sở clo hoặc tổ hợp của axit peraxetic và hydro peroxit. Oxivir Tb đã tiêu diệt khoảng  $1 \text{ Log}_{10}$  màng sinh học vi khuẩn trong khi dung dịch hydro peroxit không có hiệu quả. Tuy nhiên, lưu ý rằng nhà sản xuất Oxivir khuyến cáo thời gian tiếp xúc để tiêu diệt vi khuẩn là 10 phút chứ không phải năm phút như sử dụng trong nghiên cứu này và điều này có thể giải thích cho hiệu suất thấp hơn của nó. Tuy nhiên, thậm chí thời gian tiếp xúc 5 phút có thể là quá đủ để làm sạch các bề mặt bệnh viện khô. Phần lớn các chất khử trùng không có hiệu quả tồn dư và chỉ hoạt động khi ướt.

Sự khác biệt trong tỷ lệ tiêu diệt giữa ví dụ 9 (các chất phụ gia được phối chế) và Proxitan được pha loãng (không có chất phụ gia) cho thấy rằng hoạt tính của ví dụ 9 chống lại DSB có thể bị chi phối không chỉ bởi các thành phần hoạt tính (hydro peroxit

và axit peraxetic), mà còn bởi các nhân tố khác như các chất hoạt động bề mặt hoặc các tá dược được bổ sung, các tác nhân chelat hóa hoặc độ pH dung dịch của nó.

Các chất hoạt động bề mặt có thể làm tăng sự khuếch tán của các thành phần hoạt tính vào trong màng sinh học (do sự giảm sức căng bề mặt của dung dịch, và do đó cải thiện độ ướt của bề mặt màng sinh học).

Sự khuếch tán được tăng lên có khả năng dẫn đến việc tiêu diệt màng sinh học được tăng lên ở tất cả các chất khử trùng được thử nghiệm này, với sự không có mặt của chất bản hữu cơ, có thể tiêu diệt 7 Log<sub>10</sub> sinh vật phù du. Phức của các tác nhân chelat hóa với các ion canxi và magie bất kỳ có mặt trong nước cứng, thêm với kim loại gây nhiễu khác bất kỳ thường có mặt trong nước máy như sắt, mangan và do đó làm tăng hiệu suất khử trùng trong nước cứng.

#### Tài liệu tham khảo

1. Vickery K, Deva A, Jacombs A, Allan J, Valente P, Gosbell IB; "Presence of biofilm containing viable multiresistant organisms despite terminal cleaning on clinical surfaces in an intensive care unit"; *Journal of Hospital Infection*, (2012) 80, 52-55
2. Hu H, Johani K, Gosbell IB, Jacombs AS, Almatroudi A, Whiteley GS, Deva AK, Jensen S, Vickery K; "Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug-resistant bacteria in biofilms: combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy"; *Journal of Hospital Infection*. (2015) 91, 35-44
- 3 Whiteley GS, Knight JL, Derry CW, Jensen SO, Vickery K, Gosbell IB; A pilot study into locating the bad bugs in a busy intensive care unit" *American Journal of Infection Control*, (2015) 43, 1270-1275

4. Almatroudi A, Hu H, Deva A, Gosbell IB, Jacombs A, Jensen SO, Whiteley G, Glasbey T, Vickery K; "A new dry surface biofilm model: An essential tool for efficacy testing of hospital decontamination procedures"; (2015), 117, 171-176
5. "Standard test method for quantification of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm grown with high shear and continuous flow using CDC biofilm reactor". ASTM E2562-12. ASTM International, West Conshohocken
6. Almatroudi A, Gosbell IB, Hu H, Jensen SO, Espedido BA, Tahir S, Glasbey TO, Legge P, Whiteley G, Deva A, Vickery K. "Staphylococcus aureus dry-surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control"; *Journal of Hospital Infection*, (2016), 93, 263-270
7. Almatroudi A, Tahir S, Hu H, Chowdhury D, Gosbell IB, Jensen SO, Whiteley GS, Deva AK, Glasbey T, Vickery K.; "Staphylococcus aureus dry surface biofilms are more resistant to heat treatment than traditional hydrated biofilms", *Journal of Hospital Infection* (2018), 98, 161-167
8. Vickery K, Pajkos A, Cossart Y.; "Removal of biofilm from endoscopes: Evaluation of detergent efficiency"; *American Journal of Infection Control* (2004), 32, 170-176
9. Vickery K, Ngo QD, Zou J, Cossart YE.; "The effect of multiple cycles of contamination, detergent washing, and disinfection on the development of biofilm in endoscope tubing"; *American Journal of Infection Control* (2009), 37, 470-475

