



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 96290

(13) C2

(51) МПК (2011.01)  
A62B 27/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ І ПРИСТРІЙ ТЕСТУВАННЯ ДЛЯ ОЦІНЮВАННЯ ЗАХИСТУ ЗАСОБАМИ ІНДИВІДУАЛЬНОГО ЗАХИСТУ ВІД БІОЛОГІЧНИХ РЕЧОВИН

1

2

(21) а200813043

(22) 03.04.2007

(24) 25.10.2011

(86) PCT/IT2007/000250, 03.04.2007

(31) PS2006A000008

(32) 12.04.2006

(33) IT

(46) 25.10.2011, Бюл.№ 20, 2011 р.

(72) ЧЕРБІНІ СТЕФАНО, IT

(73) КЛ. КОМ С.Р.Л., IT

(56) US 6435009, 20.08.2002

WO 88/08526, 03.11.1988

DD 264855, 15.02.1989

(57) 1. Спосіб тестування для оцінювання захисту засобами індивідуального захисту (ЗІЗ) дихального тракту від біологічних речовин, який **відрізняється** тим, що виробляють контрольний аерозоль мікроорганізмів за допомогою генератора (а) вірусного або бактеріального аерозолу і направляють аерозоль у випробувальну камеру (b), всередині якої знаходиться голова Шефільда, на яку надітий ЗІЗ, причому випробувальна камера сполучена з дихальним апаратом (с) і з всмоктувальною системою (d) для взяття проб, при цьому повітря всередині випробувальної камери вдихається головою Шефільда через дихальний апарат, який імітує справжнє дихання, регулюючи частоту вдиху/видиху, і голова Шефільда модифікована для спрямовування в автоматичний дихальний апарат повітря, що вдихається через рото-носову область, і повітря, що видихається через задню частину голови, причому система всмоктування направляє проби повітря, взяті в різних точках, до декількох барботерів, щоб розрахувати мікробні концентрації в повітрі всередині камери (білий тест) і в повітрі, яке проходить через ЗІЗ (контрольний тест), при цьому обидва тести, і білий тест, і контрольний тест, проводять одночасно за допомогою барботажу через дві роздільні трубки дисперсії біологічних речовин у випробувальній камері і проби повітря, яке проходить через ЗІЗ, протягом визначеного періоду часу і при постійному потоці, в розчині, що має і потрібний склад, і потрібний показник рН, а

в кінці тесту розчини, що містяться в барботерах, переносять у відповідні стерильні контейнери і

потім визначають кількість мікроорганізмів, при цьому

коефіцієнт мікроорганізмів, затриманих ЗІЗ, визначають таким чином:

% (процент затриманих мікроорганізмів) =  $100 - (Na / Nv \times 100)$ ,

де:

Nv - концентрація контрольного мікроорганізму в аерозолі всередині випробувальної камери (білий тест),

Na - концентрація контрольного мікроорганізму нижче фільтрувальної лицьової маски (контрольний зразок).

2. Спосіб за п. 1, в якому суспензію відомої кількості мікроорганізмів подають за допомогою перистальтичного насоса (1) в розпилювач (2), в якому стиснуте повітря, проходячи через трубку розпилення (3), створює аерозоль, при цьому аерозоль подають в трубку зневоднення (4), де аерозоль змішується з сухим стиснутим повітрям, яке надходить окремо з лінії потоку (5); краплі мікробного аерозолу, що потрапляють в трубку зневоднення, швидко випаровуються і рухаються у випробувальну камеру постійним потоком, при цьому

випробувальна камера складається з герметично закритого контейнера (6), що має герметичні стінки, з прокладками, одна з яких може бути відкрита для роботи операторів, а

голову Шефільда (7) вміщують в герметичний контейнер і з'єднують з'єднувальною трубкою з автоматичним дихальним апаратом і з трубкою для відбирання проб повітря, що міститься у випробувальній камері, і повітря, що проходить через ЗІЗ, причому

пристрій дихального апарата виконаний з насоса з можливістю регулювання частоти дихання як звичайного дихання людини, а

всмоктувальна система всмоктує дисперсію мікроорганізмів у випробувальну камеру для визначення їх кількості; при цьому всмоктування відбувається через вакуумний насос (8), який здійснює відбирання на постійному потоці, який контролюється регуляторами потоку (9), причому

обидва тести, і білий тест, і тест проби, проводять одночасно двома окремими лініями за допомогою

(13) C2

(11) 96290

(19) UA

барботажу дисперсій мікроорганізмів у відповідному і з контрольованим значенням рН розчині, при цьому

дисперсію для білого тесту беруть з випробувальної камери через першу всмоктувальну лінію (10) і барботують в першому стерилізованому скляному барботері (11), а

дисперсію для контрольного тесту беруть з повітря, що проходить через 3ІЗ, за допомогою другої всмоктувальної трубки (12), і барботують у другому стерилізованому скляному барботері (13), при цьому

в кінці тесту барботери від'єднують, розчини відправляють в стерильні контейнери, і здійснюють визначення кількості мікроорганізмів в розчинах.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що у випробувальній камері стінки виконують з Лексану, одна з них має складану систему відкривання/закривання; голову Шефільда забезпечують додатковим обладнанням, що має три концентричні трубки, дві з яких з'єднують з автоматичним дихальним апаратом, а третя, сполучена з системою всмоктування, збирає повітря, яке пройшло через 3ІЗ на рото-носовому рівні голови; і ще однією трубкою, четвертою, сполученою з всмоктувальною системою, яка розміщена на рівні правого ока і забирає повітря, що міститься у випробувальній камері; причому дихальний апарат складається з поршневого насоса, клапанів і перетворювача, який регулює швидкість вдиху/видиху.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що частота дихання знаходиться в межах 20-40 циклів/хвилину, об'єм повітря знаходиться між 1,5 і 3,5 літрами за цикл, а систему всмоктування вмикають через декілька хвилин після того, як ввімкнений генератор аерозолі, щоб випробувальна камера була заповнена однорідно.

