



УКРАЇНА

(19) UA (11) 92178 (13) C2
(51) МПК (2009)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/055 (2006.01)
A61K 31/60
A61P 31/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСІБ ДЛЯ БОРОТЬБИ ІЗ ПАРАЗИТИЧНИМИ ПРОТОЗОЯМИ

1

(21) a200802143
(22) 06.07.2006
(24) 11.10.2010
(86) PCT/EP2006/006599, 06.07.2006
(31) 10 2005 033 496.2
(32) 19.07.2005
(33) DE
(46) 11.10.2010, Бюл.№ 19, 2010 р.
(72) ГРАЙФ ГІЗЕЛА, DE, ФРОЙМАН РОБРЕХТ, BE/DE, ОРТИЦ КЛАУДІО, CL/DE, РЕННЕР ГЕРД-ФРІДРІХ, DE, ЕКСНЕР ОТТО, DE, ШЛЕГЕЛЬ ДІТ-МАР, DE, МАТИСІАК РОЛЬФ, DE
(73) БАЕР ЕНІМАЛ ХЕЛС ГМБХ, DE, ЛАНКСЕСС ДОЙЧЛАНД ГМБХ, DE
(56) WO 9417661, A, 18.08.1994
EP 1 380 208, A, 14.01.2004
DE 1 202 443, B, 07.10.1965
US 3 063 895, A, 13.11.1962
US 2 874 087, A, 17.02.1959
DE 649 172, C, 21.08.1937
WO 2004021786, A, 18.03.2004
(57) 1. Засіб для боротьби із паразитичними протозоями, включаючи стійкі (довгоживучі) форми останніх, що містить
(a) 45-60мас.%, у перерахунку на фенольні біоциди, хлорованого біоцидного фенолу,
(b) 15-30мас.%, у перерахунку на фенольні біоциди, іншого хлорованого або 13-45мас.%, у перерахунку на фенольні біоциди, нехлорованого біоцидного фенолу,
(c) 10-20мас.% у перерахунку на фенольні біоциди, феноксіетанолу,

2

(d) 5-18 мас. %, у перерахунку на засіб, кератолітику,
(e) 30-50мас.% у перерахунку на засіб, неводних розчинників,
(f) воду - решта.
2. Засіб згідно з п.1, що містить два різних хлорованих біоцидних феноли.
3. Засіб згідно з п.1 або 2, що містить нехлороване біоцидне похідне фенолу.
4. Засіб згідно з п.1, причому хлорований біоцидний фенол вибирають із групи: 4-хлор-3-метилфенол (PCMC, п-хлор-м-крезол), 4-хлор-3-етилфенол, 2-н-аміл-4-хлорфенол, 2-н-гексил-4-хлорфенол, 2-циклогексил-4-хлорфенол, 4-хлор-3,5-ксиленол (PCMX, п-хлор-м-ксиленол), 2,4-дихлор-3,5-ксиленол (DCMX, дихлор-п-ксиленол), 4-хлор-2-фенілфенол, 2-бензил-4-хлорфенол, бензил-4-хлор-м-крезол, 4-хлорбензил-дихлор-м-крезол.
5. Засіб згідно з п.1, причому нехлорований біоцидний фенол вибирають із групи: 2-метилфенол, 3-метилфенол, 4-метилфенол, 4-етилфенол, 2,4-диметилфенол, 2,5-диметилфенол, 3,4-диметилфенол, 2,6-диметилфенол, 4-н-пропілфенол, 4-н-бутилфенол, 4-н-амілфенол, 4-н-гексилфенол, тимол (2-ізопропіл-5-метилфенол), 2-фенілфенол, 4-фенілфенол, 2-бензилфенол.
6. Засіб згідно з п.1, причому кератолітик вибирають із групи: органічні кислоти, сечовина, резорцин, меркаптооцтова кислота, сульфіді, 5-фторурацил.
7. Засіб згідно з п.6, причому кератолітиком є саліцилова кислота.

Винахід стосується засобу дезінфекції, що містить спеціальну комбінацію біоцидного фенолу та, при необхідності, похідні фенолів, а також кератолітик. Засіб дезінфекції особливо придатний для боротьби із паразитичними простішими організмами (протозоями), включаючи стійкі (довгоживучі) форми останніх.

Такі засоби дезінфекції мають, наприклад, особливе значення у боротьбі із кокцидіозами сільськогосподарських тварин. *Eimeria tenella* - протозойний збудник пташиного кокцидіозу, хвороби, що призводить до значної економічної проблеми при інтенсивному розведенні курчат та курей. Інфекція тварин починається із підхоплення спорів ооцистів, які виступають носіями зара-

(19) UA (11) 92178 (13) C2

зних одноклітинних спорозоїтів (Sporozoiten). Спорозоїти колонізують клітини кишечника, де відбувається розмноження Parasitenstadien у мільйони разів. До патологій кокцидіозу належать кров'яні проноси, які можуть спричинити значну економічну шкоду за рахунок зменшеного споживання їжі та втрату курами ваги.

Для профілактики цієї хвороби застосовують антикокцидозні препарати, щонайменше, на суму 350 мільйонів американських доларів щорічно. Починаючи із 1970, хемотерапевтичне лікування проводять, перед усім, із застосуванням поліетеріонофорів Моненсину, Наразину, Саліноміцину та Лазалоциду. Окрім суттєвого медикаментозного забруднення птиці, серйозною проблемою хемотерапевтичного лікування є розвиток медикаментозної резистентності. Першою ознакою розвитку резистентності часто виступає поновлене зростання виділення/екскреції ооцистів.

Альтернативою хемотерапевтичному способу боротьби із кокцидіозом могла б бути своєчасна дезінфекція пташників. При цьому стійкі форми *Eimeria*, так названі ооцисти, виділяються із нечистотами тварин і можуть довго залишатися разом із залишками нечистот та складовими корму на покритті полу, на поверхні стін, у тріщинах стін та на обладнанні, і виступати у якості постійних джерел інфекції, викликаючи нові випадки захворювань у новозаселених тварин протягом довгого часу. Ооцисти *Eimeria* можуть залишатися інфекційними до одного року після виділення із зараженого організму. Протягом цього часу перенос ооцистів людьми або тваринами у сусідні пташники становить додаткову проблему.

