

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 69947

**МОДИФІКОВАНИЙ СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ
БАКТЕРИЦИДНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВИХ
ДЕЗІНФІКУЮЧИХ ЗАСОБІВ**

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі **25.05.2012.**

Голова Державної служби
інтелектуальної власності України

М.В. Паладій





ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **69947** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61L 12/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2011 10753	(72) Винахідник(и):	Зон Григорій Анатолійович (UA), Ващик Євгенія Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	07.09.2011	(73) Власник(и):	СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Кірова, 160, м. Суми, 40021 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.05.2012		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.05.2012, Бюл. № 10		

(54) МОДИФІКОВАНИЙ СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ БАКТЕРИЦИДНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВИХ ДЕЗІНФІКУЮЧИХ ЗАСОБІВ

(57) Реферат:

Модифікований спосіб визначення бактерицидних властивостей нових дезінфікуючих засобів належить до галузі ветеринарної мікробіології, санітарії і біотехнології, зокрема дезінфектології, та може бути використаний при проведенні випробувань щодо дослідження ефективності нових дезінфекційних препаратів.

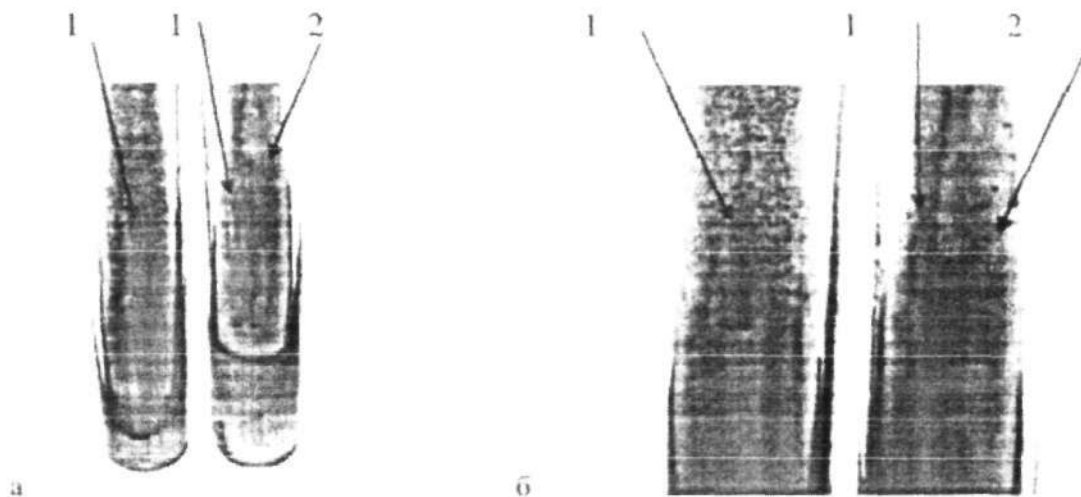


Рис. 1а (16 - збільшено)

Лінія затримки росту (2) культури *P. aeruginosa* (1) в місці нанесення дезінфектанту (2) "Вет-амін" методом "стікаючої краплі" у порівнянні з чистою культурою *P. aeruginosa* на скошеному МПА (1) (пробірка зліва - контроль - чиста культура; праворуч - дослідження)

UA 69947 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної мікробіології, санітарії і біотехнології, зокрема дезінфектології, та може бути використаний при проведенні випробувань щодо дослідження ефективності нових дезінфекційних препаратів.

- Відомим є метод визначення бактерицидних властивостей дезінфекційних засобів за допомогою тест-об'єктів, якими є пластинки розміром 10×10 см з матеріалів, що використовуються у виробничих приміщеннях, або самі об'єкти, штучно інфіковані тест-культурами. Для визначення ефективності дезінфікуючих засобів, методів та режимів використовують наступні види мікроорганізмів:
- а) кишкову паличку *E. coli*, як найбільш стійкий вид з кишкової групи бактерій;
 - б) золотистий стафілокок *St. aureus*, як найбільш стійкий вид з кокової групи мікроорганізмів;
 - в) антракоід *B. anthracoides* в споровій формі, як представник спороутворюючих мікроорганізмів.