5. Пристрій для оцінювання захисту від біологічних речовин засобів індивідуального захисту дихального тракту, який **відрізняється** тим, що має генератор вірусного і/або бактеріального аерозолі, випробувальну камеру, що містить голову Шефільда; дихальний апарат, що імітує дихання і регулює частоту вдиху і видиху; систему всмоктування, що доставляє зразки повітря, взятого в різних точках, до барботерів для визначення вірусної і/або бактеріальної концентрації; при цьому голова Шефільда сполучена з'єднувальними трубками з автоматичним дихальним апаратом для вдиху і видиху повітря через рото-носову об-

ласть і з трубками для відбирання повітря, що міститься у випробувальній камері, і повітря, що проходить через 3ІЗ.

6. Пристрій за п. 5, який **відрізняється** тим, що генератор аерозолі містить насос, трубопровід розпилення, розпилювач, трубку зневоднення і трубопровід; причому випробувальна камера складається з герметично закритого контейнера з головою Шефільда, забезпеченою трубками, що з'єднуються з автоматичним дихальним апаратом, і з трубками для відбирання проб повітря, що міститься у випробувальній камері, і повітря, що проходить через 3ІЗ, при цьому

обладнання дихального апарата складається з насоса і регулює швидкість вдиху/видиху; система всмоктування складається з вакуумного насоса, регуляторів потоку, лінії всмоктування з барботером для білого тесту, лінії всмоктування з барботером для контрольного тесту.

7. Пристрій за п. 5, в якому голова Шефільда поміщена у випробувальній камері, виконаний з Лексану, і забезпечена обладнанням, що має три концентричні трубки, дві з яких сполучені з автоматичним дихальним апаратом, а третя збирає повітря, яке пройшло через 3ІЗ на рото-носовому рівні голови; ще одна трубка, четверта, розміщена на рівні правого ока і забирає повітря, що міститься у випробувальній камері; причому дихальний апарат складається з насоса, клапанів і перетворювача, який регулює швидкість вдиху/видиху.

8. Застосування голови Шефільда, виконаної відповідно до п. 7, для оцінювання захисту засобу індивідуального захисту дихального тракту від біологічних речовин.

9. Застосування поршневого насоса, доповненого перетворювачем для імітації дихання, в оцінці захисту засобом індивідуального захисту дихального тракту від біологічних речовин.

10. Спосіб за п. 1 для оцінювання захисту засобом індивідуального захисту дихального тракту від вірусних речовин.

11. Спосіб за п. 1 для оцінювання захисту засобом індивідуального захисту дихального тракту від бактеріальних речовин.

12. Спосіб за п. 2, в якому приготування суспензій мікроорганізмів здійснюють будь-яким способом, відомим для цього застосування.

13. Спосіб за п. 1, в якому визначення кількості мікроорганізмів здійснюють будь-яким способом, відомим для цього застосування.

Даний винахід стосується способу тестування засобів індивідуального захисту для дихального тракту для оцінювання захисту від біологічних речовин, в якому використовується різне обладнання для відтворення реального використання засобів захисту.

Існує багато способів перевірки для оцінювання ефективності засобів захисту дихального тракту і, зокрема, для підрахунку внутрішніх втрат герметизації (Європейський стандарт EN 13274-1) і ди-

хального опору (Європейський стандарт EN 13274-3).

Як відомо, існує також множина способів розрахунку ефективності видалення вірусу фільтрувальними матеріалами, використовуваними як фільтрувальні мембрани в лабораторіях, в фармацевтичній промисловості або в пристроях для медичних цілей. Ці методики/методології використовують нешкідливе аерозольне контрольне зараження і бактеріофаги.

Приклад такого способу наведений в статті "Ефективність складчастого гідрофобного фільтра як бар'єра для передачі в дихальній системі *Mycobacterium Tuberculosis*" "Efficacy of a pleated hydrofobic filter as a barrier to *Mycobacterium Tuberculosis* transmission within breathing systems»» (Speigh S. i ін. Centre for Applied Microbiology & Research-Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, UK).

Однак, всі ці способи ніколи не застосовувалися до засобів захисту для дихального тракту: фактично до цього часу було неможливо перевірити ефективність видалення бактерій та вірусів безпосередньо на засобах індивідуального захисту під час імітації дихання і реального застосування на обличчі користувача.

Для визначення ефективності захисту засобів індивідуального захисту (як фільтри для цілих лицьових масок, напівмасок, фільтрувальних лицьових масок і т. д.) від біологічних речовин, таких як бактерії і віруси, завжди застосовувалися аналітичні методики з використанням пілоподібних препаратів і/або різного роду хімічних аерозолів, одержаних з неживих субстратів.

