

Исследование бактерицидной активности новых производных четвертичных аммониевых солей на основе пиридоксина *in vitro* в отношении грамположительных / грамотрицательных бактерий

М.Н. Агафонова, Е.С. Булатова, С.В. Сапожников, А.С. Биктимирова, Е.Д. Кобылинская, Н.В. Штырлин, Ю.Г. Штырлин

Казанский (Приволжский) федеральный университет Научно-образовательный центр фармацевтики, Казань, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Профилактика и успешное лечение инфекционных заболеваний, в том числе внутрибольничных инфекций, относится к числу важнейших задач современного здравоохранения. Для решения этой проблемы существует не так много эффективных антисептиков и дезинфектантов. Четвертичные аммониевые соли на сегодняшний день являются одним из перспективных классов дезинфицирующих средств, однако их применение ограничивается способностью микроорганизмов вырабатывать устойчивость к данным соединениям. Модификация четвертичных аммониевых солей заместителями различной природы может стать решением данной проблемы.

Цель исследования — провести сравнительный анализ бактерицидной активности двух оригинальных низкомолекулярных соединений на основе пентаэритрита в сравнении с бензалкония хлоридом.

Материалы и методы. Бактерицидные свойства 0,1 и 0,2% водных растворов оригинальных четвертичных аммониевых солей на основе пиридоксина были исследованы в отношении двух широко распространённых возбудителей — *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*; данные об антибактериальной активности получены с помощью стандартного теста *in vitro* (исследование бактерицидной активности на поверхности металла, время экспозиции — 1, 5 и 15 мин). В дополнение к стандартным условиям бактерицидные свойства также были изучены в условиях добавления белковой нагрузки (в виде раствора бычьего сывороточного альбумина).

Результаты. В ходе исследования было показано, что для изучаемых соединений RF — фактор редукции (снижение $\log_{10}$ КОЕ микроорганизмов) — в среднем ≥ 3 . Усложнение модельных условий в виде белковой нагрузки приводило к снижению эффективности на 1–3 порядка. Мы также наблюдали эффект изменения специфичности в зависимости от времени воздействия.

Заключение. Полученные результаты показали высокую активность исследуемых соединений (соответствуют критерию эффективности RF ≥ 3 , предъявляемому для коммерческих соединений, используемых в данной области).

Ключевые слова: дезинфектанты; бензалкония хлорид; бактерицидная активность; тест на поверхности.

Как цитировать

Агафонова М.Н., Кобылинская Е.Д., Булатова Е.С., Сапожников С.В., Биктимирова А.С., Штырлин Н.В., Штырлин Ю.Г. Исследование бактерицидной активности новых производных четвертичных аммониевых солей на основе пиридоксина *in vitro* в отношении грамположительных / грамотрицательных бактерий // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2024. Т. 29, № 2. С. 00–00. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID624847>

Статья поступила: 20.12.2023

Статья одобрена: 13.03.2024

Опубликована online: 08.04.2024

In vitro study of the bactericidal activity for new derivatives of quaternary ammonium salts based on pyridoxine against gram-positive / gram-negative bacteria

Mariya N. Agafonova, Elena S. Bulatova, Elizaveta D. Kobylinskaia, Sergey V. Sapozhnikov, Alina S. Biktimirova, Nikita V. Shtyrlin, Yurii G. Shtyrlin
Kazan Federal University, Scientific and Educational Center of Pharmaceutics, Kazan, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: preventive care and successful treatment of infectious diseases (including hospital-acquired infections) are among the most important tasks of modern healthcare. There are not many effective antiseptics and disinfectants to solve this problem. Quaternary ammonium salts are currently one of the promising classes of disinfectants but their use is limited by the ability of microorganisms to develop resistance to these compounds. Modification of quaternary ammonium salts with substituents of various natures is a possible way to solve this problem.

AIM: in this work a bactericidal activity comparative analysis for two original quaternary ammonium compounds based on pyridoxine was carried out in comparison with benzalkonium chloride.

MATERIALS AND METHODS: the bactericidal activity of 0.1 and 0.2% aqueous solutions of original quaternary ammonium salts based on pyridoxine were studied against two widespread pathogens: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Antibacterial activity data were obtained using a standard *in vitro* test (bactericidal activity test on a metal surface, exposure time 1, 5 and 15 minutes). In addition to standard conditions, antibacterial efficacy was also studied under protein loading conditions (adding BSA solution to the surface).

