



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72218** (13) **U**
(51) МПК

G01N 15/08 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/36 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 01218	(72) Винахідник(и): Поліщук Олена Іванівна (UA), Брич Оксана Іванівна (UA), Колесніков Михайло Михайлович (UA), Синетар Едіта Олександрівна (UA), Приходько Тетяна Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.02.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2012, Бюл.№ 15	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ІМ. Л. В. ГРОМАШЕВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. М. Амосова, 5, м. Київ, 03038 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ БАКТЕРІОПРОНИКНОСТІ НЕТКАНИХ МАТЕРІАЛІВ

(57) Реферат:

Спосіб визначення бактеріопроникності нетканих матеріалів включає посів культур бактерій, інкубацію посівів у термостаті, розрахунок обсіменіння поверхні матеріалу. Також виконують відбір еталонних культур бактерій, вирощують відібрані еталонні культури бактерій на поживних середовищах, готують завись у фізіологічному розчині, наносять завись на зразок нетканого матеріалу, підсушують зразок нетканого матеріалу з нанесеною зависсю, здійснюють посів шляхом відбитку нижньої поверхні зразка нетканого матеріалу на поверхню поживного середовища, посіви інкубують в термостаті, визначають ступінь бактеріопроникності.

UA 72218 U

Корисна модель належить до медичної мікробіології і може використовуватися для проведення діагностичних та наукових досліджень.

Відомі складні способи визначення мікробного обсіменіння нетканних матеріалів (НМ) із застосуванням спеціальних комерційних тестів та апаратури (електронного мікроскопа) [2]. У вітчизняній практиці відомий так званий "пелюшковий тест" [1]. Контролю підлягає внутрішня частина пелюшки, яка дотикалася до шкіри живота дитини і не забруднена випорожненнями. Змив внутрішньої поверхні тканини здійснюється за допомогою ватного тампона, змоченого стерильним фізіологічним розчином (5 см^3 у пробірці) з площі 50 см^2 ($7,1 \times 7,1$), після чого тампон занурюють в ту саму пробірку з фізіологічним розчином, змив струшують протягом 10 хвилин, потім змивну рідину засівають по $0,1 \text{ см}^3$ на тверді поживні середовища. Посіви інкубують в термостаті при температурі 37°C . Розрахунок обсіменіння внутрішньої пелюшки проводиться на 50 см поверхні. Така методика дає можливість отримати тільки орієнтовні результати ступеня обсіменіння та кількісних співвідношень виділених мікроорганізмів на матеріалі, що контактує зі шкірою людини.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки способу визначення ступеня обсіменіння внутрішньої поверхні нетканних матеріалів бактеріями, що були нанесені на зовнішню поверхню цих матеріалів для аналізу бар'єрних властивостей матеріалів та виробів з них.

Поставлена задача вирішується у способі визначення бактеріопроникності нетканних матеріалів, який включає посів культур бактерій, інкубацію посівів у термостаті при температурі 37°C , розрахунок обсіменіння поверхні матеріалу. Новим є те, що виконують відбір еталонних культур бактерій; вирощують відібрані еталонні культури бактерій на поживних середовищах; готують завись в діапазоні концентрацій бактерій 10^3 - 10^6 КУО/мл у фізіологічному розчині в об'ємі 2 см^3 ; наносять завись в кількості $0,3 \text{ см}^3$ на зразок нетканого матеріалу; підсушують зразок нетканого матеріалу з нанесеною зависсю протягом 3 годин при кімнатній температурі; здійснюють посів шляхом відбитку нижньої поверхні зразка нетканого матеріалу на поверхню поживного середовища; посіви інкубують в термостаті при 37°C протягом 24-48 годин, визначають ступінь бактеріопроникності за кількісною характеристикою росту індикаторних бактерій шляхом підрахунку кількості КУО за формулою:

$$\text{КУО} = X_k \cdot 20^3,$$

де X_k - кількість колоній,

КУО - колонієутворююча одиниця,

та при кількості КУО 10^3 та більше роблять висновок про високий ступінь бактеріопроникності нетканого матеріалу, при КУО 10 - 10^2 роблять висновок про помірний ступінь бактеріопроникності нетканого матеріалу.

