

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ»

(ФГБНУ ФИЦВиМ)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ ФИЦВиМ
доктор ветеринарных наук,
профессор



Д.В. Колбасов

« 18 » апреля 2020 г.

ОТЧЕТ

ОБ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СРЕДСТВА
«ДЕЗОМИГ КРАФТ» ПРОИЗВОДСТВА ООО «МК-АГРОТОРГ» В ОТНОШЕНИИ
ВОЗБУДИТЕЛЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Заказчик работ:
ООО «МК-АГРОТОРГ»
Юридический адрес:
127081, г. Москва, ул. Полярная, д. 7, корп. 2,
эт. 1, пом. 1, комн. 35
Телефон (факс): 8 (495) 526- 33-20
mk.agrotorg@mail.ru
Генеральный директор Т.Н.Булгакова

Руководитель исследования:
Гл. научн. сотр. лаб.
Диагностики и мониторинга,
д-р биол. наук, профессор

 18.04.20

подпись, дата

Ю.О. Селянинов

Вольгинский, 2020 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»:

Руководитель исследования,

Ответственный исполнитель

Гл. научн. сотр. лаборатории

Диагностики и мониторинга, д-р

биол. наук, профессор



Ю.О. Селянинов

Исполнители:

Гл. научн. сотр. лаборатории

Диагностики и мониторинга, д-р

вет. наук, профессор



В.М. Балышев

Зам. руков. группы



М.Ю. Власов

Микробиолог



А.Ю. Сизова

РЕФЕРАТ

Отчет на 12 стр., 1 табл.

Ключевые слова: ДЕЗОМИГ КРАФТ, ВИРУС АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ, ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ, БИОПРОБА

Объект исследования: представленный образец дезинфицирующего средства «ДЕЗОМИГ КРАФТ», производства ООО «МК-АГРОТОРГ».

Цель исследования: изучение дезинфицирующего действия средства «ДЕЗОМИГ КРАФТ» в отношении вируса АЧС.

Методы исследования:

В лабораторных условиях исследовано дезинфицирующее действие средства «ДЕЗОМИГ КРАФТ» при обеззараживании контаминированных вирусом АЧС поверхностей, имитирующих объекты животноводческих помещений. Для этого на тест-поверхности из бетона наносили суспензию вирус-крови со стерильным свиным навозом и после её высыхания обрабатывали раствором дезинфектанта. По окончании времени экспозиции с поверхностей делали смывы, которые инокулировали свиньям внутримышечно в объеме 1,0 см³. Наблюдение за животными вели в течение 21 суток. Размещение, содержание и уход за животными осуществляли в соответствии с национальными стандартами, а работу с животными - согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123).

Основные результаты: по результатам испытания представленного образца дезинфицирующего средства «ДЕЗОМИГ КРАФТ» в испытаниях на целевых животных (свиньи) установлено, что контаминированные вирусом АЧС тест-поверхности из бетона были полностью обеззаражены 0,25 %-ным раствором средства при экспозиции 10 минут с нормой расхода 0,3 л/м² и температуре инкубации 18°C.

СОДЕРЖАНИЕ

№ п/п		Стр.
1	Список исполнителей	2
2	Реферат	3
3	Содержание	4
4	Термины и определения, сокращения и обозначения	4
5	Нормативные ссылки	5
6	Основная часть отчета об исследовании	6
7	Заключение	11

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АЧС	- африканская чума свиней.
Биоцид	- общий термин для любого агента, убивающего микроорганизмы.
Восприимчивые (целевые) животные	- животные, которые могут быть заражены болезнью.
Дезинфектант	- химическое вещество или смесь химических веществ, применяемое для уничтожения микробов вне организма животного.
ДТСА	- дрожжевой триптон соевый агар.
Контаминация	- загрязнение или наличие патогенных микроорганизмов на неживых объектах среды, например, на инвентаре оборудовании, кормах, продуктах питания, и т.п.
М.т.	- микробные тела.
Обеззараживание	- уменьшение до предельно допустимых норм загрязнения и заражения территории, объектов, воды, продовольствия, пищевого сырья и кормов опасными биологическими веществами – путём дезинфекции и детоксикации.
Патоген	- биологический агент, способный вызывать заболевания.

