УКРАЇНА

(19) UA **(11) 89438** **(13) U**

(51) МПК
C12Q 1/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 11162**

(22) Дата подання заявки: **19.09.2013**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.04.2014**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.04.2014, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):
Марієвський Віктор Федорович (UA),
Кролевецька Надія Михайлівна (UA),
Рубан Надія Михайлівна (UA),
Матошко Галина Вікторівна (UA),
Бубало Володимир Олександрович (UA),
Омельченко Володимир Вікторович (UA)

(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, 03680 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ БІОПЛІВОК ДО ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ЗАСОБІВ РІЗНИХ ГРУП ХІМІЧНИХ СПОЛУК

(57) Реферат:

Спосіб визначення чутливості мікроорганізмів біоплівок до дезінфекційних засобів включає приготування розчину дезінфікуючого засобу, бактерійної культури і поживного середовища, експозицію суміші суспензії культури мікроорганізму з дезінфікуючим засобом в лунках імунологічних планшетів, додавання нейтралізатора дезінфікуючого засобу, висів суспензії на поживне середовище з подальшою оцінкою зростання мікроорганізмів на поживному середовищі шляхом обліку зростання в посівах контрольних та дослідних зразків порівнювання і визнання найменшої бактерицидної концентрації, при якій проявилися бактерицидні властивості дезінфекційного засобу причому спочатку формують біоплівку на рідкому поживному середовищі в лунках імунологічних планшетів, з лунок планшету з сформованою біоплівкою видаляють рідке поживне середовище, потім оброблюють біоплівку дезінфекційним засобом після експозиції, відбирають з дослідних лунок частину їх вмісту і переносять у інший планшет до нейтралізатора дезінфекційного засобу, далі вміст висівають на тверде диференційне середовище; виконують контрольне дослідження суспензії цієї ж бактерії з тією ж послідовністю дій, посіви інкубують при 37 °С протягом 24-48 год., після чого здійснюють оцінку зростання мікроорганізмів.

UA 89438 U

Корисна модель стосується галузі медичної мікробіології та може використовуватися для підбору дезінфектантів і їх концентрації для знезараженні медичного інструментарію, виробів медичного призначення з різних видів матеріалів і побутовій сфері.

Відомо, що більшість бактерій існують в природних екосистемах не у вигляді окремих плаваючих клітин, а у вигляді специфічно організованих біоплівок, що прикріплюються до певних субстратів. Біоплівки - це високоорганізоване мікробне "співтовариство" одного або кількох видів мікроорганізмів, які в складі біоплівки об'єднані складними міжклітинними зв'язками, що надає їм перевагу при виживанні.

Відомо про формування біоплівок та вплив на них антибактеріальних препаратів - антибіотиків – [Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Смирнова Т.А. и др. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов Salmonella typhimurium / Ж. микробиол., 2006, № 4, - С. 38-42].

Відомий спосіб санітарно-мікробіологічного дослідження змивів з поверхонь тест-об'єктів [див. UA8271, МПК C12Q 1/04, дата публікації: 15.07.2005], що включає визначення ефективності бактерицидної дії нових дезінфікуючих засобів та контроль дезінфекції поверхонь тест-об'єктів, який характеризується тим, що рідину, відтиснену з тампонів, попередньо не центрифугують, кишкову паличку висівають на зелене середовище КОДА, яке жовтіє при наявності росту E. coli, а стафілокок висівають на сольовий м'ясопептонний бульйон з вмістом 6,5 % кухонної солі, і при його помутнінні змиви пересівають на молочно-сольовий агар, ставлять на 24 години в термостат при температурі 37 °С і при появі білувато-жовтих в'язких колоній середнього розміру судять про наявність росту S. aureus.

Недоліком запропонованого способу є недостатня інформативність і неможливість точно визначити знищення мікроорганізмів біоплівки на всій поверхні тест-об'єкту, що перешкоджає ефективному підбору дезінфікуючого засобу і його концентрації.

Відомий спосіб визначення ефективності дезінфікуючих засобів [RU 2409679, МПК C12Q 1/04, A61L 2/16, дата публікації: 20.01.2011], за яким в приготований розчин дезінфектанту вносять бактерійну культуру і після експозиції впродовж 15-30 мін отриману суміш переносять в лунки планшета з поживним середовищем і заздалегідь внесеним і висушеним в ній нейтралізатором дезінфектантов, витримують її впродовж 30 хв і переносять в лунки, що містять заздалегідь висушене в них поживне середовище з редокс-індикатором колірності. Планшет поміщають в термостат на 4-24 год., після чого проводять оцінку отриманих результатів по зміні кольору середовища.

