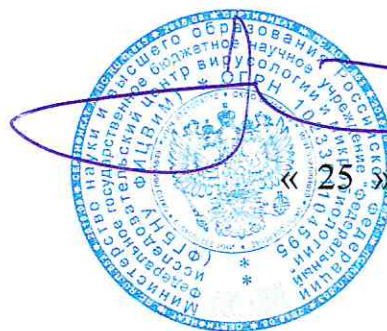


Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»  
(ФГБНУ ФИЦВиМ)

УТВЕРЖДАЮ

Директор



*Д.В.КОЛБАСОВ*

« 25 » декабря 2018 г.

ОТЧЕТ

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЗИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ  
СРЕДСТВА НИКА-АЛЬВЕТ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ  
АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

п. Вольгинский, 2018

## РЕФЕРАТ

Отчет на 10 стр., 2 табл.

Ключевые слова: НИКА-АЛЬБЕТ, E. COLI, ST. AUREUS, ВИРУС АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, БАКТЕРИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ, ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ, ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ, БИОПРОБА

**Объект** исследований: представленный образец дезинфицирующего средства Ника-АЛЬБЕТ производства ООО «НПФ «Геникс».

**Цель работы:** изучение дезинфицирующего действия средства Ника-АЛЬБЕТ в отношении вируса АЧС.

В лабораторных условиях исследованы бактериостатическая и минимальная бактерицидная концентрации средства Ника-АЛЬБЕТ, 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 транспорта, 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 их многообразии количество входящих в их состав компонентов, весьма ограничено, причем целый ряд соединений обладает высокой бактерио- и вирусстатической активностями и низким бактерицидным и вирулицидным действием. Это не позволяет таким препаратам эффективно обеззараживать контаминированные поверхности, особенно загрязненные органическими веществами. Проблема внедрения новых высокоэффективных дезинфектантов приобрела особую актуальность в последние годы, в связи с продолжающимся распространением по территории РФ занесенной в 2007 году из Грузии африканской чумы свиней (АЧС), представляющей реальную угрозу свиноводству страны. С этого времени АЧС уже более 10 лет регистрируется на территории России, что свидетельствует о её стационарном характере. В течение этого времени (данные на конец 2017 г.) зарегистрировано 1252 вспышки АЧС в 40 субъектах РФ - 765 среди домашних свиней и 487 среди кабанов, причём в 2017 году болезнь диагностировали в 6 новых, восточных регионах страны – Омской, Иркутской, Тюменской, Челябинской областях, в Красноярском крае и Ямало-Ненецком автономном округе. На сегодняшний день прямой и косвенный ущерб от АЧС в РФ оценивается в 70 млрд. рублей.

При АЧС отсутствуют средства специфической профилактики и, как показал анализ эпизоотических вспышек болезни, ведущую роль в их возникновении играет «человеческий фактор». Это связано с высокой устойчивостью вируса во внешней среде, его длительной сохраняемостью в продукции свиноводства и контаминированных объектах, включая транспорт, которые могут являться причинами вспышек болезни на больших расстояниях от первичных очагов АЧС. Этот факт подтверждается заносом вируса АЧС в 2017 году в Сибирский и Уральский Федеральные



округа, которые расположены на расстоянии более 4000 км от неблагополучных территорий европейской части России, где ранее регистрировалась АЧС. Для предотвращения заноса вируса с контаминированными объектами в т.ч. с различными видами транспорта из одного региона в другой, одним из важнейших мероприятий является проведение эффективной экспресс дезинфекции.

Учитывая то, что для большинства дезинфектантов не изучена их вирулицидная активность в отношении вируса АЧС, в т.ч. в контаминированной этим возбудителем почве, целесообразно проведение дальнейших работ по обеспечению ветеринарной дезинфекционной практики протестированными высокоэффективными дезсредствами.

## **1 ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Представленный образец дезинфицирующего средства Ника-АЛЬВЕТ производства ООО «НПФ «Геникс».

Средство представляет собой прозрачную светло-желтого цвета жидкость, в качестве действующего вещества содержит алкилдиметиламмония хлорид-10%, глутаровый альдегид – 4% и глиоксаль - 4%, а в качестве вспомогательных компонентов спирт изопропиловый и ПАВ. Срок годности 3 года с даты изготовления.

