



Инструментальный метод с импедиметрической детекцией для оценки антимикробного потенциала материалов, используемых для медицинских масок

Н. В. Дудчик

Научно-практический центр гигиены, г. Минск, Беларусь

Резюме

Цель исследования. Оптимизировать параметры тестирования антимикробной активности модифицированных нетканых материалов, используемых для изготовления медицинских масок, в отношении изолятов микроорганизмов с выраженными фенотипическими признаками агрессии и провести количественную оценку антимикробного потенциала методом с импедиметрической детекцией.

Материалы и методы. Оценка антимикробного потенциала проводили, моделируя прямой контакт материала после обработки растворами октенидина гидрохлорида, в условиях *in vitro* методом с импедиметрической детекцией на основании предложенного маркера *IDT* — продолжительности lag-фазы развития популяции тест-штамма с использованием программного обеспечения микробиологического анализатора. Антимикробный потенциал рассчитывали по предложенной формуле и оценивали в соответствии с обоснованной количественной шкалой.

Результаты. В лабораторных условиях оптимизированы параметры тестирования антимикробной активности нетканых материалов с антимикробной обработкой октенидина гидрохлоридом с использованием инструментального метода с импедиметрической детекцией. Установлено, что изолят *Escherichia coli* 43-02012021 и изолят *Enterobacter cloacae* 14-21072021 были более чувствительны к воздействию образца, полученного методом электронно-лучевого напыления октенидина гидрохлорида из активной газовой фазы, по сравнению с образцом, полученным методом импрегнирования октенидина гидрохлоридом *wet chemistry* из раствора в вакууме.

Заключение. Метод оценки с импедиметрическим принципом детекции расширяет арсенал инструментальных методов количественного определения антимикробного потенциала нетканых материалов. Стандартные отклонения измерений σ составили 4,4–8,1 %, что является приемлемым для получения достоверных результатов в условиях внутривлабораторного тестирования.

Ключевые слова: маски медицинские, тест-штаммы, тестирование, антимикробный потенциал, маркеры, критериальная шкала, импедиметрические параметры

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы «Провести моделирование и разработать методику оценки антимикробного потенциала нетканых полимерных материалов, модифицированных органическими и полимер-неорганическими покрытиями», договор с ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси» от 01.12.2021 г. № Х21УЗБГ-030/01, в рамках задания «Создание модифицированных органическими и полимер-неорганическими покрытиями волокнистых материалов различного функционального назначения» по договору от 15.11.2021 г. № Х21УЗБГ-030 с БРФФИ ГКНТ-Узбекистан, № ГР 20220004 от 5.01.2022 г.

Для цитирования: Дудчик НВ. Инструментальный метод с импедиметрической детекцией для оценки антимикробного потенциала материалов, используемых для медицинских масок. Проблемы здоровья и экологии. 2022;19(3):130–134. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2022-19-3-18>

Instrumental method with impedimetric detection for the evaluation of the antimicrobial potential of materials used for medical masks

Natallia V. Dudchik

Scientific Practical Centre of Hygiene, Minsk, Belarus

Abstract

Objective. To optimize the parameters for testing the antimicrobial activity of modified non-woven materials used for the manufacture of medical masks against microorganism isolates with strong phenotypic aggression signs, and to quantify their antimicrobial potential using a method with impedimetric detection.

Materials and methods. The antimicrobial potential was assessed by simulating a direct contact of the material after treatment with octenidine dihydrochloride solutions under *in vitro* conditions by the method with impedimetric detection based on the proposed IDT marker – duration of the lag-phase of the growth of a test stain population using the software of a microbiological analyser. The antimicrobial potential was calculated according to the proposed formula and evaluated in accordance with a reasonable quantitative scale.

Results. The parameters for testing the antimicrobial activity of nonwoven materials with antimicrobial octenidine dihydrochloride treatment using an instrumental method with impedimetric detection have been optimized in laboratory conditions. It was found that *Escherichia coli* 43-02012021 isolate, *Enterobacter cloacae* 14-21072021 isolate were more sensitive to the impact of the sample obtained by the method of electron beam deposition of octenidine hydrochloride from the active gas phase compared with the sample obtained by wet impregnation from octenidine hydrochloride solution in vacuum.

Conclusion. The evaluation method with the impedimetric detection principle expands the arsenal of instrumental methods of quantitative determination of the antimicrobial potential of nonwoven materials. The standard deviations of σ measurements were 4.4–8.1 %, which is acceptable for obtaining reliable results under the conditions of intralaboratory testing.