RESULTS: for the studied compounds the RF (reduction factor - reduction lgCFU of microorganisms) was on average ≥ 3 . Complicating the model conditions in the form of protein load led to a decrease in efficiency by 1–3 orders. We have also observed an interesting effect of exposure time-dependent specificity reversal to the *S. aureus* and *E. coli*.

CONCLUSIONS: The obtained results showed high activity of the studied compounds (corresponding to the effectiveness criterion $RF \geq 3$ for commercial compounds used in this field).

Keywords: disinfectants; benzalkonium chloride; bactericidal activity.

To cite this article

Agafonova MN, Kobylinskaia ED, Bulatova ES, Sapozhnikov SV, Biktimirova AS, Shtyrlin NV, Shtyrlin YuG. *In vitro* study of the bactericidal activity for new derivatives of quaternary ammonium salts based on pyridoxine against gram-positive / gram-negative bacteria. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2024;29(2):??–??. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID624847>

Received: 20.12.2023

Accepted: 13.03.2024

Published

online:

08.04.2024

ОБОСНОВАНИЕ

Антисептики и дезинфектанты являются неотъемлемыми компонентами не только поддержания личной гигиены, но и контроля над возникновением и распространением различных инфекционных заболеваний, внутри- и внебольничных инфекций [1, 2]. В качестве представителей можно выделить класс четвертичных аммониевых солей (ЧАС), а среди представителей данного класса — бензалкония хлорид (БХ) [3, 4]. Бензалкония хлорид — широко используемое дезинфицирующее средство и консервант, однако следует отметить его токсичность и сильное раздражающее действие на кожу и слизистые человека. Кроме того, из-за широкого применения и попадания бензалкония хлорида в окружающую среду к данному препарату наблюдается постепенное снижение чувствительности бактерий [5]. Модификация ЧАС заместителями различной природы является возможным способом решения данной проблемы. В то же время в литературе отсутствуют систематические сравнительные данные об эффективности антисептиков, которые были бы получены по единым стандартизированным методикам. Более того, нормативные стандарты, принятые для использования в разных странах, могут различаться, и, наконец, эксперименты в условиях, приближенных к реальным, как правило, остаются на усмотрение разработчиков [6]. Нельзя не упомянуть, что многие исследования проводятся с использованием спиртовых растворов антисептиков или их смесей / композиций [7–9], что зачастую непригодно для объективной оценки биоцидных свойств самих оригинальных соединений. В настоящей работе мы постарались учесть эти особенности при изучении свойств тестируемых соединений.

Цель исследования — провести сравнительный анализ бактерицидной активности двух оригинальных низкомолекулярных соединений на основе пентаэритрита в сравнении с бензалкония хлоридом.

Исследуемые соединения, полученные с использованием пентаэритрита как синтетически удобной и доступной платформы:

- соединение 1: 1,3-бис(8-диметил(децил)аммоний)метил)-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5, 6-с]пиридин-9-окси)-2,2-бис((8-диметил(децил)аммоний)метил)-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин-9-окси)метил)пропан тетрахлорид;
- соединение 2: 1,3-бис(8-диметил(децил)аммоний)метил)-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5, 6-с]пиридин-9-окси)-2,2-бис((8-диметил(децил)аммоний)метил)-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин-9-окси)метил)пропан тетрахлорид.

Ранее для аналогов приведённых соединений нами было показано, что наряду с антибактериальной эффективностью они обладают более благоприятным профилем безопасности по сравнению с БХ [10]. Это позволило нам предположить, что соединения способны проявлять антибактериальную активность не только в суспензионных тестах, но также могут выступать перспективными дезинфицирующими средствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительную оценку дезинфицирующего действия проводили на музейных штаммах *Staphylococcus aureus* ATCC 209p и *Escherichia coli* CDCF-50. Бактериальные штаммы получены из Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии (Казань, Россия).

Бульон Мюллера–Хинтон готовили из сухих сред (Mueller Hinton broth, Acumedia, Baltimore), культивирование осуществляли на агаризованной среде Мюллера–Хинтон, которая включает дополнительно 2% агара. Среды стерилизовали автоклавированием при 121 °C в течение 15 мин.

