

Российская академия сельскохозяйственных наук

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

УТВЕРЖДАЮ

Директор института



Д.В.КОЛБАСОВ

29 апреля 2013 г.

ОТЧЕТ

ИСПЫТАНИЙ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СРЕДСТВА
«КЕМИЦИД» ПРОИЗВОДСТВА ООО «КЕМИКЛКРАФТ» В
ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Покров, 2013

РЕФЕРАТ

Отчет на 12 стр., 4 табл.

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

Объект исследований: дезинфицирующее средство «Кемицид» производства ООО «КемиклКрафт».

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

В лабораторных условиях исследованы бактериостатическая и минимальная бактерицидная концентрации средства «Кемицид» 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, противозидемических и противозидоотических 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. С 2007 года (первая вспышка) африканская чума свиней (АЧС) распространилась на 26 субъектов Российской Федерации. При этом выявлены 309 неблагополучных пунктов и 45 инфицированных объектов.

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 «Кемицид» производства ООО «КемиклКрафт».

Средство представляет собой раствор светло-желтого цвета (допускается до красно-коричневого цвета согласно инструкции), содержащий в качестве действующих веществ: алкилдиметилбензиламмония хлорид–12%, полигексаметиленбигуанидина гидрохлорид–2,5%, глутаровый альдегид–8%, в качестве вспомогательных компонентов–алкилглюкозид, изопропиловый спирт, органические кислоты. рН 1%-го водного раствора средства–4,0. Срок годности средства при соблюдении условий хранения - 3 года со дня изготовления.

2 ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Определить дезинфицирующую активность средства «Кемицид» 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 № 05/13 от 05.02.2013 г. с ООО «КемиклКрафт» в период с 05 марта 2013 года по 10 апреля 2013 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 «Кемицид».

Токсичность (МПД) средства «Кемицид» для перевиваемой гибридной линии клеток почки свиньи (СПЭВ) А₄С₂.

Дезинфицирующее действие средства «Кемицид» на вирус АЧС с использованием тест-объектов из впитывающего и не впитывающего материалов с применением культуры клеток А₄С₂.

Дезинфицирующее действие средства «Кемицид» 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) засевали 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 «Кемицид» и влияния на их уровень высокомолекулярного белка

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия средства «Кемицид» 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 «Кемицид» готовили его серийные двукратные разведения на дрожжевым 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 инокулом одной из культур в объеме 0,2 мл и инкубировали при температуре 37⁰С.

Результаты учитывали визуально через 18-20 часов инкубации при 37⁰С 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 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 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 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 «Кемицид» in vitro и in vivo

При исследованиях с вирусом, использовали вирулентный эпизоотически значимый вирус АЧС. На стерильные тест-объекты имитирующие объекты животноводческих помещений (впитывающие и не впитывающие поверхности) наносили по 1,5 мл вирусосодержащей жидкости на 100 см^2 . 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 1-2 часа. Испытуемые 0,5-2,0 %-ные растворы средства «Кемицид» равномерно наносили методом орошения на тест-объекты, из расчета $0,3 \text{ л}/\text{м}^2$ площади.

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

С обработанных растворами дезинфектанта тест-объектов, испытуемые материалы отбирали через 0,5-3,0 часа. Вирусный материал соскабливали, добавляли по 4,5 мл среды Хенкса или Игла-МЕМ, экстрагировали при комнатной температуре в течение 30 минут, затем центрифугировали 15 минут при 3000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость сразу использовали для заражения культуры A_4C_2 с

последующими двумя пассажами, а также для постановки биопробы на подсвинках. Биопробу проводили на 18 животных: 16 – опытных и 2 – контроль.

Наблюдение за культурой клеток вели в течение 14 дней с учетом двух последовательных пассажей, а за инфицированными подсвинками - 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 «Кемицид» 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 дезсредства «Кемицид».

Таблица 1 Антимикробная активность дезсредства «Кемицид» 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 дезсредство «Кемицид» 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* – 0,0039 %;
- МБК *E. coli* – 0,0156 %;
- МПК *S. aureus* – 0,0019 %;
- МБК *S. aureus* – 0,0078 %.

При добавлении высокомолекулярного белка происходит снижение бактерицидной активности средства: белковый индекс для *E. coli* и *S. aureus* составляет 4.

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).

Данные по оценке токсичности дезсредства «Кемицид» для культуры клеток А₄С₂ представлены в таблице 2.

Таблица 2 Оценка токсичности дезсредства «Кемицид» для культуры клеток А₄С₂

Наименование дезсредства	Конц-я, %	Культура клеток	Срок наблюдения (сут)						
			1	2	3	4	5	6	7
«Кемицид»	1,0	А ₄ С ₂	+	+	+	+	+	+	+
	0,5		+	+	+	+	+	+	+
	0,25		+	+	+	+	+	+	+
	0,125		+	+	+	+	+	+	+
	0,0625		+	+	+	+	+	+	+
	0,0312		+	+	+	+	+	+	+
	0,015		+	+	+	+	+	+	+
	0,0075		-	+	+	+	+	+	+
	0,00375		-	-	-	-	-	-	-
	0,00185		-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» - отсутствие дегенерации монослоя клеток; «+» - наличие дегенерации.

