

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191024** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.06

(22) Дата подачи заявки
2021.04.14

(51) Int. Cl. *A01N 25/18* (2006.01)
A01N 43/50 (2006.01)
A01N 59/12 (2006.01)
C06D 3/00 (2006.01)
C01D 9/00 (2006.01)
C08L 1/02 (2006.01)
C01B 7/24 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)

(54) ПРОТИВОГРИБКОВЫЙ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИЙ ПРЕПАРАТ

(96) KZ2021/016 (KZ) 2021.04.14

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
ИЗМАЙЛОВ ТИМУР ХУСАИНОВИЧ
(KZ)

(74) Представитель:
Налибаева Г.К. (KZ)

(57) Изобретение относится к сельскому хозяйству, в частности к ветеринарии, и может быть использовано для дезинфекции объектов ветеринарного надзора: помещений и оборудования в присутствии животных и птицы. Бактерицидное средство содержит энилконазол, монохлорид иода, калий и/или натрий азотнокислый, карбогидрат и/или карбогидрат с лигнином. Заявляемое бактерицидное средство обладает высокой бактерицидной активностью, малотоксично в эффективных бактерицидных концентрациях, эффективно против патогенной микрофлоры и обеспечивает меньшую норму расхода.

202191024

A1

A1

202191024

Противогрибковый дезинфицирующий препарат

Изобретение относится к сельскому хозяйству, в частности к ветеринарии, и может быть использовано для дезинфекции объектов ветеринарного надзора: помещений и оборудования в присутствии животных и птицы. Бактерицидное средство содержит: энилконазол, монохлорид иода, калий и/или натрий азотнокислый, карбогидрат и/или карбогидрат с лигнином.

Заявляемое бактерицидное средство обладает высокой бактерицидной активностью, малотоксично в эффективных бактерицидных концентрациях, эффективно против патогенной микрофлоры и обеспечивает меньшую норму расхода.

Известен противогрибковый препарат «Клинафарм», содержащий активное вещество энилконазол. Активен в отношении бактерий *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus Spp* спор и дерматофитов (*Dr. J. van Cutsem, F. van Gerven, P. A. J. Janssen. In Vitro Activity of Enilconazole – Against Aspergillus Spp. and its Fungicidal Efficacy in a Smoke Generator Against Aspergillus fumigatus*). Композиция широко используется в современных инкубаторах и не требует условий для организации системы вентиляции (см., например, Дезинфицирующий препарат против Аспергиллеза Клинафарм дым, адрес в Интернете: <https://petdog.ru/klinafarm-dym-1-sht.html>).

Аэрозольная обработка помещений средством “Клинафарм” производится путём сжигания порошка “Клинафарм” в помещении. При горении порошка, пары и аэрозоль которого проникают в труднодоступные места и обеспечивают эффективную дезинфекцию объёма помещения и его поверхностей.

Также известно средство «Эконафарм» - для противогрибковой и антибактериальной дезинфекции объектов ветеринарного надзора. 1 генератор дыма содержит в качестве активного вещества Энилконазол 5 г.

Производитель Farmabase Saude Animal / Фармабасе Сауде Анимал (БРАЗИЛИЯ) (Подробнее: <https://vetagro61.ru/p484609233-ekonafarm-shashki-analog.html>).

Недостатком вышеописанных средств является меньшая эффективность, большой расход в сравнении с заявляемым изобретением.

Задачей заявляемого изобретения является разработка более эффективного, безопасного и менее токсичного средства для дезинфекции воздуха и помещений ветеринарного надзора.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является его повышенная биоцидная активность за счет комбинации двух дезинфицирующих средств: энилконазола и монохлорид иода, снижение нормы расхода, что обеспечивает эффективную дезинфекцию при низкой токсичности вещества.

Критерием эффективности заявляемого средства явились 100%-ная гибель тест-культур в опытах *in-vitro* и 95%-ная эффективность при проведении дезинфекции производственных птицеводческих помещений.