10. Ren W, Sheng X, Huang X, Zhi F, Cai W. "Evaluation of detergents and contact time on biofilm removal from flexible endoscopes"; *American Journal of Infection Control* (2013), 41, e89-e92
11. Ying Fang, Zhe Shen, Lan Li, Yong Cao, Li-Ying Gu, Qing Gu, Xiao-Qi Zhong, Chao-Hui Yu, and You-Ming Li "A study of the efficacy of bacterial biofilm cleanout for gastrointestinal endoscopes" *World Journal of Gastroenterology* (2010), 16, 1019-1024
12. Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM.; "Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms"; *Microbiology* (2005) 151, 757-762
13. Chen X, PS Stewart. "Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction-diffusion interaction". *Environ Sci Technol* 1996;30: 2078-83

**Yêu cầu bảo hộ**

1. Quy trình loại bỏ màng sinh học có bề mặt khô ra khỏi bề mặt thiết bị y tế không tới hạn và có môi trường bị nhiễm bẩn, như được xác định ở đây, màng sinh học có bề mặt khô này chứa vi khuẩn nằm sâu và giàu protein hơn các màng sinh học có môi trường ướt trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) hòa tan chế phẩm dạng bột vào trong nước để tạo thành dung dịch trong đó chế phẩm dạng bột bao gồm:

- a) nguồn hydro peroxit
- b) chất cho axetyl
- c) tác nhân axit hóa,
- d) tác nhân làm ướt, và
- e) thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic

(ii) cho phép dung dịch này tạo ra axit peraxetic với nồng độ đủ để diệt vi khuẩn nằm sâu này và về cơ bản là loại bỏ protein này có mặt trong màng sinh học có bề mặt khô;

(iii) cho bề mặt bị ô nhiễm có màng sinh học có bề mặt khô tiếp xúc với dung dịch chứa axit peraxetic được sinh ra trong một khoảng thời gian đủ để diệt vi khuẩn và về cơ bản loại bỏ protein này; và

(iv) loại bỏ dung dịch và màng sinh học có bề mặt khô này từ bề mặt bị nhiễm bẩn.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó chế phẩm dạng bột còn bao gồm thêm một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm bao gồm tác nhân cànghóa, tác nhân đệm, chất thay đổi dòng chảy, chất màu và chất tạo hương.

