

КОПИЯ/ВЕРНА

подпись



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
НИЖЕГОРОДСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И  
СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ



УТВЕРЖДАЮ

Ректор ГОУ ВПО НижГМА Росздрава

Чл.- кор. РАМН

Шкарин В.В.

« \_\_\_\_\_ » 2006 г.

ОТЧЕТ

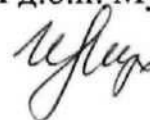
Исследование микробицидной активности фосфатно-минеральной  
композиции «Метас»

Адрес учреждения-исполнителя:

6036005 Нижний Новгород, пл. Минина, 10/1

Руководитель исследования:

Зав. ЦНИЛ НижГМА д.б.н. Мухина И.В.



Нижний Новгород - 2006

КОПИЯ/ВЕРНА  
подпись 

## РЕФЕРАТ

В исследовании изучали *in vitro* микробицидную активность вещества «Метас».

Для изучения микробицидной активности использовали водный раствор вещества «Метас». Конечные концентрации вещества в тест-системах были следующими: 5%, 2%, 1%, 0,5% и 0,1%

Изучали активность водного раствора вещества в отношении условно-патогенных бактерий и грибов - основных возбудителей оппортунистических (госпитальных) инфекций. В качестве тест-культур были использованы *Staphylococcus aureus* штамм 86М, *Candida albicans* штамм 601 (из коллекции НИИЭМ, Нижний Новгород), *Escherichia coli* штамм 775-3, *Pseudomonas aeruginosa* штамм 24 (коллекция кафедры микробиологии и иммунологии НижГМА).

Показано, что только 5% раствор вещества «Метас» оказывает выраженный микробицидный эффект в отношении всех исследуемых микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia col*, *Candida albicans*).

2% раствор вещества «Метас» оказывает бактерицидный эффект в отношении исследуемых бактерий (*S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*) и тормозящий рост эффект в отношении грибов *C.albicans*.

0,5-1% раствор вещества «Метас», в основном, лишь тормозит рост бактерий. Выраженность эффекта зависит от вида микроорганизма и концентрации вещества.

0,1% раствор вещества «Метас» не обладает антимикробной активностью.

КОПИЯ/ВЕРНА  
ПОДПИСЬ 

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ . . . . .	3
ВВЕДЕНИЕ . . . . .	4
1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ . . . . .	
2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ . . . . .	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ . . . . .	34
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ . . . . .	36

КОПИЯ/ВЕРНА  
подпись 

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЗФР - забуференный физиологический раствор

ЖСА - желточно-солевой агар

КОЕ - количество колониеобразующих единиц

МИК - минимальная ингибирующая концентрация

ММК - минимальная микробицидная (бактерицидная и фунгицидная)  
концентрация

МПА - мясо - пептонный агар

SEM - стандартная ошибка среднего

КОПИЯ/ВЕРНА  
подпись 

## ВВЕДЕНИЕ

На доклиническое изучение предоставлено вещество «Метас».

Данное исследование было проведено с целью оценки микробицидной активности вещества «Метас» и возможности его использования в качестве дезинфектанта/антисептика.

Вещество представляет собой

Физико-химические свойства.

Способ применения:

В отчете представлены данные по исследованию *in vitro* микробицидной активности вещества «Метас» в отношении условно-патогенных бактерий и грибов - основных возбудителей оппортунистических (госпитальных) инфекций по данным микробиологических исследований.

КОПИЯ/ВЕРНА  
 подпись 

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены в соответствии со следующими нормативными документами:

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М: Медицина, 2005. – 832 с.
2. Приказ Минздрава России № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации».

**Тест-системы.** В качестве тест-культур были использованы *Staphylococcus aureus* штамм 86М, *Candida albicans* штамм 601, (из коллекции НИИЭМ, Нижний Новгород), *Escherichia coli* штамм 775-3, *Pseudomonas aeruginosa* штамм 24 (коллекция каф. микробиологии и иммунологии НижГМА).

**Источник тест-систем:** коллекции НИИЭМ, кафедры микробиологии и иммунологии ГОУ ВПО НижГМА, Нижний Новгород.

**Время проведения экспериментов.** Эксперименты проводились в осеннее время года (октябрь).

**Концентрации вещества.** Для изучения микробицидной активности использовали водный раствор препарата «Метас». Конечные концентрации препарата в тест-системах были следующими: 5%, 2%, 1%, 0,5% и 0,1% .

**Методика исследования.** Для выращивания 24-часовой культуры стафилококков и синегнойной палочки использовали скошенный мясо - пептонный агар (МПА), для культивирования эшерихий - скошенный агар Олькеницкого, для выращивания кандид - агар Сабуро. Суспензии микроорганизмов готовили путем смыва забуференным физиологическим раствором (ЗФР, рН 7,2-7,4) 24-часовой агаровой культуры, отмывали в стерильной физиологическом растворе (3000 г, 20 мин) Стандартизация микробной взвеси проводилась по стандарту мутности Государственного контрольного института медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича для бактерий и спектрофотометрически для кандид. Готовили суспензию микроорганизмов в ЗФР, содержащую  $10^6$  микробных тел в 1 мл (начальная концентрация).

