

Российская академия сельскохозяйственных наук

Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной вирусологии и микробиологии
(ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии)

УТВЕРЖДАЮ
Директор института



Д.В.КОЛБАСОВ

2013 г.

ОТЧЕТ

"ИСПЫТАНИЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СРЕДСТВА
«ДЕЗАВИД» В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ АФРИКАНСКОЙ
ЧУМЫ СВИНЕЙ".

Покров, 2013

РЕФЕРАТ

Отчет на 10 стр., 2 табл.

«ДЕЗАВИД», E. COLI, ST. AUREUS, ВИРУС АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, БАКТЕРИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ, ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ, ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ, БИОПРОБА

Объект исследований: дезинфицирующее средство «ДЕЗАВИД» производства ООО «Адекватные технологии»

Цель работы: изучение дезинфицирующего действия средства «ДЕЗАВИД» в отношении вируса АЧС.

В лабораторных условиях исследованы бактериостатическая и минимальная бактерицидная концентрации средства «ДЕЗАВИД» с использованием тест-микроорганизмов 1-й и 2-й групп устойчивости, снижение активности дезинфицирующего средства в присутствии высокомолекулярного белка и испытана эффективность его дезинфицирующего действия при обеззараживании контаминированных вирусом АЧС поверхностей из впитывающих материалов, имитирующих объекты ветеринарно-санитарного надзора, с подтверждением полноты инаktivации вируса постановкой биопробы на восприимчивых животных.

ВВЕДЕНИЕ

В системе санитарных, противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий, обеспечивающих благополучие страны по инфекционным болезням, повышение продуктивности животных и санитарное качество продуктов, сырья и кормов животного происхождения, дезинфекция занимает одно из важных мест. Средство «ДЕЗАВИД» производства ООО «Адекватные технологии» имеет регистрационный номер ПВР-5-10.7/02084 от 30.08.2010 г. и разрешено для дезинфекции объектов ветеринарного надзора и аквакультуры, профилактики болезней животных и рыб.

Средство применяют для проведения профилактической и вынужденной дезинфекции животноводческих, птицеводческих, звероводческих и рыбоводческих помещений, вспомогательных объектов животноводства, технологического оборудования и инвентаря, различных видов транспортных средств, используемых для перевозки животных и птицы, и продукции животного происхождения, спецодежды обслуживающего персонала и др.

Учитывая, что в связи с продолжающимся распространением по территории РФ занесенной в 2007 году африканской чумы свиней, представляющей реальную угрозу свиноводству страны, в последние годы особую актуальность приобрела проблема внедрения новых высокоэффективных дезинфектантов. С 2007 года (первая вспышка) африканская чума свиней (АЧС) распространилась на 32 субъекта Российской Федерации и только в 2013 году выявлено более 50 неблагополучных пунктов из 40 инфицированных объектов. Прямой ущерб для агропромышленного комплекса РФ составил более 30 млрд. рублей.

При АЧС отсутствуют средства специфической профилактики и, как показал анализ эпизоотических вспышек болезни, ведущую роль в их возникновении играет «человеческий фактор», т.к. вирус АЧС переносится различными видами транспорта из одного региона в другой. Очевидно, что в предотвращении дальнейшего распространения болезни одним из важнейших мероприятий является проведение эффективной дезинфекции.

Поскольку для большинства дезинфектантов не изучена их вирулицидная активность в отношении вируса АЧС, целесообразно проведение работ по обеспечению ветеринарной дезинфекционной практики протестированными высокоэффективными дезсредствами.

1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дезинфицирующее средство «ДЕЗАВИД», производства ООО «Адекватные технологии».

Средство представляет собой бесцветную прозрачную жидкость, содержащую в качестве действующих веществ: полигексаметиленгуанидин гидрохлорид – 2,7 %, алкилдиметилбензиламмония хлорид – 0,5 %, а в качестве растворителя воду до 100 %. Срок годности средства при соблюдении условий хранения — 3 года с даты изготовления.

Средство «ДЕЗАВИД» заявлено на дополнительное изучение вирулицидной активности в отношении вируса АЧС.

2. ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Определить спектр антимикробного действия средства «ДЕЗАВИД» в отношении тест-микроорганизмов 1-й и 2-й групп устойчивости.

- Определить дезинфицирующую активность средства «ДЕЗАВИД» в отношении вирулентного штамма вируса африканской чумы свиней (АЧС) на контаминированных вирусом поверхностях из впитывающих материалов, имитирующих объекты ветеринарно-санитарного надзора.

3. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Испытания проводили в рамках договора № 17/13 от 05.04.2013 г. с ООО «Адекватные технологии» в период с 25.04.2013 г. по 01.07.2013 г. согласно руководству «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности», Р 4.2.2643-10 утвержденному Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г. Онищенко 01.06.2010 г., «Методическим указаниям о порядке испытания новых дезинфицирующих средств для ветеринарной практики», утвержденным ГУВ Госагропрома СССР в 1987 г., с использованием биопробы и методическим указаниям «Определение

чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», МУК 4.2.1890-04, утвержденным Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г.Онищенко 04.03.2004 г.

4. ОЦЕНИВАЕМЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

- Инфекционная активность вируса АЧС изолят Ставрополь в перевиваемой гибридной культуре клеток почки свиньи (A₄C₂).

- Минимальные бактериостатическая и бактерицидная концентрации средства «ДЕЗАВИД».

- Дезинфицирующее действие средства «ДЕЗАВИД» на вирус АЧС с использованием тест-объектов из впитывающих материалов, имитирующих поверхности объектов ветеринарно-санитарного надзора, требующих наиболее «жестких» режимов дезинфекции (шероховатые впитывающие поверхности из бетона, резина) и постановкой биопробы на подсвинках массой 18-25 кг.

5. МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

5.1. Получение культур тест-микроорганизмов

В пробирки со скошенным триптон-соевым агаром засеивали предварительно проверенные на отсутствие посторонней контаминации бактериальной и грибной микрофлорой культуры тест-микроорганизмов (*Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) в посевной дозе 10³-10⁶/мл. Посевы инкубировали при температуре (36±1)°С в течение 18-20 ч. Суточные культуры контролировали на отсутствие контаминантов. Для этой цели из полученных культур готовили мазки, окрашивали по Грамму и подвергали световой микроскопии. Затем агаровые культуры смывали физиологическим раствором.

5.2. Определение бактериостатической и бактерицидной активности дезинфекционного средства «ДЕЗАВИД» и влияния на их уровень высокомолекулярного белка.

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия дезинфицирующего средства «ДЕЗАВИД» проводили методом серийных разведений согласно методическим указаниям «Определение

чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», МУК 4.2.1890-04 в нашей модификации. Для определения минимальной бактерицидной концентрации средства «ДЕЗАВИД» готовили его серийные двукратные разведения на мясо-пептонном бульоне (МПБ) от 0,5% до 0,0009% в объеме 2,0 мл.

С использованием денситометра DEN-1 концентрацию микробных клеток в суспензиях тест-микроорганизмов (*E. coli* штамм К-12 и *S. aureus* штамм 209-Р) доводили до 0,5 ЕД MF (10^6 м.т./мл).

В приготовленные разведения средства вносили инокулом одной из культур в объеме 0,2 мл и инкубировали при температуре 37°C.

Результаты учитывали визуально через 18-20 часов инкубации при 37°C по появлению роста культуры в пробирках (бактериостатическое действие). Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) определяли по наименьшей концентрации средства, которая подавляла видимый рост тест-микроорганизмов.

Контролем служили бульонные культуры микроорганизмов, в которые препарат не вносился.

Бактерицидное действие средства изучали по окончании исследований по определению бактериостатического действия. Для этого из пробирок, в которых видимый рост отсутствовал, по 0,2 мл высевали на дрожжевой триптон-соевый агар (ДТСА). Посевы инкубировали при 37°C. Учет результатов проводили через 18-24 часа инкубирования и затем через 5 суток.

Минимальную бактерицидную дозу определяли по наименьшей концентрации средства, при которой отсутствовал рост микроорганизма на ДТСА.