В состав нейтрализующего раствора входили следующие компоненты: 8% Tween80, 6% сапонин, 0,8% лецитин, 2% SDS, PBS).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ НА КОНТАМИНИРОВАННОЙ МЕТАЛЛИЧЕСКОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Тест проводили в соответствии с европейскими рекомендациями по тестированию химических дезинфицирующих средств и антисептиков [6, 11–16, 17]. Для приготовления бактериальной

суспензии культуры микроорганизмов, выращенные на плотной питательной среде Мюллера–Хинтон в течение 18–24 ч, смывали стерильным изотоническим раствором хлорида натрия. Бактериальную суспензию каждого микроорганизма доводили до мутности, соответствующей 3 единицам МакФарланда. Одновременно для моделирования условий контаминированной поверхности таким же образом готовили инокулят с добавлением бычьего сывороточного альбумина (БСА) (конечная концентрация 0,4%).

Для оценки чувствительности бактерий к испытуемым соединениям на предварительно очищенную металлическую поверхность (нержавеющая сталь AISI типа 304, расчерченная на квадраты 5×5 см) наносили микробную взвесь (содержащую и не содержащую БСА) в объёме 0,125 мл и распределяли стерильным шпателем по всей площади квадрата. После высыхания наносили 0,5 мл испытуемых соединений и препарата сравнения (концентрация 0,1 и 0,2%) и распределяли по поверхности квадрата стерильным шпателем. Выдерживали 1, 5 и 15 мин при 25 °С. После окончания экспозиции стерильной марлевой салфеткой, смоченной в растворе нейтрализатора (объём 1 мл), тщательно протирали контаминированную поверхность и погружали салфетку в 10 мл стерильного физиологического раствора, встряхивали в течение 10 мин. Далее проводили посев жидкости на плотную питательную среду, культивирование осуществляли 24–48 ч при 37 °С. КОЕ тест-микроорганизмов подсчитывали через 24 или 48 ч инкубации при 37 °С. Параллельно делали несколько контролей: контроль жизнеспособности микроорганизма; контроль стерильности раствора дезинфектанта; контроль полноты нейтрализации дезинфектанта; контроль стерильности поверхности. Коэффициент редукции (RF) – снижения КОЕ $\log_{10}$ для каждого времени контакта — рассчитывали по формуле:

$$RF = \log_{10} n_c - \log_{10} n_d,$$

где n_c — количество жизнеспособных клеток (КОЕ) в контроле; n_d — количество жизнеспособных клеток (КОЕ) после воздействия тестируемых соединений.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Методы статистического анализа данных: статистическую обработку результатов проводили с использованием редактора Microsoft Excel и программы Graph PadPrism. Для показателей рассчитывали средние арифметические значения и стандартные отклонения.

ОСНОВНОЙ ИСХОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно нормативам, критерием эффективности является $3 \geq RF \geq 5$ [5, 6, 11–16] в зависимости от конкретной области применения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дезинфицирующую активность исследуемых соединений 1 и 2 на поверхности металла исследовали с помощью количественного лабораторного теста *in vitro*. Металлические поверхности контаминировали тест-культурами (*S. aureus* и *E. coli*), затем высушивали и обрабатывали исследуемыми веществами в концентрациях 0,1 и 0,2% в течение 1, 5 и 15 мин. Следует отметить, что при проведении исследований для усложнения условий также использовали микробную взвесь, содержащую белок — БСА. Используемые параметры моделируют дезинфицирующую активность веществ в более жёстких условиях по сравнению с тестом в пробирке (суспензионный тест), поскольку на высушенной поверхности происходит адгезия микроорганизмов, что снижает активность антисептиков / дезинфектантов [18, 19].

Согласно полученным результатам, в концентрации 0,1% наиболее значимое снижение колониеобразующих единиц (КОЕ) *S. aureus* наблюдалось после 15-минутного воздействия ($RF=6,3–6,6$) (табл. 1). При уменьшении времени воздействия до 5 мин наблюдаемый эффект исследуемых соединений сопоставим с препаратом сравнения. Однако при воздействии в течение 1 мин исследуемые соединения уступают препарату сравнения ($RF=4,08, 4,15$ и $5,49$ для соединений 1, 2 и БХ соответственно). Введение БСА снижало активность всех веществ примерно в 1,3–1,5 раза. Однако увеличение концентрации до 0,2% приводило к увеличению значений RF во всех исследованных образцах в среднем на 1–2 лог. ед.

