



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 89001

(13) U

(51) МПК

C02F 1/50 (2006.01)

B22F 9/16 (2006.01)

A61L 2/16 (2006.01)

A61L 2/22 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 12274	(72) Винахідник(и): Коваленко Вячеслав Леонідович (UA), Яненко Ульяна Миколаївна (UA), Яненко Вячеслав Михайлович (UA), Гнатенко Альона Васильївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 21.10.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2014	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НААН, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2014, Бюл.№ 7	

(54) СПОСІБ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДЕЗІНФІКУЮЧИХ РЕЧОВИН НА ПЕРСИСТЕНЦІЮ В. ANTHRACIS**(57) Реферат:**

Спосіб дослідження впливу дезінфікуючих речовин на персистенцію *V. anthracis* включає визначення впливу мінімально інгібуючої дози дезінфікуючої рідини на антилізоцимну активність (АЛА) *V. anthracis*. Використовують метод відстроченого антагонізму в тесті з двошаровими агаровими пластинками, причому нижній шар 1,5 %-го м'ясо-пептонного агару (МПА) слугує поживною підкладкою для вирощування макроколоній дослідних культур бактерій, які в подальшому інактивують парами хлороформу та в якому створюють перемінну концентрацію лізоциму від 1 мкг/см³ до 10 мкг/см³ і більше, а у верхній шар 0,7 %-го МПА вносять суспензію живої індикаторної культури *Micrococcus luteus*. При наявності АЛА у дослідній культурі навколо її макроколоній спостерігають ріст індикаторної культури *M. luteus*, за її відсутності - росту *M. luteus* немає.

UA 89001 U

Корисна модель належить до ветеринарної медицини, зокрема до ветеринарної епізоотології, мікробіології, токсикології та експертизи, і може бути використана в роботі наукових та науково-виробничих лабораторій ветеринарної медицини.

На фоні створеного благополуччя, через специфічність збудника сибірки (тривале його збереження у ґрунті тощо) зберігається постійна загроза захворювання людей і тварин вірулентними формами *B. anthracis*. Саме тому необхідно мати досконалі засоби дезінфекції, що ефективно і всебічно діють на чинник сибірки, особливо споровий матеріал. Такий механізм є запорукою своєчасної дезінфекції та санації людей, тварин і навколишнього середовища в осередках сибіркової інфекції.

Існують методичні рекомендації "Рекомендації щодо санітарно-мікробіологічного дослідження змивів з поверхонь тест-об'єктів та об'єктів ветеринарного нагляду і контролю": Методичні рекомендації / О.М. Якубчак, В.Л. Коваленко, В.І. Хоменко, Г.М. Денисюк, Т.О. Бондар, С.В. Мідик. - Київ: НАУ, 2005. - 18 с. Даний спосіб регламентує порядок проведення та контролю профілактичної та вимушеної дезінфекції тваринницьких приміщень при інфекційних захворюваннях сільськогосподарських тварин. Недоліком даного способу є те, що за даних умов немає можливості проаналізувати резистентність, чутливість мікроорганізмів до дії бактерицидних препаратів.

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].

Найближчими аналогами є дослідження впливу антибактеріальних препаратів на антилізоцимну активність (АЛА) бактерій. Ряд науковців, особливо гуманної медицини, приділяють значну увагу до персистенції бактерій по відношенню до лізоциму організму господаря та антибіотиків. Це дає змогу визначити вірний шлях лікування та профілактики багатьох таких інфекцій як: стрептококоз, стафілококоз, харчові токсикоінфекції, пастерельоз, сальмонельоз тощо [3, 4, 5, 6, 7].

Основний напрямок розробки є запобігання персистенції патогенних мікроорганізмів до дезінфікуючих речовин.