Поставленная задача достигается заявляемым бактерицидным средством, которая содержит: энилконазол, монохлорид иода, калий и/или натрий азотнокислый, карбогидрат и/или карбогидрат с лигнином, массовая доля в %:

Энилконазол – 3-6 г;

Монохлорид иода – 0,1-2г;

Калий и/или натрий азотнокислый – 34-85г;

Карбогидрат ии карбогидрат с лигнином- 14-35г..

Сочетание заявленных компонентов в определённых соотношениях позволяет достичь поставленный технический результат. Добавление в состав монохлорида иода – эффективного бактерицидного вещества, в комбинации с энилконазолом, существенно повышает биоцидную активность заявляемого средства, данная комбинация неизвестна из уровня техники, что также делает ее уникальной.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика заявляемого средства от аналогов

Заявка, патент	Доза, содержание эникконазола (г)	Норма расхода (м ³)	Концентрация иода в мг/м ³
Бактерицидное средство «Клинафарм»	5	50	-
Бактерицидное средство «Эконафарм»	5	40	-
Заявляемое бактерицидное средство по примеру 1	3	100	0,3
Заявляемое бактерицидное средство по примеру 2	5	100	1,2
Заявляемое бактерицидное средство по примеру 3	6	100	2,1

Заявляемый термовозгонный дезинфицирующий противогрибковый препарат, шашка дымовая, где в качестве активно-действующего вещества выступает эникконазол – синтетическое антимикотическое средство. Активен в отношении возбудителей: *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*.

Ингибируя биосинтез эргостерина, триглицеридов, фосфолипидов вызывает гибель грибов.

По степени воздействия на организм относится к умеренно токсичным веществам (3 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76), высоко токсичен для рыб.

При применении в рекомендуемых дозах не оказывает побочного действия.

Эффективность заявляемого средства определяли методом *in vitro* на эталонные тест-штаммы *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Фунгицидную активность определяли методом двухкратных разведений в микропробирках типа Eppendorf, согласно CLSI M38-2A «Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi», 2-nd Edition. Для тестирования использовали бульон и агар Сабуро.

Суспензию тест-штаммов микроорганизмов готовили непосредственно перед проведением исследования. Для исследования брали только культуры в экспоненциальной фазе роста. Стандартизовали содержание микробных клеток в суспензии с помощью денситометра DEN-1 (BioSan, Латвия). Сначала готовили суспензию, содержащую 2,0 ед по Мак-Фарланду, затем разбавляли эту суспензию в 100 раз в питательной среде. Окончательная концентрация суспензии тест-штаммов составляла $\sim 5 \times 10^6$ КОЕ/мл.

Навеску заявляемого термовозгонного дезинфицирующего противогрибкового препарата в количестве 20 мг растворяли в 5 мл физиологического раствора, получили базовый раствор исследуемого вещества с концентрацией 4 мг/мл.

В каждом тестовом ряду ставили положительные и отрицательные контроли:

1 микропробирка - контроль роста тест-штамма без препарата; 2 микропробирка – контроль стерильности питательной среды.

В микропробирки №№ 3 - 17 вносили бульон Сабуро по 0,5 мл. В микропробирку № 3 внесли 0,5 мл базового раствора противогрибкового препарата МусетоДез. В четвертую пробирку, содержащую 0,5 мл физ.раствора, внесли 0,5 мл из микропробирки № 3. Повторяли процедуру до микропробирки №17. Из последней микропробирки ряда избыточный объем - 0,5 мл удаляли в дез. раствор. В результате в микропробирке оставалось по 0,5 мкл жидкости. После во все пробирки добавили по 0,05 мл тест-штаммов

(5×10^6 КОЕ/мл). После посева помещали пробирки в инкубатор BD115 (Binder) при 22 ± 1 °C на 3-5 суток. По истечении времени инкубации производили мерный высев на плотную питательную среду Сабуро. Посевы помещали в инкубатор на 3-5 суток при 22 ± 1 °C, после чего проводили учет результатов.