В целом можно заключить, что аналогичная тенденция наблюдалась и после воздействия изучаемых соединений на *E. coli* (табл. 2). Полное подавление роста бактерий фиксировалось через 15 мин обработки независимо от используемой концентрации (0,1 или 0,2%). Та же активность была продемонстрирована после 5-минутного воздействия в концентрации 0,2%. Стоит также отметить, что уменьшение времени воздействия для концентрации 0,1% (до 1 и 5 мин) приводило к резкому снижению антибактериальной активности в 1,6–2 раза. После

добавления БСА полное подавление роста было показано только в случае концентрации 0,2% и лишь в случае для максимального времени воздействия (15 мин). В целом добавление БСА снижало антибактериальную активность на 0,2–3 порядка.

Таким образом, максимальный эффект для исследуемых соединений обнаруживается в концентрации 0,2% и при времени воздействия не менее чем 5 мин. Следует отметить, что введение белковой нагрузки в большинстве случаев снижает активность соединений, но при этом их эффективность сопоставима с эффективностью препарата сравнения. Также наблюдаемая активность обоих исследуемых соединений в отношении *E. coli* и *S. aureus* практически одинакова.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов дезинфицирующей активности исследуемых соединений выявил, что после воздействия в течение 15 мин исследуемые соединения более специфично подавляют рост *E. coli*, а не *S. aureus*, как это можно было бы изначально предположить. Хотя при краткосрочном действии (1 мин) оба соединения демонстрируют повышенную активность именно против *S. aureus* в концентрации как 0,1%, так и 0,2%. Характер активности сохраняется и при добавлении БСА. Таким образом, мы можем заключить, что введение белковой нагрузки хотя и затрудняет работу, но не оказывает существенного влияния на специфичность исследуемых соединений. Единственное отличие от экспериментов, проводимых в отсутствие БСА, состоит в том, что соединения теряют специфичность по отношению к *S. aureus* уже после экспозиции в течении 1-й минуты.

Механизмы наблюдаемого эффекта на данном этапе не вполне ясны. Можно предположить, что это связано со снижением проницаемости молекул для *S. aureus* в случае, когда клетки находятся в состоянии адгезии. Предположительно, высушенные клетки *S. aureus* образуют более компактные и плотные структуры, более устойчивые к действию антисептиков / дезинфектантов. Напротив, клетки *E. coli* образуют менее плотные структуры, более чувствительные к действию биоцидов в аналогичных условиях.

В частности, ранее была показана повышенная чувствительность *E. coli* к высыханию по сравнению с *S. aureus* [20]. Так как в данной работе изучены только два штамма бактерий, следует подчеркнуть, что данный эффект может быть связан не со всеми грамположительными и грамотрицательными бактериями, а с конкретными рассмотренными бактериальными организмами.