Ооцисти *Eimeria tenella* мають розмір 18.3-24.5мкм та утворюються у кінці бесполого циклу розмноження у клітинах кишечника інфікованих тварин, розмножуючись у мільйони разів. Жіночий макрогамонт запліднюється чоловічою мікрогаметою та утворює зиготу, яка вкривається двома типами оболонок: гладкою зовнішньою, що виникає у результаті злиття тіла, що формує стінку WFI („wall forming body I), та внутрішньою оболонкою, що виникає у результаті злиття тіла, що формує стінку WFII („wall forming body II). До дозрівання обох оболонок зростаючий ооцист залишається у паразитофорній вакуолі інфікованої клітини кишечника та тільки після цього виділяється із послідом. У присутності кисню починається так зване спорування: із недиференційованих споронтів виникають у результаті редукційного ділення чотири спорозоїти, кожен з яких містить два спорозоїти (Sporozoiten). Споруювання для *Eimeria tenella* триває, як правило, 2-3 дні. Лише після розкриття ооцист стає інфекційним.

Завдяки будові та складу стінок обох оболонок ооцисту, ооцисти мають чітко виражену біохімічну і фізіологічну здатність до опор. Оболонки утворюють ефективний захисний бар'єр для виживання зародків паразитів у навколишньому середовищі. Тоді як зовнішні стінки ооцисту складаються з фосфоліпідів, довголанцюжкових спиртів та тригле-

цидів, внутрішній шар складається з глікопротеїнів, які стабілізовані дисульфідними містками. Головний протеїн стінки ооцисту із молекулярною вагою 12-14kDa містить амінокислоти серин, тирозин, та треонін, і пов'язаний із вуглеводом. Такі протеїни надають ооцисту високої структурної стабільності до холоду та нагрівання. Ліпіди зовнішнього шару надають високої хімічної резистентності.

Застосування простих фізичних заходів, таких як тепло, холод, висихання або опромінення для дезінфекції досить обмежене. В лабораторії ооцити гинуть при температурі 60-100°C за декілька хвилин, але дезінфікуюча дія гарячої води при практичному застосуванні у пташнику, більшою мірою, дуже мала, оскільки вода на полу швидко охолоджується. Також лише часткової дезінфекції досягають при чищенні за умов високого тиску при невеликих часах обробки. Ооцити мають також значну резистентність на холоді. Навіть при заморожуванні до -25°C протягом 14 днів ооцисти *Eimeria* виживають та лишаються інфекційними. Висушування має певний ефект і призводить до певного ушкодження ооцистів, але такий спосіб дезінфекції є малонадійним.

Опромінення гамма- та електронним променями від 3,5-4,0kGy призводить до втрати ооцитами здатності до спорування, але використання опромінення непрактичне в умовах сільського господарства, за причини високих затрат на придбання необхідних приладів.

Хімічні засоби дезінфекції, що активні проти більшості бактерій та вірусів, неефективні проти ооцистів *Eimeria*, оскільки їх оболонка має комплексну хімічну будову та ускладнює проникнення хімічних речовин. Засіб дезінфекції, специфічний до паразиту, має спочатку проникнути крізь ліпідовмісну зовнішню оболонку ооцисту, а далі захопити стабільні глікопротеїни внутрішньої оболонки, до того як він зможе надати шкоди спорозистам та спорозоїтам, які містять мембрану.

Ооцисти *Eimeria* мають 1000-кратно більшу стійкість до дії агресивних неорганічних сполук, таких як гідроксид натрію (NaOH) або гіпохлорит натрію (NaOCl), ніж бактерії. Інфекційна здатність ооцистів не втрачається навіть при концентраціях >5% та часу дії 120 мін. У країнах західної Європи для цього із успіхом застосовують амоніак (NH₃) протягом 24 годин, але при цьому, за рахунок запаху амоніаку, одночасно відбувається сильне забруднення атмосфери.

Етанол (70-90%) та формальдегід не мають активності, достатньої для практичного застосування проти стійких ооцистів типу *Eimeria*.

Лише похідні фенолів, особливо р-хлор-м-крезол, містяться як єдині органічні активні речовини у деяких торгових препаратах (Таблиця), при цьому у комбінації із сірковуглецем та хлороформом (Таблиця 1). У практиці їх використовують для боротьби із кокцидіозом птиці у порожніх пташниках.

Таблиця

Допустимі засоби дезінфекції із активністю проти ооцистів *Eimeria* (Bohm 2000)

Торгова назва	Активна речовина	Застосування (% , год)
Calgonit sterilid P24	Крезол	4%, 2год.
Dessau DES SPEZIAL N	Крезол	4%, 2год.
ENDOSANFORTE S Neu	Крезол	4%, 2год.
JEME®-OKOK5	Фенольні сполуки Сірковуглець Хлороформ	5%, 2год.
LOMASEPT®L20	Фенольні сполуки Сірковуглець Хлороформ	5%, 2год.
NEOPREDISAN 135-1	Крезол	4%, 2год.
NOACK-DES ENDO	Крезол	4%, 2год.

WO 94/17661 описує засіб дезінфекції з антипаразитною активністю, який містить один або декілька фенолів у комбінації із активними сполуками із кератолітичною дією: такі як органічні кислоти, діалкілетири етиленліколю, а також алкілсульфонати натрію або калію, або сульфати.

У Німеччині активність антипаразитних засобів дезінфекції досліджують згідно із нормативами Німецького Ветеринарно-медичного Товариства (DVG) на ооцистах *Eimeria tenella* у лізисному досліді із суспензією, а також у інфекційному тесті на курчаті. Ооцисти *Eimeria tenella*, штамм "Houghton", класифікують як особливо резистентні, і тому їх рекомендують як тестові організми.

На практиці проблемою є боротьба із ооцистами різних типів *Eimeria*. Звичайно, будова стінок цисти схожа у різних протозойних, особливо у кокцидів, а також у гелмінтів. Вищенаведений представлений приклад типів *Eimeria* може бути перенесений на ці організми.