Недоліком такого способу є низька достовірність отриманих результатів, тому що за способом ефективність дезінфікуючих засобів визначали не на біоплівках бактерій, а на розчинах бактерій, в зв'язку з чим у відомому способі визначення ефективності дезінфікуючих засобів не враховувалося особливості організації мікробного "співтовариства" кількох видів мікроорганізмів, які в складі біоплівки об'єднані складними міжклітинними зв'язками, що надає їм перевагу при виживанні в реальних в природних екосистемах, де вони прикріплюються до певних субстратів.

Задачею розробки є створення способу визначення чутливості мікроорганізмів біоплівок до дезінфектантів із різних груп хімічних сполук, в якому за рахунок змін порядку здійснення дій, застосування нових дій та нових режимів їх виконання забезпечується підвищення достовірності отриманих результатів.

Для вирішення цього завдання спосіб визначення чутливості мікроорганізмів біоплівок до дезінфекційних засобів включає приготування розчину дезінфікуючого засобу, бактерійної культури і поживного середовища, експозицію суміші суспензії культури мікроорганізму з дезінфікуючим засобом в лунках імунологічних планшетів, додавання нейтралізатора дезінфікуючого засобу, висів суспензії на поживне середовище з подальшою оцінкою зростання мікроорганізмів на поживному середовищі шляхом обліку зростання в посівах контрольних та дослідних зразків порівнювання і визнання найменшої бактерицидної концентрації, при якій проявилися бактерицидні властивості дезінфекційного засобу.

Новим у способі є те, що спочатку формують біоплівку на рідкому поживному середовищі в лунках імунологічних планшетів, з лунок планшета з сформованою біоплівкою видаляють рідке поживне середовище, потім оброблюють біоплівку дезінфекційним засобом після експозиції, відбирають з дослідних лунок частину їх вмісту і переносять у інший планшет до нейтралізатора дезінфекційного засобу, далі вміст висівають на тверде диференційне середовище; виконують контрольне дослідження суспензії цієї ж бактерії з тією ж послідовністю дій, посіви інкубують при 37 °С протягом 24-48 год., після чого здійснюють оцінку зростання мікроорганізмів.

Запропонований спосіб дає можливість більш достовірно визначити вид і концентрації дезінфектантів для знезараження мікроорганізмів біоплівок на виробах медичного призначення, для дезінфекції у побутовій сфері (труби водопостачання, у трубках кондиціонерів, та ін.).

Запропонований спосіб визначає концентрації, при яких дезінфектанти можуть проявляти бактерицидну дію по відношенню до мікроорганізмів у сформованих в експерименті біоплівках в порівнянні з бактеріальними клітинами у суспензії, а отже і вибір ефективних концентрацій та експозицій дезінфікуючих засобів для знезараження виробів медичного призначення та інструментарію.

Запропонований спосіб ілюструється прикладами його виконання.

На сформованих протягом 24 год. біоплівках на імунологічних плоскодонних плашках вивчалася дія різних концентрацій дезінфікуючих засобів (ДЗ) при різних експозиціях, при цьому для нейтралізації активності хімічних сполук застосовували універсальний нейтралізатор для гуанідинових та четвертинно-амонієвих сполук, для хлорвмісних - розчин тіосульфату натрію. Як контроль використовували суспензію бактерій досліджених штамів, ДЗ в таких же концентраціях і експозиціях.

Дослідження проведені на чотирьох ДЗ з активними компонентами - четвертинними амонієвими солями ("CD-256", "СД-преміум"), комплексний хлорвмісний ("Дезактив-Хлор"), гуанідинові ("Гембар").

Двократні серійні розведення дезінфектантів готували на стерильній водопровідній воді.

В експерименті досліджено бактерії біоплівок різних штамів і видів роду Salmonella (typhimurium, Java, derby), свіжовиділених від хворих в лікувально-профілактичних закладах та музейних штамів (Salmonella jena).

Для отримання біоплівки, штами вирощувалась на рідкому поживному середовищі (триптон-соєвому бульйоні виробництва BioMerieux (Франція) в лунках плоскодонних імунологічних планшетів в об'ємі 0,2 мл. Ступінь формування біоплівки визначали фотометрично при довжині хвилі 630 нм за показниками оптичної густини біоплівки. Визначали середні значення та достовірність різниці показників біоплівки з показниками контролю.

Визначення здатності штамів сальмонел утворювати біоплівку показало, що штами сальмонел, як виділені від хворих, так і музейні штами, здатні утворювати біоплівку. Показники оптичної густини біоплівки досліджених штамів мали показники від 0,38 до 0,33 і мали достовірну різницю з показниками контролю, що свідчило про достатній ступінь формування біоплівки в планшетах. Експозиції ДЗ визначалися нормативними документами по застосуванню ДЗ.

