

Российская академия сельскохозяйственных наук

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

УТВЕРЖДАЮ  
Директор института



Д.В.КОЛБАСОВ  
«6» июля 2013 г.

ОТЧЕТ

ИСПЫТАНИЙ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СРЕДСТВА  
«КДП» ПРОИЗВОДСТВА СООО «БЕЛАСЕПТИКА-ДЕЗ» В  
ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Покров, 2013

## РЕФЕРАТ

Отчет на 10 стр., 2 табл.

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

**Объект исследований:** дезинфицирующее средство «КДП» производства СООО «БелАсептика-Дез».

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

В лабораторных условиях исследованы бактериостатическая и минимальная бактерицидная концентрации средства «КДП» 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, 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 32 субъекта Российской Федерации. Прямой ущерб для агропромышленного комплекса РФ составил более 30 млрд. рублей.

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 «КДП» производства ООО «БелАсептика-Дез».

Средство представляет собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета с характерным запахом, содержащую: глутаровый альдегид, додецил-диметил-аммоний хлорид, бензалкониум хлорид, изопропиловый спирт, алкилполиэтиленгликоль, поверхностно-активные вещества, комплексообразователи, ингибитор коррозии, отдушку и стабилизирующие добавки. Срок годности средства при соблюдении условий хранения – 3 года с даты изготовления.

## **2 ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ**

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

Определить дезинфицирующую активность средства «КДП» 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 № 34/13 от 26.09.2013 г. с ООО «БелАсептика-Дез» в период с 01 октября 2013 года 5 ноября 2013 года в соответствии с руководством «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 перевиваемой культуре клеток А<sub>4</sub>С<sub>2</sub>.

Минимальные бактериостатическая и бактерицидная концентрации средства «КДП».

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

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия средства «КДП» 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 «КДП» 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 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). 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<sup>0</sup>С. 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<sup>3</sup> с 1-2-х суточной культурой клеток А<sub>4</sub>С<sub>2</sub>. Инфицированную культуру А<sub>4</sub>С<sub>2</sub> инкубировали в СО<sub>2</sub> инкубаторе при (37±0,5)<sup>0</sup>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  $\lg \text{ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$ .

#### ***5.4 Оценка дезинфицирующего действия средства «КДП» in vivo***

При исследованиях с вирусом, использовали вирулентный эпизоотически значимый вирус АЧС. На стерильные тест-объекты имитирующие объекты животноводческих помещений (впитывающие поверхности) наносили по 1,5 мл вирусосодержащей жидкости на  $100 \text{ см}^2$ . В качестве механической защиты вируса использовали стерильный свиной навоз в количестве 0,3 г., сухого вещества на  $100 \text{ см}^2$  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. Испытуемый 2,0 %-ный раствор средства «КДП» равномерно наносили методом орошения на тест-объекты, из расчета  $0,4 \text{ л}/\text{м}^2$  площади.

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

С обработанных раствором дезинфектанта тест-объектов, испытуемые материалы отбирали через 0,5 часа. 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 4 животных: 3 – опытных и 1 – контроль.

Наблюдение за инфицированными подсвинками проводили 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 «КДП» 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 «КДП».

Таблица 1 Антимикробная активность дезсредства «КДП» 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 «КДП» 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* – 0,0312 %;
- МБК *E. coli* – 0,125 %;
- МПК *S. aureus* – 0,0078 %;
- МБК *S. aureus* – 0,0156%.

При добавлении высокомолекулярного белка происходит снижение бактерицидной активности средства: белковый индекс для *E. coli* и *S. aureus* колеблется от 2 до 4.

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



культуре клеток А<sub>4</sub>С<sub>2</sub> составляет 7,00 lg ГАЕ<sub>50/мл</sub> (гемадсорбирующих единиц).

Дезинфицирующее действие 2,0%-ного раствора средства «КДП» 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 0,4 л/м<sup>2</sup>.

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

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

№ п/п	Конц-я раствора по препарату, %	Норма расхода, л/м <sup>2</sup>	Экспозиция, час	Результаты заражения свиней смывами с тест-объекта бетон
				пало/всего
2	2,0	0,4	0,5	0/3
4	Контроль			1/1

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

Контрольное животное пало на 7 сутки после заражения.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дезинфектант «КДП» 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 0,125 и 0,0312 % от исходной соответственно.

При испытаниях на сельскохозяйственных животных (биопроба) установлено, что полное обеззараживание тест-поверхностей, имитирующих объекты животноводческих помещений (шероховатые впитывающие 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 2,0%-ным раствором дезинфектанта «КДП» при экспозиции 0,5 часа. Норма расхода составляла 0,4 л/м<sup>2</sup>.

Дезинфицирующее средство «КДП» 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., «Ветеринарно-санитарными правилами борьбы с африканской чумой свиней», утвержденными постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 29.08.2013 №758, «Ветеринарно-санитарными правилами проведения ветеринарной дезинфекции», утвержденными Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 29.08.2013 №758 с целью полной инактивации вируса АЧС и предотвращения его распространения.

Руководитель испытаний:

Зав. лаб. «Экспериментальной микробиологии»

доктор биологических наук, профессор



Сеязинов Ю. О.