Взятие пробы воздуха 1500 м^3 осуществлялось при помощи портативного прибора для микробиологического контроля воздуха AirPort MD8 (Sartorius). Отбор воздуха осуществлялся через фильтры из желатина с диаметром пор 0,22 мкм с последующим их нанесением на чашки Петри, содержащие питательные среды: питательный агар Сабуро (для определения общего числа грибов). Среда с фильтрами помещали в охлаждающий термостат (Binder KT115) на 5 суток при температуре 22 ± 1 °C. Предварительный подсчет выросших колоний производили через 72 ч, окончательный - через 120 ч. Производился подсчет общего числа выросших КОЕ на агаре.

Расчет концентрации микроорганизмов (X , КОЕ/ м^3), производили по формуле:

$$X = \frac{N \times 1500}{V} \quad (1)$$

где

N - количество колоний, выросших на чашке;

1500 - коэффициент пересчета на 1 м^3 воздуха;

V - объем отобранной пробы воздуха, дм^3 .

Определение in vitro эффективности противогрибкового препарата.
Перед началом эксперимента тест-культуры *Candida albicans* ATCC 10231 и *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 подверглись реактивации с последующим субкультивированием. При контроле чистоты культуры и физиолого-биохимической активности доказано, что культуры однородны и соответствуют систематическому положению, их свойства в процессе хранения не изменились.

Контроль жизнеспособности тест-культур осуществляли параллельно с исследованием по следующей схеме: из исследуемой 72-часовой культуры приготовили ряд разведений в концентрациях $1,5 \times 10^3$ КОЕ/мл, $1,5 \times 10^2$ КОЕ/мл, $1,5 \times 10^1$ КОЕ/мл.

Для контроля жидкой питательной среды произвели высев в 2-х повторях в пробирки. Посевы были помещены в термостат при 22 ± 1 °C на 72 часа. По истечении периода инкубации в питательной среде наблюдался отчетливо видимый рост тест-штаммов во всех пробирках, что послужило основанием считать ее пригодной для дальнейшего использования.

Из приготовленных разведений произвели высев в 2-х повторях на плотную питательную среду в объемах, указанных в таблицах 1-2. Посевы были помещены в термостат при 22 ± 1 °C на 72 часа. По истечении времени инкубации произведен подсчет выросших колоний. Результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Контроль жизнеспособности *Candida albicans* ATCC 10231

Разведение, КОЕ/мл	Высеваемый объем, мл	Количество выросших колоний, КОЕ		
		1 повтор	2 повтор	среднее
$1,5 \times 10^1$	1,0	11	15	13
$1,5 \times 10^2$	0,1	11	13	12
$1,5 \times 10^3$	0,1	126	134	130

Из данных, представленных в таблице 1 видно, что культура *Candida albicans* ATCC 10231 обладает хорошей жизнеспособностью, суспензия приготовлена верно и соответствует степени разведения.

Таблица 2 – Контроль жизнеспособности *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Разведение, КОЕ/мл	Высеваемый объем, мл	Количество выросших колоний, КОЕ		
		1 повтор	2 повтор	среднее
$1,5 \times 10^1$	1,0	9	12	10,5
$1,5 \times 10^2$	0,1	12	13	12,5
$1,5 \times 10^3$	0,1	103	108	105,5

Из данных, представленных в таблице 2 так же видно, что культура *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 обладает хорошей жизнеспособностью, суспензия приготовлена верно и соответствует степени разведения.

Определение in vitro эффективности противогрибкового препарата. Для определения фунгицидной эффективности заявляемого из базового раствора (4000 мкг/мл), был приготовлен ряд двукратных разведений от 2000 мкг/мл до 0,125 мкг/мл. Данные противогрибковой активности заявляемого средства представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Минимальная фунгицидная концентрация заявляемого средства

Тест-штамм	Минимальная фунгицидная концентрация, мкг/мл
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	8,0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	16,0

Исходя из полученных данных, испытуемый препарат обладает фунгицидной активностью по отношению как к тест-штамму *Candida albicans* ATCC 10231, так и к *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Наиболее выраженный фунгицидный эффект отмечен в отношении *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, для которого фунгицидная концентрация составила

8,0 мкг/мл. В отношении *Candida albicans* ATCC 10231 - 16,0 мкг/мл, что так же указывает на достаточно высокую фунгицидную активность.