- Розроблені з використанням вказаних тест-культур методи та засоби дезінфекції апробують на патогенних мікроорганізмах, для знищення яких рекомендуються дослідні нові дезінфекційні засоби (збудники туберкульозу з сибірки, дерматомікозів, віруси та інші). В кожному досліді використовують не менше 2-х тестів для кожного виду поверхонь. Інтенсивність контамінації розраховують за щільністю зараження - 1×10^9 мікробних клітин/см² при крапельному методі нанесення культури для розробки режимів знезараження підлоги та горизонтальних поверхонь. При розробці режимів знезараження вертикальних поверхонь та інших різних об'єктів використовують аерозольний метод контамінації тест-поверхонь - з розрахунку 2×10^9 мікробних клітин/см². як органічний захист мікроорганізмів використовують 20-40 % інактивовану сироватку великої рогатої худоби або коней, дефібриновану кров, гліцерин, м'ясопептонний бульйон та інші. Ефективність дезінфекції досліджують методом посіву змивів з тест-об'єктів на щільні живильні середовища, облік результатів проводять протягом 1-5 діб. За критерій ефективності приймають загибель культур на 99,99 % - 100 % при умові виживання поодиноких мікроорганізмів не більше ніж в 10-20 % взятих контрольних змивів (Інструкція по определению бактерицидных свойств новых дезинфицирующих средств, утвержденная Министерством здравоохранения СССР в 1968 г., № 737-68.).

- Схожим методом є випробування на батилових (бязевих) тест-об'єктах розміром 2×2 см без білкового та з білковим навантаженням, які просочують зависсю, що містить в 1 см³ $2 \cdot 10^9$ вегетативних мікробних клітин (спор бактерій або грибів) за оптичним стандартом мутності. Для встановлення впливу білкового навантаження (органічного забруднення) на рівень антимікробної активності дезінфектанту використовується також нанесення на тест-об'єкт відповідної мікробної культури з 10 % конячої сироватки. Посіви проб на щільних живильних середовищах, які відібрані після впливу дезінфектантів, оцінюють через 1-5 діб. Результати контролю мікробіцидної дії фіксують за ростом (+), суттєвим пригніченням або наявністю поодиноких колоній (±) або відсутністю росту (-). (Методы испытаний дезинфекционных средств для оценки их безопасности и эффективности. - Москва, 1998).

- Вказані вище способи є ефективними для досліджень бактерицидних властивостей нових дезінфекційних засобів, але при проведенні пошуку найвигідніших (оптимальних) концентрацій дезпрепаратів потребують випробування та використання в досліді чималої кількості різноманітних тест-об'єктів, їх подальшої дезінфекції або утилізації після проведення випробувань.

- Задачею даної корисної моделі є вдосконалення методу дослідження бактерицидних властивостей нових дезінфекційних засобів з використанням лише лабораторного посуду, поживних середовищ та необхідних тест-культур мікроорганізмів, з метою запобігання контамінаціями довкілля.

- Поставлена задача вирішується тим, що з метою розробки зручнішого методу дослідження без використання тест-об'єктів для виявлення найменших ефективних (оптимальних) концентрацій нових дезінфекційних засобів використовується модифікований метод "стікаючої краплі". В класичному варіанті при дослідженнях використовують наступні види мікроорганізмів: кишкову паличку *E. coli*, золотистий стафілокок *St. aureus*, антракоід *B. anthracoides* в споровій формі. Розроблені з використанням вказаних тест-культур методи та засоби дезінфекції апробують на патогенних мікроорганізмах, для знищення яких рекомендуються дослідні нові дезінфекційні засоби (збудники туберкульозу, дерматомікозів, сибірки та інші). При необхідності замість МПА використовують відповідне для дослідного мікроорганізму щільне поживне середовище у скошеному вигляді. Для вивчення активності дезінфекційного засобу в умовах органічного забруднення до зависі з мікробної тест-культури додають 10 % інактивованої сироватки коней або ВРХ. За методом, що заявляється, рівномірно розподіляють в 6 пробірках по поверхні скошеного МПА добову тест-культуру або суспензію мікроорганізмів, змитих з