То, как меняется активность соединений при добавлении БСА, показывает, что белковая нагрузка повышает реалистичность моделей *in vitro*. Подобная модификация позволяет хотя бы частично воспроизвести факторы, влияющие на антисептическую активность (специфические и неспецифические загрязнения, активность ферментов, локальное окружение и т.д. [21]). Такие испытания имеют особое значение, если вещество невозможно исследовать на моделях кожи человека (например, для агентов, находящихся на доклинических стадиях разработки).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было проведено сравнительное исследование антибактериальной активности двух производных ЧАС на основе пиридоксина в сравнении с бензалкония хлоридом в экспериментальных условиях на поверхности металла. Изучены бактерицидные свойства 0,1 и 0,2% водных растворов в отношении двух широко распространённых патогенов (*S. aureus* и *E. coli*). Анализ проводили на металлической поверхности, выдерживая растворы в течение 1, 5 и 15 мин. Для усложнения условий эксперимента дополнительно вводили белковую нагрузку (раствор БСА). Полученные данные показали, что соединение 1 проявило большую эффективность и по своему действию сопоставимо с препаратом сравнения (бензалкония хлоридом). Кроме того, для обоих изученных соединений наблюдался интересный эффект изменения специфичности в зависимости от времени воздействия. Данный эффект сохранялся даже в условиях усложнения эксперимента (введение нагрузки в виде БСА). Полученные результаты показали высокую активность исследуемых соединений (соответствуют критерию эффективности $RF \geq 3$). Кроме того, было наглядно продемонстрировано, что модель введения белкового загрязнения является полезным инструментом, способным повысить достоверность при исследовании эффективности антисептиков / дезинфектантов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовом обеспечении средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности № FZSM- 2022-0018.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: М.Н. Агафонова, Е.Д. Кобылинская, Е.С. Булатова — выполнение исследования дезинфицирующей активности; С.В. Сапожников, А.С. Биктимирова, Н.В. Штырлин, Ю.Г. Штырлин — синтез, характеристика и очистка изучаемых соединений.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The study was carried out with financial support from a subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment in the sphere of scientific activities (project number FZSM-2022-0018).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. M.N. Agafonova, E.D. Kobylinskaia, E.S. Bulatova — carrying out a study of disinfection activity; S.V. Sapozhnikov, A.S. Biktimirova, N.V. Shtyrlin, Yu.G. Shtyrlin — synthesis, characterization and purification of the studied compounds.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tischer M., Pradel G., Ohlsen K., Holzgrabe U. Quaternary Ammonium Salts and Their Antimicrobial Potential: Targets or Nonspecific Interactions? // *ChemMedChem*. 2012. Vol. 7, N 1. P. 22–31. doi: 10.1002/cmdc.201100404. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22113995/>
2. McDonell G., Russel A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance // *Clin Microbiol Rev*. 1999. Vol. 12, N 1. P. 147–179. doi: 10.1128/CMR.12.1.147 Erratum in: *Clin Microbiol Rev*. 2001. Vol. 14, N 1. P. 227. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9880479/>
3. Gerba C.P. Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application // *Appl Environ Microbiol*. 2015. Vol. 81, N 2. P. 464–469. doi: 10.1128/AEM.02633-14. Режим доступа: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.02633-14>
4. Pereira BMP, Tagkopoulos I. Benzalkonium chlorides: Uses, regulatory status, and microbial resistance // *Appl Environ Microbiol*. 2019. Vol. 85, N 13. P. e00377-19. doi: 10.1128/AEM.00377-19. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6581159/>
5. Thomas L., Russell A.D., Maillard J.-Y. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues // *J Appl Microbiol*. 2005. Vol. 98, N 3. P. 533–543. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02402.x. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15715855/>
6. BS EN 14885:2015 E Chemical disinfectants and antiseptics – Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics [интернет]. Режим доступа: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/1b75492a-aade-4295-9fcd-a376dd55f3ae/en-14885-2015>
7. Müller G., Kramer A. In vitro action of a combination of selected antimicrobial agents and chondroitin sulfate // *Chem Biol Interact*. 2000. Vol. 124, N 2. P. 77–85. doi: 10.1016/S0009-2797(99)00142-8. Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279799001428>
8. López-Rojasa R., Fernández-Cuenca F., Serrano-Rocha L., Pascual Á. In vitro activity of a polyhexanide-betaine solution against high-risk clones of multidrug-resistant nosocomial pathogens // *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017. Vol. 35, N 1. P. 12–19. doi: 10.1016/j.eimc.2016.02.008. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27004429/>