При використанні таких тестових організмів ми несподівано знайшли, що засіб, що містить комбінацію різних біоцидних фенолів, відповідно, похідних фенолів, при одночасному застосуванні із кератолітиками має дезінфікуючу ефективність, значно вищу за існуючий засіб дезінфекції.

Тому винахід стосується: засобу дезінфекції, що містить

- (а) Хлорований біоцидний фенол
- (б) Інший хлорований або нехлорований біоцидний фенол
- (с) Інший нехлорований біоцидний фенол та/або фенол-похідне
- (д) Кератолітик

Під біоцидними фенолами розуміють такі фенольні сполуки, які містять вільну ОН-групу та мають біоцидну активність. Такі феноли можуть містити інші замісники у кільці, наприклад, такі як галогени, особливо хлор, C_{1-6} -алкіл, C_{3-6} -циклоалкіл, феніл, хлорфеніл, бензил та/або хлорбензол як замісники.

Нехлорованими біоцидними фенолами є, наприклад: 2-метилфенол, 3-метилфенол, 4-метилфенол, 4-етилфенол, 2,4-диметилфенол, 2,5-диметилфенол, 3,4-диметилфенол, 2,6-диметилфенол, 4-н-пропілфенол, 4-н-бутилфенол, 4-н-амілфенол, 4-н-гексилфенол, тимол (2-

ізопропіл-5-метилфенол), 2-фенілфенол, 4-фенілфенол, 2-бензил фенол. Переважно у якості нехлорованих біоцидних фенолів використовують 2-фенілфенол.

Хлорованими біоцидними фенолами є, наприклад: 4-хлор-3-метилфенол (PCMC, р-хлор-м-крезол), 4-хлор-3-етилфенол, 2-н-аміл-4-хлорфенол, 2-н-гексил-4-хлорфенол, 2-циклогексил-4-хлорфенол, 4-хлор-3,5-ксиленол (PCMX, п-хлор-м-ксиленол), 2,4-дихлор-3,5-ксиленол (DCMX, дихлор-п-ксиленол), 4-хлор-2-фенілфенол, 2-бензил-4-хлорфенол, бензил-4-хлор-м-крезол, 4-хлорбензил-дихлор-м-крезол. Переважними хлорованими біоцидними фенолами є 2-бензил-4-хлорфенол, 4-хлор-3,5-ксиленол, 2,4-дихлор-3,5-ксиленол, а особливу перевагу віддають 4-хлор-3-метилфенолу.

Під фенол-похідними розуміють такі сполуки, що походять від фенолу, та які містять дериватизовану ОН-групу, таким чином, що вони не містять жодної вільної ОН-групи. Переважними є фенолетири, особливо аліфатичних спиртів із від 1 до 6 атомами вуглецю. Як переважний приклад може бути названий феноксиетанол.

За одним способом виконання, згідно із винаходом, у якості біоцидних активних речовин можуть бути скомбіновані один нехлорований фенол із двома хлорованими фенолами. Переважним прикладом є комбінація 4-хлор-3-метилфенолу, 2-фенілфенолу та 2-бензил-4-хлорфенолу.

Однак з'ясувалось, що пряме використання нехлорованих фенол-похідних, особливо феноксиетанолу, разом із біоцидними фенолами, як правило, призводить до покращання активної дії.

Згідно із одним переважним способом виконання винаходу, у якості біоцидних активних речовин можуть бути введені один хлорований фенол, один нехлорований фенол, та одне нехлороване фенол-похідне, особливо феноксиетанол.

Згідно із наступним переважним способом виконання, у якості біоцидних активних речовин можуть бути введені два різних хлорованих феноли та одне нехлороване фенол-похідне, особливо феноксиетанол.

Особливо перевагу у якості біоцидних активних речовин віддають введенню двох різних хлорованих фенолів, одного нехлорованого фенолу

та одного нехлорованого фенол-похідного, особливо феноксиетанолу. Особливо переважним прикладом є комбінація 4-хлор-3-метил-фенолу, 2-фенілфенолу, 2-бензил-4-хлорфенолу та феноксиетанолу.

Кератолітиками є речовини, що можуть впливати, а у крайньому випадку, і денатурувати або розкладати кератин. Для засобу дезінфекції, згідно із винаходом, у якості кератолітиків розглядають: органічні кислоти, такі як лимонна кислота, мурашина кислота, та саліцилова кислота; а також сечовину, резорцин, меркаптооцтову кислоту, сульфіді, 5-фторурацил. Згідно із винаходом перевагу віддають саліциловій кислоті.

Фенольні активні речовини та кератолітик можуть бути сформульовані у склад засобу дезінфекції різними способами, причому одержують тверді або рідкі формулювання.

Тверді формулювання можуть бути використані, наприклад, у вигляді порошків, розпилювачів, гранулятів і т.п. Такі формулювання, зазвичай, містять носії та/або допоміжні речовини. Активні речовини можуть бути або змішані із носіями та/або допоміжними речовинами, або нанесені на них.

Переважними є однак рідкі формулювання, наприклад у формі емульсій, суспензій, або, особливо, розчинів. Рідкі формулювання можуть бути застосовані напям, переважно при цьому мова йде про концентрати, які, як правило, перед використанням розводять водою до придатної концентрації.

Використовують емульсії типу вода-у-маслі або масло-у-воді. Їх готують таким чином, що активні речовини розчиняють у гідрофільній або гідрофобній фазі, та цю фазу гомогенізують із розчинником другої фази із використанням допоміжних засобів - придатних емульгаторів, та при необхідності додають інші допоміжні засоби, такі як барвники, консерванти, антиоксиданти, світлозахисні засоби, речовини для підвищення в'язкості.