добової культури МПА та витримують всі пробірки в термостаті при +38 °С протягом 40 хв. Потім у чотири пробірки вносять по 1 краплі дезрозчину досліджуваної концентрації та ставлять їх в спеціальний штатив для стікання краплі на 15 хв. В дві пробірки дезрозчин не вносять та залишають для контролю (контроль № 1). Інкують в термостаті з температурою +38 °С, облік ведуть через 12, 24, 48 год. (для класичних тест-культур). Паралельно інкують дві пробірки з поживним середовищем (МПА) за аналогічних умов для контролю чистоти середовища (контроль № 2).

В результаті ефективною концентрацію дезрозчину можна вважати таку, де чітко виявляється лінія затримки росту тест-культур в місці нанесення робочого розчину дослідного дезінфекційного препарату. Так, в пробірках з концентрацією дослідного дезінфекційного препарату, яка має бактерицидну дію, по ходу стікання нанесеної краплі ріст культури відсутній - має вигляд "чистої доріжки", можливе навіть утворення "бордюру" з колоній тест-культур навколо "чистої доріжки". В пробірках з концентрацією дослідного дезінфекційного препарату, яка має бактериостатичну дію, "бордюру" з колоній тест-культур відсутній або слабковиражений, переривчастий, лінія, затримки росту культур є нечіткою, несучільною. В пробірках з концентрацією дослідного дезінфекційного препарату, яка вже не має бактерицидної та бактериостатичної дії, або тест-культури є резистентними до даного дезінфекційного засобу, лінія затримки росту тест-культур ("чиста доріжка") відсутня, ріст тест-культур виявляється по всій поверхні скошеного агару. В контрольних пробірках (контроль № 1) ріст тест-культур повинен бути суцільний, по всій скошеній поверхні агару, а в пробірках контролю № 2 - відсутній.

Для підтвердження ефективності способу дослідження бактерицидної активності нових дезінфекційних засобів, що заявляється, були проведені дослідження в бактеріологічній лабораторії кафедри патанатомії, вірусології та хвороб птиці факультету ветеринарної медицини Сумського національного аграрного університету. Метою випробувань було порівняння ефективності способів дослідження бактерицидної дії нового дезінфекційного препарату "Вет-амін" за допомогою тест-об'єктів та модифікованого способу "стікаючої краплі", що заявляється, щодо збудника псевдомонози птиці - *Pseudomonas aeruginosa*. Відомо, що *Pseudomonas aeruginosa* є полірезистентним збудником до багатьох дезінфекційних-препаратів, тому авторами внесено *P. aeruginosa* у число тест-культур при дослідженні ефективності нових дезінфекційних засобів.

При визначенні антимікробної активності дезінфекційного препарату "Вет-амін" як тест-об'єкти використовували оцинковане залізо, дерев'яні бруски (пофарбовані та непофарбовані), червону цеглу та вирізи з штукатурки, розміром 10 на 10 см², як тест-культури використовували: *E. coli* (шт. 1257), *St. aureus* (шт. р. 209), антракоїд *Bac. anthracoides* (шт. Р. 96), *P. aeruginosa* (шт. 27/99). В досліді використовували 2 млрд. зависі добових агарових культур на стерильному ізотонічному розчині з рН 7,2 (виготовлених за стандартом мутності ДНКІ ім. Тарасевича (Москва). Зависі спорових культур готували з тридобових агарових культур, що зберігалися 10 діб при кімнатній температурі. За умов стерильності тест-об'єкти, попередньо продезінфіковані методом кип'ятіння протягом 5 хв. (крім штукатурки), викладали на емальовані кювети горизонтально і піпеткою наносили на них підготовлені зависі тест-культур. Підсушували протягом 60 хв. при кімнатній температурі. За допомогою оприскувача наносили розчин "Вет-аміну" на поверхню тест-об'єктів (з розрахунку 10 мл на 10 см²) в концентрації 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,2 %. Робочі розчини використовували за експозиції 60 хв. Контрольні тест-об'єкти зрошували перекип'яченою водопровідною водою кімнатної температури (контроль № 1).

