

**Российская академия сельскохозяйственных наук**

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

**УТВЕРЖДАЮ**  
Директор института



*Д.В.КОЛБАСОВ*  
*июль* 2011 г.

**ОТЧЕТ**

**ИСПЫТАНИЙ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СРЕДСТВА  
«ВИРОЦИД» ПРОИЗВОДСТВА СИД ЛАЙНС НВ/СА (БЕЛЬГИЯ)  
В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ.**

Покров, 2011

## РЕФЕРАТ

Отчет на 12 стр., 2 табл.

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

**Объект исследований:** дезинфицирующее средство «Вироцид» производства СИД ЛАЙНС НВ/СА (Бельгия).

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

В лабораторных условиях исследованы бактериостатическая и минимальная бактерицидная концентрации средства «Вироцид» 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 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 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 3 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.

Одним из перспективных дезинфектантов является средство «Вироцид», основные действующие вещества которого четвертично-аммониевые соединения и глутаровый альдегид. Ранее было установлено, что «Вироцид» обладает широким спектром бактерицидного и вирулицидного действия в отношении микроорганизмов различных групп устойчивости, включая спорообразующие. «Вироцид» эффективен при агрессивных факторах окружающей среды, таких как ультрафиолетовое излучение, присутствие солей в воде, придающих жесткость (до 400 мг/л солей кальция) и на поверхностях с остаточными органическими загрязнениями. Вироцид при этом является рН нейтральным, т.е. не агрессивен для чувствительных материалов транспорта и оборудования, щадяще относится к обрабатываемым поверхностям, высоко стабилен и биобезопасен в применении. Температурный диапазон «Вироцида» от 5 до 80<sup>0</sup>С (с антифризовой добавкой и до -20<sup>0</sup>С) при длительности действия препарата до 7 суток.

Таким образом, учитывая наличие пористых поверхностей в помещениях для содержания свиней, остаточных загрязнений на дезинфицируемых площадях и, зачастую, высокое содержание минеральных солей в воде, используемой для приготовления рабочих растворов, для пополнения арсенала практикующих ветеринарных специалистов эффективными дезсредствами целесообразно проведение испытаний дезинфицирующей активности средства «Вироцид» в отношении вируса АЧС.

## **1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Образец дезинфицирующего средства «Вироцид» производства СИД ЛАЙНС НВ/СА (Бельгия).

## **2. ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ**

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

Определить дезинфицирующую активность средства «Вироцид» 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 28 апреля 2011 г по 30 июня 2011 года в соответствии с «Методами испытаний дезинфекционных средств для оценки их безопасности и эффективности», утвержденными Главным государственным санитарным врачом РФ, М., 1998 г, «Методическими указаниями о порядке испытания новых дезинфицирующих средств для ветеринарной практики», утвержденными ГУВ Госагропрома СССР в 1987 г, с использованием биопробы и «Методическими указаниями по отбору, оценке и испытаниям противовирусного и антибактериального действия химических соединений» М., 2004 г.

### 4. ОЦЕНИВАЕМЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Инфекционная активность вируса АЧС изолят Ставрополь в первичной культуре клеток костного мозга свиней.

Минимальные бактериостатическая и бактерицидная концентрации средства «Вироцид».

Токсичность (МПД) средства «Вироцид» для первичной культуры клеток костного мозга свиней (ККМС).

Дезинфицирующее действие средства «Вироцид» производства СИД ЛАЙНС НВ/СА (Бельгия) на вирус АЧС в культуре ККМС с использованием тест-объектов из впитывающего (бетон) и не впитывающего (полимерное покрытие) материалов.

Дезинфицирующее действие средства «Вироцид» производства СИД ЛАЙНС НВ/СА (Бельгия) 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-микроорганизмов

В пробирки со скошенным триптон-соевым агаром засевают 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 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 бактерицидной и бактериостатической активности методом серийных разведений.

Для определения минимальной бактерицидной концентрации средства «Вироцид» готовили его серийные двукратные разведения на мясо-пептонном бульоне (МПБ) от 0,5 % до 0,0009% в объеме 2,0 мл.

При приготовлении заражающей суспензии определяли исходную концентрацию бактериальных клеток в смывах с агаровых культур тест-микроорганизмов (*E. coli* штамм O:157 и *S. aureus* штамм 209-P) с использованием стандарта мутности, после чего готовили рабочее разведение инокулюма в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл.