Keywords: *medical masks, test strains, testing, antimicrobial potential, markers, criteria scale, impedimetric parameters*

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Funding. This work was performed within the framework of the research work «To carry out modelling and to develop a method for assessing the antimicrobial potential of nonwoven polymer materials modified with organic and polymer-inorganic coatings», agreement with the Institute of Chemistry New Materials of the NAS of Belarus dated 01.12.2021 No.X21Y3БГ-030/01 within the task «Development of fiber materials of various functional purposes modified with organic and polymer-inorganic coatings» as per agreement dated 15.11.2021 No.X21Y3БГ-030/01, supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research and the State Committee on Science and Technology of the Republic of Belarus, with Uzbekistan No.ГР 20220004 dated 05.01.2022.

For citation: Dudchik NV. Instrumental method with impedimetric detection for the evaluation of the antimicrobial potential of materials used for medical masks. *Health and Ecology Issues*. 2022;19(3):130–134. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2022-19-3-18>

Введение

В настоящее время количественная микробиология, основанная на химико-кинетическом моделировании процессов микробного роста, является активно развивающейся областью, имеющей много фундаментальных и практических приложений. Анализ динамических закономерностей роста и развития микробных популяций, дополненных метаболическими и культурально-морфологическими параметрами в качестве эффективных маркеров оценки неблагоприятных воздействий, в том числе антимикробных эффектов, представляется весьма перспективным с практической точки зрения [1–5].

Антимикробные свойства материалов для производства медицинских масок могут быть обеспечены различными органическими и неорганическими компонентами, в том числе октенидина дигидрохлоридом [6, 7]. Он принадлежит к классу биспиридинов в группе бигуанидинов. Растворы антисептиков на основе октенидина дигидрохлорида применяются в медицине и косметологии для обеззараживания и стабилизации микробного статуса изделий, так как спектр его антимикробного действия весьма широк. Обработка этим антисептиком может быть выполнена с использованием метода электронно-лучевого напыления из активной газовой фазы и методом импрегнирования *wet chemistry* из раствора в вакууме. Модификация октенидина дигидрох-

лоридом для обоих рассмотренных способов протекает с образованием тонкой стойкой гидрофильной пленки, что обуславливает низкие фильтрационные свойства, однако в водной фазе такая обработка может приводить к значительному антибактериальному эффекту [8, 9].

Ранее нами было показано, что средства индивидуальной защиты, используемые персоналом лечебных стационаров, контаминированы микроорганизмами с модифицированными фенотипическими признаками, проявляющими устойчивость к антимикробным препаратам, дезинфицирующим средствам и ультрафиолетовому излучению, что является результатом воздействия биотических и абиотических факторов на популяцию микроорганизмов [10–12]. Поэтому использование таких изолятов при разработке методов оценки антимикробных свойств нетканых материалов представляется целесообразным и практически значимым.

Цель исследования

Оптимизировать параметры тестирования антимикробной активности модифицированных нетканых материалов, используемых для изготовления медицинских масок, в отношении изолятов микроорганизмов с выраженными фенотипическими признаками агрессии и провести количественную оценку антимикробного потенциала методом с импедиметрической детекцией.

Материалы и методы

Объектами исследования были образцы полипропиленового нетканого материала «Акваспан» с поверхностной плотностью 100 г/см² отечественного производства, модифицированные 100 нм растворами октенидина дигидрохлорида с использованием метода электронно-лучевого напыления из активной газовой фазы (материал 1) и методом импрегнирования *wet chemistry* из раствора в вакууме (материал 2). Образцы предоставлены ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси».

В работе использовали изоляты бактерий семейства *Enterobacteriaceae* *Escherichia coli* 43-02012021 и *Enterobacter cloacae* 14-21072021, выделенные в ходе изучения микробных профилей средств индивидуальной защиты персонала лечебных стационаров организаций здравоохранения г. Минска в весенне-летний период 2021 г. Прослеживаемость фенотипических свойств штаммов в рабочей коллекции республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены» обеспечивается процедурой криохранения. Изоляты демонстрировали высокую устойчивость культурально-морфологических и биохимических признаков в процессе многократных пассажей культивирования.