Визначення якості дезінфекції проводили за допомогою стерильних вологих ватних тампонів, які після взяття проб занурювали в пробірки з МПБ і інкубували в термостаті при температурі +38 °С. Облік вели через 12, 24, 48 год. Для контролю чистоти поживного середовища паралельно інкубували дві пробірки з МПБ за аналогічних умов (контроль № 2). За умов помутніння МПБ, зміна його кольору на синьо-зелений, утворення сіруватої плівки на поверхні та ослизлого осаду на дні пробірки вважали про наявність росту мікроорганізмів. Ідентифікували мікроорганізми на МЛА, молочно-сольовому агарі, середовищах Ендо, Вільсон-Блер.

Ефективність дезінфектанту "Вет-амін" модифікованим методом "стікаючої краплі" вивчали наступним чином: рівномірно розподіляли аналогічно підготовлені зависі добових тест-культур по поверхні скошеного МПА (брали по 6 пробірок на кожен вид мікроорганізму та на кожную дослідну концентрацію), витримували їх в термостаті при +38 °С протягом 40 хв., після чого в чотири з кожних шести пробірок вносили по 1 краплі дезрозчину вище вказаних концентрацій та ставили їх в штатив для стікання краплі на 15 хв. В дві пробірки, що залишались, дезрозчин не

вносили та залишали для контролю (контроль № 1). Інкубували в термостаті при температурі +38 °С, облік вели через 12, 24, 48 год. Паралельно інкубували дві пробірки з поживним середовищем (МПА) за аналогічних умов для контролю чистоти середовища (контроль № 2). Ефективною концентрацією дезрозчину вважали таку, де чітко виявлялась лінія затримки росту культур *P. aeruginosa* в місці нанесення дезрозчину та "чиста доріжка" була суцільною, непереривною.

- В результаті проведених досліджень було виявлено, що після нанесення 0,005 % розчину було виділено культури *E. coli* та *P. aeruginosa* з поверхні нефарбованої деревини, цегли та штукатурки, *St. aureus* - з поверхні непофарбованої і пофарбованої деревини та штукатурки, *Bac. anthracoides* - зі всіх типів поверхонь. При використанні 0,01 % дезінфекційного розчину відбувалась загибель всіх тест-культур на оцинкованому залізі та пофарбованій деревині, проте ріст всіх культур було виявлено з поверхні непофарбованої деревини, також виявляли ріст *St. aureus* з поверхні штукатурки, *Bac. anthracoides* - цегли та штукатурки та *P. aeruginosa* - цегли. Після дії розчину в концентрації 0,02 % та вищих (0,05 %, 0,2 %) - ріст культур не встановлювали незалежно від структури поверхні тест-об'єкта. В контролі № 1 був виявлений суцільний ріст всіх тест-культур, а в контролі № 2 - росту культур не виявлено в обох пробірках. Результати дослідження (в двох повторностях) занесені в таблицю 1.

Таблиця 1

Результати визначення ефективності дезінфекційного засобу "Вет-амін" щодо тест-культур на різних тест-об'єктах за експозиції 1 год.

Тест-об'єкти	Вид мікроорганізмів/концентрації дезрозчину																			
	<i>E. coli</i>					<i>St. aureus</i>					<i>Bac. anthracoides</i>					<i>P. aeruginosa</i>				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
оцинковане залізо	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
пофарбована деревина	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
непофарбована деревина	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
цегла	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
штукатурка	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-

Примітка: «+» - ріст культур виявлено, «-» - росту культур не виявлено;

1 - відповідає концентрації 0,005 %;

2 - відповідає концентрації 0,01 %;

3 - відповідає концентрації 0,02 %;

4 - відповідає концентрації 0,05 %;

5 - відповідає концентрації 0,2 %.