Персистенція (від лат. *persistere* - залишатися, наполягати) - це форма симбіозу із збереженням довготривалої стійкості мікроорганізму в організмі господаря. За умов інактивації персистенція бактерій в макроорганізмі називається хронічним інфекційним процесом або бактеріоносійством, коли збудник забезпечує своє збереження в організмі. Персистентних властивостей бактерії набувають при умові подолання механізмів захисту макроорганізму. Таким чином механізми персистенції - це механізми виживання бактеріальних патогенів, які включають продукування секретів, що інактивують фактори захисту у господаря; антигенну мімікрію; утворення L-форм бактерій із відсутністю клітинної стінки. Одним із факторів персистенції є здатність мікроорганізмів проявляти антилізоцимну активність завдяки інактивації лізоциму [6]. Лізоцим підсилює літичну дію гідролітичних ферментів на мікроорганізми. У процесі еволюційного розвитку в мікроорганізмі з'явилася здатність до інактивації цього фактору захисту в організмі господаря та в інших бактерій в умовах біоценозу тобто здатність до антилізоцимної активності (АЛА) [6, 7]. Антилізоцимна активність (АЛА) мікроорганізмів полягає у специфічній здатності бактерій інактивувати лізоцим. АЛА є одним із факторів персистенції, що притаманна представникам не лише патогенних мікроорганізмів, але й нормофлори [8].

В основу корисної моделі поставлена задача підвищення ефективності досліджень антибактеріальних препаратів (антибіотиків) та ряд дезінфектантів при тривалому використанні, які викликають у мікроорганізмах мутації, що виражаються у здатності протистояти (персистенції) до застосованих препаратів. Тривалими дослідженнями доведено, що лікувальні та дезінфікуючі препарати стимулюють, пригнічують або можуть бути індиферентними по відношенню персистенції (антилізоцимної активності) патогенів. Саме вивчення даного маркера відіграє важливу роль в ефективності застосованого препарату. Через це, рекомендуємо спочатку визначити АЛА бактерій, а потім вплив на цю величину дослідного препарату.

Спосіб виконується таким чином:

Визначення АЛА мікроорганізмів.

Нами використано метод відстроченого антагонізму в тесті з двошаровими агаровими пластинками. При цьому нижній шар 1,5 %-го МПА слугує поживною підкладкою для вирощування макроколоній дослідних культур бактерій, які в подальшому інактивують парами хлороформу. В нижньому шарі агару створюють перемінну концентрацію лізоциму від 1 мкг/см³ до 10 мкг/см³ і більше, а у верхній шар 0,7 %-го МПА вносять суспензію живої індикаторної культури *Micrococcus luteus*. При наявності АЛА у дослідній культурі навколо її макроколоній

спостерігається ріст індикаторної культури *M. luteus*, за її відсутності - росту *M. luteus* немає (Рис.)

На рис. представлена «Схема постановки досліду визначення антилізоцимної активності мікроорганізмів», де:

- 5 1 - шар агарового середовища з лізоцимом; 2 - шар агарового середовища з індикаторною культурою *M. luteus*; 3 - ріст індикаторної культури *M. luteus*; 4 - дослідна культура має АЛА; 5 - дослідна культура не має АЛА.

10 Основною характеристикою для дезінфікуючого засобу є його якість, ефективність, безпечність для людини і тварин. Аналізуючи світову літературу, ми прийшли до висновку, що запобігання персистенції патогенів є одним з важливих параметрів дезінфекторів. Для того, щоб дослідити цей аспект необхідно визначити мінімально інгібуючу дозу дезречовини та її вплив на АЛА патогену.

Визначення субінактивуючих доз дезінфекційних речовин.

На кожний дослідний зразок дезінфікуючого засобу виділяємо по 6 пробірок з 5 см³ МПБ.

- 15 У пробірки з МПБ автоматичною піпеткою (від 0 до 1 см³) додаємо дезінфектанти в таких концентраціях: 0,05 см³; 0,01 см³; 0,5 см³; 1,0 та 1,5 см³. Шоста пробірка слугує контролем, до неї вносимо 1,0 см³ фізіологічного розчину.

До кожної пробірки піпеткою вносимо по 0,5 см³ добової бульйонної культури *B. anthracis*.

- 20 Дослідний матеріал ставили до термостату при температурі 37 °С на 24 години. Після інкубації дослідний матеріал пересіваємо бактерицидною петлею у пробірки з скошеним МПА.

Експериментальні пробірки з МПА ставимо у термостат при температурі 37 °С протягом 24 год. Після інкубації проводимо перегляд росту культури.

За субклінічну дозу вважаємо ту концентрацію, після якої на МПА виростуть поодинокі колонії (1-3) при суцільному рості у контролі.