9. Koburger T., Hübner N.-O., Braun M., Siebert J., Kramer A. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate // *Antimicrob Chemother.* 2010. Vol. 65, N 8. P. 1712–1719. doi: 10.1093/jac/dkq212. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20551215/>
10. Shtyrlin N.V., Pugachev M.V., Sapozhnikov S.V., et al. Novel Bis-Ammonium Salts of Pyridoxine: Synthesis and Antimicrobial Properties // *Molecules.* 2020. Vol. 25, N 18. P. 4341. doi: 10.3390/molecules25184341. Режим доступа: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/18/4341>
11. EN 14885:2015 Chemical disinfectants and antiseptics — Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics [интернет]. Режим доступа: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/1b75492a-aade-4295-9fcd-a376dd55f3ae/en-14885-2015>
12. CSN EN 1499:2013 Chemical disinfectants and antiseptics — Hygienic handwash — Test method and requirements (phase 2/step 2) [интернет]. Режим доступа: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/7f7742a1-1f13-46d1-9e15-fddfd18ffe0/en-1499-2013>
13. EN 1500:1997 Chemical disinfectants and antiseptics — Hygienic handrub — Test method and requirements (phase 2/step 2) [интернет]. Режим доступа: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/f86b1705-62de-45fe-ac52-01d21161d73a/en-1500-1997>
14. BS EN 13697:2015 Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas – Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2) [интернет]. Режим доступа: <https://www.wfcascade.com/wp-content/uploads/2020/07/5605-13697-Holquat-60-seconds-4.pdf>
15. BS EN 13727+A2:2015 Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area— Test method and requirements (phase 2, step 1) [интернет]. Режим доступа: <https://www.en-standard.eu/bs-en-13727-2012-a2-2015-chemical-disinfectants-and-antiseptics-quantitative-suspension-test-for-the-evaluation-of-bactericidal-activity-in-the-medical-area-test-method-and-requirements-phase-2-step-1/>
16. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard.* 9th Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Режим доступа: https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf
17. EN 1040:1997 Chemical disinfectants and antiseptics – Basic bactericidal activity – Test method and requirements (phase 1). German version [интернет]. Режим доступа: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/7edfa93a-7b9f-4ee7-891c-87b46985f22c/en-1040-1997>
18. Kim H., Ryu J.-H., Beuchat Larry R. Effectiveness of Disinfectants in Killing *Enterobacter sakazakii* in Suspension, Dried on the Surface of Stainless Steel and in a Biofilm // *Appl Environ Microbiol.* 2007. Vol. 73, N 4. P. 1256–1265. doi: 10.1128/AEM.01766-06. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828648/>
19. Singh M., Sharma R., Gupta Pramod K., et al. Comparative efficacy evaluation of disinfectants routinely used in hospital practice: India // *Indian J Crit Care Med.* 2012. Vol. 16, N 3. P. 123–129. doi: 10.4103/0972-5229.102067. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23188950/>
20. Hedge A. Survival of *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* on Wood and Plastic Surfaces // *J Microb Biochem Technol.* 2015. Vol. 7, N 4. P. 210–212. doi: 10.4172/1948-5948.1000207. Режим доступа: <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/survival-of-escherichia-coli-pseudomona-aeruginosa-staphylococcus-aureus-on-wood-and-plastic-surfaces-1948-5948-1000207.pdf>
21. Wiegand C., Abel M., Ruth P., Elsner P., Hipler U.-C. pH Influence on Antibacterial Efficacy of Common Antiseptic Substances // *Skin Pharmacol Physiol.* 2015. Vol. 28, N 3. P.147–158. doi: 10.1159/000367632. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25614073/>

REFERENCES

1. Tischer M, Pradel G, Ohlsen K, Holzgrabe U. Quaternary Ammonium Salts and Their Antimicrobial Potential: Targets or Nonspecific Interactions? *ChemMedChem.* 2012;7(1):22–31. doi: 10.1002/cmdc.201100404. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22113995/>
2. McDonell G, Russel AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):147–179. doi: 10.1128/CMR.12.1.147 Erratum in: *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(1):227. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9880479/>

3. Gerba CP. Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(2):464–469. doi: 10.1128/AEM.02633-14. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.02633-14>
4. Pereira B.M.P., Tagkopoulos I. Benzalkonium chlorides: Uses, regulatory status, and microbial resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019;85(13):e00377-19. doi: 10.1128/AEM.00377-19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6581159/>
5. Thomas L, Russell AD, Maillard JY. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. *J Appl Microbiol.* 2005;98(3):533–543. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02402.x. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15715855/>
6. BS EN 14885:2015 E Chemical disinfectants and antiseptics — Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics [Internet]. Available from: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/1b75492a-aade-4295-9fcd-a376dd55f3ae/en-14885-2015>
7. Müller G, Kramer A. In vitro action of a combination of selected antimicrobial agents and chondroitin sulfate. *Chem Biol Interact.* 2000(2);124(2):77–85. doi: 10.1016/S0009-2797(99)00142-8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279799001428>
8. López-Rojasa R, Fernández-Cuenca F, Serrano-Rocha L, Pascual Á. In vitro activity of a polyhexanide-betaine solution against high-risk clones of multidrug-resistant nosocomial pathogens. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(1):12–19. doi: 10.1016/j.eimc.2016.02.008. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27004429/>
9. Koburger T, Hübner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1712–1719. doi: 10.1093/jac/dkq212. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20551215/>
10. Shtyrlin NV, Pugachev MV, Sapozhnikov SV, et al. Novel Bis-Ammonium Salts of Pyridoxine: Synthesis and Antimicrobial Properties. *Molecules.* 2020;25(18):4341. doi: 10.3390/molecules25184341. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/18/4341>
11. EN 14885:2015 Chemical disinfectants and antiseptics — Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics [Internet]. Available from: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/1b75492a-aade-4295-9fcd-a376dd55f3ae/en-14885-2015>
12. CSN EN 1499:2013 Chemical disinfectants and antiseptics — Hygienic handwash — Test method and requirements (phase 2/step 2) [Internet]. Available from: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/7f7742a1-1f13-46d1-9e15-fddfdcd18ffe0/en-1499-2013>
13. EN 1500:1997 Chemical disinfectants and antiseptics — Hygienic handrub — Test method and requirements (phase 2/step 2) [Internet]. Available from: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/f86b1705-62de-45fe-ac52-01d21161d73a/en-1500-1997>
14. BS EN 13697:2015 Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas — Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2) [Internet]. Available from: <https://www.wfascade.com/wp-content/uploads/2020/07/5605-13697-Holquat-60-seconds-4.pdf>
15. BS EN 13727+A2:2015 Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area— Test method and requirements (phase 2, step 1) [Internet]. Available from: <https://www.en-standard.eu/bs-en-13727-2012-a2-2015-chemical-disinfectants-and-antiseptics-quantitative-suspension-test-for-the-evaluation-of-bactericidal-activity-in-the-medical-area-test-method-and-requirements-phase-2-step-1/>
16. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard.* 9th Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. Available from: https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf
17. EN 1040:1997 Chemical disinfectants and antiseptics, Basic bactericidal activity-test method and requirements (phase 1). German version [Internet]. Available from: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/7edfa93a-7b9f-4ee7-891c-87b46985f22c/en-1040-1997>
18. Kim H, Ryu JH, Beuchat Larry R. Effectiveness of Disinfectants in Killing *Enterobacter sakazakii* in Suspension, Dried on the Surface of Stainless Steel and in a Biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(4):1256–1265. doi: 10.1128/AEM.01766-06. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828648/>
19. Singh M., Sharma R., Gupta Pramod K., Rana Jatinder K., Sharma M., and Taneja N. Comparative efficacy evaluation of disinfectants routinely used in hospital practice: India. *Indian J Crit*