Визначення бактеріопроникності зразків нетканних матеріалів різної щільності проводять з використанням еталонних тест-мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 і *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Культури вказаних видів мікроорганізмів вирощують на середовищах (МПА або Мюллер-Хінтон), готують завись у стерильному фізіологічному розчині (2 см^3) з використанням приладу денситометру DENSIMAT за стандартом оптичної густини бактеріальних зависей McFarland $0,5$ з подальшим серійним розведенням до концентрацій: 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 КУО/мл.

Дослідженню підлягають внесені у стерильні маркіровані чашки Петрі зразки (кожний площею 36 см^2) окремо взятого виду нетканних матеріалів, на зовнішню поверхню яких наносять кожену приготовлену концентрацію відібраних тест-мікроорганізмів (в кількості $0,3 \text{ см}^3$). В якості матеріалу для порівняння використовують бавовняну тканину, артикул 262, яку досліджують аналогічним способом.

Змочені різними концентраціями тест-штамів, зразки витримують при температурі 24°C для підсушування. Через 3 години інкубації здійснюють посів досліджуваних зразків шляхом відбитку їх нижньої поверхні на відповідні поживні середовища (жовтково-сольовий агар, ентерокоагар, агар Ендо, середовище Мюллер-Хінтон). Посіви інкубують в термостаті при 37°C протягом 24 годин. Термін інкубації для *S.aureus* 48 годин. Дослідження супроводжують контрольними висівами приготовлених концентрацій тест-мікроорганізмів на відповідні поживні середовища.

Оцінку результатів здійснювали на другу добу у разі наявного росту індикаторних мікроорганізмів шляхом їх кількісного обліку.

Для розрахунку кількості КУО на чашці на весь об'єм мікробної зависі, кількість колоній кожного типу множать на 20 і на 3.

Наприклад: $120 \text{ колоній} \times 20 \times 3 = 7,2 \times 10^3 \text{ КУО}$.

Визначення ступеня бактеріопроникності базується на принципі розподілу результатів бактеріологічних досліджень за кількісною характеристикою обсіменіння індикаторних мікроорганізмів.

Помірний ступінь бактеріопроникності характеризується виділенням індикаторних мікроорганізмів в невеликих кількостях (10^1 - 10^2).

Високим ступенем бактеріопроникності вважають виявлення одного або декількох індикаторних мікроорганізмів у кількості 10^3 КУО і більше на 36 см^2 нижньої поверхні досліджуваного зразка.

Приклад 1. Результати використання способу.

Таблиця 1

Результати бактеріопроникності зразків
нетканних матеріалів до тест-мікроорганізмів *Staphylococcus aureus*

Вид зразка нетканних матеріалів	Щільність зразка, г/м^2	Кількість прохідних мікроорганізмів (КУО) при нанесенні концентрації мікробної зависі <i>S.aureus</i>				
		10^3	10^4	10^5	10^6	
					Поверхня зразка	
					внутрішня	зовнішня
СММС	20	р/в	р/в	60	$2,4 \times 10^2$	р/в
СМС	30	р/в	р/в	р/в	60	р/в
СМС	35	р/в	р/в	р/в	$1,2 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$
Спанбонд	30	60	$1,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	60
Спанлейс	50	р/в	р/в	$1,2 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	60
Бавовняна тканина	Арт. 262	р/в	р/в	р/в	р/в	$2,1 \times 10^3$
Контрольний висів мікробної зависі <i>S.aureus</i> на жовтково-сольовий агар		50	3×10^2	4×10^3	6×10^4	

Примітка: р/в - ріст відсутній

Таблиця 2

Результати бактеріопроникності зразків
нетканних матеріалів до тест-мікроорганізмів *Enterococcus faecalis*