Дизайн модельного эксперимента. Исследования выполняли на импедиметрическом анализаторе BacTrac 4300 (SYLab). Проведено по 5 серий экспериментов для оценки антимикробного потенциала материала 1 и материала 2. В каждой серии проводили испытание путем параллельного внесения образцов материалов в оптимизированную культуральную среду, содержащую 1×10^7 – 1×10^8 КОЕ/мл тест-штамма, их совместного культивирования в ячейках микробиологического анализатора при температуре 37 ± 1 °С и одновременного осуществления импедиметрической регистрации электрохимических изменений (импеданса) для определения показателя IDT роста популяции бактериальной тест-культуры в среде культивирования.

Среда культивирования была нами оптимизирована и имела следующий состав: пептон — 5,5 г, дрожжевой экстракт — 1,5 г, глюкоза — 1 г, натрий хлористый — 2 г, калий фосфорнокислый однозамещенный — 1,5 г, калий фосфорнокислый двузамещенный — 0,75 г, вода дистиллированная — до 1000 мл.

За окончательный результат измерения принимали среднее арифметическое значение результатов трех параллельных измерений.

Способ оценки антибактериальной активности нетканых материалов основан на оценке показателей IDT — продолжительности lag-фазы развития популяции тест-штамма с использо-

ванием программного обеспечения микробиологического анализатора с импедиметрическим принципом детекции. Антимикробный потенциал рассчитывали по предложенной формуле и оценивали в соответствии с обоснованной количественной шкалой.

Для количественной оценки антимикробного действия введен термин «антимикробный потенциал» и обоснован показатель AMP_i , рассчитываемый по формуле:

$$AMP_i = (IDT_2 - IDT_1) / IDT_1 \times 100 \%,$$

где IDT_1 — время наступления lag-фазы в контроле с внесением образца материала без импрегнирования октенидина гидрохлоридом, ч;

IDT_2 — время наступления lag-фазы в опыте с внесением образца материала с импрегнированием октенидина гидрохлоридом, ч.

Мы предлагаем следующую количественную шкалу оценки AMP: менее 25 % — слабый антимикробный потенциал, от 25 до 50 % — умеренно выраженный антимикробный потенциал; от 50 до 75 % — выраженный антимикробный потенциал, более 75 % — сильный антимикробный потенциал в отношении тест-штамма.

В работе использовали средства измерений и испытательное оборудование, должным образом поверенные и калиброванные в соответствии с [13]. Дизайн и проведение исследований соответствовали требованиям надлежащей лабораторной практики — GLP.

Результаты и обсуждение

При выборе динамической модели развития популяции микроорганизмов для оценки антимикробных воздействий целесообразно остановиться на периодическом культивировании [14]. Кривые развития популяции микроорганизмов в закрытых системах (периодическое культивирование) имеют несколько характерных фаз. В результате обоснования популяционных моделей развития микроорганизмов в периодической системе как методологической основы оценки модулирующего действия факторов среды и с учетом результатов собственных экспериментальных данных нами была разработана принципиальная схема и технология проведения тестирования с импедиметрическим принципом детекции [5]. Для оценки роста тест-штамма выбирали параметр детекции таким образом, чтобы кривая роста тест-культур на соответствующих питательных средах имела характерный вид: стабильную базовую линию, выраженную фазу быстрого роста культуры и значительные значения изменений электрохимических показателей среды. Основным показателем роста тест-куль-

туры является показатель *IDT*, который определяется программным обеспечением анализатора по интегральному изменению электрохимических показателей среды культивирования при развитии популяции тест-штаммов микроорганизмов.

Продолжительность lag-фазы напрямую зависит от того, насколько благоприятны условия

для роста тест-микроорганизма, в том числе и от антимикробных эффектов, поэтому увеличение продолжительности lag-фазы, которое мы предлагаем оценивать по показателю *IDT*, свидетельствует об ингибирующей активности исследуемого фактора.

Получены следующие результаты (таблица 1).