Однак, всі ці способи перевірки не є репрезентативними ні відносно поведінки мікробіологічної речовини, ні відносно її властивостей проникати через бар'єр, яким є засіб захисту для дихального тракту.

Даний винахід належить до нового способу тестування для оцінювання захисту від біологічних речовин Засобів Індивідуального Захисту (ЗІЗ) дихального тракту, який відрізняється тим, що використовується різне обладнання для відтворення використання ЗІЗ, імітуючи дихання через голову Шефілда (прим, перекладача - можливо, ідіоматична назва випробувального манекена) і автоматичний дихальний апарат.

Конкретним варіантом здійснення даного винаходу є пристрій, який загалом використовується для оцінювання захисних властивостей ЗІЗ від біологічних речовин, також як і використання голови Шефілда і автоматичного дихального апарата для оцінювання захисних властивостей ЗІЗ від біологічних речовин.

На Фіг.1 - представлена схема використовуваного пристрою.

Пристрій складається з:

- а) генератора вірусного і/або бактеріального аерозолі,
- б) випробувальної камери, що містить голову Шефілда,
- с) дихального апарата, який імітує дихання і регулює частоту вдиху і видиху,
- д) системи всмоктування, яка доставляє зразки повітря, взятого в різних точках, до барботерів для визначення вірусної і/або бактеріальної концентрації.

Даний спосіб полягає, головним чином, у виробленні за допомогою генератора (а) аерозолі з тестового мікроорганізму і направленні аерозолі у випробувальну камеру (б).

Всередині випробувальної камери знаходиться голова Шефілда, на яку надітий ЗІЗ.

Повітря всередині випробувальної камери вдихається головою Шефілда через автоматичний дихальний апарат (с).

Здійснені модифікації голови Шефілда, щоб вдих повітря через рото-носову область і видих через задню частину голови направлявся в автоматичний дихальний апарат.

Завдяки розміщенню ЗІЗ безпосередньо на голові Шефілда, під час виконання тесту по перевірці ефективності захисту ЗІЗ навколишні характеристики, пов'язані з фізичними/механічними і ергономічними характеристиками ЗІЗ (які є основними для ЗІЗ, щоб він був придатний для використання як захист від біологічних речовин) також бралися до уваги.

Іншими словами, можливі канали зараження, обумовлені порушенням герметизації за рахунок поганого надягання ЗІЗ (і тому, не залежать від фільтрувальних властивостей фільтрувального матеріалу самого по собі) також були оцінені.

Щоб розрахувати здатність ЗІЗ втримувати віруси і бактерії, проведено два контрольних аналізи повітря, взятого із всмоктувальної системи (d) і направлено до декількох барботерів.

Зокрема, розраховані мікробні концентрації в повітрі всередині випробувальної камери (білий тест, взятий з положення, яке відповідає правому оку голови Шефілда) і в повітрі, яке пройшло через ЗІЗ (контрольний зразок, взятий нижче ЗІЗ, що відповідає роту).

І білий тест, і контрольний зразок проведені одночасно протягом визначеного періоду часу за допомогою барботажу через дві окремі трубки дисперсії біологічних речовин у випробувальній камері (білий тест) і зразка повітря, що проходить через ПЗЗ (контрольний зразок) в розчині, що має і відповідний склад, і потрібну кислотність/лужність (pH).

Два барботери приєднані до всмоктувальної системи при постійній течії.

У кінці тестування розчини, що містяться в барботерах, переміщують у відповідні стерильні контейнери і потім визначають зібрані мікроорганізми.

Коефіцієнт мікроорганізмів, затриманих ЗІЗ, визначається таким чином:

$$\% \text{ (процент затриманих мікроорганізмів)} = 100 - (Na/Nv)(100)$$

де:

$Nv$  = концентрація контрольного мікроорганізму в аерозолі всередині випробувальної камери (білий тест),

$Na$  = концентрація контрольного мікроорганізму нижче фільтрувальної лицьової маски (контрольний зразок).

На Фіг.2-6 детально зображена обробка потоку і її складові елементи.

Генератор аерозолі (Фіг.2) виконаний з:

- перистальтичного насоса (1),
- розпилювача (2),
- трубопроводу розпилення (3),
- трубки зневоднення (4),
- трубки Вентурі (5).

Суспензію з відомої кількості мікроорганізму подають через перистальтичний насос (1) в розпилювач (2), де стиснуте повітря, що проходить

через трубопровід розпилення (3), створює аерозоль.

Цей аерозоль, будучи поданий в трубу зневоднення (4), змішується з сухим стиснутим повітрям, яке подають окремо з трубки Вентурі (5).

Мікробні аерозольні краплі попадають в трубку зневоднення, швидко випаровуються і рухаються у випробувальну камеру постійним потоком.

Випробувальна камера складається, головним чином, з:

- герметично закритого контейнера (6),
- однієї голови Шефільда, поміщеної в контейнер, з підвідними трубками.

Форма і розміри контейнера (6) дозволяють розмістити в ньому голову Шефільда. а контейнер виконаний з матеріалу, який гарантує повітронепроникність; для цього стінки ущільнені за допомогою прокладок, і одна зі стінок може бути відкрита, дозволяючи здійснювати дії, необхідні за методикою.