Для изучения влияния высокомолекулярного белка на антимикробную активность проводили аналогичные испытания с добавлением в МПБ нормальной сыворотки крови лошади в конечной концентрации 40 %.

5.3. Определение инфекционной активности вируса АЧС в культуре клеток.

Для определения инфекционной активности вируса АЧС готовили десятикратные последовательные разведения вирусосодержащей крови на среде Игла-МЕМ (с 10^{-1} до 10^{-8}). Каждое разведение вносили в 4

пластиковых культуральных флакона объемом 25 см^3 с 1-2-х суточной культурой клеток A_4C_2 . Инфицированную культуру A_4C_2 инкубировали в CO_2 инкубаторе при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 6-7 суток. Наличие вируса в инфицированной культуре клеток определяли по феномену гемадсорбции (адсорбция эритроцитов свиней на инфицированных вирусом АЧС клетках). Титр вируса рассчитывали по методу Кербера в модификации И.П.Ашмарина и выражали в $\text{lg ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$.

5.4. Оценка дезинфицирующего действия средства «ДЕЗАВИД» in vivo

При исследованиях действия дезинфектанта «ДЕЗАВИД» на вирус АЧС, использовали вирулентный эпизоотически значимый штамм возбудителя.

На стерильные тест-объекты, имитирующие поверхности животноводческих помещений, наносили по 1,5 мл вирусосодержащей жидкости на 100 см^2 поверхности. В качестве механической защиты вируса использовали стерильный свиной навоз в количестве 0,3 г. сухого вещества на 100 см^2 поверхности, что составило 20 % органических веществ в вирусосодержащей жидкости. Перед нанесением на поверхность вирусосодержащую суспензию тщательно перемешивали с соответствующим количеством навоза. Смесь равномерно распределяли на поверхности тестов, после чего их подсушивали в течение 1-2 часов. Испытуемые 6,0 - 30,0 %-ные растворы средства «ДЕЗАВИД» равномерно наносили методом орошения на тест-объекты из расчета $0,4 \text{ л}/\text{м}^2$ площади.

На контрольные тест-объекты, вместо раствора средства «ДЕЗАВИД», наносили такое же количество водопроводной воды, которая использовалась для приготовления раствора средства.

С обработанных растворами дезинфектанта тест-объектов, испытуемые материалы отбирали через 3,0 часа. Вирусный материал соскабливали, добавляли по 4,5 мл среды Хенкса, экстрагировали при комнатной температуре в течение 30 минут, затем центрифугировали в течение 15 минут при 3000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость сразу использовали для заражения подсвинков. Биопробу проводили на 12 животных: 11 – опытных и 1 – контроль.

Наблюдение за инфицированными подсвинками проводили в течение 21 суток. Дезинфекцию признавали эффективной, если свиньи опытной группы оставались клинически здоровыми на протяжении всего периода наблюдения при гибели животных контрольной группы.

6. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

Антимикробную активность средства «ДЕЗАВИД» изучали в отношении *E. coli* и *S. aureus* в жидких и на твердых питательных средах с использованием белковой нагрузки и без нее.

Минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) определяли методом серийных разведений в МПБ с последующим высевом на МПА на чашках Петри.

В таблице 1 представлены результаты изучения бактериостатического и бактерицидного действия средства «ДЕЗАВИД».

Таблица 1. Антимикробная активность средства «ДЕЗАВИД» в отношении *E. coli* и *S. aureus*.

Тест-микроорг.	Вид действия	Белковая защита	Концентрация средства ¹									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>E. coli</i>	б/с	нет	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	б/ц		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	б/с	есть	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	б/ц		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	б/с	нет	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	б/ц		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	б/с	есть	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	б/ц		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

¹ Концентрация средства (средство принимается за 100% вещество): 1 – 0,5 %; 2 – 0,25 %; 3 – 0,125 %; 4 – 0,0625 %; 5 – 0,0312 %; 6 – 0,0156 %; 7 – 0,0078 %; 8 – 0,0039 %; 9 – 0,0019 %; 10 – 0,0009 %;

Примечание: «-» - роста нет; «+» - рост есть; б/с – бактериостатическое действие; б/ц – бактерицидное действие.

