

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»
(ФГБНУ ФИЦВиМ)

УТВЕРЖДАЮ
Директор
Д.В.КОЛБАСОВ
« 12 » июля 2018 г.



ОТЧЕТ

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЗИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ
СРЕДСТВА ЧИСТО+ДЕЗ ПРОИЗВОДСТВА ООО «БЕЛФАРМАКОМ» В
ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

п. Вольгинский, 2018

РЕФЕРАТ

Отчет на 10 стр., 2 табл.

Ключевые слова: ЧИСТО+ДЕЗ, E. COLI, ST. AUREUS, ВИРУС АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, БАКТЕРИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ, ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ, ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ, БИОПРОБА

Объект исследований: представленный образец дезинфицирующего средства Чисто+Дез.

Цель работы: изучение дезинфицирующего действия средства Чисто+Дез в отношении вируса АЧС.

В лабораторных условиях исследованы бактериостатическая и минимальная бактерицидная концентрации средства Чисто+Дез, с использованием тест-микроорганизмов 1, 2 групп устойчивости, снижение активности дезинфицирующего средства в присутствии высокомолекулярного белка и испытана эффективность его дезинфицирующего действия при обеззараживании контаминированных вирусом АЧС поверхностей, имитирующих объекты животноводческих помещений и транспорта, 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. 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 вирусстатической 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 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 неблагоприятных территорий европейской части России, где ранее регистрировалась АЧС. 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 ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ

Представленный образец дезинфицирующего средства Чисто+Дез производства ООО «Белфармаком».

Средство представляет собой прозрачную жидкость желто-коричневого цвета. В качестве действующих веществ содержит глутаровый альдегид, алкилдиметилбензиламмония хлорид, дидецилдиметиламмония хлорид, полигуксаметиленбигуанидин вспомогательные вещества (амфотерные ПАВ). Срок годности 3 года со дня изготовления.

2 ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определить спектр антимикробного действия средства Чисто+Дез производства ООО «Белфармаком» в отношении тест-микроорганизмов 1, 2 групп устойчивости.

Определить дезинфицирующую активность средства Чисто+Дез в отношении вирулентного штамма вируса африканской чумы свиней (АЧС) на контаминированных вирусом поверхностях, имитирующих объекты животноводческих помещений.

3 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Испытания проводили в рамках договора № 06/18 от 04.06.18 г в период с 07.06.2018 по 12.07.2018 года 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 штамм «Ставрополь 01/08» в перевиваемой гибридной линии клеток спленоцитов и почки свиньи А₄С₂.

Минимальные бактериостатическая и бактерицидная концентрации средства Чисто+Дез.

Дезинфицирующее действие средства Чисто+Дез на вирус АЧС с использованием тест-объектов (шероховатые поверхности из бетона) и постановкой биопробы на подсвинках массой 18-25 кг.

5 МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

5.1 Получение культур тест-микроорганизмов

В пробирки со скошенным дрожжевым триптон-соевым агаром (ДТСА) засеивали предварительно проверенные на отсутствие посторонней контаминации бактериальной и грибной микрофлорой культуры тест-микроорганизмов (*Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) в посевной дозе 10^3 - 10^6 /мл. Посевы инкубировали при температуре $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 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, бактерицидной активности дезинфекционного средства Чисто+Дез и влияния на их уровень высокомолекулярного белка

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия средства Чисто+Дез 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 Чисто+Дез 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.г./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-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 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 ДТСБ 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}), которые вносили в 4 пластиковых культуральных флакона объемом 25 см³ с 1-2-х суточной культурой клеток А₄С₂. Инфицированную культуру А₄С₂ инкубировали в СО₂ инкубаторе при (37±0,5)°С 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.

5.4 Оценка дезинфицирующего действия средства Чисто+Дез 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 механической защиты вируса 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. Испытуемые 0,5 и 1,0 %-ные растворы средства Чисто+Дез равномерно наносили методом орошения на тест-объекты из расчета 0,3 л/м² площади.