Вид зразка нетканних матеріалів	Щільність зразка, г/м^2	Кількість прохідних мікроорганізмів (КУО) при нанесенні концентрації мікробної зависі <i>E.faecalis</i>				
		10^3	10^4	10^5	10^6	
					Поверхня зразка	
					внутрішня	зовнішня
СММС	20	р/в	р/в	$1,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$
СМС	30	р/в	р/в	р/в	р/в	$1,2 \times 10^4$
СМС	35	р/в	р/в	р/в	р/в	$1,4 \times 10^4$
Спанбонд	30	р/в	р/в	р/в	р/в	$1,5 \times 10^4$
Спанлейс	50	р/в	р/в	$1,4 \times 10^3$	9×10^3	$3,6 \times 10^4$
Бавовняна тканина	Арт. 262	р/в	р/в	р/в	60	3×10^3
Контрольний висів мікробної зависі <i>E.faecalis</i> на ентерококагар		30	4×10^2	6×10^3	9×10^4	

Примітка: р/в - ріст відсутній

Таблиця 3

Результати бактеріопроникності зразків
нетканих матеріалів до тест-мікроорганізмів *Escherichia coli*

Вид зразка нетканих матеріалів	Щільність зразка, г/м ²	Кількість прохідних мікроорганізмів (КУО) при нанесенні концентрації мікробної зависі <i>E.coli</i>				
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
					Поверхня зразка	
					внутрішня	зовнішня
СММС	20	р/в	р/в	р/в	р/в	р/в
СМС	30	р/в	р/в	р/в	р/в	р/в
СМС	35	р/в	р/в	р/в	1,1 × 10 ⁴	4,8 × 10 ⁴
Спанбонд	30	р/в	р/в	р/в	р/в	3,6 × 10 ³
Спанлейс	50	р/в	р/в	р/в	6 × 10 ²	6 × 10 ²
Бавовняна тканина	Арт. 262	р/в	1,2 × 10 ³	2,4 × 10 ³	4,8 × 10 ³	9 × 10 ³
Контрольний висів мікробної зависі <i>E.coli</i> на агар Ендо		50	3 × 10 ²	4 × 10 ³	8 × 10 ⁴	

Примітка: р/в - ріст відсутній

Таблиця 4

Результати бактеріопроникності зразків
нетканих матеріалів до тест-мікроорганізмів *Pseudomonas aeruginosa*

Вид зразка нетканих матеріалів	Щільність зразка, г/м ²	Кількість прохідних мікроорганізмів (КУО) при нанесенні концентрації мікробної зависі <i>P.aeruginosa</i>				
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
					Поверхня зразка	
					внутрішня	зовнішня
СММС	20	2,4 × 10 ³	5,8 × 10 ³	9,6 × 10 ³	1,8 × 10 ⁴	1,2 × 10 ⁵
СМС	30	3,6 × 10 ²	7,2 × 10 ²	3 × 10 ³	7,2 × 10 ³	р/в
СМС	35	р/в	р/в	р/в	3,6 × 10 ³	р/в
Спанбонд	30	2,3 × 10 ³	8,4 × 10 ³	1,1 × 10 ⁴	1,8 × 10 ⁴	1,2 × 10 ⁴
Спанлейс	50	60	1,4 × 10 ³	3,3 × 10 ³	3,6 × 10 ³	1,1 × 10 ⁴
Бавовняна тканина	Арт. 262	1,2 × 10 ²	4,8 × 10 ²	9 × 10 ³	1,9 × 10 ⁴	7,2 × 10 ³
Контрольний висів мікробної зависі <i>P.aeruginosa</i> на агар Мюллер-Хінтон		80	6 × 10 ²	2 × 10 ³	1,2 × 10 ⁴	

Примітка: р/в - ріст відсутній

Таблиця 5

Результати бактеріопроникності зразків
нетканих матеріалів до тест-мікроорганізмів *Staphylococcus aureus*