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней.

СП 1.3.2518-09 «Дополнения и изменения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. СП 1.3.2322-08» (приложение).

СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123, Страсбург, 18 марта 1986 года).

Р 4.2.2643-10 Руководство «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности», утвержденное Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г. Онищенко 01.06.2010 г.

Методические указания «О порядке испытания новых дезинфицирующих средств для ветеринарной практики», утвержденные ГУВ Госагропрома СССР в 1987 г, с использованием биопробы.

Методические указания «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», МУК 4.2.1890-04

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА ОБ ИССЛЕДОВАНИИ

Наименование, адрес организации, проводившей исследование: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ).

Место осуществления исследования: 601125, Владимирская область, Петушинский район, п. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 29, 30.

Договор № 02/20 от 10.01.2020 г

Даты начала и завершения исследования: 21.01.2020 – 18.04.2020 г.г.

Цель и задачи исследования: определить дезинфицирующую активность средства «ДЕЗОМИГ KRAFT» в отношении вирулентного штамма вируса африканской чумы свиней (АЧС) на контаминированных вирусом поверхностях, имитирующих объекты животноводческих помещений.

ФИО, ученая степень (при наличии), место работы лица, ответственного за осуществление данного вида исследования: Селянинов Юрий Олегович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории Диагностики и мониторинга ФГБНУ ФИЦВиМ.

1. 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. Под дезинфекцией понимают уничтожение на объектах внешней среды или удаление из них патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Основное назначение дезинфекции – разорвать эпизоотическую цепь путем воздействия на ее важнейшее звено - фактор передачи возбудителя болезни от источника инфекции к восприимчивому организму.

В последние годы на рынке дезинфицирующих средств представлен весьма большой ассортимент препаратов как отечественного, так и зарубежного производства, но при всем их многообразии количество входящих в их состав компонентов, весьма ограничено, причем целый ряд соединений обладает высокой бактерио- и вирустатической активностями и низким бактерицидным и вирулицидным действием. Это не позволяет таким препаратам эффективно обеззараживать контаминированные поверхности, особенно загрязненные органическими веществами. Проблема внедрения новых высокоэффективных дезинфектантов приобрела особую актуальность в последние годы, в связи с продолжающимся распространением по территории РФ занесенной в 2007

году из Грузии африканской чумы свиней (АЧС), представляющей реальную угрозу свиноводству страны. С этого времени АЧС уже более 10 лет регистрируется на территории России, что свидетельствует о её стационарном характере. В течение этого времени (данные на конец 2017 г.) зарегистрировано 1252 вспышки АЧС в 40 субъектах РФ - 765 среди домашних свиней и 487 среди кабанов, причём в 2017 году болезнь диагностировали в 6 новых, восточных регионах страны – Омской, Иркутской, Тюменской, Челябинской областях, в Красноярском крае и Ямало-Ненецком автономном округе. На сегодняшний день прямой и косвенный ущерб от АЧС в РФ оценивается в более чем 70 млрд. рублей.

При АЧС отсутствуют средства специфической профилактики и, как показал анализ эпизоотических вспышек болезни, ведущую роль в их возникновении играет «человеческий фактор». Это связано с высокой устойчивостью вируса во внешней среде, его длительной сохраняемостью в продукции свиноводства и контаминированных объектах, включая транспорт, которые могут являться причинами вспышек болезни на больших расстояниях от первичных очагов АЧС. Этот факт подтверждается заносом вируса АЧС в 2017 году в Сибирский и Уральский Федеральные округа, которые расположены на расстоянии более 4000 км от неблагополучных территорий европейской части России, где ранее регистрировалась АЧС. В ЕС вспышки АЧС зарегистрированы в странах Балтии (2014), Польше (2014), Чешской Республике (2017), Бельгии и Венгрии (2018). В августе 2018 года была зарегистрирована первая вспышка АЧС в провинции Ляонин на северо-востоке Китая, затем в 2019 году во Вьетнаме, Гонконге, Камбодже, КНДР, Лаосе, Монголии, Мьянме, Сербии и Словакии.