Таблица 1. Результаты оценки показателя *AMPi* нетканых материалов на бактериальные тест-штаммы родов *Escherichia* и *Enterobacter* ± σ, n = 15

Table 1. Results of the evaluation of the effect of the *AMPi* parameter of nonwoven materials on bacterial test stains of *Escherichia* and *Enterobacter* families ± σ, n = 15

Материал	Показатели			Оценка
	<i>IDT</i> ₁ (контроль)	<i>IDT</i> ₂	<i>AMP</i>	
<i>Escherichia coli</i> 43-02012016				
Материал 1	4,5 ± 0,2 ч	8,7 ± 0,7* ч	93 %	Сильный антимикробный потенциал
Материал 2	4,5 ± 0,2 ч	7,4 ± 0,4* ч	64 %	Выраженный антимикробный потенциал
<i>Enterobacter cloacae</i> 14-21072014				
Материал 1	3,8 ± 0,2 ч	5,0 ± 0,5* ч	32 %	Сильный антимикробный потенциал
Материал 2	3,8 ± 0,2 ч	4,6 ± 0,4* ч	21 %	Выраженный антимикробный потенциал

* Статистически значимое различие средних значений в опыте и контроле ($p < 0,05$)

Стандартные отклонения измерений σ составляли 4,4–8,1 %, что является приемлемым для получения достоверных результатов в условиях внутрилабораторного тестирования.

Заключение

В лабораторных условиях оптимизированы параметры тестирования антимикробной активности нетканых материалов с антимикробной обработкой с использованием инструментально-

го метода с импедиметрической детекцией. Установлено, что изолят *Escherichia coli* 43-02012021 и изолят *Enterobacter cloacae* 14-21072021 были более чувствительны к воздействию образца, полученного методом электронно-лучевого напыления октенидина гидрохлорида из активной газовой фазы по сравнению с образцом, полученным методом импрегнирования октенидина гидрохлоридом *wet chemistry* из раствора в вакууме.

Список литературы

- Munteanu F-D, Titoiu AM, Marty J-L, Vasilescu A. Detection of Antibiotics and Evaluation of Antibacterial Activity with Screen-Printed Electrodes. *Sensors (Basel)*. 2018;18(3):901. DOI: <https://doi.org/10.3390/s18030901>
- Muddin A, Hossain MM, Safavieh M, Wong YL, Abd Rahman I, Zourob M. et al. Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes (Review). *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36(3):495-505. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.992387>
- Majdinasab M, Badea M, Marty JL. Aptamer-Based Lateral Flow Assays: Current Trends in Clinical Diagnostic Rapid Tests. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(1):90. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph15010090>
- Brosel-Oliu S, Mergel O, Uria N, Abramova N, van Rijn P, Bratov A. 3D impedimetric sensors as a tool for monitoring bacterial response to antibiotics. *Lab Chip*. 2019;(19):1436-1447. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8LC01220B>
- Дудчик НВ. Альтернативное тестирование токсичности: применение методов импедансной технологии в токсиколого-гигиенической практике. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2008;(1):148.
- Parnia Forouzandeh, Kris O'Dowd, Suresh C. Pillai. Face masks and respirators in the fight against the COVID-19 pandemic: A review of current materials, advances and future perspectives. *Materials (Basel)*. 2020;13 (15):1-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ssci.2020.104995>
- Kentaro Yamauchi, Yanyan Yao, Tsuyoshi Ochiai, Munetoshi Sakai, Yoshinobu Kubota, Goro Yamauchi. Antibacterial Activity of Hydrophobic Composite Materials Containing a Visible-Light-Sensitive Photocatalyst. *J. Nanotechnol*. 2011;(2011):1-7. DOI: <https://doi.org/10.1155/2011/380979>
- Alvarez-Marín R, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Kieffer N, Poirel L. Antimicrobial activity of octenidine against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(12):2379-2383. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3070-0>
- Malanovic N, On A, Pabst G, Zellner A, Lohner K. Octenidine: Novel insights into the detailed killing mechanism of Gram-negative bacteria at a cellular and molecular level. *Int. J. of Antimicrob. Agents*. 2020;56(5):106146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106146>

10. Dudchik NV, Sychik SI, Nezhvinskaya OE, Kolomiets ND, Fedorenko EV, Drozdova EV et al. Bacterial profiles and phenotypic biomarkers of microbiota isolates in habitat: hazard identification factors. *Health Risk Analysis*. 2020;(2):92-100. DOI: <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.10.eng>

11. Мельникова ЛА, Дудчик НВ, Коломиец НД. Изучение эффективности различных методов дезобработки. *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2003;(8):98.

12. Дудчик НВ, Филонов ВП, Щербинская ИП. Кинетические и культурально-морфологические особенности чувствительных культур микроорганизмов при токсическом воздействии. *Медицинский журнал*. 2010;3(33):143-145.

13. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Межгосударственный стандарт. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. Взамен ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009. Введ. 01.09.2019. Москва: Изд-во стандартов, 2019. 26 с.

