



УКРАЇНА

(19) UA (11) 48698 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 39/12
A61K 33/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОЇ ДІЇ ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ЗАСОБУ НА МІКРОМІЦЕТИ

1

(21) u200911160
(22) 03.11.2009
(24) 25.03.2010
(46) 25.03.2010, Бюл.№ 6, 2010 р.
(72) КОВАЛЕНКО ВЯЧЕСЛАВ ЛЕОНІДОВИЧ, ВАСЯНОВИЧ ОЛЬГА МИКОЛАЇВНА
(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК
(57) Спосіб визначення ефективного дезінфікуючого засобу на мікроміцети, що включає підтвер-

2

дження дії за допомогою визначення оцінки фунгіцидної дії засобів, який **відрізняється** тим, що готують двошарове середовище Чапека з додаванням 2 % агару і врізаними в нього лунками, які заповнені дезінфектантом випробовуваної концентрації, для контролю наявності або відсутності зон затримки росту випробовуваних культур грибів навколо лунок за розмірами.

Корисна модель відноситься до галузі медичної, ветеринарної мікології, мікробіології та токсикології і може бути використана в роботі наукових та науково-виробничих лабораторій ветеринарної медицини.

Контроль за циркуляцією стійких до дезінфектантів форм грибів у ветеринарії відсутній. Загальноприйнятих методів визначення рівня чутливості мікроміцетів до дезінфектантів не існує. У минулому частота існуючих стійких грибів до дезінфектантів не визначалась і практична ветеринарія не враховувала цього явища. Режими застосування дезінфікуючих засобів, згідно інструкцій протягом багатьох років було без зміни, що і змінило положення в даний час. На це указують спостереження про зниження ефективності застосування багатьох препаратів для дезінфекції, а в деяких випадках повна відсутність ефекту.

У мікробіологічній медичній і ветеринарній практиці широко користуються методом дифузії в агар із застосуванням дисків, просочених антибактеріальними препаратами. Існують правила використання дисків для перевірки чутливості бактерій до етіотропних препаратів [1, 2].

Результати будь-яких визначень чутливості не є абсолютними величинами, оскільки на них істотний вплив роблять умови випробувань. Відмінності таких чинників, як об'єм інокулята, склад середовища і її рН, склад атмосфери і температура інкубації роблять істотний вплив на кількість противогрибкового засобу, потрібну для дослідження грибного зростання *in vitro*.

В даний час виявилось неможливим дати рекомендації для перевірки чутливості-стійкості грибів до дезінфектантів, які були б у всіх деталях прийнятні для всіх.

Найбільш близьким аналогом за технічною суттю до заявляемого способу є суспензійний метод.

Принцип методу це додавання необхідної дослідної концентрації препаратів у середовище з мікроміцетом, де проявляється його ефективність через 7-14 діб [3, 4].

Культурами служать виділені з об'єктів зовнішнього середовища культури мікроміцетів. Ідентифікацію грибів проводять згідно мікологічних методів дослідження, тобто процес культивування залежить від роду гриба. Далі, після культивування виділених грибів, готують їх суспензію щільністю 10 одиниць каламутності (1 мільярд спор) по галузовому стандартному зразку каламутності.

Виділені культури зберігають на відповідних агаризованих середовищах (залежно від роду гриба) протягом 30 днів при температурі від 4 до 10°C, після чого пересівають на свіже живильне середовище.

Середовище Чапека: 30,0 глюкози, 2,0 натрію азотнокислого, 1,0 калію фосфорнокислого одноосновного, 0,5 магнію сірчанокислого, 0,5 калію хлористого, 0,01 заліза сірчанокислого, 1000,0 мл води дистильованої, агар-агару 20 г. Стерилізують при 0,5 атм. 20 хв.

Отримане середовище фільтрують, розливають у флакони і стерилізують в автоклаві з темпе-

(13) U
(11) 48698
(19) UA

ратурою +110-112°C, тиском - 0,5 кг/см³, протягом 20 хвилин [5, 6].

Для виконання суспензійного методу отримані розчини дезінфектантів в кількості 0,1 мл змішують з робочими розведеннями грибів, витримують протягом 10-30 хв. і висівали на тверде поживне середовище Чапека. Посіви культивують у термостаті при температурі 27°C протягом 14 діб. Облік результатів проводять за наявністю чи відсутністю росту грибів.