- 25 Добову індикаторну культуру *M. luteus* із МПБ пересівають на пробірки зі скошеним МПА та інкубують у термостаті за температури 37 °С 24 години.

Приготування зависі дослідної культури із субінактивуючими дозами дезречовин.

- 30 Відбираємо пробірки з субінактивуючою дозою дезречовини і колонії культури *B. anthracis*, вносимо до них по 0,2 см³ фізіологічного розчину для змивання мікроорганізму. Змиви відбираємо асептично у стерильні пробірки та доводять до концентрації мікробних клітин 1×10⁹ м. к./см³ за стандартом каламутності, додаючи стерильний 0,85 % розчин NaCl.

- 35 Висіви дослідної культури *B. anthracis* здійснюють у вигляді краплі (діаметром 2-3 мм) за допомогою бактеріальної петлі на підготовлені чашки Петрі із середовищем і лізоцимом у відповідній концентрації. Чашки попередньо розкреслюють та підписують відповідно до кількості досліджуваних дезінфектантів. Чашки Петрі інкубують у термостаті за температури 37 °С 24 години.

- 40 Добові колонії культури *B. anthracis* з дослідними концентраціями дезінфектантів на чашках Петрі інактивують парами хлороформу. Для цього фільтрувальний папір розміром 7 × 7 см кладуть у кришку перевернутої чашки Петрі, наливають на нього 0,5 см³ хлороформу та закривають нижньою частиною чашки із посівом (дном до верху). Витримують 40 хв. Після цього фільтрувальний папір видаляють стерильним пінцетом. Усі операції виконують під витяжною шафою.

У період інактивації дослідних зразків хлороформом *ex tempore* готують завис добової індикаторної культури *M. luteus* 1×10⁹ м. к./см³ за стандартом каламутності.

- 45 В пробірку із добовою індикаторною культурою *M. luteus*, вирощеною на скошеному МПА, додають 2 см³ стерильного 0,85 % розчину NaCl та змивають, зішкрібаючи її бактеріальною петлею.

Змив відбирають асептично у стерильну пробірку та доводять до концентрації 1×10⁹ м. к./см³ за стандартом каламутності стерильним 0,85 % розчином NaCl.

- 50 Додають завис добової індикаторної культури у розплавлений та охолоджений до температури 50 °С 0,7 % МПА із розрахунку 0,1 см³ зависі культури *M. luteus* на кожні 4 см³ агару.

- 55 У чашки з інактивованими дослідними культурами мікроорганізму мірною піпеткою (5 см³) нашаровують 4 см³ підготовлені за п. 6.8. зависі індикаторної культури *M. luteus*. Чашки витримують при кімнатній температурі в асептичних умовах упродовж 15-20 хв. для затвердіння агару, потім інкубують у термостаті за температури 37 °С 48 год.

Облік результатів реакції проводять при проникаючому денному світлі на темному фоні через 24-48 год.

Результати вважають позитивними, якщо *M. luteus* росте на поверхні та макроколонії дослідної культури, які не мають антилізоцимну активність, ріст індикаторної культури *M. luteus* буде відсутній.

За рівень АЛА дослідної культури мікроорганізмів приймають максимальне розведення концентрації лізоциму у середовищі, при якій ще спостерігається ріст *M. luteus*.

За стандарт АЛА для дослідної культури вважається її показники у контролях. Якщо дана величина збільшується, значить дія даного дезінфектанту стимулююча на *B. anthracis*, якщо рівень АЛА зменшується дослідний засіб інгібує (знижує) персистентність мікроорганізму.

Таким чином, проведені дослідження дають змогу визначити ефективний засіб для дезінфекції, що є актуальним при боротьбі з сибіркою тварин. Інгібуюча дія дезінфектанту на спорову форму *B. anthracis* - запорука охорони біобезпеки для людей.

Запропонований спосіб визначення дії дезпрепаратів на персистентні властивості бактерій є суттєвою характеристикою даного препарату і визначає його дійсну ефективність у екстремальних ситуаціях. Цей аспект необхідний не тільки у практиці ветеринарної, а й гуманної медицини.

Джерела інформації:

1. 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.

