

Утверждаю

Проректор по научной

и инновационной работе

Воротников И.Л.

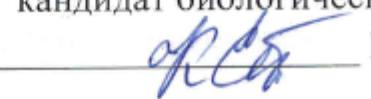


**ОТЧЕТ  
О РЕЗУЛЬТАТАХ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ  
СРЕДСТВА «КЛИОДЕЗИВ»**

(изготовитель продукции ООО «ФармПромВет»)

в рамках договора № 10/11-14 от 10 ноября 2014 г.

Руководитель темы:  
заведующий кафедрой "Микробиология,  
биотехнология и химия"  
ФГБОУ ВПО "Саратовский ГАУ"  
доктор биологических наук, профессор  
  
Ларионова О.С.

Исполнитель:  
доцент кафедры "Микробиология,  
биотехнология и химия"  
кандидат биологических наук, доцент  
  
Красникова Е.С.

Саратов 2015

# **Определение фунгицидной активности средства «Клиодезив»**

**Цель исследований:** Определить фунгицидную активность средства «Клиодезив».

- Задачи:**
- 1) Провести оценку фунгицидной активности средства «Клиодезив» с применением тест-микроорганизмов.
  - 2) Определить оптимальную дозу средства и экспозицию.
  - 3) Исключить фунгистатический эффект дезсредства.

## **Материалы и методы:**

Исследования по определению фунгицидной активности средства «Клиодезив» проводились на кафедре «Микробиология, биотехнология и химия» ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» с 14 января 2015 г. по 2 марта 2015 г. (ОПП №1 - 10 мг йода/м<sup>3</sup>, ОПП №2 – 20 мг йода/м<sup>3</sup>, ОПП №2 – 30 мг йода/м<sup>3</sup>).

Средство, предназначенное для исследования, представлено в форме порошка от светло-желтого до оранжевого цвета, с характерным запахом йода, в количестве 10 грамм. Действующее вещество – йод кристаллический – 40%, вспомогательные вещества – калий азотнокислый – 40% и углеводы (сахар, крахмал или декстрин) до 100%.

Средство "Клиодезив", согласно утверждённой инструкции, может использоваться в виде фумигационного аэрозоля, а также для лечения респираторных болезней с/х животных, санации воздуха помещений в присутствии животных и дезинфекции объектов ветеринарного надзора.

Все исследования проведены в соответствии с Р 4.2.2643-10. Методы лабораторных исследований и испытаний медико-профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство. Москва. - Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 1 июня 2010 г.)

Для проведения испытаний взяты рекомендованные инструкцией к дезсредству дозы по ДВ: 10мг/м<sup>3</sup>, 20мг/м<sup>3</sup>, 30мг/м<sup>3</sup>.

## **Исследования:**

- 1) Оценку фунгицидной активности средства «Клиодезив» проводили в насыщающих концентрациях, в герметичной емкости (эксикаторе), в которой были созданы условия свободного испарения летучих компонентов средства при комнатной температуре в течение времени экспозиции.

- 2) Испытания проводили согласно Р 4.2.2643-10 на тест-объектах: *Candida albicans* РКПГУ 401/NCTC 885-653, *Aspergillus niger* РКПГФ 1249/880-2, *Trichophyton mentagrophytes* РКПГФ 1425. Штаммы предоставлены ГБОУ ВПО "Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова" Минздрава России (договор № 263-14 нбн от 12.11.2014). Все культуры имели паспорта и по свойствам соответствовали требованиям Р 4.2.2643-10.

- 3) При проведении испытаний, концентрация жизнеспособных клеток тестовых микроорганизмов составляла не менее 3x10<sup>8</sup>КОЕ/мл.

- 4) Испытания проводили методом батистовых тест-объектов, рекомендуемым Р 4.2.2643-10 для изучения активности аэрозольно применяемых ДС. При данном методе исследования, критерием активности ДВ субстанции является 100% гибель тест-грибов при времени дезинфекционной выдержки не более 60 минут.

