

Российская академия сельскохозяйственных наук

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

УТВЕРЖДАЮ
Директор института



Д.В.КОЛБАСОВ
2012 г.

ОТЧЕТ

ИСПЫТАНИЙ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СРЕДСТВА
«ВИРУЛЕН» ПРОИЗВОДСТВА ООО «БИОВЕТЗАЩИТА»
В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Покров, 2012

РЕФЕРАТ

Отчет на 9 стр., 2 табл.

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

Объект исследований: дезинфицирующее средство «Вирулен» производства ООО «Биоветзащита».

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

В лабораторных условиях исследованы бактериостатическая и минимальная бактерицидная концентрации средства «Вирулен» 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, с подтверждением полноты инактивации вируса постановкой биопробы на восприимчивых животных.

ВВЕДЕНИЕ

Дезинфекция занимает одно из важных мест в системе санитарных, противозидемических и противозидоотических мероприятий, обеспечивающих благополучие страны по инфекционным болезням, повышение продуктивности животных и санитарное качество продуктов, сырья и кормов животного происхождения. 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 4 года, в связи с продолжающимся распространением по территории РФ занесенной в 2007 году африканской чумы свиней, представляющей реальную угрозу свиноводству страны. Так как при АЧС отсутствуют средства специфической профилактики, а, как показал анализ эпизоотических вспышек болезни, ведущую роль в их возникновении играет человек – зараженное мясо перевозится различными видами транспорта из одного региона в другой, очевидно, что в предотвращении дальнейшего распространения болезни одним из важнейших мероприятий является проведение дезинфекции. Учитывая биологические особенности вируса и то, что для большинства дезинфектантов не изучена их вирулицидная активность в отношении вируса АЧС, целесообразно проведение работ по обеспечению ветеринарной дезинфекционной практики новыми высокоэффективными дезсредствами.

1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ

Образцы дезинфицирующего средства «Вирулен» производства ООО «Биоветзащита».

2. ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

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

3. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Испытания проводили в период с 29 сентября по 14 ноября 2012 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 «Вирулен».

Дезинфицирующее действие средства «Вирулен» производства ООО «Биоветзащита» на вирус АЧС с использованием тест-объектов (бетон) и постановкой биопробы на подсвинках массой 18-25 кг.

5. МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

5.1. Получение культур тест-микробов

В пробирки со скошенным триптон-соевым агаром засевают предварительно проверенные на отсутствие посторонней контаминации

бактериальной и грибной микрофлорой культуры тест-микробов (*Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) в посевной дозе 10^3 - 10^6 /мл. Посевы инкубируют при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч. Суточные культуры контролируют на отсутствие контаминантов. Для этой цели из полученных культур готовят мазки, окрашивают по Граму и подвергают световой микроскопии. Затем агаровые культуры смывают физиологическим раствором.

5.2. Определение бактериостатической, бактерицидной активности средства и влияния на их уровень высокомолекулярного белка.

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия средства «Вирулен» 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 «Вирулен» готовили его серийные двукратные разведения на мясо-пептонном бульоне (МПБ) от 0,5 % до 0,0009% в объеме 2,0 мл.

При приготовлении заражающих суспензий микроорганизмов определяли исходную концентрацию бактериальных клеток в смывах с агаровых культур тест-микробов (*E. coli* штамм К-12 и *S. aureus* штамм 209-Р) с использованием стандарта мутности, после чего готовили рабочее разведение инокуляма в концентрации 1×10^7 м.к./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-микроба.

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 МПА. Посевы

инкубировали при 37⁰С. 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 МПА.

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 его десятикратные разведения, которые вносили в культуральные матрасы с ККМС. Продолжительность инкубации 7 дней. В контрольные культуральные матрасы с ККМС вирусосодержащая жидкость не вносилась.

5.4. Оценка дезинфицирующего действия средства «Вирулен» *in vivo*.

При исследованиях с вирусом, использовали вирулентный вирус АЧС. На стерильные тест-объекты, имитирующие объекты животноводческих помещений 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. 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 1,0 – 2,0 %-ные растворы средства «Вирулен» равномерно наносили методом орошения на тест-объекты, из расчета 0,3 л/м² площади.