Микробиологический мониторинг воздуха производственных помещений до и после применения заявляемого средства. Фунгицидную активность дезинфицирующего препарата определяли в производственных условиях – инкубаторах и местах для хранения корма птицеводческого хозяйства АО "Алатау-Кус".

Отбор проб воздуха проводили до и после его обработки. Санацию помещений проводили методом термической возгонки в отсутствии птиц.

Заявляемый противогрибковый препарат представлен в форме дымовой шашки, расфасован в полимерные флаконы. Для проведения обработок испытуемый препарат располагали равномерно в разных частях помещения и в инкубаторе на несгораемой поверхности и поджигали бытовой спичкой. При возгорании термовозгонных композиций образовывался аэрозоль серо-молочного цвета с характерным запахом костра. Препарат применяли согласно рекомендуемым дозировкам – 1 флакон на 100 м³. Обработка проводилась однократно. Отбор проб воздуха для бактериологического контроля после дезинфекции осуществляли через 30 минут (инкубатор № 2) и 12 часов (инкубатор № 1) после дезинфекции.

Отбор проб воздуха прибором AirPort MD8 с предварительно установленным желатиновым фильтром осуществлялся в течение 5 минут со скоростью потока воздуха 50 л/мин. По истечении 5 минут переносили желатиновый фильтр на поверхность плотной питательной среды Сабуро. Посевы помещали в охлаждающий термостат. Результаты исследования противогрибковой активности заявляемого средства представлены в таблицах 4, 5 и на рисунках 1, 2.

Таблица 4 – Количество КОЕ в образцах воздуха до и после 30 минутной обработки заявляемого средства

Место забора воздуха	Количество выросших колоний	
	До обработки воздуха	После обработки воздуха
Инкубатор №2	52 КОЕ/чашка	23 КОЕ/чашка
	208 КОЕ/м ³	92 КОЕ/м ³

Как видно из данных приведенных в таблице 4 и рисунке 1 до обработки инкубатора № 2 выросло 52 КОЕ/чашку, что в пересчете согласно формуле (1), составит 208 КОЕ/м³, а после обработки выросло на 55 % меньше патогенных грибов - 23 КОЕ/чашка, что соответствует 92 КОЕ/м³

Таблица 5 – Количество КОЕ в образцах воздуха до и после 12 часовой обработки заявляемого средства

Место забора воздуха	Количество выросших колоний	
	До обработки воздуха	После обработки воздуха
Инкубатор № 1	43 КОЕ/чашка	2 КОЕ/чашка
	172 КОЕ/м ³	8 КОЕ/м ³

Как видно из данных приведенных в таблице 5 и рисунке 2 до обработки инкубатора № 1 выросло 43 КОЕ/чашку, что в пересчете согласно формуле (1), составит 172 КОЕ/м³, а после обработки выросло на 95 % патогенных грибов меньше - 2 КОЕ/чашка, что соответствует 8 КОЕ/м³.

Таким образом, из представленных выше данных видно, что применение заявляемого дезинфицирующего противогрибкового препарата в помещениях птицефабрики препятствует росту плесневых грибов. Полученные результаты показали, что при 30 минутном воздействии рост плесневых грибов снижается на 55 %, а через 12 часов после проведения дезинфекции рост плесневых грибов снижается на 95 %.

Заявляемое дезинфицирующее средство, шашка дымовая обладает противогрибковой активностью в отношении плесневых грибов как в опытах *in vitro*, так и в производственных испытаниях.

Фунгицидные свойства исследуемого препарата сохраняются на высоком уровне вплоть до 12 часов с момента проведения дезинфекции, приводя к 95 % гибели патогенных микроорганизмов.