Недоліком відомого способу є те, що він потребує досить значного часу для постановки реакції, матеріалу, умов та не дає точного аналізу отриманих результатів.

Метою корисної моделі є розробка універсального та швидкого способу оцінки впливу дезінфікуючого препарату на мікроміцети, як якісного способу його ефективності.

Запропонований спосіб здійснюється наступним чином.

Спосіб визначення чутливості мікроміцетів до дезінфектантів з використанням лунок в агаризованому середовищі.

Принцип корисної моделі заснований на методі дифузії в агар із застосуванням лунок (вирізаних в товщі агару), які накладені на поверхню середовища для випробування та містять різні концентрації дезінфектантів.

Прототип методу це чашковий метод дифузії в агар визначення антибіотикорезистентності мікроорганізмів [7, 8] з змінами, стосовно даного завдання. Основна модифікація методу полягала в тому, що використовуються не диски, просочені протигрибковим препаратом, а лунки, вирізані в товщі агару і заповнені антисептиком або дезінфектантом випробовуваної концентрації; досліджувану культуру, вирощену на агаровому середовищі, залежно від виду мікроміцетів вносять до розплавленого середовища для випробування в певному об'ємі.

Отримання чистих культур і ідентифікація мікроміцетів проводиться по правилах мікологічної техніки [9, 10].

В основу двошарового агарового середовища Чапека в даній корисній моделі покладена формула щільного живильного середовища з додаванням 2 % агару.

У роботі використовують чашки Петрі. Середовище (одно- або двошарове) розливають по чашках, поміщених на строго горизонтальній поверхні, заповнюють їх на однакову висоту в об'ємі 20 мл.

Для приготування двошарового середовища, нижній шар 15 мл розливають заздалегідь, зберігаючи чашки Петрі при температурі 2-8°C протягом 5 діб. Перед застосуванням з чашок Петрі знімають кришки і розкладають в термостаті на полицю-грати вверх дном, витримуючи при 37°C до висихання конденсату (25 хвилин). Потім їх розкладають на горизонтальні столи і розливають верхній шар.

Розплавлене середовище (одношарову) призначену для верхнього шару охолоджують до певної температури, Аспорогенові культури вносять

до розплавленого середовища при температурі 48-50°C, суспензія спор -65-70°C.

Посівна доза даного гриба 120 спор в 1 мл³ розплавленого середовища. При засіві середовища недостатньою кількістю грибів на поверхні агару не виявляється суцільного росту їх колоній, виходить мереживний або рваний «газон».

Приготування робочого розчину дезінфектанту Для вибору робочої концентрації дезінфектанту, керуються регламентом по застосуванню. Обов'язковою умовою для випробовуваного препарату повинна бути наявність серії розведень, починаючи з найменших робочих концентрацій і вище, які надають і які не надають згубної дії на дані мікроміцети.

Постановка досліду

Після застигання агару роблять лунки. Лунки вирізують спеціальним щупом (бором), завдовжки близько 6-8 см, з внутрішнім діаметром 10 мм. Стерильним щупом проколюють всі шари агару (користуються двошаровим середовищем) по прикладеному трафарету під кутом 60° один до одного на відстані близько 28 мм від центру чашки Петрі.

Трафарет - накреслений на картоні круг діаметром рівний чашці Петрі. Усередині круга на відстані 1,5 см від кола, на однаковій відстані один від одного зображено шість білих кружків діаметром 10 мм. Дно чашки Петрі (з контамінованим середовищем суміщають з колом і в місці, де крізь агар видно круги, вирізують лунки.

Робочі розчини антисептиків або дезінфектантів вносять до лунок мікропіпеткою по 5 крапель (0,1 мл) однієї концентрації. Заповнення лунок починають з найменших концентрацій.

Важливою умовою є те, що після внесення різних концентрацій препарату до лунок необхідно витримати готові чашки Петрі при кімнатній температурі не більше 2 годин перед їх поміщенням в термостат. Це забезпечує кращу дифузії препарату в агар за несприятливих умов росту культур, що наближає дію препаратів до природних умов застосування. Чашки витримують в термостаті протягом 18-20 годин при температурі 37°C, а потім проводять вимір зон затримки росту грибів.

Облік результатів.