З лунок планшета з сформованою біоплівкою видаляли рідке поживне середовище, додавали по 0,2 мл різних концентрацій двократних розведень досліджуваного ДЗ, після експозиції 30 та 60 хв., багатоканальним дозатором відбирали з дослідних лунок по 0,05 мл вмісту і переносили у інший планшет - з 0,15 мл відповідного до ДЗ нейтралізатора, через 5 хв. також багатоканальним дозатором з них відбирали вміст і висівали по 0,02 мл на тверде диференційне середовище - вісмут-сульфітний агар.

Контролями служили суспензія цих же бактерій у відповідних концентраціях ДЗ при таких же експозиціях, нейтралізацію ДЗ в контролі проводили аналогічно - в лунки з нейтралізатором вносили по 0,05 мл суспензії в розчині ДЗ, потім робили висіви на вісмут-сульфітний агар. Посіви інкубували при 37 °С протягом 24-48 год., облік росту в посівах контрольних та дослідних зразків порівнювали і визначали найменшу бактерицидну концентрацію, при якій проявилися бактерицидні властивості ДЗ.

Результати досліджень показали, що досліджені штами сальмонел, незалежно від виду, як музейні, так і свіжовиділені від хворих здатні формувати біоплівки вже протягом 24 год.

Проведені дослідження показали, що при знезараженні бактерій біоплівок S.typhimurium дезінфектантами з групи четвертинно амонієвих солей "CD-256" при експозиції 30 хв. найменша бактерицидна концентрація (НБК) ДЗ була в 4 рази вища за НБК планктонних суспензійних клітин - 0,0054 г/л і 0,0013 г/л відповідно. Аналогічні показники отримані і при експозиції 60 хв.

При знезараженні бактерій в сформованій біоплівці штаму S.derby показники НБК ДЗ "CD-256" становили 0,0217 г/л та для суспензії 0,0027 г/л, тобто в 10 разів більше, при експозиціях 30 хв. і 60 хв. Для знезараження бактерій в біоплівці штаму S. jena в порівнянні з бактеріями в суспензії, НБК становила 0,0434 та 0,0027 г/л відповідно, тобто була більше в 16 разів.

Для хлорвмісного ДЗ "Дезактив-Хлор" різниця НБК становила 16-64 рази в залежності від штаму.

Для гуанідинвмісного ДЗ "Гембар" кратність НБК при знезараженні між бактеріальною біоплівкою та планктонними бактеріями в суспензії становила тільки 2-4 рази в зв'язку з тим, що гуанідини самі створюють бактерицидну плівку.

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що для знезараження бактерій в біоплівці, що сформувалася впродовж 24 год., знадобилась НБК ДЗ в 4-16 разів вища, в залежності від виду мікроорганізмів та ДЗ, за НБК, необхідну для знезараження суспензії планктонних клітин досліджених штамів сальмонел.

Випробуваний метод визначення чутливості бактерій в біоплівці до ДЗ може використовуватися при виборі дезінфікуючих засобів для знезараження сформованих високостійких біоплівок різних видів мікроорганізмів як в медицині, так і в побутовій сфері, а отже дає можливість вибору адекватного ДЗ, його ефективних концентрацій та експозицій.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення чутливості мікроорганізмів біоплівок до дезінфекційних засобів, що включає приготування розчину дезінфікуючого засобу, бактерійної культури і поживного середовища, експозицію суміші суспензії культури мікроорганізму з дезінфікуючим засобом в лунках імунологічних планшетів, додавання нейтралізатора дезінфікуючого засобу, висів суспензії на поживне середовище з подальшою оцінкою зростання мікроорганізмів на поживному середовищі шляхом обліку зростання в посівах контрольних та дослідних зразків порівнюваня і визнання найменшої бактерицидної концентрації, при якій проявилися бактерицидні властивості дезінфекційного засобу, який **відрізняється** тим, що спочатку формують біоплівку на рідкому поживному середовищі в лунках імунологічних планшетів, з лунок планшету з сформованою біоплівкою видаляють рідке поживне середовище, потім оброблюють біоплівку дезінфекційним засобом після експозиції, відбирають з дослідних лунок частину їх вмісту і переносять у інший планшет до нейтралізатора дезінфекційного засобу, далі вміст висівають на тверде диференційне середовище; виконують контрольне дослідження суспензії цієї ж бактерії з тією ж послідовністю дій, посіви інкубують при 37 °С протягом 24-48 год., після чого здійснюють оцінку зростання мікроорганізмів.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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