

Российская академия сельскохозяйственных наук

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

УТВЕРЖДАЮ
Директор института



Д.В.КОЛБАСОВ

« 15 » декабря 2014 г.

ОТЧЕТ

ИСПЫТАНИЙ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СРЕДСТВА
«ЧИСТОБЕЛ» ПРОИЗВОДСТВА ООО «БЕЛФАРМАКОМ» В
ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Вольгинский, 2014

РЕФЕРАТ

Отчет на 10 стр., 2 табл.

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

Объект исследований: дезинфицирующее средство «ЧИСТОБЕЛ».

Цель работы: изучение дезинфицирующего действия средства «ЧИСТОБЕЛ» производства ООО «Белфармаком» в отношении вируса АЧС.

В лабораторных условиях исследованы бактериостатическая и минимальная бактерицидная концентрации средства «ЧИСТОБЕЛ» 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 транспортных средств, с подтверждением полноты инактивации 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 многообразии дезинфицирующих средств, количество компонентов, входящих в их состав, весьма ограничено, причем целый ряд соединений обладает высокой бактерио- и вирусстатической активностями и низким бактерицидным и вирулицидным действием, что не позволяет им эффективно обеззараживать контаминированные поверхности, особенно загрязненные органическими веществами. Особую актуальность проблема внедрения новых высокоэффективных дезинфектантов приобрела в последние годы, в связи с продолжающимся распространением по территории РФ занесенной в 2007 году африканской чумы свиней, представляющей реальную угрозу свиноводству страны.

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 перевозится различными видами транспорта из одного региона в другой, очевидно, что в предотвращении дальнейшего распространения болезни одним из важнейших мероприятий является проведение эффективной экспресс дезинфекции.

Учитывая то, что 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 «ЧИСТОБЕЛ» производства ООО «Белфармаком».

Средство представляет собой прозрачную жидкость от бесцветного до желтого цвета со специфическим запахом, содержащее в качестве действующих веществ: глутаровый альдегид - 11 %, алкилметилбензиламоний хлорид - 17,0 %, дидецилдиметиламоний хлорид - 8,0 %, амфотерные ПАВ-3%. Срок годности средства при соблюдении условий хранения - 3 года со дня изготовления.

2 ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определить спектр антимикробного действия средства «ЧИСТОБЕЛ» в отношении тест-микробов 1, 2 групп устойчивости.

Определить дезинфицирующую активность средства «ЧИСТОБЕЛ» 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 № 24/14 от 18.11.14 г в период с 19 ноября по 15 декабря 2014 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 изолят Ставрополь в первичной культуре клеток костного мозга свиней.

Минимальные бактериостатическая и бактерицидная концентрации средства «ЧИСТОБЕЛ».

Дезинфицирующее действие средства «ЧИСТОБЕЛ» 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 «ЧИСТОБЕЛ» и влияния на их уровень высокомолекулярного белка

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия средства «ЧИСТОБЕЛ» 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 «ЧИСТОБЕЛ» 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 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 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}), 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 «ЧИСТОБЕЛ» 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 0,5-1,0 %-ные растворы средства «ЧИСТОБЕЛ» равномерно наносили методом орошения на тест-объекты, из расчета 0,3 л/м² площади.

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

С обработанных растворами дезинфектанта тест-объектов, испытуемые материалы отбирали через 30 мин и 1,0 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 7 животных: 6 – опытных и 1 – контроль.

Наблюдение за инфицированными подсвинками проводили в течение 21 суток. 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 «ЧИСТОБЕЛ» 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 «ЧИСТОБЕЛ».

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

Тест-микроорг.	Вид действия	Белковая защита	Концентрация препарата, % от исходного										
			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		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	

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

В результате проведенных испытаний установлено, что средство «ЧИСТОБЕЛ» 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: белковый индекс для *E. coli* и *S. aureus* колеблется от 4 до 16.

При определении инфекционной активности вируса АЧС изолят Ставрополь в виде вирусосодержащей крови установлено, что титр вируса в

культуре клеток A_4C_2 составляет $7,00 \lg \text{ГАЕ}_{50/\text{мл}}$ (гемадсорбирующих единиц).

Дезинфицирующее действие 0,5 и 1,0 %-ных растворов средства «ЧИСТОБЕЛ» 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 $0,3 \text{ л/м}^2$.

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

Таблица 2 - Определение в биопробе дезинфицирующего действия средства «ЧИСТОБЕЛ» 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	30	0/3
4	Контроль			1/1

Из данных таблицы 2 видно, что при орошении средством «ЧИСТОБЕЛ» тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза, поверхности из бетона были обеззаражены 0,5 %-ным раствором при экспозиции 1,0 час и 1,0%-ным раствором при экспозиции 30 мин (принимая исходный препарат за 100 %) с нормой расхода $0,3 \text{ л/м}^2$ - подсвинки опытных групп оставались клинически здоровыми в течение всего срока наблюдения.

Контрольное животное пало на 7 сутки после заражения с характерной клинической картиной АЧС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дезинфектант «ЧИСТОБЕЛ» 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 эпизоотическим изолятом вируса АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза (20% органических веществ в вирусодержащей жидкости), было достигнуто после однократного орошения 0,5%-ным раствором дезинфектанта «ЧИСТОБЕЛ» при экспозиции 1,0 час и 1,0%-ным раствором средства при экспозиции 30 мин и более при норме расхода 0,3 л/м².

Дезинфицирующее средство «ЧИСТОБЕЛ» обладает выраженным вирулицидным действием и рекомендуется для применения в очагах заражения АЧС для обработки объектов ветеринарного надзора в соответствии с «Правилами проведения дезинфекции и дезинвазии объектов государственного ветеринарного надзора» (за исключением п.п. 9 и 10), утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ РФ 16.07.2002г. с целью полной инаktivации вируса АЧС и предотвращения его распространения.

Руководитель испытаний:

Зав. лаб. «Экспериментальной микробиологии»

доктор биологических наук, профессор



Сеязинов Ю.О.