3. Quy trình theo điểm 1, trong đó dung dịch được loại bỏ bằng cách rửa sạch hoặc lau sạch.

4. Quy trình theo điểm 1, trong đó nguồn hydro peroxit được chọn từ nhóm bao gồm natri perborat, natri percacbonat, urea peroxit, povidon-hydro peroxit, canxi peroxit, dung dịch hydro peroxit, và các tổ hợp của chúng.
5. Quy trình theo điểm 1, trong đó chất cho axetyl được chọn từ nhóm bao gồm tetraaxetyletylendiamin (TAED), N-axetyl caprolactam, N-axetyl succinimit, N-axetyl phtalimit, N-axetyl maleimit, pentaaxetyl glucozo, octaaxetyl sucrozo, axit axetylsalixylic, tetraaxetyl glycouril, và các tổ hợp của chúng.
6. Quy trình theo điểm 1, trong đó tác nhân axit hóa được chọn từ nhóm bao gồm axit xitric, mononatri xitrat, dinatri xitrat, axit tartaric, mononatri tartrat, axit sulfamic, natri hydro sulphat, mononatri phosphat, axit oxalic, axit benzoic, axit benzensulfonic, axit toluensulfonic và các tổ hợp của chúng.
7. Quy trình theo điểm 1, trong đó tác nhân làm ướt được chọn từ nhóm bao gồm natri dodexyl sulphat, natri alkylbensensulphonat, Pluronic PE6800, Hyamin 1620 và các tổ hợp của chúng.
8. Quy trình theo điểm 2, trong đó tác nhân càn hóa được chọn từ nhóm bao gồm natri xitrat, axit xitric, axit phosphoric, natri tripolyphosphat, EDTA, NTA, và các tổ hợp của chúng.
9. Quy trình theo điểm 2, trong đó tác nhân đệm được chọn từ nhóm bao gồm phosphat, borat, bicacbonat, TAPS (axit 3- {[tris(hydroxymetyl)metyl]amino}propansulfonic), Bixin (N,N-bis(2-hydroxyetyl)glyxin), Tris (tris(hydroxymetyl)metylamin), Trixin (N-tris(hydroxymetyl)metyl glyxin) và các tổ hợp của chúng.
10. Quy trình theo điểm 2, trong đó chất thay đổi dòng chảy được chọn từ nhóm bao gồm silica khói (silic oxit khói - fumed silica), silica kết tủa (silic oxit kết tủa), polyetylen

glycol 6000 được micron hóa, lactozơ được micron hóa, đá tan, magie stearat, và các tổ hợp của chúng.

11. Quy trình theo điểm 1, trong đó thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic biểu thị khi axit peraxetic đủ để giết vi khuẩn nằm sâu và về cơ bản là loại bỏ protein có mặt trong màng sinh học có bề mặt khô đã được tạo ra trong dung dịch này.

12. Quy trình theo điểm 1, trong đó thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic là thuốc nhuộm 1-arylazo-2-hydroxynaphtyl.

13. Quy trình theo điểm 12, trong đó thuốc nhuộm có thể mất màu do axit peraxetic được chọn từ nhóm bao gồm Amaranth (C.I. 16185), Ponceau 4R (C.I. 16255), FD&C Yellow 6 (C.I. 15985), thuốc nhuộm 1-arylazo-2-hydroxynaphtyl bất kỳ khác, và các tổ hợp của chúng.

14. Quy trình theo điểm 1, trong đó chế phẩm dạng bột còn bao gồm thuốc nhuộm ổn định đáng kể sự mất màu.

15. Quy trình theo điểm 14, trong đó thuốc nhuộm ổn định đáng kể sự mất màu được chọn từ nhóm bao gồm Acid Blue 182, Acid Blue 80, Direct Blue 86, Acid Green 25 (C.I. 61570) và các tổ hợp của chúng.

16. Quy trình theo điểm 1, trong đó bề mặt thiết bị y tế không tới hạn và có môi trường bị nhiễm bẩn được tiếp xúc với dung dịch trong ít nhất 5 phút.