В приготовленные разведения средства вносили инокулюм одной из культур в объеме 0,2 мл и инкубировали при температуре 37<sup>0</sup>С.

Результаты учитывали визуально через 18-20 часов инкубации при 37<sup>0</sup>С по появлению роста культуры в пробирках (бактериостатическое действие).

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

Бактерицидное действие средства 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 продолжали инкубировать при 37<sup>0</sup>С и через 5 суток повторяли процедуру пересева на МПА. Пересевы инкубировали при 37<sup>0</sup>С в течение 18-24 часов, после чего проводили учет результатов.

Минимальной бактерицидной дозой является та доза 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 вируссодержащая жидкость не вносилась.

#### 5.4. Оценка токсичности средства «Вироцид» для культуры клеток.

Для определения максимально-переносимой дозы средства «Вироцид» готовили его двукратные разведения, которые вносили в культуральные матрасы с культурой ККМС. Продолжительность инкубации 7 дней. В контрольные культуральные матрасы с ККМС средство не вносили.

За МПД принимали высшую концентрацию препарата, которая не вызывала изменений культуры клеток.

#### 5.5. Оценка дезинфицирующего действия средства «Вироцид» *in vitro* и *in vivo*.

При исследованиях с вирусом, использовали вирулентный вирус АЧС. На стерильные тест-объекты, имитирующие объекты животноводческих помещений из бетона и полипропилена наносили по 1,5 мл вируссодержащей жидкости на 100 см<sup>2</sup>. В качестве механической защиты вируса использовали стерильный свиной навоз в количестве 0,3 г. сухого вещества на 100 см<sup>2</sup> поверхности, что составило 20% органических веществ в вируссодержащей жидкости. Перед нанесением на поверхность вируссодержащую суспензию тщательно перемешивали с соответствующим количеством навоза. Смесь равномерно распределяли на поверхности тестов, после чего их подсушивали 1-2 часа. Испытуемые 0,25 - 2,0 %-ные растворы средства «Вироцид» равномерно наносили методом орошения на тест-объекты, из расчета 0,3 л/м<sup>2</sup> площади.

На контрольные тест-объекты, вместо раствора средства «Вироцид» 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, экстрагировали при комнатной температуре в течение 30 минут, затем центрифугировали 15 минут при 3000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость сразу использовали для заражения культуры ККМС с последующими двумя

пассажами, а также для постановки биопробы на подсвинках. Биопробу проводили на 20 животных: 18 – опытных и 2 – контрольных.

Наблюдение за культурой клеток вели в течение 14 дней с учетом двух последовательных пассажей, а за заражёнными подсвинками — в течение 21 суток.

Опыты сопровождалась следующими контролями:

- определение инфекционного титра в вируссодержащем материале;
- снижение титра инфекционности вируса в результате обработки инфицированных поверхностей водой.

## 6. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

Антимикробную активность средства «Вироцид» 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 МПБ с последующим высевом на МПА на чашках Петри.

В таблице 1 представлены результаты изучения бактериостатического и бактерицидного действия средства «Вироцид».

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

Тест-микроорг.	Вид действия	Белковая защита	Концентрация средства, % 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 «Вироцид» обладает выраженной антимикробной активностью в отношении тест-культур грамположительных (*S. aureus*) и



грамотрицательных (*E. coli*) микроорганизмов обеспечивая их инактивацию при концентрациях 0,0019 % от исходной (таблица 1). При добавлении высокомолекулярного белка происходит снижение бактерицидной активности.

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

Данные по оценке токсичности средства «Вироцид» для культуры клеток костного мозга свиней представлены в таблице 2.

Таблица 2. Оценка токсичности средства «Вироцид» для культуры клеток костного мозга свиней.

Наименование препарата	Конц- я, %	Культура клеток	Срок наблюдения (сут)						
			1	2	3	4	5	6	7
«Вироцид»	2,0	ККМС	+	+	+	+	+	+	+
	1,0		+	+	+	+	+	+	+
	0,5		-	-	-	+	+	+	+
	0,25		-	-	-	-	-	+	+
	0,125		-	-	-	-	-	-	-

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

Как видно из представленных в таблице 2 данных средство «Вироцид» в концентрациях 0,125% и ниже не токсичен для культуры клеток костного мозга свиней, в течение 7 суток наблюдения.