Как видно из представленных в таблице 2 данных дезсредство «Кемицид» в концентрациях 0,00375% и ниже не токсично для культуры клеток А₄С₂, в течение 7 суток наблюдения.

Дезинфицирующее действие различных концентраций средства «Кемицид» в отношении вируса АЧС, которым были контаминированы впитывающие (бетон) и невпитывающие (резина) тест-объекты, определяли

в культуре клеток А₄С₂ и на свиньях. При этом норма расхода дезсредства при обработке тест-объектов составляла 0,3 л/м².

Результаты испытаний дезинфицирующего действия средства «Кемицид» на вирус АЧС в культуре клеток А₄С₂ представлены в таблице 3.

Таблица 3 Определение дезинфицирующего действия средства «Кемицид» при обеззараживании тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС, в культуре клеток А₄С₂ (испытания проведены в трех повторностях)

Конц-я раствора по препарату, %	Норма расхода, л/м ²	Экспозиция, час	Выявление гемадсорбции в культуре клеток, инфицированной смывами с тест-объектов	
			Бетон	Резина
0,5	0,3	0,5	+ / + / +	- / - / +
		1,0	- / - / +	- / - / -
		3,0	- / - / -	- / - / -
1,0	0,3	0,5	- / - / -	- / - / -
		1,0	- / - / -	- / - / -
		3,0	- / - / -	- / - / -
2,0	0,3	0,5	- / - / -	- / - / -
		1,0	- / - / -	н.и.
		3,0	- / - / -	н.и.
Контроль		0,5; 1,0; 3,0	+ / + / +	+ / + / +

Примечание: «+» - означает наличие вируса АЧС (гемадсорбция); «-» - означает отсутствие вируса АЧС.

Из данных, представленных в таблице 3 видно, что дезсредство «Кемицид» при испытаниях в культуре перевиваемых клеток А₄С₂ в концентрациях 0,5% при экспозиции 3,0 часа; 1,0% при экспозиции 0,5 часа и выше, полностью инактивирует вирус АЧС на испытуемых тест-поверхностях, а в концентрации 0,5 % с экспозицией 1,0 час - частично инактивирует вирус АЧС на впитывающих и полностью на невпитывающих тест-поверхностях.

Результаты испытаний дезинфицирующего действия дезсредства «Кемицид» в отношении вируса АЧС с использованием биопробы представлены в таблице 4.

Таблица 4 Определение дезинфицирующего действия средства «Кемицид» при обеззараживании тест-объектов из бетона и резины, контаминированных вирусом АЧС в биопробе

№ п/п	Конц-я раствора по препарату, %	Норма расхода, л/м ²	Экспозиция, час	Результаты заражения свиней смывами с тест-объектов	
				Бетон	Резина
				пало/всего	пало/всего
1	0,5	0,3	0,5	2/2	1/2
2		0,3	3,0	0/3	0/2
3	1,0	0,3	0,5	2/2	0/2
4		0,3	1,0	0/3	н.и.
5	2,0	0,3	0,5	0/2	н.и.
6	Контроль			1/1	1/1

Из данных таблицы 4 видно, что при орошении средством «Кемицид» тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза, поверхности из бетона обеззаражены 0,5 %-ным раствором при экспозиции 3,0 часа; 1,0%-ным раствором при экспозиции 1,0 час; 2,0 %-ным раствором при экспозиции 0,5 часа. Тест-объекты из резины обеззараживаются 0,5 %-ным раствором при экспозиции 3,0 часа, 1,0 %-ным раствором дезсредства при экспозиции 0,5 часа. Во всех случаях норма расхода дезсредства составляла 0,3 л/м².

Подсвинки, зараженные суспензиями смывов с контаминированных впитывающих (бетон) и не впитывающих (резина) тест-объектов, обработанных 0,5 и 1,0%-ными растворами средства «Кемицид» при экспозиции 0,5 часа заболели на 5-11-е сутки с характерной клинической картиной АЧС и погибли через 2-3 суток после появления клинических признаков. Контрольные животные пали на 7 сутки после заражения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дезинфектант «Кемицид» по результатам лабораторных исследований обладает выраженной бактерицидной и бактериостатической активностями в отношении тест-культур грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*S. aureus*) микроорганизмов обеспечивая их инактивацию при концентрациях 0,0156 и 0,0078 % от исходной соответственно.

При испытаниях на сельскохозяйственных животных (биопроба) установлено, что полное обеззараживание тест-поверхностей, имитирующих объекты животноводческих помещений (шероховатые поверхности из бетона) и контаминированных вирулентным эпизоотическим изолятом вируса АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза (20% органических веществ в вирусосодержащей жидкости), было достигнуто при однократном орошении 0,5%-ным раствором дезинфектанта «Кемицид» при экспозиции 3,0 часа, 1,0%-ным раствором средства при экспозиции 1,0 час и 2,0%-ным раствором при экспозиции 0,5 часа. Контаминированные вирусом АЧС тест-поверхности из резины обеззараживались 0,5 %-ным раствором при экспозиции 3,0 часа и 1,0 %-ным раствором дезсредства при экспозиции 0,5 часа. Норма расхода во всех случаях составляла 0,3 л/м².

Дезинфицирующее средство «Кемицид» 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.