Голова Шефільда (7) поміщена в герметичний контейнер (6) і сполучена з'єднувальними трубками з автоматичним дихальним апаратом і з трубками для відбирання зразків повітря, що міститься у випробувальній камері, і повітря, що проходить через ЗІЗ.

Герметичний контейнер виконаний у вигляді паралелепіпеда, який відповідає розмірам лабораторного столу, зі складаною стінкою, що відкривається/закривається, і зазвичай виконаний з Лексану (Lexan) або подібних матеріалів.

Голова Шефільда, наприклад, укомплектована додатковим обладнанням, що має три концентричні трубки, дві з яких з'єднані з автоматичним дихальним апаратом, а третя збирає повітря, що пройшло через ЗІЗ на рівні рото-носової області голови; ще одна трубка, четверта, розміщена на рівні правого ока і забирає повітря, що міститься у випробувальній камері.

Дихальний апарат (Фіг.4) виконаний з насоса і перетворювача, який регулює швидкість вдиху/видиху; частота дихання може бути відрегульована як нормальне дихання людини, і звичайно знаходиться між 20-40 циклами за хвилину з об'ємом повітря, що знаходиться між 1,5 і 3,5 літрами за цикл.

Система всмоктування (Фіг.5) складається, головним чином, з:

- вакуумного насоса (8),
- регулятора потоку (9),
- інгаляційної трубки білого тесту (10),
- барботера білого тесту (11),
- інгаляційної трубки контрольного зразка (12),
- барботера контрольного зразка (13).

Система всмоктує дисперсію мікроорганізмів у випробувальну камеру для визначення їх кількості.

Всмоктування відбувається через вакуумний насос (8), який дозволяє виконувати всмоктування при постійному потоці, який регулюється і контролюється регуляторами потоку (9).

І білий тест, і контрольний тест здійснюють одночасно через два різних трубопроводи, проводячи барботаж дисперсій мікроорганізмів у відповідному розчині з контрольованим значенням рН. Дисперсія, використовувана для відбирання вірус-

них речовин, звичайно є розчином з рН, що дорівнює 6,8, тоді як для бактеріальних речовин рН є нейтральним.

Дисперсію у випробувальній камері (білий тест) забирають на рівні правого ока голови Шефільда через інгаляційну трубку (10) і барботують в стерильному скляному барботері (11).

Зразок повітря, що проходить через ЗІЗ (контрольний зразок), забирають на рівні рота голови Шефільда через інгаляційну трубку (12) і барботують в стерильному скляному барботері (13).

У кінці тесту барботери від'єднують, розчини поміщують в стерильні контейнери і виконують підрахунок мікроорганізмів в розчинах.

Конкретним варіантом здійснення даного винаходу є пристрій, використовуваний для перевірки ефективності захисту ЗІЗ від біологічних речовин, який відрізняється тим, що наявний генератор вірусного і/або бактеріального аерозолю, випробувальна камера, що містить голову Шефільда, дихальний апарат, який імітує дихання і регулює частоту вдиху і видиху, система всмоктування, яка доставляє зразки повітря, взятого в різних точках, до барботерів для визначення вірусної і/або бактеріальної концентрації; голова Шефільда, забезпечена трубками, сполученими з автоматичним дихальним апаратом для здійснення вдиху і видиху повітря через рото-носову область, і з трубками відбирання і повітря, що міститься у випробувальній камері, і повітря, що проходить через ЗІЗ.

Переважним варіантом здійснення даного винаходу є пристрій, що оцінює ефективність захисту ЗІЗ від біологічних речовин, в якому голова Шефільда розміщена у випробувальній камері, виконаній з Лексану, забезпечена додатковим обладнанням, що має три концентричні трубки, дві з яких сполучені з автоматичним дихальним апаратом, а третя збирає повітря, що пройшло через ЗІЗ на рото-носовому рівні голови, і ще однією трубою, четвертою, яка розміщена на рівні правого ока і забирає повітря, що міститься у випробувальній камері, і в якому дихальний апарат виконаний з поршневого насоса і перетворювача, регулюючого швидкість вдиху/видиху.

Додатковими конкретними варіантами здійснення винаходу є також застосування голови Шефільда, модифікованої, як описано вище, і автоматичного дихального апарата, виконаного з насоса, для оцінювання ефективності захисту ЗІЗ від біологічних речовин.

Цей спосіб може бути використаний для визначення захисту від біологічних речовин, і, зокрема, від бактерій і вірусів.

Приготування суспензій контрольного зараження і визначення кількості мікроорганізмів може бути проведене будь-яким відомим для цього способом; звичайно способи є різними для вірусів і для бактерій.

Щоб краще пояснити даний винахід, нижче наведені приклади двох способів, використаних відповідно для вірусних і бактеріальних речовин.

Приклад 1: методика визначення для вірусних речовин

У описаному в даній роботі прикладі використовуваним контрольним мікроорганізмом є бакте-

ріофаг MS-2 (Національна колекція промислових бактерій 10108), який є поліедричним вірусом розміром 0,2 мкм. Число активного MS-2 бактеріофага в суспензії контрольного зараження і зберезуваного після обробки визначають, закладаючи методику дисперсії на агаровий шар.