Care Med. 2012;16(3):123–129. doi: 10.4103/0972-5229.102067. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23188950/>

20. Hedge A. Survival of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* on Wood and Plastic Surfaces. *J Microb Biochem Technol.* 2015;7(4):210–212. doi: 10.4172/1948-5948.1000207. Available from: <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/survival-of-escherichia-coli-pseudomonas-aeruginosa-staphylococcus-aureus-on-wood-and-plastic-surfaces-1948-5948-1000207.pdf>

Wiegand C, Abel M, Ruth P, Elsner P, Hipler UC. pH Influence on Antibacterial Efficacy of Common Antiseptic Substances. *Skin Pharmacol Physiol.* 2015;28(3):147–158. doi: 10.1159/000367632. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25614073/>

Accepted for publication

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Величины коэффициента редукции для исследуемых соединений и препарата сравнения в отношении *Staphylococcus aureus* при различных концентрациях и времени инкубации**Table 1.** Microbicidal effect (the logarithmic reduction factors) against *Staphylococcus aureus* at different concentrations and exposure times

Исследуемые соединения	Время инкубации, мин					
	1		5		15	
	– БСА	+ БСА	– БСА	+ БСА	– БСА	+ БСА
Бензалкония хлорид, 0,1%*	5,49±0,11	3,77±0,07	5,51±0,1	4,84±0,21	6,58±0,14	4,92±0,12
Бензалкония хлорид, 0,2%**	6,41±0,12	4,19±0,14	7,41±0,11	5,81±0,15	7,41±0,10	6,49±0,22
Соединение 1, 0,1%*	4,08±0,14	3,04±0,16	5,24±0,12	4,78±0,18	6,42±0,12	4,44±0,12
Соединение 1, 0,2%**	5,26±0,11	4,12±0,14	6,98±0,11	5,62±0,14	7,41±0,14	6,52±0,16
Соединение 2, 0,1%*	4,15±0,14	3,46±0,14	4,64±0,12	4,12±0,15	6,34±0,15	4,78±0,14
Соединение 2, 0,2%**	5,32±0,12	4,07±0,14	6,14±0,12	4,98±0,14	7,41±0,12	6,38±0,16

* lg КОЕ в контроле — 9,00. ** lg КОЕ в контроле — 7,41.

* lg of CFUs in the inoculum — 9,00. ** lg of CFUs in the inoculum — 7,41.