Fig.1

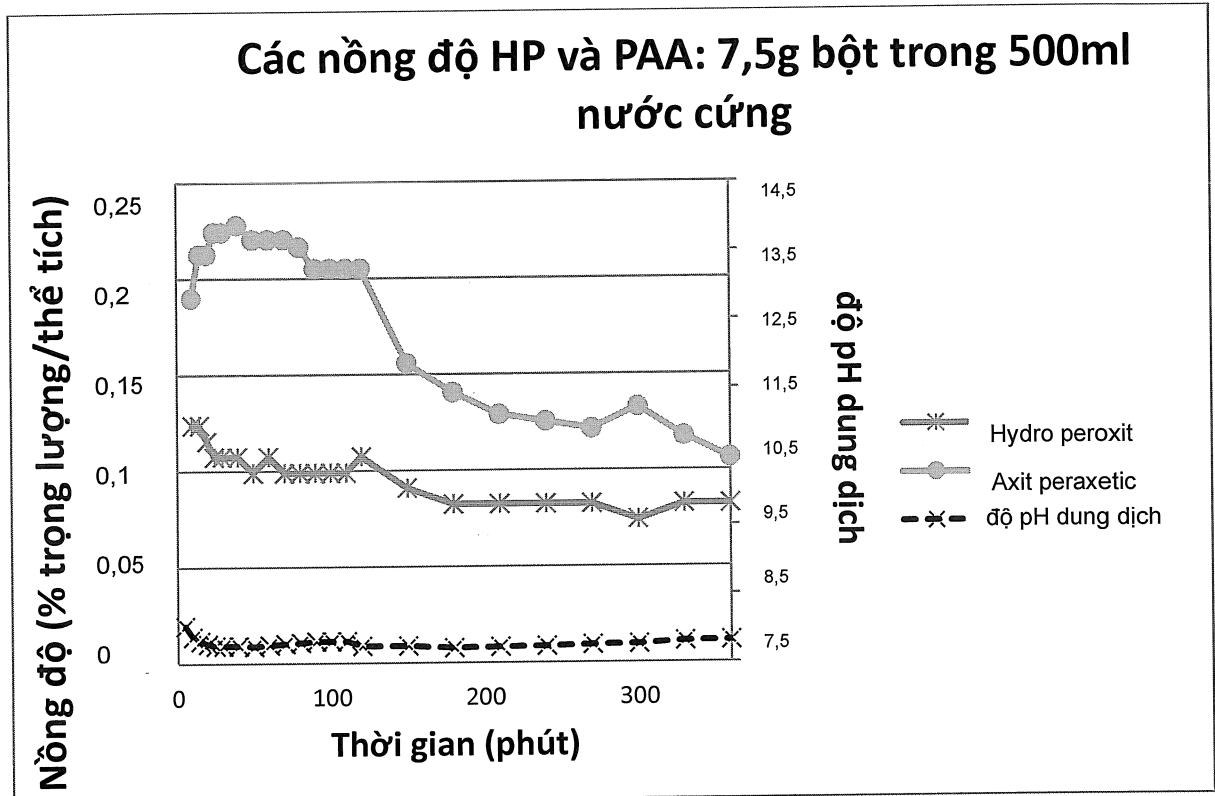


Fig.2

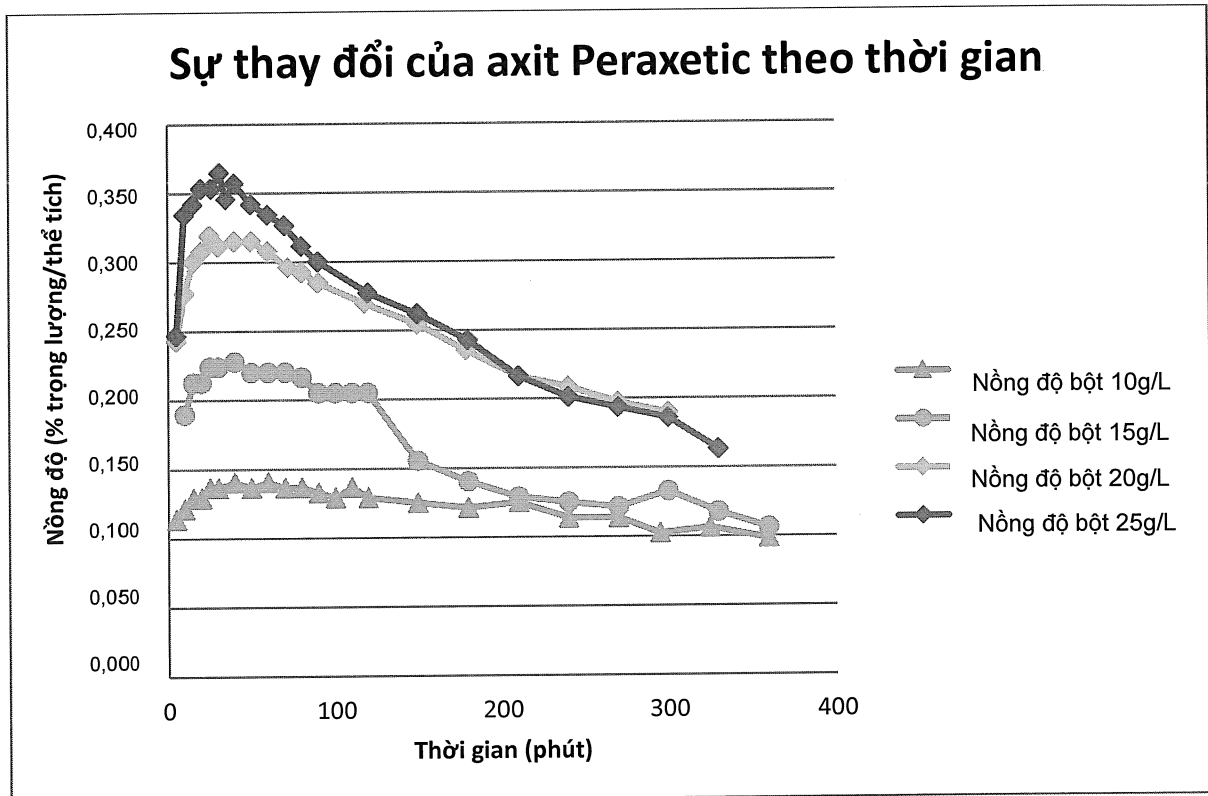