Методика визначення кількості полягає у відбиранні аліквотних проб, починаючи з 0,1 мл або 1 мл "Буферного фага" з рН 6,8, що містить MS-2 бактеріофаг, і їх змішуванні, в одному випадку з 2,5 мл з Триптонсоєвим агаром, що містить близько 0,5 мл постійного зростання (4-6 годин після внесення посівного матеріалу) *Escherichia Coli* NCIMB 9481 (приблизно  $10^8$  КОЕ/мл), у другому випадку з 5 мл Триптонсоєвого агару, що містить близько 1,0 мл постійного зростання (4-6 годин після внесення посівного матеріалу) *Escherichia Coli* NCIMB 9481 (приблизно  $10^8$  КОЕ/мл).

Агаризовану м'яку підкладку, таким чином, негайно наливають на бляшки з Триптонсоєвого агару для створення другого шару. Після 24 годинного інкубаційного періоду при температурі 37°C зчитують видимі бляшки бактеріофага. Відбирають бляшки, які показують бляшки видимого лізису (pfu - бляшкоутворювальні одиниці), і розмножують відповідним розведенням. Визначене таким чином pfu буде еквівалентне числу MS-2 бактеріофагів в Буферному розчині.

Насамперед готують суспензії при відомому титрі контрольного зараження за допомогою розведення оригінальної суспензії в Буферному фазі. Потім на одержаних розведеннях за допомогою способу "Подвійного шару" перевіряють концентрацію. Як тільки визначення кількості закінчується, повинні бути відібрані бляшки найвищого розведення, які показують зливний лізис. Пропорцію Буферного фага додають до цих бляшок, використовуючи стерильний шпатель, розбивають агар і змішують з Буфером.

У стерильному контейнері зберігають і декантують буфер, що містить агар, потім його сильно струшують, поки агар не розіб'ється. Результати одержані, залишковий агар буде складати осад. Суспензію беруть і фільтрують за допомогою мембрани, а аліквотні проби зберігають при 4°C. Таким чином приготувану суспензію з відомим титром вводять в генератор аерозолу з визначеним об'ємом.

Вірусну суспензію направляють до розпилювача (2) в потоці, створюваному насосом (1).

Потім генератор аерозолу працює під тиском аерозольного спрею (3) і в потоці зневоднення трубопроводу (5).

Після очікування гомогенного заповнення випробувальної камери, і як тільки камера заповнена, дихальний апарат і вакуумний насос всмоктувальної системи активуються. І білий тест, і контрольний тест проводять одночасно через дві окремі трубки, барботуючи в Буферному фазі взятую дисперсію. У кінці тесту обидва барботери від'єднують, розчини переносять у відповідні стерильні контейнери і контейнери зберігають відразу ж при 4°C, щоб подавити будь-який мікробний ріст.

Живі MS-2 бактеріофаги, зібрані за допомогою барботажного пробовідбірника, підраховують, ви-

користовуючи методику подвійного шару, описану вище.

Приклад 2: методика визначення для бактеріальних речовин

Ефективність захисту від бактеріальних речовин була визначена за допомогою процедури, схожої на процедуру визначення для вірусних речовин, але мікроорганізм був зібраний за допомогою барботажу в розріджувачі з рН 7,0. Як мікроорганізм для тестування використовувався *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146), бактерії розміром 0,3 мкм. Бактеріальна суспензія була приготувана таким чином: деякі підкультури були приготувані з маточної культури розповзанням на Триптонсоєвому агаровому шарі, і зберігалися при 30-35°C протягом 18-24 годин. Друга підкультура була робочою культурою.

Робочу культуру забирають і поміщують в розріджувач з рН 7,0 в бульйон.

Бульйон перемішують за допомогою механічної мішалки, а потім суспензію беруть і поміщують в трубку-тест.

Число клітин в суспензії повинно досягнути значення між  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл і  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/мл, з використанням розведення і оцінювання кількості одиниць за допомогою індексу МакФарланда.

Таким чином виконують визначення кількості мікроорганізмів в бактеріальній суспензії.

Суспензія повинна зберігатися в холодильнику при температурі 2-8°C і повинна бути використана протягом дня.

Визначення кількості бактерій в бактеріальних суспензіях, перевірених і зібраних в прямому напрямку, було здійснене таким чином:

серійні розведення суспензій, в яких треба було визначити кількість бактерій, були приготувані за допомогою розріджувача. Зразок-близнюк кожного розведення змішують і відбирають, а вибірку виконують в чашці Петрі. Визначену кількість Триптонсоєвого агару (TSA) як рідину додають, залишають у водяній бані при 45°C, злегка струшуючи. Бляшки інкубують при 30-35°C протягом 24 годин. Після визначення кількості одиниць для кожної чашки, бляшки інкубують ще додатково 24 години. Число одиниць, що вирости, на кожній бляшці визначають знову, не враховуючи тих, які погано відділяються.

Визначають найвище число одиниць для кожного зразка.

Розраховують число КОЕ/мл контрольної суспензії.

Описані вище приклади методик мають тільки одну мету - пояснити краще винахід, але не обмежують його. Наприклад, можуть бути також використані мікроорганізми, які мають схожі розміри і мікробіологічні характеристики, а також альтернативні приготування суспензії тесту, різний час і методики відбирання, і різні способи визначення одиниць.

Методика може бути використана для оцінювання ефективності всіх 313 дихального тракту від біологічних речовин, наприклад, повних лицьових масок, фільтрувальних лицьових масок, фільтрувальних лицьових масок у вигляді чашок і плоскоскладених фільтрів.