На контрольные тест-объекты вместо раствора средства Чисто+Дез наносили такое же количество водопроводной воды, которая использовалась для приготовления раствора средства.

С обработанных растворами дезинфектанта тест-объектов испытуемые материалы отбирали через 1 час. 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. Биопробу проводили на животных – 3 головы на испытуемый режим и 1 контрольное животное.

За инфицированными подсвинками наблюдали в течение 21 суток или, в случае отрицательного результата, до момента гибели. 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.

6 РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

Антимикробную активность средства Чисто+Дез изучали в жидких и на твердых питательных средах с возбудителями колибактериоза и стафилококкоза с использованием белковой нагрузки и без нее.

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

В таблице 1 представлены результаты изучения бактериостатического и бактерицидного действия средства Чисто+Дез.

Таблица 1 - Антимикробная активность средства Чисто+Дез в отношении *E. coli* и *S. aureus* (принимая концентрацию исходного образца за 100 %).

Тест-микроорганизм	Вид активности	Антимикробная активность, %	
		В отсутствии белка	В присутствии белка
1	2	3	4
<i>E. coli</i> K12	б/с	0,0078	0,0312
	б/ц	0,0156	0,0625
<i>S. aureus</i> 209-P	б/с	0,0009	0,0078
	б/ц	0,0039	0,0312

Примечание: б/с – бактериостатическая активность; б/ц – бактерицидная активность; Н.О.- не определяется

В результате проведенных испытаний установлено, что средство Чисто+Дез 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* – 0,0078 %;
- МБК *E. coli* – 0,0156 %;
- МПК *S. aureus* – 0,0009 %;
- МБК *S. aureus* – 0,0039 %.

При добавлении высокомолекулярного белка происходит снижение бактерицидной активности средства в 2-8 раза.

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 растворов средства Чисто+Дез 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 Чисто+Дез в отношении вируса АЧС с использованием биопробы представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Определение в биопробе дезинфицирующего действия средства Чисто+Дез при обеззараживании тест-объектов из бетона, контаминированных вирусом АЧС.

№ п/п	Конц-я раствора по препарату, %	Норма расхода, л/м ²	Экспозиция, мин	Тест-поверхности
				Бетон
				пало/всего
1	0,5	0,3	60	0/3
2	1,0	0,3	60	0/3
3	Контроль			1/1

Из данных таблицы 2 видно, что при орошении средством Чисто+Дез тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза, поверхности из бетона были полностью обеззаражены 0,5 %-ным раствором средства при экспозиции 60 мин и норме расхода 0,3 л/м². Подсвинки опытных групп не заболели в течение всего срока наблюдения (21 сут). Контрольное животное пало на 7 сутки после заражения с характерной клинической картиной АЧС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дезинфицирующее средство Чисто+Дез по результатам лабораторных исследований обладает бактерицидной и бактериостатической активностями в отношении тест-культур грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*S. aureus*) микроорганизмов обеспечивая их инактивацию при концентрации 0,0156 и 0,0039 % от исходной, соответственно, без добавления белковой нагрузки.

При испытаниях на сельскохозяйственных животных (биопроба) установлено, что полное обеззараживание тест-поверхностей, имитирующих объекты животноводческих помещений (шероховатые поверхности из бетона), контаминированных вирулентным референс штаммом «Ставрополь 01/08» с белковой защитой в виде свиного навоза (20% органических веществ в вирусосодержащей жидкости), было достигнуто после однократного орошения 0,5 %-ным раствором дезинфицирующего средства Чисто+Дез при экспозиции 60 с нормой расхода 0,3 л/м². Дезинфицирующее средство Чисто+Дез обладает вирулицидным действием в отношении вируса АЧС в концентрации 0,5 %

и выше при экспозиции 60 мин с нормой расхода 0,3 л/м² и может в данных режимах 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.

Руководитель испытаний:

главн. научн. сотр.

доктор биологических наук, профессор



Селиванов Ю.О.

Ответственный исполнитель

главн. научн. сотр.

доктор ветеринарных наук, профессор



Балышев В.М.