Вид зразка нетканих матеріалів	Щільність зразка, г/м ²	Кількість прохідних мікроорганізмів (КУО) при нанесенні концентрації мікробної зависі <i>S.aureus</i>				
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
					Поверхня зразка	
					внутрішня	зовнішня
Ламінований спанбонд	45	р/в	р/в	р/в	р/в	1,2 × 10 ³
Спанлейс	68	р/в	р/в	р/в	1,2 × 10 ²	1,2 × 10 ²
Ламінований спанлейс	70	р/в	р/в	р/в	р/в	1,8 × 10 ²
Контрольний висів мікробної зависі <i>S.aureus</i> на ЖСА		50	3 × 10 ²	4 × 10 ³	6 × 10 ⁴	

Таблиця 6

Результати бактеріопроникності зразків
нетканих матеріалів до тест-мікроорганізмів *Enterococcus faecalis*

Вид зразка нетканих матеріалів	Щільність зразка, г/м ²	Кількість прохідних мікроорганізмів (КУО) при нанесенні концентрації мікробної зависі <i>E.faecalis</i>				
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
					Поверхня зразка	
					внутрішня	зовнішня
Ламінований спанбонд	45	р/в	р/в	р/в	р/в	5,4 × 10 ³
Спанлейс	68	р/в	р/в	р/в	р/в	5,4 × 10 ³
Ламінований спанлейс	70	р/в	р/в	р/в	р/в	3,6 × 10 ³
Контрольний висів мікробної зависі <i>E.faecalis</i> на ентерокоагар		30	4 × 10 ²	6 × 10 ³	9 × 10 ⁴	

Таблиця 7

Результати бактеріопроникності зразків
нетканих матеріалів до тест-мікроорганізмів *Escherichia coli*

Вид зразка нетканих матеріалів	Щільність зразка, г/м ²	Кількість прохідних мікроорганізмів (КУО) при нанесенні концентрації мікробної зависі <i>E.coli</i>				
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
					Поверхня зразка	
					внутрішня	зовнішня
Ламінований спанбонд	45	р/в	р/в	р/в	р/в	р/в
Спанлейс	68	р/в	р/в	р/в	р/в	р/в
Ламінований спанлейс	70	р/в	р/в	р/в	р/в	р/в
Контрольний висів мікробної зависі <i>E.coli</i> на агар Ендо		50	3 × 10 ²	4 × 10 ³	8 × 10 ⁴	

Таблиця 8

Результати бактеріопроникності зразків
нетканих матеріалів до тест-мікроорганізмів *Pseudomonas aeruginosa*

Вид зразка нетканих матеріалів	Щільність зразка, г/м ²	Кількість прохідних мікроорганізмів (КУО) при нанесенні концентрації мікробної зависі <i>P.aeruginosa</i>				
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
					Поверхня зразка	
					внутрішня	зовнішня
Ламінований спанбонд	45	р/в	р/в	р/в	р/в	1,8 × 10 ⁴
Спанлейс	68	р/в	р/в	р/в	р/в	7,2 × 10 ²
Ламінований спанлейс	70	р/в	р/в	р/в	р/в	4,8 × 10 ³
Контрольний висів мікробної зависі <i>P.aeruginosa</i> на агар Мюллер-Хінтон		80	6 × 10 ²	2 × 10 ³	1,2 × 10 ⁴	

Примітка: р/в - ріст відсутній

З наведених прикладів проведених визначень бар'єрних властивостей окремих різновидів НМ, а саме СМС, СММС, Спанбонду та Спанлейсу певної щільності для різних видів мікроорганізмів можна зробити висновки про те, що бактеріопроникність збільшується паралельно із зростанням вихідної концентрації нанесених на поверхню НМ мікроорганізмів. Так, при концентраціях 10³ та 10⁴ КУО/мл практично всі види НМ, окрім Спанбонду, виявились непроникними для стафілококів, ентерококів та кишкових паличок. Спанбонд був проникним для стафілококу, при цьому вихідна концентрація знижувалась на 1-2 порядки у (10-100 разів). Найвищу бактеріопроникність продемонстрували всі досліджені НМ щодо бактерій *Pseudomonas aeruginosa* навіть при цих невисоких вихідних концентраціях мікроорганізмів, які після нанесення на СМС, СММС та Спанлейс знижувались на 1-2 порядки. Водночас, Спанбонд практично не затримував проникність бактерій *P.aeruginosa*, що виражалось у відсутності суттєвої різниці між концентраціями мікробів до та після нанесення на Спанбонд.