У якості гідрофобної фази (масла) можуть бути названі: парафіни, силіконові масла, природні рослинні масла, такі як сезамове, мигдальне, касторове масло, синтетичні триглицериди, такі як диглицерид капріл/капринової кислоти, триглицеридна суміш з рослинними жирними кислотами із довжиною ланцюгу C_{8-12} , або іншими спеціально вибраними природними жирними кислотами, частково глицеридна суміш насичених або ненасичених жирних кислот, а також таких, що містять гідроксильні групи, моно- та ди-глицериди C_8/C_{10} -жирних кислот, естери жирних кислот, такі як етилстеарат, ди-н-бутирил-адипат, гексиловий естер лауринової кислоти, дипропіленглікольпеларгонат, естери розгалужених жирних кислот середньої довжини ланцюгу із насиченими жирними спиртами із довжиною ланцюгу $C_{16}-C_{18}$, ізопропілмиристат, ізопропілпальмитат, естер капріл/капринової кислоти із насиченим жирними спиртами із довжиною ланцюгу $C_{12}-C_{18}$, ізопропілстеарат, олеїловий естер олеїнової кислоти, дециловий естер олеїнової кислоти, етиловий естер олеїнової кислоти, етиловий естер молочної кис-

лоти, воскоподібні естери жирних кислот, такі як дибутилфталат, диізопропіловий естер адипінової кислоти, та споріднені останнім суміші естерів, серед інших, жирні спирти, такі як ізотридециловий спирт, 2-октилдодеканол, цетилстеариловий спирт, олеїловий спирт; жирні кислоти, такі як наприклад, олеїнова кислота та їх суміші.

У якості гідрофільної фази можуть бути названі: вода, спирти, такі як, наприклад, пропіленгліколь, глицерин, сорбітол, етанол, 1-пропанол, 2-пропанол, n-бутанол, а також суміші цих розчинників.

У якості емульгаторів можуть бути названі: неіоногенні ПАР, такі як, наприклад, поліоксіетильована касторова олія, поліоксіетильований сорбітанмоноолеат, сорбітан моностеарат, глицеринмоностеарат, поліоксіетилстеарат, алкілфенолполіглікольетер; амфолітичні ПАР, такі як ди-Na-n-лаурил-β-імінодипропіонат або лецитин;

Аніонні ПАР, такі як сульфоновий етер жирних спиртів, C_{8-18} -алкілсульфонат, або сульфат, як Na-лаурилсульфат, або вторинний алкілсульфонат (Mersolate®), переважним чином такий, що має алкільний ланцюжок із 15 атомів вуглецю), моно/диалкілполіглікольетер, естер ортофосфорної кислоти, сіль моноетаноламіну;

Катіонні ПАР, такі як цетилтриметиламмонійхлорид.

У якості інших допоміжних засобів називають речовини для підвищення в'язкості та стабілізатори емульсій, такі як карбоксиметилцелюлоза, метилцелюлоза, та інші похідні целюлози та крохмалю, поліакрилати, альгінати, полівінілпірролідон, полівініловий спирт, сополімери метил вінілового етеру та ангідриду малеїнової кислоти, поліетиле-нгліколь, воски, колоїдна кремнієва кислота, або суміш приведених речовин.

Суспензії готують суспендуванням активної речовини у рідині-носії, при необхідності із додаванням інших допоміжних речовин, таких як пом'якшувачі, барвники, консерванти, антиоксиданти, світлостабілізатори.

У якості рідини-носія можуть бути використані всі тут названі розчинники та їх гомогенні суміші.

У якості пом'якшувача (засіб - диспергатор) називають вище перелічені ПАР.

Розчини готують, розчиняючи активну речовину у придатному розчиннику та, при необхідності, додаючи всі добавки, такі як ПАР, агенти для розчинення, кислоти, основи, солі для буферних розчинів, антиоксиданти, консерванти.

У якості розчинника називають воду, спирти із від 1 до 4 атомів вуглецю (наприклад, етанол, 1-пропанол, 2-пропанол, n-бутанол), ароматично заміщені спирти, такі як бензиловий спирт, фенілетанол; глицерин, гліколь, пропіленгліколь, поліетиле-нгліколь, поліпропіленгліколь, естери, такий як етиловий естер оцтової кислоти, бутилацетат, бензилбензоат; етери, такі як алкіленглікольалкіловий етер,

дипропіленглікольмонометиловий етер, диетиле-нглікольмонобутиловий етер; кетони, такі як ацетон, метил етил кетон, ароматичні та/або аліфатичні вуглеводні, рослинні або синтетичні масла, диметилформамід (ДФМ), диметилацетамід, N-

метилпірролідон, 2-диметил-4-оксиметилєн-1,3-диоксолан а також їх суміші.

ПАР для застосування у розчинах можуть бути ПАР, приведені при описі емульсій, перевагу віддають аніонним ПАР, особливу перевагу віддають C_{8-18} -алкілсульфонатам або сульфатам, наприклад, вторинним алкілсульфонатам (Mersolate®), переважно із середньою довжиною алкільного ланцюга -15 атомів вуглецю.

У якості агента розчинення називають: розчинник, який викликає розчинення активної речовини у головному розчиннику, або заважає його осадженню. Прикладами є полівінілпірролідон, поліоксietильована касторова олія, поліоксietильований сорбітанестер.

Засоби дезінфекції, згідно із винаходом, можуть містити у якості інших допоміжних речовин або добавок також пластифікатори (пом'якшувачі) та/або інгібітори корозії.

У якості пом'якшувача йдеться про добавки, відомі із практики водообробки, наприклад, фосфонові кислоти, поліфосфати, що утворюють ланцюжки, або низькомолекулярні полікарбоніві кислоти.

У випадку коли засіб дезінфекції, згідно із виходом, має бути ще розведений для застосування, зазвичай використовують такі концентрації інгредієнтів:

Біоцидні феноли та, при необхідності, фенол-похідні зазвичай містяться у загальній концентрації від 10 до 90ваг.%, переважно 10 від 50ваг.%, особливо переважно від 15 до 40ваг.% відносно кількості засобу дезінфекції.