- 5) В ходе эксперимента, контаминированные милиарной взвесью тест-штамма батистовые

тест-объекты, выдерживали 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минут в ДС (концентрация ДВ 10мг/м<sup>3</sup>, 20мг/м<sup>3</sup> и 30мг/м<sup>3</sup>).

6) С целью исключения бактериостатического действия, после окончания экспозиции, ДВ инактивировали, согласно инструкции, 1% раствором тиосульфата натрия, а затем погружали в бульон Сабуро.

7) Положительным контролем являлись контаминированные батистовые тест-объекты, погруженные на весь период эксперимента в питьевую воду. Отрицательным контролем являлись контаминированные батистовые тест-объекты, погруженные на весь период эксперимента в нейтрализатор (1% раствор тиосульфата натрия).

8) Учитывали время экспозиции и концентрацию ДВ для каждого тест-объекта. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

*Оценка фунгицидной активности средства «Клиодезив»*

Микроорганизм		Эффективность ДС	
Вид	Концентрация	Концентрация ДВ	Время экспозиции
<i>Candida albicans</i> РКПГУ 401/NCTC 885-653	$3 \times 10^8$ КОЕ/мл	10 мг/м <sup>3</sup>	Более 60 мин*
		20 мг/м <sup>3</sup>	Не менее 60 мин.
		30 мг/м <sup>3</sup>	Не менее 30 мин.
<i>Aspergillus niger</i> РКПГФ 1249/880-2	$4 \times 10^8$ КОЕ/мл	10 мг/м <sup>3</sup>	Более 60 мин*
		20 мг/м <sup>3</sup>	Не менее 60 мин.
		30 мг/м <sup>3</sup>	Не менее 40 мин.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> РКПГФ 1425.	$6 \times 10^8$ КОЕ/мл	10 мг/м <sup>3</sup>	Более 60 мин*
		20 мг/м <sup>3</sup>	Не менее 40 мин.
		30 мг/м <sup>3</sup>	Не менее 30 мин.

\* При исследовании методом батистовых тест-объектов, критерием активности ДВ субстанции является 100% гибель тест-грибов при времени дезинфекционной выдержки не более 60 минут. // Методы лабораторных исследований и испытаний медико-профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство Р 4.2.2643-10. Москва. - Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010, стр.200.

Основные параметры фунгицидной активности средства «Клиодезив» вычислены, как среднестатистические в повторных экспериментах.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что средство «Клиодезив» имеет следующие параметры:

1) Для тест - культуры *Candida albicans* РКПГУ 401/NCTC 885-653LD50 фунгицидный эффект достигается использованием ДС в концентрации ДВ 20 мг/м<sup>3</sup> не менее 60 минут, 30 мг/м<sup>3</sup> не менее 30 минут.

2) Для тест - культуры *Aspergillus niger* РКПГФ 1249/880-2 фунгицидный эффект достигается использованием ДС в концентрации ДВ 20 мг/м<sup>3</sup> не менее 60 минут, 30 мг/м<sup>3</sup> не менее 40 минут.

3) Для тест - культуры *Trichophyton mentagrophytes* РКПГФ 1425 фунгицидный эффект достигается использованием ДС в концентрации ДВ 20 мг/м<sup>3</sup> не менее 40 минут, 30 мг/м<sup>3</sup> не менее 30 минут.

4) Применение ДС в концентрации ДВ 10 мг/м<sup>3</sup> не показало фунгицидного эффекта при указанной в Р 4.2.2643-10 экспозиции до 60 минут.

#### **Результаты и выводы:**

Максимально эффективной для ДС «Клиодезив» является концентрация ДВ 30 мг/м<sup>3</sup>, при этом время экспозиции для достижения общего фунгицидного эффекта – не менее 40 минут.

При концентрации ДВ 20 мг/м<sup>3</sup>, для достижения общего фунгицидного эффекта время экспозиции должно быть не менее 60 минут.