Для того, щоб визначити дійсну категорію чутливості, необхідно з достатньою точністю заміряти діаметр кожної зони гальмування росту. При вимірюванні розміру зон в процесі перевірки правильності проведення випробування діаметр зон повинен вимірюватися з точністю до 1 мм.

Діаметри зон заміряють після витягання чашок Петрі з термостата, не видаляючи залишків препарату з лунок. Для цих цілей користуються міліметровою лінійкою або штангенциркулем.

Відсутність зон пригноблення росту культур свідчить про те, що даний препарат не володіє протигрибковою дією у випробовуваній концентрації.

Наявність зон відсутності росту культур мікроміцетів навколо лунок більш ніж на 5 мм від краю, указує на фунгіцидну дію препарату в даній концентрації.

Зона пригнічення росту даних мікроміцетів менше 5 мм від краю лунки, розглядається як фунгістатична дія препарату в даній концентрації.

При виявленні культур мікроміцетів, резистентних до досліджуваного препарату цей препарат визнається непридатним, і його слід негайно замінити.

Спосіб, який пропонуємо, забезпечує, в порівнянні з прототипом, скорочення часу на тестування, значне спрощення методичної та матеріальної бази аналізів. Крім того, використання методу розширило можливості застосування способу, оскільки динаміка показника чутливості мікроміцетів, який визначено в будь-якій речовині, може бути екстрапольована на всю велику кількість мікроорганізмів аналогічної стійкості.

Спосіб технологічно нескладний, вимагає обладнання вітчизняного виробництва і може бути використаний в роботі наукових і виробничих лабораторій ветеринарної медицини.

Використання нами даних методичних прийомів може служити підставою для вироблення різних розпоряджень, що регламентують застосування дезінфектантів.

Критерієм оцінки фунгіцидної дії препаратів служить наявність або відсутність зон затримки росту випробовуваних культур навколо лунок та в порівнянні з іншими аналогами по визначенню резистентності мікроміцетів до дезінфікуючих засобів за допомогою пропонованого методу веде до економії робочого часу в 10-12 разів і зменшення живильних середовищ в 5-6 разів. Пропонована корисна модель в порівнянні з суспензійним і батистових тест-об'єктах має значні технічні переваги, що полягають в стандартності і простоті виконання.

Бібліографічні дані:

1. Платонов Г.И., Бобрякова А.Г., Зудина М.А., Челнокова А.К., Останин Г.И. К вопросу организа-

ции бактериологического контроля заключительной дезинфекции в очагах туберкулеза // Современные методы и средства дезинфекции и стерилизации. / Сб. науч. тр. ВНИИДиС. - М., 1978, - в. 27. - с. 52-55.

2. Антонов В.Я. Справочник ветеринарного лаборанта. - М, "Колос", 1981.

3. Котик А.Н., Труфанова В.А. Случаи микотоксикозов сельскохозяйственных птиц в Украине в 1974-96 гг. // Птахівництво (Борки, Харків, обл.). Міжвідомчий тем. наук. збірник. - 1997. - В.47. - с. 92-100.

4. Black P.N., Udy A.A., Brodie S.M. Sensitivity to fungal allergens is a risk factor for life-threatening asthma // Allergy. 2000. V. 55. P. 501-504.

5. Методы исследования в ветеринарной микологии. Курасова В.В., Костин В.В., Малиновская Л.С. /М., «Колос». 1971. - 312 с.

6. Aspergillus niger // Микробиологический журнал. 1990. Т. 52. № 6. с. 69-73.

7. Платонов Г.И., Бобрякова А.Г., Зудина М.А., Челнокова А.К., Останин Г.И. К вопросу организации бактериологического контроля заключительной дезинфекции в очагах туберкулеза // Современные методы и средства дезинфекции и стерилизации. / Сб. науч. тр. ВНИИДиС. - М., 1978, - в. 27. - с. 52-55.

8. Калашникова Н.А., Родзевич В.И. Активность фосфатаз различных культур плесневых грибов // Прикладная биохимия и микробиология. 1971. Т. VII. Вып. 4. с. 446-450.

9. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. М., 1988. 230 с.

10. Gareis M., Bauer J., Enders C, Gedek B. Contamination of cereals and feed with Fusarium mycotoxins in european countries // Fusarium: Mycotoxins, Taxon a. Path.: Semin. Warsaw. Sept. 1987. - 1989. - P. 441-472.