Наприклад, обробка в прикладі 1 була використана для розрахунку ефективності складаної фільтрувальної лицьової маски, подібної тій, що описана в заявці на патент WO 2005/077214 A1, відмінної тим, що в фільтрувальному шарі, який складається з борокремнеземних мікроскопіволо-

кон, зв'язаних разом вінілацетатною смолою, матриця з волокон утримується сильним субстратом на основі целюлози, і структура оброблена покриттям на основі силікону.

Результати наступні:

Вірус в контрольному зараженні ( $\times 10^9$ )	Вірус всередині випробувальної камери, Білий тест (Nv)( $\times 10^5$ )	Вірус, виявлений після фільтрувальної лицьової маски, Тест зразок (Na) ( $\times 10^3$ )	Затримані віруси % 100-(Na/Nv $\times 100$ )
4,6	3,4	1,7	99,5000
4,6	7,5	1,3	99,8267
4,6	4,9	1,0	99,7959
3,1	4,5	1,2	99,7333
3,1	6,4	2,1	99,6719
3,1	4,6	1,4	99,6957

Методика даного винаходу була підтверджена згідно із заголовками в Good Laboratory Practice (GLP).

Дослідження підтвердження методики врахувало і ефективність системи дослідження (одноманітність розподілу в буферах суспензії мікроорганізмів, життєздатність мікроорганізму під час виконання дослідження, загальна точність способу), і аналітичну ефективність визначення мікробіологічних речовин (повторюваність, проміжну точність, ретельність).

Перевірка підтвердження була проведена відносно і способу для вірусних речовин з використанням MS-2 бактеріофага, і способу для бактеріальних речовин з використанням *Brevundimonas diminuta*.

Ефективність визначення бактерій в суспензії мікроорганізмів була перевірена насамперед.

Концентрація суспензії мікроорганізмів була розрахована за допомогою відповідної методики визначення кількості бактерій. Для кожного розведення титр був перевірений багато разів і тест був повторений декілька разів.

Результати були використані для визначення повторюваності аналітичних результатів, іншими словами точності, повторно перевіряючи в гомогенному зразку кількість суспензії.

Для кожного вибраного розведення були визначені середнє і стандартне відхилення.

Потім був розрахований Процент Ступеня Змін (CV%), одержаний з процентного співвідношення між стандартним відхиленням і середнім відхиленням проведених вимірювань.

$$CV\% = \sigma/Y \times 100,$$

де:

$\sigma$  = стандартне відхилення,

Y = середні значення.

Значення CV, одержане для різних розведень, було нижчим ніж 15 % і для вірусного, і для бактеріального оцінювання, демонструючи правильну повторюваність визначення.

Використовуючи результати, одержані в описаних вище шести тестах, була перевірена ретельність методики, іншим словами, як експериментальні значення відрізняються від відомого теоретичного значення.

Критерій оцінювання заснований на % відновлення, який є відношенням експериментального значення і теоретично відомого значення.

$$\% \text{ відновлення} = N_s/N \times 100,$$

де:

N = теоретично відоме значення суспензії вірусу (pfu/мл),

$N_s$  = одержане експериментальне значення суспензії вірусу (pfu/мл).

Значення % відновлення, одержані в 12 проведених тестах, всі знаходяться в межах 70-130 % і у випадку вірусів, і у випадку бактерій.

Середнє значення % відновлення, в обох випадках, і в тестах, проведених з використанням вірусів, і в тестах, з використанням бактерій, знаходяться в межах 80-120 %.

Нарешті, тести для розрахунку повторюваності були проведені двома різними операторами протягом двох різних днів. Тому, проміжна точність аналітичних результатів була також розрахована, взята як точність, що залежить від днів і різних людей.

Значення CV, одержане для різних розведень двома операторами протягом двох різних днів, було меншим ніж 15 %, в обох випадках, і у випадку вірусів, і у випадку бактерій.

Цей результат вказує на хорошу проміжну точність.

Також була перевірена ефективність контрольної системи.

Була приготована робоча культура, як вже показано в описі способу, і вона була поміщена в аерозольний пристрій з визначеним об'ємом суспензії мікроорганізмів. Генератор аерозолу був ввімкнений і наданий час, щоб аерозоль заповнив випробувальну камеру. Потім був ввімкнений вакуумний насос всмоктувальної системи, а потім і генератор аерозолу, і вакуумний насос були відключені.

Обидва барботери були відключені від живлення, і розчини поміщені в стерильні контейнери, що зберігаються при 4°C для пригнічення будь-якого росту мікробів.

Деякі тести визначення кількості бактерій були проведені з необхідними розведеннями на буферних розчинах з використанням способу, придатного для цього типу мікроорганізмів.

Тест був проведений багато разів протягом двох різних робочих днів.

Одноманітність розподілу суспензії мікроорганізмів в двох барботерах (білий тест і контрольний тест) була розрахована так само, як і в двох взятих точках всередині камери.

Для кожного тесту була розрахована різниця між процентним вмістом мікроорганізмів, зібраних в двох барботерах, з використанням наступної формули:

Процент різниці розподілу ( $R\%$ ) =  $N_a/N_v \cdot 100$ ,  
де:

$N_v$  = кількість мікроорганізмів, одержаних в барботері 11 (pfu/мл),

$N_a$  = кількість мікроорганізмів, одержаних в барботері 13 (pfu/мл).