Fig.3

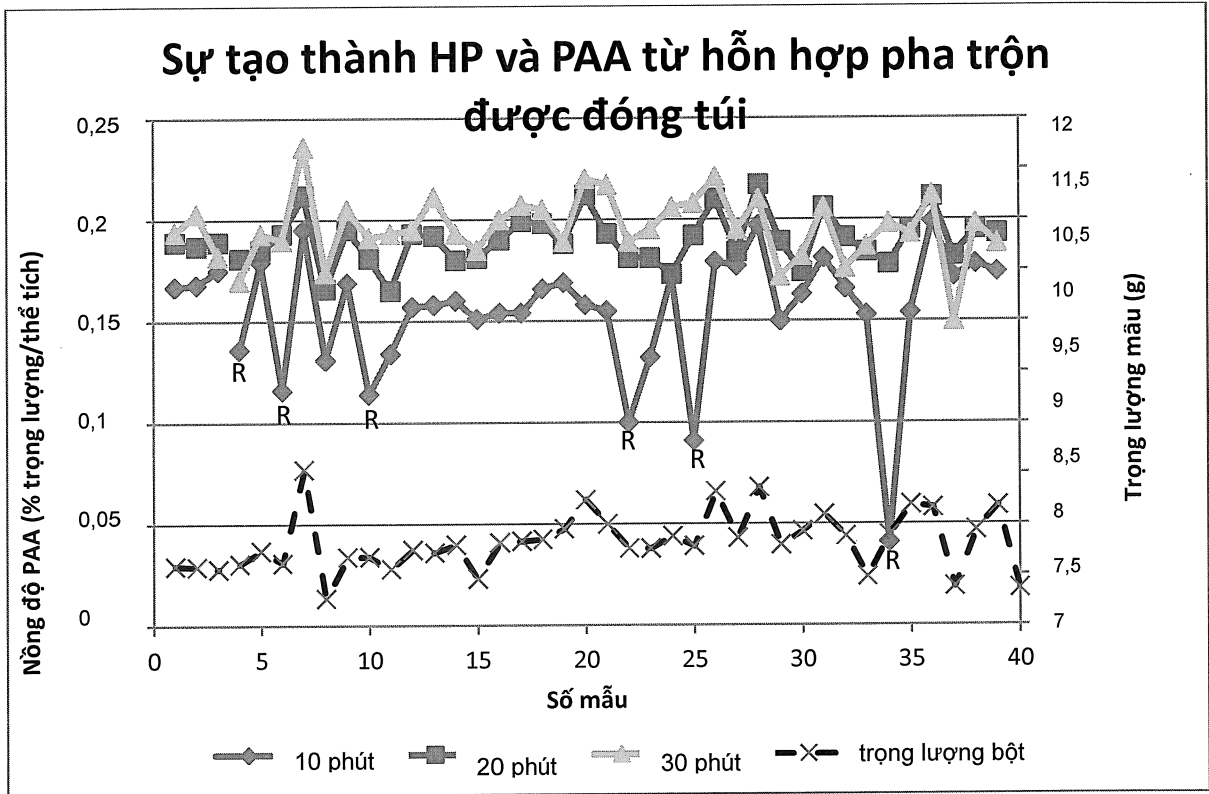


Fig.4