Для предотвращения заноса вируса с контаминированными объектами в т.ч. с различными видами транспорта из одного региона в другой, одним из важнейших мероприятий является проведение эффективной экспресс дезинфекции.

Учитывая то, что для большинства дезинфектантов не изучена их вирулицидная активность в отношении вируса АЧС, в т.ч. в контаминированной этим возбудителем почве, целесообразно проведение дальнейших работ по обеспечению ветеринарной дезинфекционной практики, протестированными высокоэффективными дезсредствами.

1.1 Материалы

Объект исследований: представленный образец дезинфицирующего средства «ДЕЗОМИГ КРАФТ» производства ООО «МК-АГРОТОРГ». Объем представленного образца для исследований 500 мл.

Средство представляет собой прозрачную жидкость до светло-желтого цвета. В качестве основных действующих веществ содержит в 100 мл средства формальдегид-25 мл, глутаровый альдегид – 10 мл, бензалкония хлорид – 8 мл, стабилизаторы. Срок годности – 3 года.

Материалы: 4 головы свиней массой 28-25 кг. из отдела подготовки подопытных животных ФГБНУ ФИЦВиМ. Корма для свиней. Размещение, содержание и уход за животными осуществляли в соответствии с национальными стандартами, а работу с животными - согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123).

Культуры тест-микробов (*Escherichia coli* шт. К-12, *Staphylococcus aureus* шт. 209-P, African swine fever virus шт. Ставрополь 01/08) получены в «Государственной коллекции патогенных микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных» ФГБНУ ФИЦВиМ.

Перевиваемая гибридная линия клеток спленоцитов и почки свиньи А₄С₂, набор питательных сред для культивирования вирусов и бактерий.

Лабораторный пластик и расходные материалы: пластиковые культуральные флаконы объемом 25 см³, пипетки объемом 5 см³, шприцы объемом 1 и 5 см³ со съемной иглой, пакеты для сбора биологических отходов класса Б.

Оборудование: комплекс общелабораторного и научного оборудования.

1.2 Методики

Получение культур тест-микробов.

В пробирки со скошенным дрожжевым триптон-соевым агаром (ДТСА) засекали предварительно проверенные на отсутствие посторонней контаминации бактериальной и грибной микрофлорой культуры тест-микробов (*E. coli* и *St. aureus*) в посевной дозе 10³-10⁶ м.т./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.

Определение бактериостатической, бактерицидной активности дезинфекционного средства «ДЕЗОМИГ KRAFT».

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия средства «ДЕЗОМИГ KRAFT» 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 «ДЕЗОМИГ KRAFT» готовили его серийные двукратные разведения на дрожжевом триптон-соевом бульоне (ДТСБ) 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 инокулюм одной из культур в объеме 0,2 мл и инкубировали при температуре $(36\pm 1)^\circ\text{C}$.

Результаты учитывали визуально через 18-20 часов инкубации при $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ по появлению роста культуры в пробирках (бактериостатическое действие). Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) определяли по наименьшей концентрации средства, которая подавляла видимый рост тест-микроорганизма.

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

Бактерицидное действие средств изучали по окончании исследований по определению бактериостатического действия. Для этого из пробирок, в которых видимый рост отсутствовал, по 0,2 мл высевали на ДТСА. Посевы инкубировали при $(36\pm 1)^\circ\text{C}$. 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.

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}), которые вносили в 4 пластиковых культуральных флакона объемом 25 см^3 с 1-2-х суточной культурой клеток А₄С₂. Инфицированную культуру А₄С₂ инкубировали в CO₂ 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 lg ГАЕ₅₀/см³.

Оценка дезинфицирующего действия средства «ДЕЗОМИГ KRAFT» in vivo

При исследованиях с вирусом использовали вирулентный эпизоотически

значимый вирус АЧС. На стерильные тест-объекты, имитирующие объекты животноводческих помещений (шероховатые поверхности из бетона), наносили по 1,5 мл вирусосодержащей жидкости на 100 см². В качестве органического загрязнения использовали стерильный свиной навоз в количестве 0,3 г сухого вещества на 100 см² 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 1-2 часа. Испытуемый 0,25 %-ный раствор средства «ДЕЗОМИГ KRAFT» равномерно наносили методом орошения на тест-объекты из расчета 0,3 л/м² площади. Тест-объекты инкубировали при температуре 18°C в течение 10 мин.