Таблица 2. Величины коэффициента редукции для исследуемых соединений и препарата сравнения в отношении *Escherichia coli* при различных концентрациях и времени инкубации**Table 2.** Microbicidal effect (the logarithmic reduction factors) against *Escherichia coli* at different concentrations and exposure times

Исследуемые соединения	Время инкубации, мин					
	1		5		15	
	– БСА	+ БСА	– БСА	+ БСА	– БСА	+ БСА
Бензалкония хлорид, 0,1%*	3,62±0,18	3,44±0,18	4,92±0,20	3,93±0,18	8,16±0,22	5,38±0,14
Бензалкония хлорид, 0,2%**	5,97±0,12	4,61±0,15	8,09±0,11	6,01±0,12	8,09±0,12	8,09±0,21
Соединение 1, 0,1%*	3,25±0,16	3,03±0,16	4,12±0,18	3,44±0,14	8,16±0,14	5,04±0,16
Соединение 1, 0,2%**	5,33±0,14	4,28±0,12	8,09±0,12	5,32±0,15	8,09±0,14	8,09±0,12
Соединение 2, 0,1%*	3,15±0,18	3,00±0,16	3,92±0,16	3,04±0,11	8,16±0,18	4,96±0,18
Соединение 2, 0,2%**	4,63±0,15	3,85±0,14	8,09±0,12	4,89±0,14	8,09±0,14	8,09±0,12

* lg в контроле — 8,16. ** lg КОЕ в контроле — 8,09.

* lg of CFUs in the inoculum — 8,16. ** lg of CFUs in the inoculum — 8,09.

ОБ АВТОРАХ	AUTHORS' INFO
* Агафонова Мария Николаевна , канд. хим. наук; адрес: Россия, 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18; ORCID: 0000-0001-5286-4116; eLibrary SPIN: 9019-9731; e-mail: Mariya.Agafonova@kpfu.ru	* Mariya N. Agafonova ; Cand. Sci. (Chemistry); address: 18 Kremlevskaya street, 420008 Kazan, Russia; ORCID: 0000-0001-5286-4116; eLibrary SPIN: 9019-9731; e-mail: Mariya.Agafonova@kpfu.ru
Булатова Елена Сергеевна ; ORCID: 0000-0003-1529-1018; eLibrary SPIN: 8678-3777; e-mail: elena_krylova.stud2015@mail.ru	Elena S. Bulatova ; ORCID: 0000-0003-1529-1018; eLibrary SPIN: 8678-3777; e-mail: elena_krylova.stud2015@mail.ru
Сапожников Сергей Витальевич , канд. хим. наук; ORCID: 0000-0003-2864-5620; eLibrary SPIN: 1648-2576; e-mail: sapozhnikovsergei@gmail.com	Sergey V. Sapozhnikov ; Cand. Sci. (Chemistry); ORCID: 0000-0003-2864-5620; eLibrary SPIN: 1648-2576; e-mail: sapozhnikovsergei@gmail.com
Биктимирова Алина Сергеевна ; ORCID: 0009-0008-2937-9882; eLibrary SPIN: 9717-0221; e-mail: yandimirova2016@mail.ru	Alina S. Biktimirova ; ORCID: 0009-0008-2937-9882; eLibrary SPIN: 9717-0221; e-mail: yandimirova2016@mail.ru
Кобылинская Елизавета Дмитриевна ; ORCID: 0009-0002-5982-6459; eLibrary SPIN: 1648-2576; e-mail: EDKobylinskaya@stud.kpfu.ru	Elizaveta D. Kobylinskaia ; ORCID: 0009-0002-5982-6459; eLibrary SPIN: 1648-2576; e-mail: EDKobylinskaya@stud.kpfu.ru
Штырлин Никита Валерьевич , канд. хим. наук; ORCID: 0000-0001-7926-5121; eLibrary SPIN: 7270-0800; e-mail: Nikita.Shtyrilin@kpfu.ru	Nikita V. Shtyrilin ; Cand. Sci. (Chemistry); ORCID: 0000-0001-7926-5121; eLibrary SPIN: 7270-0800; e-mail: Nikita.Shtyrilin@kpfu.ru
Штырлин Юрий Григорьевич , д-р хим. наук; ORCID: 0000-0002-2777-719X; eLibrary SPIN: 9316-4418; e-mail: Yuri.Shtyrilin@kpfu.ru	Yurii G. Shtyrilin ; Dr. Sci. (Chemistry); ORCID: 0000-0002-2777-719X; eLibrary SPIN: 9316-4418; e-mail: Yuri.Shtyrilin@kpfu.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author