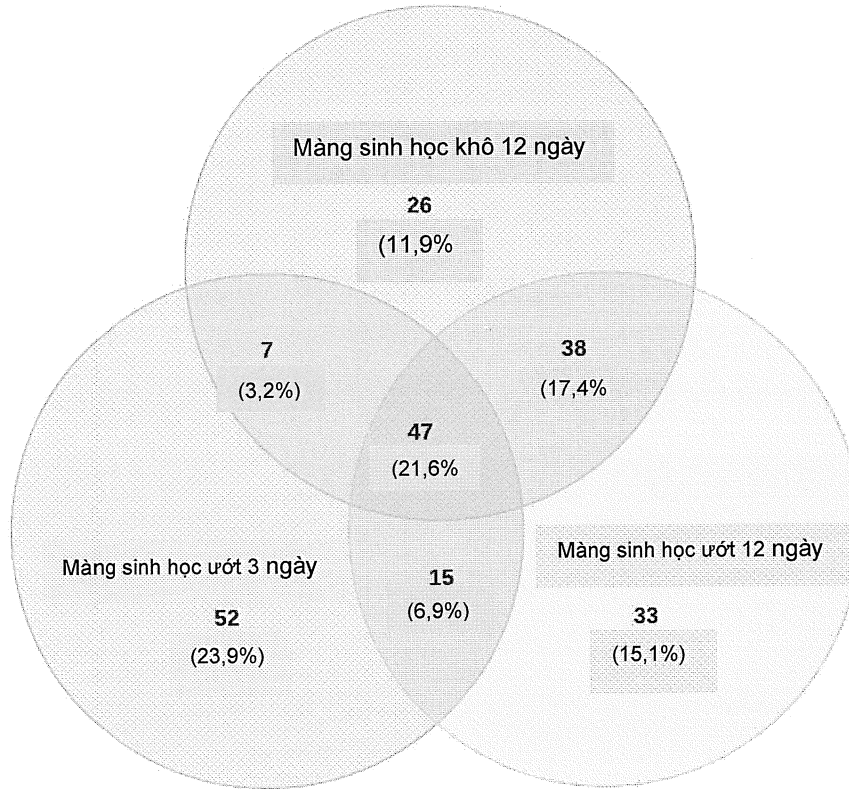


Fig.5

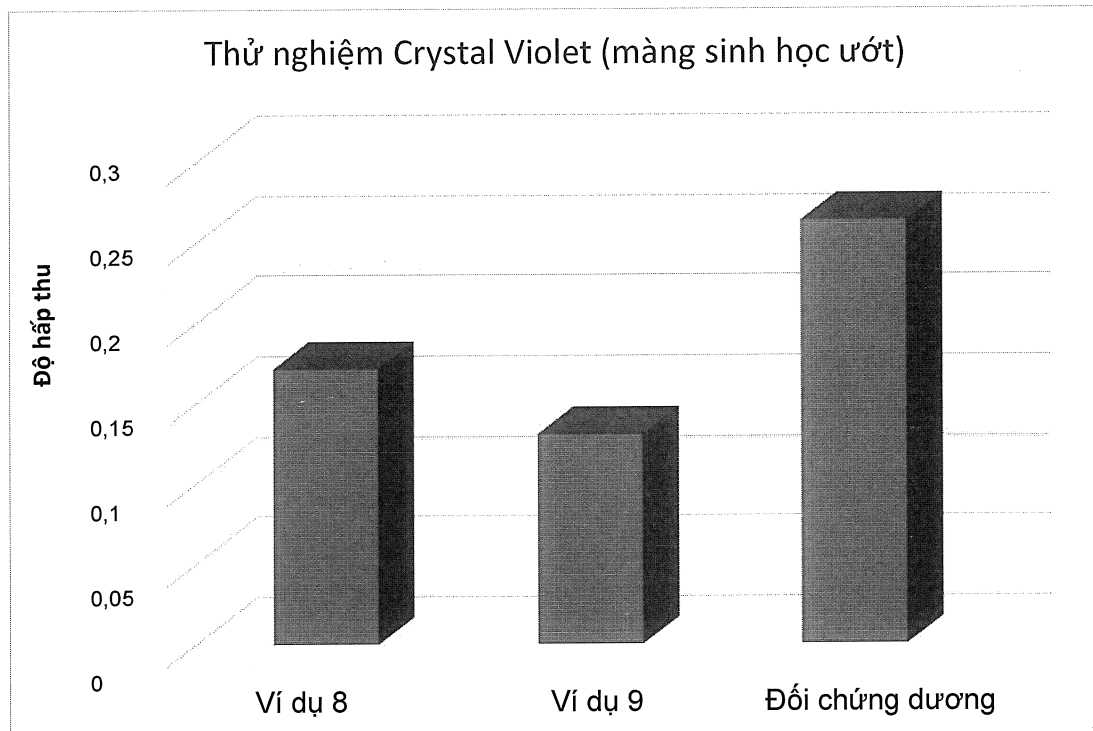