Жодне із значень різниці розподілу не вийшло за межі  $\pm 5\%$  в обох випадках, і у випадку вірусів, і у випадку бактерій. Отже, розподіл мікроорганізмів в різних точках проведення є придатним.

Точність всієї методики була оцінена в умовах повторюваності аналітичних результатів.

Використовуючи значення, одержані в цих попередніх тестах для двох барботерів, було розраховано CV% за допомогою наступної формули:

$CV\% = \sigma/Y \cdot 100$ ,

де:

$\sigma$  - стандартне відхилення,

$Y$  = середнє значення для  $n$  зразків.

Значення CV%, одержане протягом двох днів, було  $>25\%$ , в обох випадках, і у випадку вірусів, і у випадку бактерій, що вказує на придатну повторюваність аналітичних результатів точності всієї методики.

Нарешті, була визначена життєздатність мікроорганізмів під час виконання тесту, іншими словами, здатність мікроорганізму бути живим протягом принаймні 30 хвилин, що дозволяє зберегти достатню концентрацію у випробувальній камері для визначення, з точки зору аналітичного аспекту, ефективності захисту 3І3.

Визначення кількості бактерій в суспензії мікроорганізмів, яка має відомий титр, що знаходиться між  $1 \times 10^7$  і  $1 \times 10^8$ , було здійснене відразу ж після її приготування ( $T_0$ ).

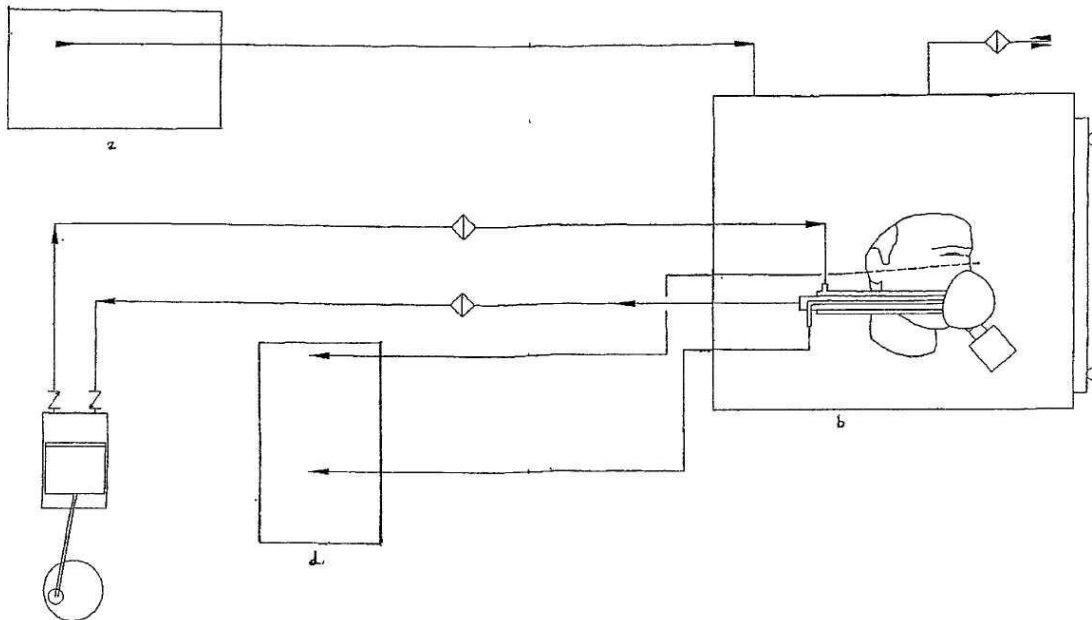
Визначення кількості бактерій в тій же самій суспензії було здійснене через 15, 30 і 45 хвилин після приготування ( $T_{15}$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{45}$ ).

Одержані кількості  $T_{15}$ ,  $T_{30}$ , і  $T_{45}$  потім порівняли з  $T_0$ .

Тест повторили три рази.

Титр зменшувався,  $T_{15}$ ,  $T_{30}$  і  $T_{45}$  були менше ніж 2 логарифми в порівнянні з вірусним титром при  $T_0$ , і у випадку з вірусами, і у випадку з бактеріями.

Отже, мікроорганізми завжди мають життєздатність під час проведення тесту.