Полученные результаты специфической антимикотической активности испытуемого противогрибкового препарата свидетельствуют о перспективности его дальнейшего изучения на предмет использования в качестве фунгицида в ветеринарии и/или медицине.

Таким образом, заявляемое бактерицидное средство высокоэффективен против патогенной микрофлоры, обладая высокой бактерицидной активностью и обеспечивает меньшую норму расхода.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Смешивают 3 г энилконазола, 0,1 г монохлорида иода, 34 г калия или натрия азотнокислого, 14 г целлюлозы, получая состав 1 при следующем соотношении компонентов, г

Энилконазол – 3 г;

Монохлорид иода – 0,1г;

Калий и/или натрий азотнокислый – 34г;

Карбогидрат ии карбогидрат с лигнином- 14г.

.

Пример 2. Смешивают 4 г энилконазола, 1,5 г монохлорида иода, 60 г калия или натрия азотнокислого, 25,3 г целлюлоза с лигнином, получая состав 2 при следующем соотношении компонентов, г:

Энилконазол – 4 г;

Монохлорид иода – 1,5 г;

Калий и/или натрий азотнокислый – 60 г;

Карбогидрат или карбогидрат с лигнином- 22 г.

Пример 3. Смешивают 6 г энилконазола, 0,2 г монохлорида иода, 85 г калия или натрия азотнокислого, 35 г целлюлоза с лигнином, получая состав 3 при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Энилконазол – 3-6 г;

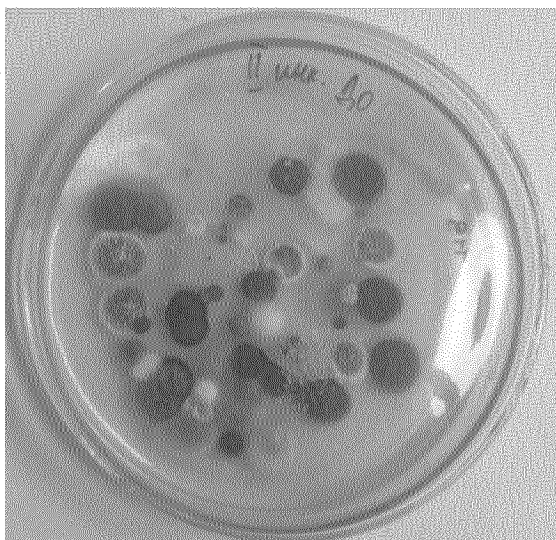
Монохлорид иода – 0,1-2г;

Калий и/или натрий азотнокислый – 34-85г;

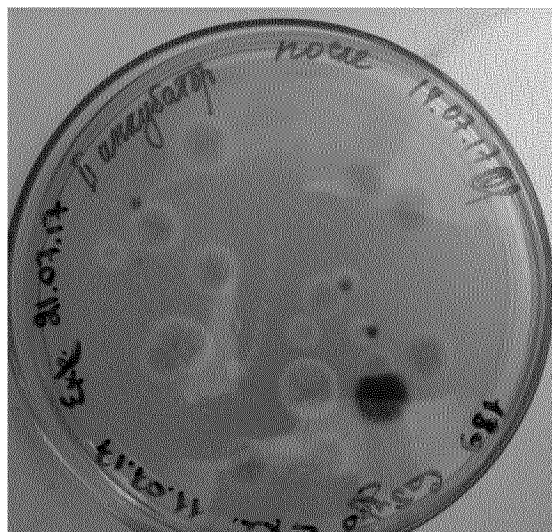
Карбогидрат ии карбогидрат с лигнином- 14-35г.

Формула изобретения

1. Термовозгонная дымовая шашка для противогрибковой дезинфекции, содержащая энилконазол, калий и/или натрий азотнокислый, карбогидрат и/или карбогидрат с лигнином, отличающаяся тем, что с целью повышения микробоцидного действия дополнительно содержит монохлорид иода.
2. Термовозгонная дымовая шашка по п.1, отличающаяся тем, что представлена составом:
Энилконазол – 3-6 г;
Монохлорид иода – 0,1-2г;
Калий и/или натрий азотнокислый – 34-85г;
Карбогидрат ии карбогидрат с лигнином- 14-35г.
3. Термовозгонная дымовая шашка по п.1., отличающаяся тем, что в качестве карбогидрата используют целлюлозу и ее производные.