- Таким чином, за даним методом дослідження встановлено бактерицидну дію "Вет-аміну" в концентрації 0,02 %; бактериостатичну дію - в концентрації 0,01 %.

- В результаті досліджень, проведених методом "стікаючої краплі" встановлена бактерицидна дія при використанні розчину "Вет-аміну" з 0,02 % концентрацією та вищою (0,05 %; 0,2 %;), про що свідчить виявлена чітка непереривчаста лінія затримки росту тест-культур в місці нанесення дезінфектанту таких концентрацій. Бактериостатична дія виявлена в концентрації 0,01 % для всіх тест-культур та в концентрації 0,005 % для *E. coli* та *St. aureus* - після нанесення дезрозчину даних концентрацій виявляли нечітку, переривчасту лінію затримки росту тест-культур. Резистентність тест-культур *Bac. anthracoides* та *P. aeruginosa* до дезрозчину з концентрацією 0,005 % підтверджена відсутністю лінії затримки росту та суцільним ростом даних тест-культур по всій поверхні МПА (Рис., табл. 2). Дослідження виконувались в двох паралелях.

Таблиця 2

Результати визначення ефективності дезінфекційного засобу "Вет-амін" щодо тест-культур модифікованим способом "стікаючої краплі"

Результати росту тест-культур	Вид мікроорганізмів/концентрації дезрозчину																			
	E. coli					St. aureus					Bac. anthracoides					P. aeruginosa				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Чітка непереривчаста лінія затримки росту культур	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Переривчаста, нечітка лінія затримки росту культур	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Ріст культур суцільний по поверхні МПА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Ріст культур відсутній по всій поверхні МПА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Примітка: «+» - вказана ознака виявлена, «-» - вказану ознаку невиявлено; К № 1 - контроль № 1, К № 2 - контроль № 2;

1 - відповідає концентрації 0,005 %;

2 - відповідає концентрації 0,01 %;

3 - відповідає концентрації 0,02 %;

4 - відповідає концентрації 0,05 %;

5 - відповідає концентрації 0,2 %.

- Таким, чином, в ході проведених паралельних досліджень бактерицидних властивостей нового дезінфекційного засобу "Вет-амін" вище вказаними методами виявлено, що за двома методами результати досліджень збігаються. Отримані висновки свідчать про ефективність способу, що заявляється, для вивчення бактерицидних властивостей нових дезінфекційних засобів з метою пошуку їх найвигідніших концентрацій. Спосіб відрізняється тим, що не потребує вироблення та використання різноманітних тест-об'єктів з необхідною подальшою їх дезінфекцією та утилізацією, і, на думку авторів, є більш зручним у виконанні, достовірним і скорочує час досліджень. В дослідженнях методом, що заявляється, використовується лише звичайний лабораторний посуд, поживні середовища та тест-культури.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Модифікований спосіб визначення бактерицидних властивостей нових дезінфікуючих засобів, спрямованих на визначення мінімальних бактерицидних концентрацій дезінфекційних препаратів з використанням тест-культур мікроорганізмів та штамів патогенних мікроорганізмів, який відрізняється тим, що досліджувані культури мікроорганізмів наносять та рівномірно розподіляють на скошеному м'ясопептонному агарі (або іншому щільному живильному середовищі), витримують на термостаті 15 хв. (з температурою +37 °С), з наступним нанесенням 1 краплі дослідного робочого дезінфекційного розчину та розміщенням у спеціальному штативі для стікання краплі, ставиться у спеціальний штатив для стікання краплі, за наявності бактерицидної дії у дослідного дезінфекційного препарату через 24-48 год. інкубування з температурою +37 °С по ходу стікання краплі робочого розчину виявляється лінія затримки росту культур у вигляді "чистої доріжки".