Переважним чином, співвідношення хлорованого біоцидного фенолу до нехлорованого біоцидного фенолу, відповідно, фенол-похідного, знаходиться у області від 40:60 до 90:10, переважно від 50:50 до 85:15, та особливо переважно, від 65:35 до 82:18 (вагові співвідношення відносно до загальної ваги біоцидних фенолів або фенол-похідних у засобі, у наступному скорочено позначених як фенольні біоциди). Як приклад для переважних фенольних біоцидів тут наведені переважні області концентрацій (наданий ваговий процент відносно до загальної ваги всіх фенольних біоцидів, що містяться у згаданому засобі):

4-хлор-3-метилфенол: 30 до 80, переважно 40 до 70, особливо переважно 45 до 60%. 2-бензил-4-хлорфенол: 5 до 50, переважно 10 до 40, особливо переважно 15 до 30%. 2-фенілфенол: 5 до 60, переважно 10 до 50, особливо переважно 13 до 45%. феноксиетанол: 3 до 30, переважно 5 до 25, особливо переважно 10 до 20%.

Згідно одного особливого переважного способу виконання, засіб дезінфекції, згідно із винаходом, містить у якості біоцидних фенолів комбінацію із 4-хлор-3-метилфенолу, 2-бензил-4-хлорфенолу та 2-фенілфенолу, а при необхідності, особливо переважно, може також містити феноксиетанол. Концентрації активних компонентів знаходяться у заданих вище межах.

Кератолітику вводять до складу засобу дезінфекції у ваговому співвідношенні до фенольних біоцидів від 50:50 до 10:90, переважно 40:60 до 15:85, особливо переважно 30:70 до 20:80. Відно-

сно до готового засобу дезінфекції (інакше кажучи, концентрату) концентрації кератолітика знаходяться, як правило, у межах 1 до 30ваг.-%, переважно 3 до 20ваг.-%, особливо переважно 5 до 18ваг.-%.

Засіб дезінфекції, згідно із винаходом, містить ПАР, звичайно у концентраціях від 3 до 20ваг.-%, переважно 5 до 20ваг.-%, особливо переважно 5 до 15ваг.-%.

Вміст розчинника може бути варійований у наступних межах. До складу концентратів вводять неводні розчинники, переважно вищезгадані спирти з 1 до 4 атомами вуглецю (наприклад, етанол, 1-пропанол, 2-пропанол, н-бутанол), звичайно у кількостях від 15 до 65ваг.%, переважно 20 до 60ваг.%, особливо переважно 30 до 50ваг.%. Далі, засіб містить, переважним чином, воду, звичайно від 0 до 30ваг.%, переважно 5 до 25ваг.%, особливо переважно 5 до 20ваг.%.

Далі описані засоби дезінфекції - концентрати, які для використання, як правило, розводять водою. Готові для застосування розчини містять зазвичай 0,5 до 20об.-%, переважно 1 до 10об.-%, особливо переважно 1 до 5об.-% концентрату засобу дезінфекції. Використана концентрація може бути вибрана згідно із метою застосування. Наприклад, при вищих концентраціях засобу для задовільної ефективності необхідні коротші часи дії.

Типові часи дії знаходяться, наприклад, у межах 0,5 до 5 годин, переважно від 1 до 4 годин.

Засоби дезінфекції, згідно із винаходом, придатні для боротьби із паразитичними протозойними та гельмінтами, які зустрічаються при розведенні сільгоспхудоби та племінних тварин, розведенні тварин у зоопарках, лабораторних та піддослідних тварин, а також домашніх тварин. При цьому ці засоби, поперед усім, ефективні проти стійких форм (екстра клітинні Cystenstadien).

До паразитичних протозойних відносять: Sarcomastigophora (Rhizopoda), такі як Entamoebidae, наприклад, Entamoeba histolytica, Hartmannellidae, наприклад, Acanthamoeba sp., Hartmannella sp.

Apicomplexa (Sporozoa), особливо Kokzidien, такі як Eimeridae Eimeria acervulina, E. adenoides, E. alabamensis, E. anatis, E. anseris, E. arloingi, E. ashata, E. auburnensis, E. bovis, E. brunetti, E. canis, E. chinchillae, E. clupearum, E. columbae, E. contorta, E. crandalis, E. deblickei, E. dispersa, E. ellipsoidales, E. falciformis, E. faurei, E. flavescens, E. gallopavonis, E. hagani, E. intestinalis, E. iroquoiana, E. irrisidua, E. labbeana, E. leucarti, E. magna, E. maxima, E. media, E. meleagridis, E. meleagrimitis, E. mitis, E. necatrix, E. ninakohlyakimovae, E. ovis, E. parva, E. pavonis, E. perforans, E. phasani, E. piriformis, E. praecox, E. residua, E. scabra, E. spec, E. stiedai, E. suis, E. tenella, E. truncata, E. truttae, E. zuernii, Globidium spec, Isospora belli, I. canis, I. felis, I. ohioensis, I. rivolta, I. spec, I. suis, Neospora caninum, Cystispora spec, Cryptosporidium spec, такі як Toxoplasmadidae, наприклад, Toxoplasma gondii, такі як Sarcocystidae, наприклад, Sarcocystis bovicanis, S. bovivominis, S. ovis, S. ovifelis, S. spec, та S. suis.

Mastigophora (Flagellata), такі як, наприклад, Giardia lamblia, G. canis. Femer Myxospora та Microspora, наприклад, Glugea spec, Nosema spec.

До гельмінтів відносять трематоди, лінточні черви та нематоди.

До трематодів належать наприклад збудники сімейства/роду: Fasciola, Paramphistomum, Dicrocoelium, Opisthorchis;

До лінточних червей належать, наприклад, збудники сімейства/роду: Moniezia, Anoplocephala, Diphylobothrium, Taenia, Echinococcus, Dipylidium, Raillietina, Choanotaenia, Echinuria,

До нематодів належать, наприклад, збудники сімейства/роду: Strongyloides, Haemonchus, Ostertagia, Trichostrongylus, Cooperia, Nematodirus, Trichuris, Oesophagostomum, Chabertia, Bunostomum, Toxocara vitulorum, Ascaris, Parascaris, Oxyuris, Oesophagostomum, Globocephalus, Hyostrongylus, Spirocerca, Toxascaris, Toxocara, Ancylostoma, Uncinaria, Capillaria, Prosthogonimus, Amidostomum, Capillaria, Ascaridia, Heterakis, Syngamus, Acanthocephalen.