В результате проведенных испытаний установлено, что средство «ДЕЗАВИД» обладает антимикробной активностью в отношении тест-культур грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*S. aureus*) микроорганизмов в следующих концентрациях, принимая средство за 100 % вещество:

- МПК *E. coli* – 0,0312 %;
- МБК *E. coli* – 0,125 %;
- МПК *S. aureus* – 0,0078 %;
- МБК *S. aureus* – 0,0625 %.

При добавлении высокомолекулярного белка происходит снижение бактерицидной активности средства: белковый индекс для *E. coli* и *S. aureus* равен 2.

При определении инфекционной активности вируса АЧС изолят Ставрополь в виде вирус-крови установлено, что титр вируса в культуре клеток А₄С₂ составляет 7,00 lg ГАЕ_{50/мл} (гемадсорбирующих единиц).

Дезинфицирующее действие различных концентраций средства «ДЕЗАВИД» в отношении вируса АЧС, которым были контаминированы шероховатые впитывающие тест-объекты, определяли в экспериментах на свиньях. При этом норма расхода дезсредства при обработке тест-объектов составляла 0,4 л/м².

Результаты испытаний дезинфицирующего действия дезсредства «ДЕЗАВИД» в отношении вируса АЧС с использованием биопробы представлены в таблице 2.

Таблица 2. Определение дезинфицирующего действия средства «ДЕЗАВИД» при обеззараживании тест-объектов из бетона, контаминированных вирусом АЧС (эксперимент *in vivo*).

№ п/п	Конц-я раствора по препарату, %	Норма расхода, л/м ²	Время экспозиции, часы	Результаты заражения свиней смывами с тест-объекта
				пало/всего
1	10,0	0,4	3,0	3/3
2	20,0	0,4	3,0	3/3
3	30,0	0,4	3,0	0/3
4	Контроль			1/1

Из данных таблицы 2 видно, что при орошении средством «ДЕЗАВИД» тест-объектов из бетона, контаминированных вирусом АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза, обеззараживание поверхности достигалось при использовании 30,0 %-ного раствора средства, времени экспозиции 3,0 часа и норме расхода 0,4 л/м².

Подсвинки, зараженные суспензиями смывов с контаминированных впитывающих тест-поверхностей (бетон), обработанных 6,0 - 20 %-ными растворами средства при времени экспозиции 3,0 часа и норме расхода 0,4 л/м² заболели на 4-6 сутки с характерной клинической картиной АЧС и погибли через 2-3 суток после появления клинических признаков. Контрольное животное пало на 7 сутки после заражения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Дезинфектант «ДЕЗАВИД» производства ООО «Адекватные технологии», по результатам лабораторных исследований обладает бактерицидной и бактериостатической активностями в отношении тест-культур грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*E. coli*) микроорганизмов обеспечивая их инактивацию при концентрации 0,125 и 0,0625 % от исходной, соответственно.

При испытаниях на сельскохозяйственных животных (биопроба) установлено, что обеззараживание наиболее трудно поддающихся дезинфекции тест-объектов, имитирующих поверхности объектов ветеринарно-санитарного надзора (шероховатые впитывающие поверхности из бетона), контаминированных вирулентным эпизоотическим изолятом вируса АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза (20 % органических веществ в вирусодержащей жидкости), было достигнуто при однократном орошении 30,0 %-ным раствором средства, времени экспозиции 3 часа и норме расхода 0,4 л/м².

Таким образом, дезинфицирующее средство «ДЕЗАВИД» обладает вирулицидным действием и может применяться в очагах заражения АЧС для обработки объектов ветеринарного надзора в соответствии с «Правилами проведения дезинфекции и дезинвазии объектов государственного ветеринарного надзора», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ РФ 16.07.2002 г. с целью полной инактивации вируса АЧС и предотвращения его распространения.

Руководитель испытаний:

Зав. лаб. «Экспериментальной микробиологии»

доктор биологических наук, профессор



Селянинов Ю.О.