На контрольный тест-объект вместо раствора средства «ДЕЗОМИГ KRAFT» наносили такое же количество водопроводной воды, которая использовалась для приготовления раствора препарата.

С обработанных растворами дезинфектанта тест-объектов испытуемые материалы отбирали через 10 мин. Вирусный материал соскабливали, добавляли по 4,5 мл среды Игла-МЕМ, экстрагировали при комнатной температуре в течение 30 минут, затем центрифугировали 15 минут при 3000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость сразу использовали для постановки биопробы на подсвинках – 3 головы на испытуемый режим и 1 контрольное животное.

За инфицированными подсвинками наблюдали в течение 21 суток с измерением температуры тела или, в случае отрицательного результата, до момента гибели животных. Специфичность заболевания и гибели животных подтверждали методом обнаружения вируса АЧС в их крови в реакции аутогемадсорбции (адсорбция эритроцитов свиней на инфицированных вирусом АЧС клетках). Реакцию аутогемадсорбции ставили согласно ГОСТ 28573-90. Дезинфекцию признавали эффективной, если свиньи опытной группы оставались клинически здоровыми на протяжении всего периода наблюдения при гибели животных контрольной группы.

1.3 Результаты исследований

Антимикробную активность средства «ДЕЗОМИГ KRAFT» изучали в жидких и на твердых питательных средах с возбудителями колибактериоза и стафилококкоза.

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

В результате проведенных испытаний установлено, что раствор средства «ДЕЗОМИГ KRAFT» 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* – 0,0156%;
- МБК *E. coli* – 0,0156 %;
- МПК *S. aureus* – 0,0019 %;
- МБК *S. aureus* – 0,0039 %.

При определении инфекционной активности вируса АЧС штамм «Ставрополь 01/08» в виде вирусосодержащей крови установлено, что титр вируса в культуре клеток А₄С₂ составляет 7,00 lg ГАЕ_{50/мл} (гемадсорбирующих единиц).

Дезинфицирующее действие раствора средства «ДЕЗОМИГ КРАФТ» в отношении вируса АЧС, которым были контаминированы впитывающие шероховатые тест-поверхности (бетон), определяли в экспериментах на свиньях. При этом норма расхода дезсредства при обработке тест-объектов составляла 0,3 л/м².

Результаты испытаний дезинфицирующего действия средства «ДЕЗОМИГ КРАФТ» в отношении вируса АЧС с использованием биопробы представлены в таблице 1.

Таблица 1. Определение в биопробе дезинфицирующего действия средства «ДЕЗОМИГ КРАФТ» при обеззараживании тест-объектов из бетона, контаминированных вирусом АЧС. Температура инкубации составляла 18°С.

№ п/п	Конц-я раствора, %	Норма расхода, л/м ²	Экспозиция, мин	Тест-поверхность
				Бетон пало/всего
1	0,25	0,3	10	0/3
2	Контроль			1/1

Из данных таблицы видно, что при орошении средством «ДЕЗОМИГ КРАФТ» тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза, поверхности из бетона были полностью обеззаражены 0,25 %-ным раствором средства при экспозиции 10 минут с нормой расхода 0,3 л/м² и температуре инкубации 18° С. Подсвинки опытной группы оставались живы в течение всего периода наблюдений.

Контрольное животное заболело АЧС и пало на 7 сутки после заражения с характерной клинической картиной АЧС. Реакция аутогемадсорбции была положительной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дезинфицирующее средство «ДЕЗОМИГ КРАФТ» по результатам лабораторных исследований в испытанном режиме (0,25 % раствор, экспозиция 10 мин, температура инкубации 18°C, норма расхода 0,3 л/м²) обеззараживает контаминированные вирусом АЧС тест-поверхности, имитирующие объекты животноводческих помещений (бетон) и может в данном режиме применяться в очагах заражения АЧС для дезинфекции объектов животноводства в соответствии с действующими инструктивными документами с целью полной инаktivации вируса АЧС и предотвращения его распространения.