Результаты исследований по определению фунгицидной активности средства «Клиодезив» показывают, что ДС в концентрации ДВ 10 мг/м<sup>3</sup> не оказывает фунгицидного действия на *Candida albicans* РКПГУ 401/NCTC 885-653, *Aspergillus niger* РКПГФ 1249/880-2, *Trichophyton mentagrophytes* РКПГФ 1425 при времени экспозиции до 60 минут.

## ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведены исследования средства «Клиодезив»: ОПП №1, ОПП №2 и ОПП №3.

Средство «Клиодезив» в форме порошка от светло-желтого до оранжевого цвета, с характерным запахом йода, согласно утвержденной инструкции по его применению, можно использовать в виде фумигационного аэрозоля, а также для лечения респираторных болезней сельскохозяйственных животных, санации воздуха помещений в присутствии животных и дезинфекции объектов ветеринарного надзора.

Действующим веществом средства «Клиодезив» является йод кристаллический – 40%, вспомогательные вещества – калий азотнокислый – 40% и углеводы (сахар, крахмал или декстрин) до 100%.

Испытания проводили согласно Р 4.2.2643-10, на стандартных тест-объектах: *Candida albicans* РКПГУ 401/NCTC 885-653, *Aspergillus niger* РКПГФ 1249/880-2, *Trichophyton mentagrophytes* РКПГФ 1425, предоставленных ГБОУ ВПО "Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова" Минздрава России (договор № 263-14 ибн от 12.11.2014).

Рабочие культуры указанных выше микроорганизмов хранились при температуре  $(3 \pm 1)^\circ\text{C}$  на плотных питательных средах (скошенный агар Сабуро). Тест-микроорганизмы имели типичные биохимические, морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства, присущие данному виду и обладали стандартной устойчивостью к эталонным ДС: растворам хлорамина, перекиси водорода, катамина АБ – алкилдиметилбензиламмония.

Для оценки роста культур тест-грибов визуально просматривали каждую пробирку и учитывали характер и массивность роста, изменение цвета питательной среды. Рабочие суспензии тест-грибов готовили из культуры данного тест-штамма, выращенного на питательной среде.

Культуру *Trichophyton mentagrophytes* РКПГФ 1425, выращенную на бульоне Сабуро при температуре  $27^\circ\text{C}$  в течение 28 суток, извлекали петлей из пробирки, помещали в фарфоровую ступку и растирали с небольшим количеством стерильного физиологического раствора до гомогенной взвеси с минимальным размером частиц. Полученную суспензию фильтровали через стерильный ватно-марлевый фильтр и доводили с помощью физиологического раствора по оптическому стандарту мутности (ФГУН Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора) № 20 до концентрации  $2 \times 10^9$  КОЕ/мл.

Культуру *Candida albicans* РКПГУ 401/NCTC 885-653 выращивали на агаре Сабуро в течение 2 суток при температуре  $27^\circ\text{C}$  в течение 48 ч. Затем ее смывали с питательной среды небольшим количеством стерильного физиологического раствора и тщательно перемешивали. Полученную суспензию фильтровали и разводили так же, как и культуру *T. mentagrophytes*.

Культуру *Aspergillus niger* РКПГФ 1249/880-2, выращенную на бульоне Сабуро в течение 2 суток и выдержанную в течение 3 суток в темном месте, извлекали петлей из пробирки, помещали в фарфоровую ступку и растирали с небольшим количеством стерильного физиологического раствора до гомогенной суспензии с минимальным размером частиц. Полученную взвесь фильтровали через стерильный ватно-марлевый фильтр и доводили до концентраций  $2 \times 10^9$  КОЕ/мл по оптическому стандарту мутности.

В связи с тем, что суспензия может содержать наряду с живыми мертвые микроорганизмы, определяли биологическую концентрацию тест-грибов. Для этого проводили десятикратные разведения суспензии тест-гриба в стерильной дистиллированной воде с последующим высевом суспензии в чашки Петри с плотной питательной средой (агар Сабуро). После определенного

времени инкубации при соответствующей температуре подсчитывали количество выросших колониеобразующих единиц КОЕ и определяли количество жизнеспособных клеток в одном мл супензии.