Окрім застосування проти протозойних та гельмінтів, засіб дезінфекції, згідно із винаходом, може бути також застосований, наприклад, для боротьби із бактеріями, такими як, наприклад, Clostridium, Escherichia coli, Salmonella spec, Pseudomonas spec, Staphylococcus spec, Mycobacterium tuberculosis та дріжджових грибків таких як, наприклад, Candida albicans та грибкових інфекцій. Далі, засіб дезінфекції, згідно із винахо-

дом, може бути застосований також для боротьби із вірусами, такими як, наприклад, Influenzaviren. Відомі віруси інфлюєнці типу А та типу В. Так, наприклад, для птиці особливо важливими є повітряні віруси інфлюєнці типу А. Як приклад можна назвати повітряний вірус підтипу H5N1.

До сільгоспхудоби та племінної худоби тварин належать ссавці, такі як, наприклад, корови, коні, вівці, свині, кози, верблюди, індійські водяні буйволи, осли, мули, зебри, кролики, лані; пушний звір, наприклад, норка, шиншила, енот; птиця, така як, наприклад, кури, гуси, індики, вутки, голуби, фазани, а також всі типи птиці, що можуть утримуватися вдома та у зоопарку.

До лабораторних та піддослідних тварин належать миші, криси, сірійські хом'яки, собаки та кішки.

До домашніх тварин належать собаки та кішки.

Засоби дезінфекції згідно із винаходом, придатні, перше усе, до застосування при масовому утриманні тварин, особливо наприклад, при розведенні птахів (наприклад, курей), телят та свиней.

Приклади

І. Приклади формулювань

Загальний спосіб приготування

Феноли розчиняють у спирті, або, відповідно, у суміші спиртів, при перемішуванні. До отриманого спиртового розчину додають воду, та, відповідно, при необхідності феноксиетанол, саліцилову кислоту, та алкансульфонат (Mersolat® W93), та розчиняють все при постійному перемішуванні.

Складові формулювання	Номер прикладу						
	1 [г]	2 [г]	3 [г]	4 [г]	5 [г]	6 [г]	7 [г]
1-пропанол	25	25	25	25	25	25	25
2-пропанол	15	15	15	15	15	15	15
4-хлор-3-метилфенол	15	15	15	15	15	15	15
2-фенилфенол	10	5	5	5	5	5	10
2-бензил-4-хлорфенол		5	5	5	5	5	
вт. алкілсульфонат, середня довжина ланцюжка: C ₁₅ (Mersolat®W93)	10	10	10	10	15	10	10
Саліцилова кислота	10	10	10	15	10	10	10
Феноксиетанол	5					5	5
Вода	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100

Матеріали і методи для біологічних тестів

Тестування активності формулювань антипаразитних засобів дезінфекції досліджували згідно із нормативами Німецького Ветеринарно-медичного Товариства (DVG) а також до опублікованих методів Dauschies et al. (2002)

1. Отримання ооцистів

Для тестування використовують штам "Houghton" Eimeria tenella (Institute for Animal Health, Compton Laboratories, Near Newbury, Berks. RG16 0NN, UK). Для розмноження та отримання ооцистів застосовують курчат віком 14-днів чоловічої статі (штам LSL) сімейства Brinkschulte. Тварини у віці один день доставляють у тваринний центр та витримують у тваринному центрі в умовах вільних від кокцидину, до початку дослідження даючи курячий корм без кокцидіостатиків та воду скільки треба. Для зараження тварини індивідуально інюкують через шлунковий зонд використовуючи 13.000 ооцистів у 0,2мл води. На сьомий день після зараження тварин безболісно ушпля-

ють діоксидом вуглецю, ізолюють ооцисти із сліпої кишки та витримують у 2% розчині дихромату калію протягом 4 днів для спорювання. У день дослідження вимивають дихромат калію із суспензії ооцистів шляхом центрифугування, що проводять 3 рази протягом 5 хвилин з використанням 2000 обертів за хвилину. Залишок ресуспендують у воді. Після трьох центрифугувань суспензію ооцистів розводять водою у Burkner-Kammer до концентрації 25000 ооцистів на мл розчину штаму.

2. Дезінфекція ооцистів (лізисний тест)

Досліджуваний засіб дезінфекції у подвійній концентрації поміщають у бідистильовану воду безпосередньо перед кожним проведенням тесту. Виходячи із розчину штаму готують 1%, 2% та 4% розчини:

100мл розчину штаму +4900мл дистильованої води (=1%, подвійна концентрація!)

200мл розчину штаму +4800мл дистильованої води (=2%, подвійна концентрація!)

400мл розчину штаму +4600мл дистильованої води (=4%, подвійна концентрація!)

Кожне формулювання вводиться у кожний дослід двічі. Для одного додавання використовують 0,5мл суспензії ооцистів (=12.500 ооцистів =100%) та 0,5мл розчину дезінфекції у двох скляних стаканах на 25мл. Для внутрішнього дослідного контролю (KI) у 0,5мл води вводять 0,5мл суспензії ооцистів. Протягом часу дії (1год., 2год., або 3год.) суспензії витримують при струшуванні із застосуванням режиму сильного струшування.

Після закінчення відповідного часу впливу загальний вміст стакану переносять у колбу Ерленмейера на 2000мл. Стакани промивають водою, промивні води вливають у колбу, доводячи загальний об'єм до 1500мл. Вміст колби перемішують, та проводять седиментацію протягом 24 годин при кімнатній температурі. Після седиментації розчин зливають до 100мл залишкового об'єму. Седимент переносять у 200мл пробірку для центрифугування, розводять водою до 200мл та залишають на ніч. Наступного дня рідину із залишку відсмоктують до об'єму біля 30мл, седимент переносять у пробірку для центрифугування на 50мл та розводять водою до 50мл. Після змішування шляхом вливання піпеткою відбирають розчин дезінфектанту (6 разів по 200мкл) для кожного досліді і вносять у 6 комірок одного мікротитр-планшета на 96 комірок. Планшети витримують при 4°C у холодильнику. Розрахунок наявних ооцистів ведуть під мікроскопом Inversmikroskop при 200-кратному збільшенні. Рахують лише наявні неушкоджені ооцисти без такої зміни зовнішньої оболонки, яку можна розпізнати.