**Изучение микробицидной активности** и определение минимальной ингибирующей (МИК) концентрации осуществляли методом разведений препарата в жидкой питательной среде согласно ранее описанным рекомендациям [2, 3, 4]. Испытуемые вещества растворяли в жидкой питательной среде в конечной концентрации 5%, 2%, 1%, 0,5% и 0,1% . Использовали мясо-пептонный бульон для тест-систем со стафилококком, эшерихиями и синегнойной палочкой, а также бульон Сабуро - для тест-систем с кандидами. Готовили серии по 6 пробирок, в 5 пробирок вносили по 4 мл бульона с соответствующими разведениями

КОПИЯ/ВЕРНА  
подпись 

препарата (табл. 1, 2, 3 и 4), 6-ая пробирка содержала бульон без препарата (контроль). Затем во все пробирки каждой серии добавляли по 0,1 мл взвеси тестируемого микроорганизма в начальной концентрации  $10^6$  клеток/ 1 мл. Пробирки инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 18-24 ч. Все эксперименты ставились в 3-х повторах

Для изучения **минимальной микробицидной (бактерицидной и фунгицидной) концентрации** (ММК) из всех пробирок с препаратом, в том числе, из тех, где визуально отсутствовал рост микроорганизмов, готовили субкультуру [2, 3, 4]. Делали высев по 0,1 мл на отдельные чашки Петри с селективной средой. Готовили посев сплошным газоном по Дригальскому. Использовали желточно-солевой агар (ЖСА) для выращивания стафилококков, МПБ- для синегнойной палочки, среду Эндо для культивирования эшерихий, агар Сабуро для выращивания кандид. Инкубировали  $37^\circ\text{C}$  в течение 18-24 ч. Учитывали количество колониеобразующих единиц на чашке Петри. Все эксперименты ставились в 3-х повторах

**Методы статистической обработки данных.** Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (SEM). Полученные результаты были обработаны на IBM PC/AT с помощью пакетов прикладных программ Statistica 5.5.

КОПИЯ/ВЕРНА  
 подпись 

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, представленные в таблицах 1, 2, 3 и 4 суммируют результаты 3-х серий экспериментов. Минимальную ингибирующую концентрацию вещества определяли по пробирке с наименьшей концентрацией испытуемого вещества, где отсутствовал визуальный рост микроорганизмов. Минимальную микробицидную концентрацию препарата определяли по первой пробирке с веществом (с наименьшей концентрацией), высеив из которой не давал роста колоний.

Таблица 1

Микробицидная активность вещества «Метас» в системах с *Staphylococcus aureus* штамм 86М (M±SEM)

Конечная концентрация вещества в жидкой питательной среде.	5%	2%	1%	0,5%	0,1%	К
Культивирование в пробирках	-	-	-	-	-	+
Субкультивирование на чашках Петри	-	-	9,3± 2,7 КОЕ	83, 1 ± 7,3 КОЕ	375 ± 64,3 КОЕ	Сплошной рост

Примечание:

"- " - отсутствие видимого роста микроорганизмов / отсутствие колоний

" + " - наличие роста микроорганизмов

К - (без препарата)

КОЕ - колониобразующие единицы

Таблица 2

Микробицидная активность вещества «Метас» в системах *Escherichia coli* штамм 775-3 (M±SEM)

Конечная концентрация вещества в жидкой питательной среде.	5%	2%	1%	0,5%	0,1%	К
Культивирование в пробирках	-	-	-	-	+	+
Субкультивирование на чашках Петри	-	-	24,3± 8,7 КОЕ	152,2 ± 86,1 КОЕ	Сплошной рост	Сплошной рост

Примечание:

"- " - отсутствие видимого роста микроорганизмов / отсутствие колоний

" + " - наличие роста микроорганизмов



КОПИЯ/ВЕРНА  
 подпись 

К - (без препарата)

КОЕ - колониеобразующие единицы

Таблица 3

Микробицидная активность вещества «Метас» в системах с *Pseudomonas aeruginosa* штамм 24

Конечная концентрация вещества в жидкой питательной среде.	5%	2%	1%	0,5%	0,1%	К
Культивирование в пробирках	-	-	+	+	+	+
Субкультивирование на чашках Петри	-	-	865,7± 215,1 КОЕ	Сплош- ной рост	Сплош- ной рост	Сплош- ной рост

Примечание:

"- " - отсутствие видимого роста микроорганизмов / отсутствие колоний

" + " - наличие роста микроорганизмов

К - (без препарата)

КОЕ - колониеобразующие единицы

Таблица 4

Микробицидная активность вещества «Метас» в системах с *Candida albicans* штамм 601 (M±SEM)