Fig.6

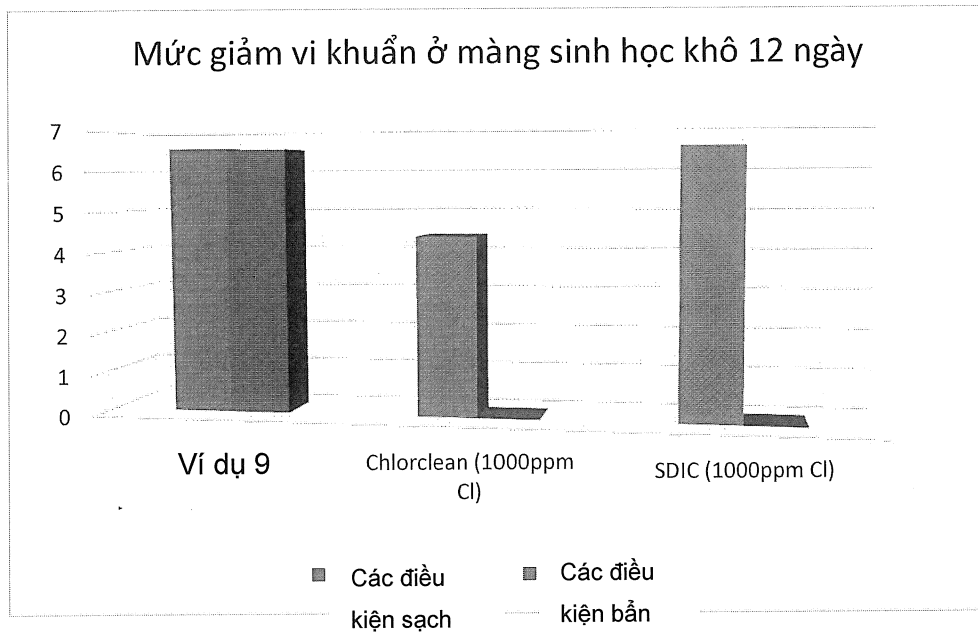


Fig.7