3. Розрахунок частоти лізису

Основою для розрахунку частоти лізису були середньоарифметичні кількості числа знайдених ооцистів із двох мікропланшет (планшета 1, планшета 2, подвійне визначення) для кожної загрузки засобу дезінфекції. При цьому частота повторного знаходження (WR) для кожної загрузки засобу дезінфекції пов'язана із частотою повторного знаходження (WR KI) для контрольного досліді (необробленого засобом дезінфекції) наступним рівнянням,

де відн. WR - відносна частота повторного знаходження

Відн. WR [%] = $WR \text{ (частота ооцистів після дезінфекції)} \times 100 / WR \text{ KI контроль (для контрольного досліді) [%]}$.

Ефективність формулювання засобу дезінфекції виражено як "Частота лізису" ооцистів. Її знаходять за формулою:

Частота лізису [%] = $100 - \text{відн. WR [%]}$.

4. Глобальна оцінка in vivo (Тест на інфекційність на курчатах).

Для того, щоб з'ясувати чи дезінфіковані ооцисти дійсно вбиті та втратили інфекційну здатність, необхідне тестування дезінфікованих ооцистів на курчатах, згідно із нормативами Німецького Ветеринарно-медичного Товариства (DVG).

В наших дослідіах використовують LSL курчат чоловічої статі віком 14 днів, яких інфікують ооцистами. Для цього густу суспензію, отриману після дезінфекції та зупинки реакції дезінфекції розводять до теоретичної дози 2000/мл, за спеціально розрахованим фактором розведення, відповідно до контрольного досліді. Для розрахунків цієї величини використовують 96-ячейковий планшет із лізисного досліді in vitro для усереднення того, скільки мл суспензії із 50мл пробірки контрольного досліді (KI) містить 2000 спорованих ооцистів. Усереднені при цьому об'єми вибирають також із усіх інших додавань засобу дезінфекції, незалежно від числа ооцистів, що при цьому зустрічаються. Об'єм, застосований на одну курку, складав 0,5мл. Додатково для внутрішнього контрольного дослідіа проводять інфекційний контроль із вихідними суспензіями ооцистів із концентрацією 2000 ооцистів/мл у об'ємі 0,3мл. На сьомий день після зараження тварин безболісно вбивають вуглекислим газом.

Для оцінки ефективності розглядають наступні критерії: набір ваги від початку досліді до кінця, рівень смертності, викликаній за рахунок інфекції, макроскопічне оцінювання посліду стосовно проносу, та виділення крові на 5 та 7 дні після зараження (оцінка від 0 до 6), макроскопічне оцінювання слизової кишечника на наявність виразок, особливо сліпої кишки (оцінка 0 до 6), та виділення ооцистів. Число ооцистів у посліді визначають за допомогою рахувальної камери McMaster. Одиничні знахідки співвідносять із результатами для необроблених неінфікованих контрольних груп, таким чином розраховують глобальну оцінку (Haberkorn und Greif 1999).

Результати дослідіжень наведені у наступних таблицях, разом із формулюваннями, приготованими згідно із винаходом. Покращена ефективність нового формулювання у порівнянні із формулюванням не за винаходом, особливо очевидна за показником зменшення виділення ооцистів.

У таблицях, наведених для опису прикладів В, Е, F, Н, назви у строчках означають:

у строчці "обробка" фраза "неінф. контроль" - означає неінфікована контрольна група; "інф. контроль" означає інфікована контрольна група; Приклад 1 означає приклад формулювання номер 1.

У строчці "мертві" приведено число померлих тварин, у порівнянні із введеними у досліді. У строчці "вага у % неінф. контроль" приведені співвідношення ваги оброблених тварин до ваги тварин неінфікованої контрольної групи. У строчках "Пронос", "Виразки" та "Ооцисти" приведені одиночні дані. У строчці "% ефективності" приведена глобальна оцінка; 0% означає відсутність ефективності, 100% означає повна ефективність.

Результати біологічних дослідіжень Приклад А

Оцінка ефективності різних формулювань засобів дезінфекції (4%) проти ооцистів *Eimeria tenella* in vitro, після 3 годин дії.

Формулювання, обробка	Число ооцистів		Середнє число ооцистів	відн. WR%	Частота лізису
	Планшет 1	Планшет 2			
Приклад 1	0	0	0	0,0	100
Приклад 2	0	0	0	0,0	100
Приклад 3	5	8	6,5	15,3	84,7
Неопредизан**	32	27	29,5	69,4	30,6
контроль	49	36	42,5	100	0,0

Біологічний приклад В:

Оцінка ефективності різних формулювань засобів дезінфекції (4%) проти ооцистів *Eimeria tenella* in vivo на курчатах, після 3 годин дії.

Формулювання, обробка	Мертві	Вага у % неінф. контроль	Пронеси Оцінка 1-6	Виразки Оцінка 1-6	Ооцисти	Ооцисти у % інф. контроль	% ефективності
неінф. контроль	0/6	100	0	0	0	0	100
інф. контроль	0/3	92	0-4	6	45000	100	0
Приклад 2	0/3	>100	0	2	200	0,4	92
Приклад 3	0/3	79	0	0	0	0	92
Приклад 4	0/3	90	0	0	200	0,4	92
Приклад 5	0/3	90	0	1,3	0	0	85
Приклад 7	0/3	93	0	0	0	0	100
Неопредизан **	0/3	>100	0	0	35000	78	54
Ki	0/3	88	0-4	6	214000	>100	0

* не згідно із винаходом

** Комерційний продукт, торгова назва

Біологічний приклад С:

Оцінка ефективності різних формулювань засобів дезінфекції (1%, 2%, 4%) проти ооцистів *Eimeria tenella* in vivo, після 3 годин дії.