Устойчивость тест-грибов к растворам эталонных ДС определяли методом батистовых тест-объектов.

Перед приготовлением батистовых тест-объектов кусок батиста погружали на 24 ч в холодную воду для удаления апплитуры, крахмала. Затем его тщательно стирали с мылом, кипятили, сушили и гладили утюгом. С помощью иглы в приготовленном куске ткани выдергивали нитки в продольном направлении на расстоянии 11 мм друг от друга, а в поперечном - на расстоянии 6 мм. По этим линиям батист разрезали ножницами на тест-объекты и по 50 штук раскладывали в чашки Петри, последние заворачивали в бумагу и стерилизовали паровым методом при 132°C (2,0 кГс/см<sup>2</sup>) 20 мин.

Для контаминации стерильные батистовые тест-объекты в чашке Петри заливали супензией тест-микроорганизма из расчета 0,5 мл на 1 тест-объект, равномерно смачивая все тест-объекты. Чашку Петри закрывали крышкой и оставляли на 20 мин. Затем в асептических условиях батистовые тест-объекты, пропитанные супензией тест-микроорганизмов, переносили на поверхность стерильной фильтровальной бумаги (2-4 слоя на дне чашки Петри), прикрывали их сверху стерильной фильтровальной бумагой и закрывали чашку Петри крышкой. Через 10 мин после удаления избытка жидкости тест-объекты переносили на поверхность сухой стерильной фильтровальной бумаги в чашке Петри и сверху прикрывали стерильным листом фильтровальной бумаги, подсушивали в термостате при 37°C в течение 20 мин с приоткрытой крышкой.

Экспериментальные работы осуществляли в замкнутом пространстве: бикс, объемом 8 л. При постановке опытов компоненты ДС смешивали с сохранением пропорции: ДВ-йод кристаллический – 40%, вспомогательные вещества: калий азотнокислый – 40% и углеводы (сахар, крахмал или декстрин) – 20%. Для достижения концентрации ДВ 10/20/30 мг/м<sup>3</sup> в заданном объеме брали 0,08/0,16/0,24 мг йода кристаллического соответственно и пропорциональное количество вспомогательных веществ. Смесь, завернутую в чистую белую бумагу, поджигали и плотно закрывали бикс, внутри которого в открытой чашке Петри находились контаминированные тест-объекты.

Отсчет времени воздействия начинали с момента полного сгорания смеси в биксе тест-объектов раствором. Через определенные интервалы времени (10 мин) стерильным пинцетом извлекали по 2 тест-объекта из раствора и погружали в пробирки с 5 мл стерильного раствора нейтрализатора (1% раствор тиосульфата натрия). Через 5 мин тест-объекты переносили в пробирку со стерильной питьевой водой, а еще через 5 мин каждый из двух тест-объектов в отдельности переносили в пробирки с жидкой питательной средой Сабуро, необходимой для культивирования изучаемых тест-микроорганизма.

Контролем являлись 2 тест-объекта, погруженные на весь период эксперимента в раствор нейтрализатора (1% раствор тиосульфата натрия), и 2 тест-объекта, погруженные на этот же срок в питьевую воду, которые по окончании эксперимента переносили в питательную среду. Посевы инкубировали в термостате при температуре 27°C: *Candida albicans* РКПГУ 401/NCTC 885-653 - 48 ч.; *Aspergillus niger* РКПГФ 1249/880-2 - 2 суток и затем выдерживали в течение 3 суток в темном месте; *Trichophyton mentagrophytes* РКПГФ 1425 - 28 суток. Результаты оценивают качественно по отсутствию/наличию роста тест-микроорганизма в питательном бульоне.

Критерием активности ДС и субстанций является 100% гибель тест-микроорганизмов при времени дезинфекционной выдержки не более 60 минут.

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено  
печатью (6) шесть листов.  
Проректор по научной и инновационной работе  
д.э.н., профессор Воротников Н.П.