Результаты испытаний дезинфицирующего действия средства «Вироцид» в культуре ККМС представлены в таблице 3.

Из данных, представленных в таблице 3 видно, что средство «Вироцид» в концентрации 0,5 %, экспозиции 30 минут и норме расхода 0,3 л/м<sup>2</sup> полностью инактивирует вирус АЧС на невпитывающих и частично – на впитывающих тест-поверхностях. В концентрации 0,5 % и экспозиции 1,0 час, а также 1,0% и экспозиции 30 минут с нормой расхода 0,3 л/м<sup>2</sup> средство обеззараживает контаминированные вирусом АЧС опытные тест-поверхности из не впитывающих и впитывающих материалов с белковой защитой в виде свиного навоза при испытаниях в культуре ККМС.

Таблица 3 Определение в культуре ККМС дезинфицирующего действия средства «Вироцид» при обеззараживании тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС.

Концентрация действующего вещества, %	Норма расхода, л/м <sup>2</sup>	Экспозиция, час	Полипропилен	Бетон
0,25	0,3	0,5	+ / + / +	+ / + / +
		1,0	- / - / +	+ / + / +
0,5	0,3	0,5	- / - / -	- / + / +
		1,0	- / - / -	- / - / -
1,0	0,3	0,5	- / - / -	- / - / -
		1,0	- / - / -	- / - / -
2,0	0,3	0,5	- / - / -	- / - / -
		1,0	- / - / -	- / - / -
Контроль		0,25; 0,5; 1,0; 2,0	+ / + / +	+ / + / +

Примечание: + - означает наличие вируса АЧС;  
 - - означает отсутствие вируса.

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

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

№ п/п	Конц-я раствора по препарату, %	Норма расхода, л/м <sup>2</sup>	Экспозиция, час	Тест-поверхности
				Бетон
				пало/всего
1	0,5	0,3	1,0	3/3
2	1,0	0,3	0,5	3/3
3		0,3	1,0	3/3
4		0,3	3,0	1/3
5		0,5	3,0	0/3
6	2,0	0,3	1,0	0/3
7	Контроль			2/2

Из данных таблицы 4 видно, что при орошении средством «Вироцид» тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза, поверхности из бетона были обеззаражены 2,0 %-ным раствором при экспозиции 1 час и норме расхода 0,3 л/м<sup>2</sup> и 1,0% -ным раствором при экспозиции 3 часа и норме расхода 0,5 л/м<sup>2</sup>.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.**

Дезинфектант «Вироцид» по результатам лабораторных исследований обладает выраженной бактерицидной и бактериостатической активностями в отношении тест-культур грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*E. coli*) микроорганизмов обеспечивая их инактивацию при концентрациях 0,0019 % от исходной.

На основании проведенных исследований в культуре клеток костного мозга свиней (*in vitro*) установлено, что полное обеззараживание впитывающих и невпитывающих тест-поверхностей, имитирующих объекты животноводческих помещений, контаминированных вирулентным эпизоотическим изолятом вируса АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза, было достигнуто при однократном орошении 0,5 %-ным раствором средства «Вироцид» с экспозицией 1 час и 1,0%-ным раствором средства при экспозиции 30 минут с нормой расхода 0,3 л/м<sup>2</sup>. Это свидетельствует о высокой вирулицидной активности дезинфектанта «Вироцид» в отношении вируса АЧС.

При испытаниях на сельскохозяйственных животных (биопроба) установлено, что полное обеззараживание 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 дезинфектанта «Вироцид» при норме расхода 0,5 л/м<sup>2</sup> с экспозицией 3 часа и 2,0 %-ным раствором средства «Вироцид» при расходе 0,3 л/м<sup>2</sup> и экспозиции 1 час.

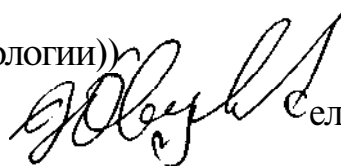
Таким образом, дезинфицирующий препарат «Вироцид» обладает выраженным вирулицидным действием и рекомендуется для применения в очагах заражения АЧС для обработки объектов ветеринарного надзора в соответствии с «Правилами проведения дезинфекции и дезинвазии объектов государственного ветеринарного надзора», 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.