На контрольные тест-объекты, вместо растворов средства «Вирулен» наносили такое же количество воды, которая использовалась для приготовления растворов средств.

С обработанных растворами дезинфектанта тест-объектов, испытуемые материалы отбирали через 1,0 - 3,0 часа. Вирусный материал соскабливали, добавляли по 4,5 мл среды Хенкса, экстрагировали при комнатной температуре в течение 30 минут, затем центрифугировали 15 минут при 3000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость использовали для

заражения подсвинков. Биопробу проводили на 13 животных: 12 – опыт и 1 – контроль.

Наблюдение за заражёнными подсвинками вели в течение 21 суток.

Опыты сопровождались контролем определения инфекционного титра в вирусодержащем материале.

6. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

Антимикробную активность средства «Вирулен» изучали в жидких и на твердых питательных средах с возбудителями колибактериоза и стафилококкоза с использованием белковой нагрузки и без нее.

Минимальные подавляющую (бактериостатическую) и бактерицидную концентрации (МПК и МБК, соответственно) 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 «Вирулен».

Таблица 1. Антимикробная активность средства «Вирулен» 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>	Бактериостатич.	нет	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
		есть	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Бактерицидн.	нет	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
		есть	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	Бактериостатич.	нет	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
		есть	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Бактерицидн.	нет	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
		есть	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

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.

В результате проведенных испытаний установлено, что средство «Вирулен» 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* – 0,0019 %;
- МБК *E. coli* – 0,0078 %;
- МПК *S. aureus* – 0,0019 %;

- МБК *S. aureus* – 0,0156 %.

При добавлении высокомолекулярного белка происходит снижение бактерицидной активности средства: белковый индекс для *E. coli* и *S. aureus* равен 8-16.

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

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

Таблица 2 Определение в биопробе дезинфицирующего действия средства «Вирулен» при обеззараживании тест-объектов из бетона, контаминированных вирусом АЧС.

№ п/п	Конц-я раствора по препарату, %	Норма расхода, л/м ²	Экспозиция, час	Результат заражения
				пало/всего
1	1,0	0,3	1,0	3/3
2		0,3	3,0	0/3
3	2,0	0,3	1,0	0/3
4		0,3	3,0	0/3
5	Контроль			1/1

Из данных таблицы 2 видно, что при обработке средством «Вирулен» методом орошения тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза, поверхности из бетона обеззараживаются 1,0 %-ным раствором при экспозиции 3,0 часа с нормой расхода 0,3 л/м² и 2,0 %-ным и выше растворами при экспозиции 1,0 час с нормой расхода 0,3 л/м².

Три из трех подсвинков, зараженных суспензиями смывов с контаминированных впитывающих тест-поверхностей (бетон), обработанных 1,0 %-ным раствором средства при экспозиции 1,0 час и норме расхода 0,3 л/м² заболели на 5-6 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.

Средство «Вирулен» по результатам лабораторных исследований определения антибактериальной активности методом серийных разведений обладает бактериостатическим и бактерицидным действием в отношении тест-культур грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*S. aureus*) микроорганизмов обеспечивая их инактивацию при используемых условиях в концентрациях 0,0078 и 0,0156 %, соответственно, принимая средство за 100 % вещество.

При испытаниях на сельскохозяйственных животных (биопроба) установлено, что полное обеззараживание впитывающих тест-поверхностей (бетон), имитирующих объекты животноводческих помещений и контаминированных вирулентным эпизоотическим изолятом вируса АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза было достигнуто при однократном орошении 1,0 %-ным раствором средства «Вирулен» при норме расхода 0,3 л/м² с экспозицией 3,0 часа и 2,0 %-ным раствором средства при экспозиции 1,0 час с нормой расхода 0,3 л/м², принимая средство за 100 % вещество.

Дезинфицирующее средство «Вирулен» 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», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ РФ 16.07.2002г. с целью полной инактивации вируса АЧС и предотвращения его распространения.

Руководитель испытаний:

Зав. лаб. «Экспериментальной микробиологии»

доктор биологических наук, профессор



Сеязнинов Ю.О.