14. Couto RAS, Lima JLFC, Quinaz MB. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. *Talanta*. 2016;(146):801-814. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.011>

References

1. Munteanu F-D, Titoiu AM, Marty J-L, Vasilescu A. Detection of Antibiotics and Evaluation of Antibacterial Activity with Screen-Printed Electrodes. *Sensors (Basel)*. 2018;18(3):901. DOI: <https://doi.org/10.3390/s18030901>

2. Muddin A, Hossain MM, Safavieh M, Wong YL, Abd Rahman I, Zourob M. et al. Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes (Review). *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36(3):495-505. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.992387>

3. Majdinasab M, Badea M, Marty JL. Aptamer-Based Lateral Flow Assays: Current Trends in Clinical Diagnostic Rapid Tests. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(1): 90. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph15010090>

4. Brosel-Oliu S, Mergel O, Uria N, Abramova N, van Rijn P, Bratov A. 3D impedimetric sensors as a tool for monitoring bacterial response to antibiotics. *Lab Chip*. 2019;(19):1436-1447. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8LC01220B>

5. Dudchik NV. Alternative testing of toxicity: application of the methods of impedance technology in toxicohygienic practice. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2008;(1):148.

6. Parnia Forouzandeh, Kris O'Dowd, Suresh C. Pillai. Face masks and respirators in the fight against the COVID-19 pandemic: A review of current materials, advances and future perspectives. *Materials (Basel)*. 2020;13 (15):1-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ssci.2020.104995>

7. Kentaro Yamauchi, Yanyan Yao, Tsuyoshi Ochiai, Munetoshi Sakai, Yoshinobu Kubota, Goro Yamauchi. Antibacterial Activity of Hydrophobic Composite Materials Containing a Visible-Light-Sensitive Photocatalyst. *J Nanotechnol*. 2011;(2011):1-7. DOI: <https://doi.org/10.1155/2011/380979>

8. Alvarez-Marín R, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Kieffer N, Poirel L. Antimicrobial activity of octenidine against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(12):2379-2383. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3070-0>

9. Malanovic N, On A, Pabst G, Zellner A, Lohner K. Octenidine: Novel insights into the detailed killing mechanism of Gram-negative bacteria at a cellular and molecular level. *Int. J of Antimicrob. Agents*. 2020;56(5):106146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106146>

10. Dudchik NV, Sychik SI, Nezhvinskaya OE, Kolomiets ND, Fedorenko EV, Drozdova EV et al. Bacterial profiles and phenotypic biomarkers of microbiota isolates in habitat: hazard identification factors. *Health Risk Analysis*. 2020;(2):92-100. DOI: <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.10.eng>

11. Melnikova LA, Dudchik NV, Kolomiets ND. Studying the efficiency of different methods of desinfection. *Khranenie i pererabotka sel'khozsyrya*. 2003;(8):98.

12. Dudchik NV, Filonov VP, Shcherbinskaya IP. Kinetic and cultural-morphological features of sensitive cultures of microorganisms under toxic effects. *Medical Journal*. 2010;(3,33):143-145.

13. GOST ISO/IEC 17025-2019. Interstate standard. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Instead of GOST ISO/IEC 17025-2009. Input. 09/01/2019. Moscow: Publishing House of Standards, 2019.26 p (in Russ).

14. Couto RAS, Lima JLFC, Quinaz MB. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. *Talanta*. 2016;(146):801-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.011>

Информация об авторе / Information about the author

Дудчик Наталья Владимировна, д.биол.н., доцент, заведующий лабораторией микробиологии, РУП «Научно-практический центр гигиены», Минск, Беларусь
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5877-9307>
 e-mail: micro_sanitary@rspch.by; n_dudchik@mail.ru; n_dudchik@tut.by

Natallia V. Dudchik, DBiolSc, Associate Professor, Head of the Microbiology Laboratory, Scientific and Practical Center of Hygiene, Minsk, Belarus
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5877-9307>
 e-mail: micro_sanitary@rspch.by; n_dudchik@mail.ru; n_dudchik@tut.by

Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Дудчик Наталья Владимировна
 e-mail: n_dudchik@mail.ru; n_dudchik@tut.by

Natallia V. Dudchik
 e-mail: n_dudchik@mail.ru; n_dudchik@tut.by

Поступила в редакцию / Received 16.02.2022
 Поступила после рецензирования / Accepted 28.03.2022
 Принята к публикации / Revised 19.08.2022