Формулювання, обробка	Число ооцистів		Середнє число ооцистів	відн. WR%	Частота лізису
	Планшет 1	Планшет 2			
Приклад 3, 1%	0,2	15,0	7,6	25,9	74,1
Приклад 3, 2%	0,3	0,3	0,3	1,1	98,9
Приклад 3, 4%	0,0	0,8	0,4	1,4	98,6
Приклад 6, 1%	33,5	26,8	30,2	100	0
Приклад 6, 2%	7,7	16,8	12,3	41,8	58,2
Приклад 6, 4%	0,0	0,0	0,0	0	100
Приклад 7, 1%	22,2	36,2	29,2	99,4	0,6
Приклад 7, 2%	8,3	8,3	8,3	28,4	71,6
Приклад 7, 4%	4,3	5,8	5,1	17,3	82,7
Контроль	28,7	30,0	29,3	100	0

Біологічний приклад D:

Оцінка ефективності різних формулювань засобів дезінфекції (4%) проти ооцистів *Eimeria tenella* in vitro, після 1, 2 та 3 годин дії.

Формулювання, обробка	Число ооцистів		Середнє число ооцистів	відн. WR%	Частота лізису
	Планшет 1	Планшет 2			
Приклад 3, 1г	1,0	0,2	0,6	2,0	98,0
Приклад 3, 2г	0,2	0,8	0,5	1,7	98,3
Приклад 3, 3г	0,0	2,5	1,3	4,2	95,8
Приклад 6, 1г	0,0	0,0	0,0	0,0	100
Приклад 6, 2г	0,0	0,0	0,0	0,0	100
Приклад 6, 3г	0,0	0,0	0,0	0,0	100
Приклад 7, 1г	0,7	1,2	0,9	3,1	96,9
Приклад 7, 2г	4,7	9,2	6,9	23,2	76,8
Приклад 7, 3г	1,5	0,5	1,0	3,4	96,6
Контроль	28,8	30,7	29,8	100	0

Біологічний приклад E:

Оцінка ефективності різних формулювань засобів дезінфекції (4%) проти ооцистів *Eimeria tenella* на курчатах in vivo, після 3 годин дії

Формулювання, обробка	Мертві	Вага у % неінф. контроль	Пронеси Оцінка 1-6	Виразки Оцінка 1-6	Ооцисти	Ооцисти у % інф. контроль	% ефективності
неінф. контроль	0/6	100	0	0	0	0	100
інф. контроль	0/3	94	0-2	4,6	106000	100	0
Приклад 3	0/3	92	0	0	3000	3	91
Приклад 6	0/3	>100	0	0	6000	6	91
Приклад 7	0/3	94	0	0	2000	2	91

Біологічний приклад F:

Оцінка ефективності різних формулювань засобів дезінфекції (4%) проти ооцистів *Eimeria tenella* на курчатах *in vivo*, після 1 години дії.

Формулювання, обробка	Мертві	Вага у % неінф. контроль	Пронеси Оцінка 1-6	Виразки Оцінка 1-6	Ооцисти	Ооцисти у % інф. контроль	% ефективності
неінф. контроль	0/6	100	0	0	0	0	100
інф. контроль	0/3	84	0	6	1800	100	0
Приклад 3	0/3	>100	0	0	3000	>100	45
Приклад 6	0/3	98	0	0	0	0	100
Приклад 7	0/3	>100	0	0	2600	>100	45

Біологічний приклад G:

Оцінка ефективності формулювання засобу дезінфекції за прикладом 6 (1%) *in vitro* проти ооцистів *Eimeria tenella*, у порівнянні із Неопредизаном (Neopredisan (1%)), після 1, 2 та 3 годин дії.

Формулювання, обробка	Число ооцистів		Середнє число ооцистів	відн. WR%	Частота лізису
Приклад 6, 1год.	2,17	6,67	4,42	13,3	86,7
Приклад 6, 2год.	2,50	1,83	2,17	6,5	93,5
Приклад 6, 3год.	4,00	10,00	7,00	21,1	78,9
Неопредизан 1год.	26,33	24,33	25,33	76,2	23,8
Неопредизан 2год.	11,50	26,33	18,92	56,9	43,1
Неопредизан 3год.	24,17	20,17	22,17	66,7	33,3
Контроль	29,00	37,50	33,25	100,0	0,0

Біологічний приклад H:

Оцінка ефективності формулювання засобу дезінфекції за прикладом 6 (1%, 4%) *in vivo* проти ооцистів *Eimeria tenella*, у порівнянні із Неопредизаном (Neopredisan®) 1%, 4%, після 1 години дії.

Формулювання, обробка	Мертві	Вага у % неінф. контроль	Пронеси Оцінка 1-6	Виразки Оцінка 1-6	Ооцисти	Ооцисти у % інф. контроль	% ефективності
неінф. контроль	0/6	100	0	0	0	0	100
інф. контроль	0/6	82	0-2	6		100	0
Приклад 6 1%,	0/3	>100	0	4		14	42
Приклад 6 4%	0/3	>100	0	0		1,4	92
Неопредизан 1%	0/3	>100	0-2	6		64	8
Неопредизан 4%	0/3	98	0	2		87	42

Список літератури:

Bohm, R. (2000): Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung (Handelspräparate). Deutsches Tierärzteblatt 9/2000.

Daughsies, A., Böse, R., Marx, J., Teich, K., Friedhoff, KT (2002): Development and application of a standardized assay for chemical disinfection of coccidia oocysts. Vet. Parasitol. 103 (4):299-308.

Mouafo, A.N., Richard, F., Entzeroth, R. (2000): Observation of sutures in the oocyst wall of *Eimeria tenella* (Apicomplexa). Parasitol. Res. 86: 1015-1017.

Eckert, J. (2000): Parasitenstadien als umwelthygienisches Problem. In: Veterinärmedizinische Parasitologie 94-119. Ed.: Rommel, Eckert, Kutzer, Körting, Schnieder. Parey Buchverlag Berlin.

Haberkom, A., Greif, G. (1999): Animal Models of Coccidia Infection. In: Handbook of Animal Models of Infection, chapter 99. Academic Press.