У разі нанесення на поверхню НМ суспензій мікроорганізмів у концентраціях 10⁵-10⁶ КУО/мл матеріали знижували кількість бактерій на 1-4 порядки (від 10 до 10000 разів). Найменшу біопроникність при застосованих концентраціях виявив СМС, найбільшу - Спанбонд. Щодо окремих видів мікроорганізмів, то найбільш ефективними НМ виявились по відношенню до кишкових паличок та ентерококів, найменш ефективними - до синьогнійних бактерій.

Отримані дані, які стосуються різниці у кількості мікроорганізмів на зовнішній та внутрішній поверхнях зразків НМ, з одного боку вказують, що досліджені матеріали мають вкрай низьку бактеріопроникність навіть при застосуванні високих концентрацій мікроорганізмів (в реальних умовах такі концентрації можуть бути в деяких видах біологічного матеріалу від пацієнтів). З іншого боку, кількість мікроорганізмів на поверхні на 2-3 порядки менше порівняно з нанесеною концентрацією та відсутність бактерій на внутрішній поверхні дозволяють припустити, що певна частина мікробів проникає та затримується у внутрішніх шарах досліджених зразків НМ.

В результаті проведених досліджень встановлено низькі показники бактеріопроникності у видів СММС, СМС, Спанлейс різної щільності. Виявлений вищий ступінь проникності у зразків Спанбонд може бути пов'язаний зі структурою матеріалу та біологічними характеристиками певних видів мікроорганізмів (рухливість, властива бактеріям *E.coli* та *P.aeruginosa*).

Таким чином, запропонований спосіб визначення бактеріопроникності нетканих матеріалів не складний у застосуванні, дає можливість встановити бар'єрні, бактеріостатичні та бактерицидні властивості нетканих матеріалів, призначених для виготовлення медичних виробів одноразового використання.

Джерела інформації:

1. Наказ Міністерства охорони здоров'я України № 59 від 10.02.2003 "Про удосконалення заходів щодо профілактики внутрішньолікарняних інфекцій в пологових будинках (акушерських стаціонарах). - С. 53-54.

2. Antimicrobial techniques for medical nonwovens: a case study // W. Curtis White, Dr. Jerry M. Olderman. - USA.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб визначення бактеріопроникності нетканих матеріалів, який включає посів культур бактерій, інкубацію посівів у термостаті при температурі 37 °С, розрахунок обсіменіння поверхні матеріалу, який **відрізняється** тим, що виконують відбір еталонних культур бактерій; вирощують відібрані еталонні культури бактерій на поживних середовищах; готують завись в діапазоні концентрацій бактерій 10^3 - 10^6 КУО/мл у фізіологічному розчині в об'ємі 2 см³; наносять завись в кількості 0,3 см на зразок нетканого матеріалу; підсушують зразок нетканого матеріалу з нанесеною зависсю протягом 3 годин при кімнатній температурі; здійснюють посів шляхом відбитку нижньої поверхні зразка нетканого матеріалу на поверхню поживного середовища; посіви інкубують в термостаті при температурі 37 °С протягом 24-48 годин, визначають ступінь бактеріопроникності за кількісною характеристикою росту індикаторних бактерій шляхом підрахунку кількості КУО за формулою:
- $$КУО = X_k \cdot 20 \cdot 3,$$
- де X_k - кількість колоній,
 КУО - колонієутворююча одиниця,
 та при кількості КУО 10^3 та більше роблять висновок про високий ступінь бактеріопроникності нетканого матеріалу, при КУО 10 - 10^2 роблять висновок про помірний ступінь бактеріопроникності нетканого матеріалу.

 Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

 Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601