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

3. Бухарин О.В. Значение персистенции бактериальных патогенов для клинической практики / Материалы выступлений на девятой (LXXII) сессии Общего собрания РАМН. - Медицина. - № 3 - С. 18-27.

4. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. - М.: Медицина, 1999. - 367 с.

5. Дерябин Д.Г., Курлаев П.П., Брудастов Ю.А. Роль персистентных характеристик возбудителя в определении затяжного течения гнойно-воспалительного процесса // Журн. микробиол. - 1996. - № 3. - С. 74-77.

6. Лосин Е.И. Экспериментальное обоснование комплексной антибактериальной терапии сальмонеллеза. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Челябинск, 1984.

7. Обгольц А.А. Механизмы персистирования бактерий// Журн. микробиол. - 1992. - № 4. - С. 70-72.

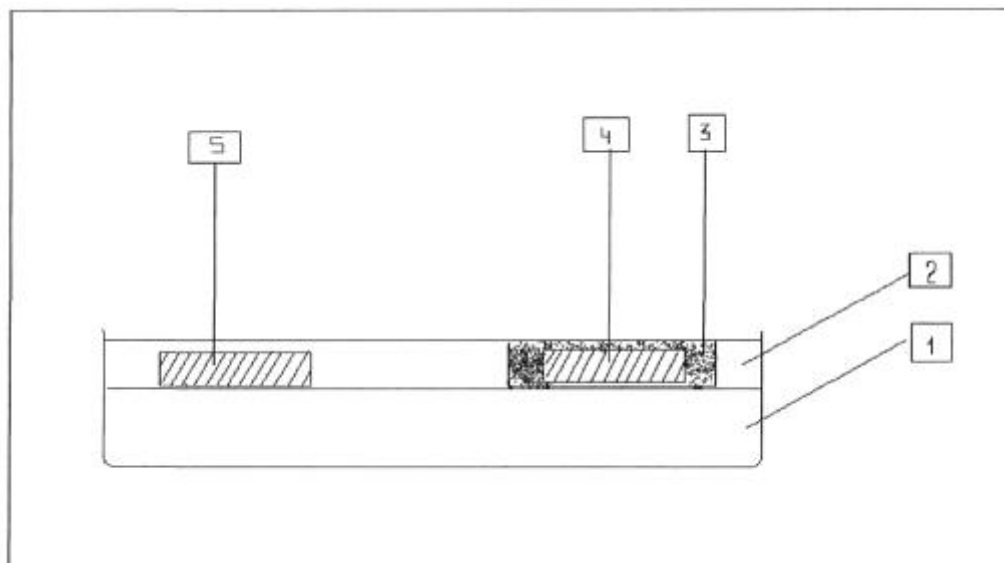
8. Бухарин О.В. Механизмы персистенции бактериальных патогенов // Вестн. РАМН. - 2000. - № 2. - С. 43-49.

9. Бухарин О.В., Усвятцов Б. Я. Новые подходы к лабораторной диагностике внутриклеточно паразитирующих бактериальных патогенов // Клин, лабор. диагностика. - 1999. - № 11. - С. 2-3.

10. Бухарин О. В., Усвятцов Б. Я., Малышкин А. П., Немцева В.П.// Журн. микроб, эпидем. и иммуноб. - 1984г. - № 2. - С. 27-28.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб дослідження впливу дезінфікуючих речовин на персистенцію *B. anthracis*, що включає визначення впливу мінімально інгібуючої дози дезінфікуючої рідини на антилізоцимну активність (АЛА) *B. anthracis*, який **відрізняється** тим, що використовують метод відстроченого антагонізму в тесті з двошаровими агаровими пластинками, причому нижній шар 1,5 %-го м'ясо-пептонного агару (МПА) слугує поживною підкладкою для вирощування макроколоній дослідних культур бактерій, які в подальшому інактивують парами хлороформу та в якому створюють перемінну концентрацію лізоциму від 1 мкг/см³ до 10 мкг/см³ і більше, а у верхній шар 0,7 %-го МПА вносять суспензію живої індикаторної культури *Micrococcus luteus*, причому при наявності АЛА у дослідній культурі навколо її макроколоній спостерігають ріст індикаторної культури *M. luteus*, за її відсутності - росту *M. luteus* немає.



Комп'ютерна верстка В. Мацело

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