Фіг. 1

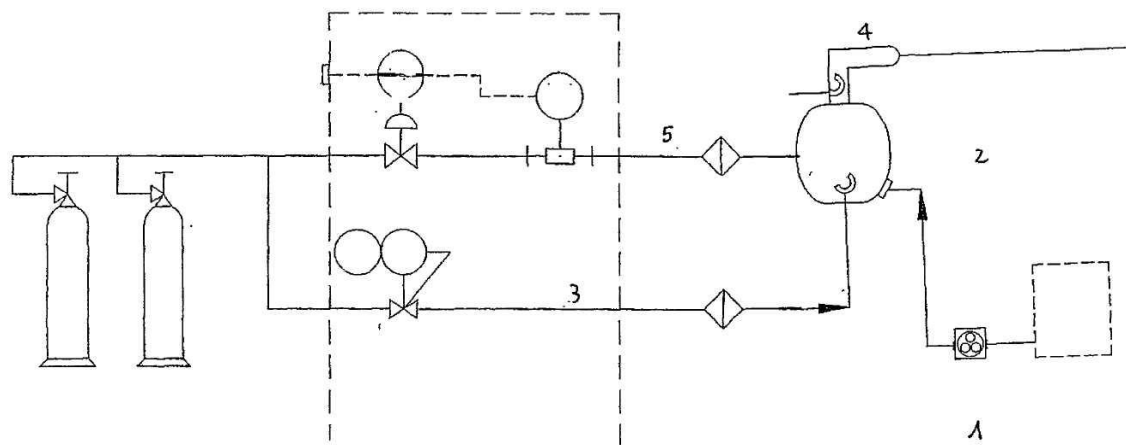


Fig. 2

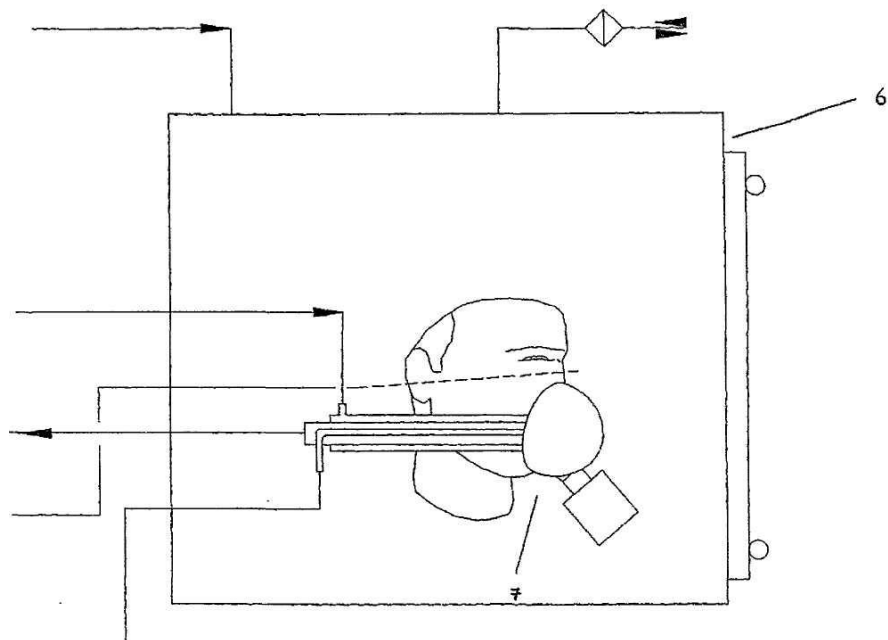
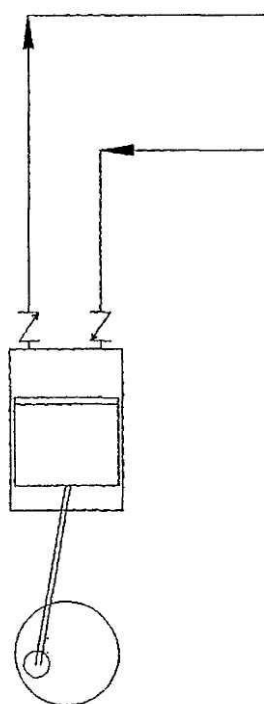
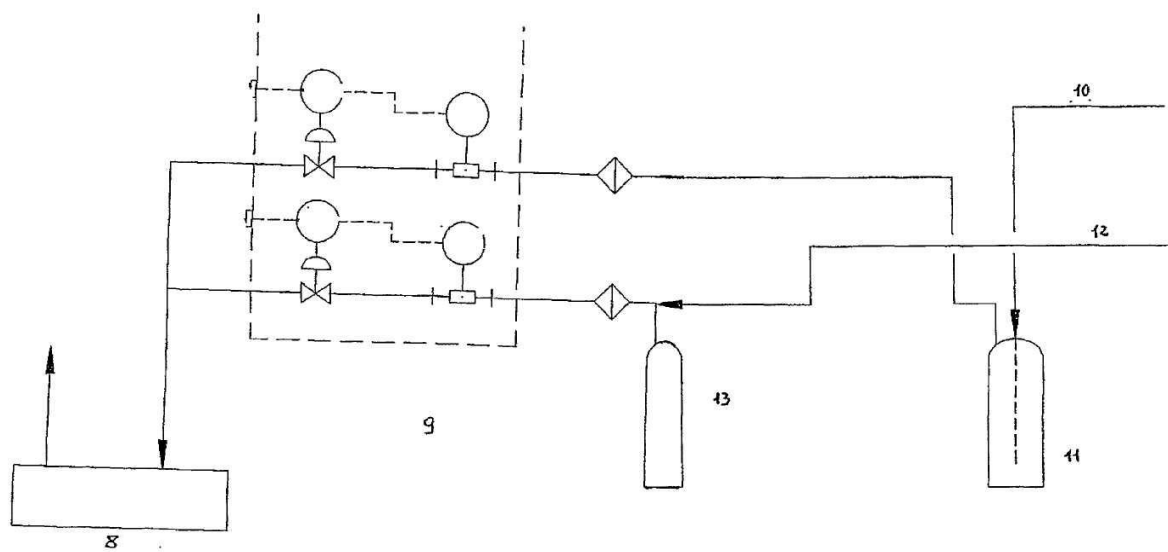


Fig. 3





Фіг. 4



Фіг. 5