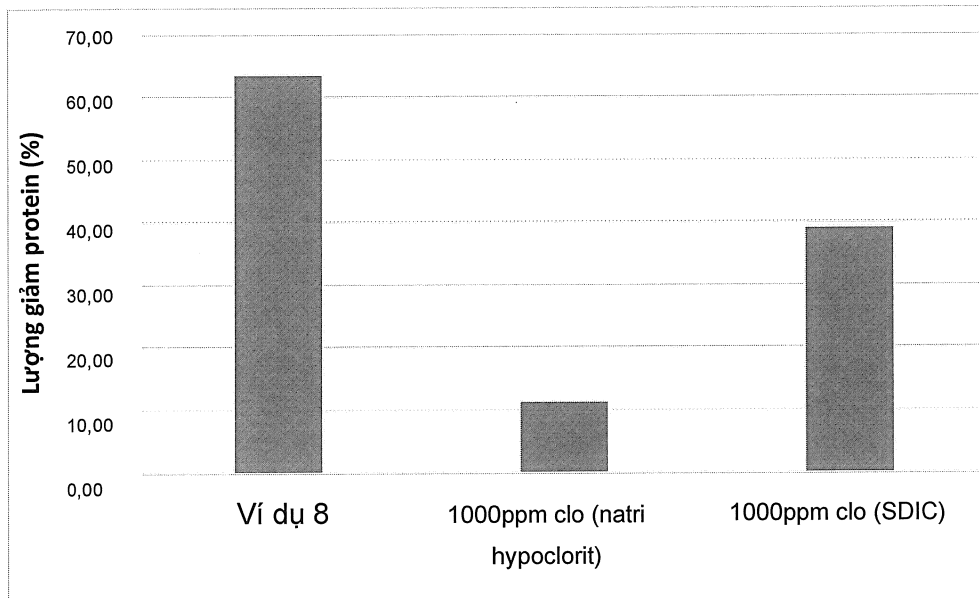


Fig.8

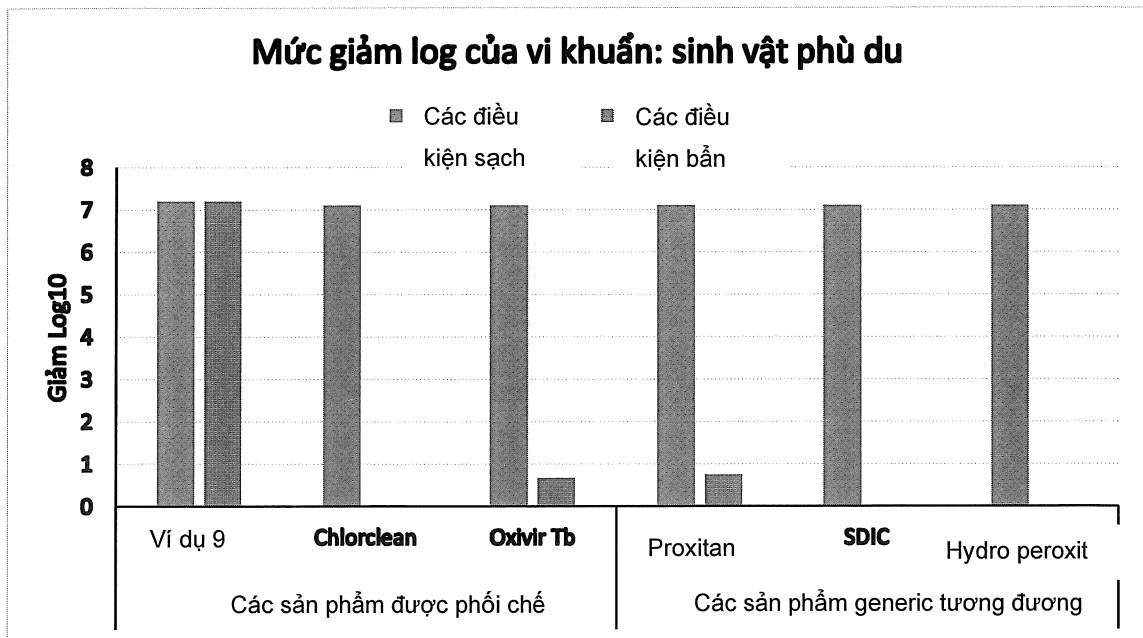




Fig.9