Конечная концентрация вещества в жидкой питательной среде.	5%	2%	1%	0,5%	0,1%	К
Культивирование в пробирках	-	-	+	+	+	+
Субкультивирование на чашках Петри	-	87,1± 17,3 КОЕ	914,3± 118,2 КОЕ	Сплош- ной рост	Сплош- ной рост	Сплош- ной рост

Примечание:

"- " - отсутствие видимого роста микроорганизмов / отсутствие колоний

" + " - наличие роста микроорганизмов

К - (без вещества)

КОЕ - колониеобразующие единицы

Как показывают результаты, представленные в таблице 1,2,3,4 вещество в концентрации 5% проявляло микробицидный эффект как в

КОПИЯ/ВЕРНА  
ПОДПИСЬ 

отношении бактерий (стафилококков, кишечной палочки и палочки синезеленого гноя), так и грибов рода кандида.

Вещество в концентрации 2% оказывало бактериостатический и бактерицидный эффект в отношении испытуемых бактерий. Эта концентрация убивала такие микроорганизмы как *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*, однако оказывала лишь фунгистатический (тормозящий) эффект в отношении роста грибов *Candida albicans*.

Вещество в концентрации 1% и 0,5% оказывало лишь некоторый тормозящий эффект на рост *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, но практически не задерживала рост *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*.

Концентрация 0,1 % не влияла существенно на рост и размножение испытуемых микроорганизмов.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

- 1) Показано, что 5% раствор вещества «Метас» оказывает выраженный микробицидный эффект в отношении исследуемых бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) и грибов *Candida albicans*..
- 2) 2% раствор вещества «Метас» оказывает бактерицидный эффект в отношении испытуемых бактерий, и тормозящий рост эффект в отношении грибов рода *Candida*.
- 3) 0,5-1% раствор, в основном, тормозит рост бактерий. Выраженность эффекта зависит от вида микроорганизма и концентрации вещества.
- 4) 0,1% раствор вещества «Метас» не обладает антимикробной активностью.

КОПИЯ/ВЕРНА  
подпись 

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании *in vitro* изучали микробицидную активность вещества «Метас».

Для изучения микробицидной активности использовали водный раствор вещества «Метас». Конечные концентрации вещества в тест-системах были следующими: 5%, 2%, 1%, 0,5% и 0,1%.

Изучали активность водного раствора вещества в отношении условно-патогенных бактерий и грибов - основных возбудителей оппортунистических (госпитальных) инфекций. В качестве тест-культур были использованы *Staphylococcus aureus* штамм 86М, *Candida albicans* штамм 601 (из коллекции НИИЭМ, Нижний Новгород), *Escherichia coli* штамм 775-3, *Pseudomonas aeruginosa* штамм 24 (коллекция кафедры микробиологии и иммунологии НижГМА).

*Изучение микробицидной активности* и определение минимальной ингибирующей (МИК) концентрации осуществляли методом разведений препарата в жидкой питательной среде

Для изучения *минимальной микробицидной (бактерицидной и фунгицидной) концентрации* (ММК) из всех пробирок с препаратом, в том числе, из тех, где визуально отсутствовал рост микроорганизмов, готовили субкультуру [2, 3, 4]. Делали высев по 0,1 мл на отдельные чашки Петри с селективной средой. Готовили посев сплошным газоном по Дригальскому. Использовали желточно-солевой агар (ЖСА) для выращивания стафилококков, МПБ- для синегнойной палочки, среду Эндо для культивирования эшерихий, агар Сабуро для выращивания кандид. Инкубировали 37°C в течение 18-24 ч. Учитывали количество колониеобразующих единиц на чашке Петри.

Показано, что только 5% раствор вещества «Метас» оказывает выраженный микробицидный эффект в отношении всех исследуемых

КОПИЯ/ВЕРНА  
ПОДПИСЬ 

микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*).

2% раствор вещества «Метас» оказывает бактерицидный эффект в отношении исследуемых бактерий (*S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*) и тормозящий рост эффект в отношении грибов *C.albicans*.

0,5-1% раствор вещества «Метас», в основном, лишь тормозит рост бактерий. Выраженность эффекта зависит от вида микроорганизма и концентрации вещества.

0,1% раствор вещества «Метас» не обладает антимикробной активностью.

КОПИЯ/ВЕРНА  
подпись 

### СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лабораторные методы исследования в клинике:Справочник/ Под ред. В.В. Меньшикова.- М. Медицина.-1987.-368 с
2. Маянский А.Н. Микробиология для врачей. Нижний Новгород, Из-во НГМА. 1999.
3. Медицинская микробиология. Часть первая/ Под ред. А.М. Королюка и В.Б. Сбойчакова.-СПб., 1999.-272с
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М: Медицина, 2005.- 832 с.
5. Энциклопедия клинических лабораторных тестов: под ред. Н. Тица / Перевод с англ. под ред. В.В. Меньшикова.М., Из-во"Лабинформ"- 1997.-960 с.