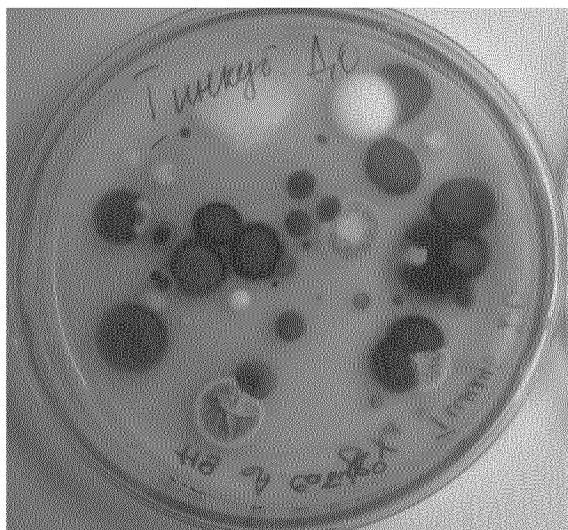


а) Инкубатор № 2 до обработки

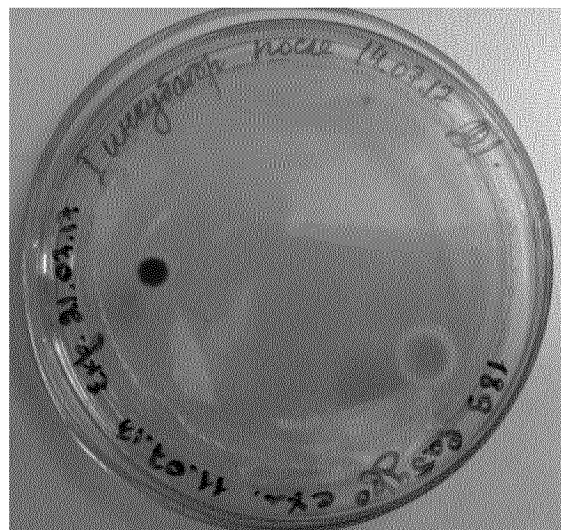


б) Инкубатор № 2 после обработки

Рисунок 1 – Количество выросших колоний в образцах воздуха до и после 30 минутной обработки противогрибковым препаратом MucetoDez в инкубаторе № 2



а) Инкубатор № 1 до обработки



б) Инкубатор № 1 после обработки

Рисунок 2 – Количество выросших колоний в образцах воздуха до и после 12 часовой обработки противогрибковым препаратом MucetoDez в инкубаторе № 1

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202191024

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
см. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A01N 25/00, 25/18, 43/00, 43/50, 59/00, 59/12, C06D 3/00, C01D 9/00, C08L 1/00, 1/02, C01B 7/00, 7/24, A01P 3/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, ESPACENET, PATENTSCOPE, REAXYS, GOOGLE

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	EA 201600286 A1 (ИЗМАЙЛОВ Т. Х.) 2017-05-31, весь документ	1 - 3
Y	BY 15166 C1 (ООО «ГРУППА ФОКИНА») 2011-12-30, весь документ	1 - 3
Y	CN 102633744 A (UNIV NANKAI) 2012-04-05, п.п.5,6 формулы	1 - 3

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи

евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

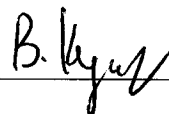
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **20/07/2021**

Уполномоченное лицо:

/Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины



А.В. Чебан

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202191024

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

A01N 25/18 (2006.01)

A01N 43/50 (2006.01)

A01N 59/12 (2006.01)

C06D 3/00 (2006.01)

C01D 9/00 (2006.01)

C08L 1/02 (2006.01)

C01B 7/24 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)