## **2 ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Определить спектр антимикробного действия средства Ника-АЛЬВЕТ в отношении тест-микроорганизмов 1, 2 групп устойчивости.

Определить дезинфицирующую активность средства Ника-АЛЬВЕТ 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 № 30/18 от 25.09.18 г в период с 02.10.2018 по 25.12.2018 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 штамм «Ставрополь 01/08» в перевиваемой гибридной линии клеток спленоцитов и почки свиньи А<sub>4</sub>С<sub>2</sub>.

Минимальные бактериостатическая и бактерицидная концентрации средства Ника-АЛЬВЕТ.

Дезинфицирующее действие средства Ника-АЛЬВЕТ 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 пробы 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 Ника-АЛЬВЕТ и влияния на их уровень высокомолекулярного белка***

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия средства Ника-АЛЬВЕТ 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 Ника-АЛЬВЕТ 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 МF ( $10^6$  м.т./мл).

В приготовленные разведения средства вносили инокулом одной из культур в объеме 0,2 мл и инкубировали при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ .

Результаты учитывали визуально через 18-20 часов инкубации при  $37^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$ . 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 ДТСБ 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  $25\text{ см}^3$  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  $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$  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  $\lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$ .

### **5.4 Оценка дезинфицирующего действия средства Ника-АЛЬВЕТ 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 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 0,5; 1,0 и 1,0 %-ные растворы средства Ника-АЛЬВЕТ равномерно наносили методом орошения на тест-объекты из расчета 0,3 л/м<sup>2</sup> площади.

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

С обработанных растворами дезинфектанта тест-объектов испытуемые материалы отбирали через 1 час, 15 мин и 30 мин, соответственно. 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 животных – 3 головы на испытуемый режим и 1 контрольное животное.

За инфицированными подсвинками наблюдали в течение 21 суток или, в случае отрицательного результата, до момента гибели. 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 Ника-АЛЬВЕТ 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 Ника-АЛЬВЕТ. Таблица 1 - Антимикробная активность средства Ника-АЛЬВЕТ в отношении *E. coli* и *S. aureus* (принимая концентрацию исходного образца за 100 %).

Тест-микроорганизм	Вид активности	Антимикробная активность, %	
		В отсутствии белка	В присутствии белка
1	2	3	4
<i>E. coli</i> K12	б/с	0,0156	0,125
	б/ц	0,0312	0,25
<i>S. aureus</i> 209-P	б/с	0,0039	0,0156
	б/ц	0,0078	0,0625

Примечание: б/с – бактериостатическая активность; б/ц – бактерицидная активность

В результате проведенных испытаний установлено, что средство Ника-АЛЬВЕТ обладает антимикробной активностью в отношении культур грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*S. aureus*) микроорганизмов в следующих концентрациях, принимая средство за 100 % вещество:

- МПК *E. coli* – 0,0156 %;
- МБК *E. coli* – 0,0312 %;
- МПК *S. aureus* – 0,0039 %;
- МБК *S. aureus* – 0,0078 %.

При добавлении высокомолекулярного белка происходит снижение бактерицидной активности средства в 4-8 раз.

При определении инфекционной активности вируса АЧС штамм «Ставрополь 01/08» 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 растворов средства Ника-АЛЬВЕТ 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 л/м<sup>2</sup>.

Результаты испытаний дезинфицирующего действия средства Ника-АЛЬВЕТ в отношении вируса АЧС с использованием биопробы представлены в таблице 2.



Таблица 2 – Определение в биопробе дезинфицирующего действия средства Ника-АЛЬВЕТ при обеззараживании тест-объектов из бетона, контаминированных вирусом АЧС.

№ п/п	Конц-я раствора, %	Норма расхода, л/м <sup>2</sup>	Экспозиция, мин	Тест-поверхности
				Бетон
				пало/всего
1	0,5	0,3	60	0/3
2	1,0	0,3	15	0/3
3	1,0	0,3	30	0/3
4	Контроль			1/1

Из данных таблицы 2 видно, что при орошении средством Ника-АЛЬВЕТ тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза, поверхности из бетона были полностью обеззаражены 0,5 %-ным раствором средства при экспозиции 1 час и 1 %-ным раствором при экспозиции 15 мин и выше с нормой расхода 0,3 л/м<sup>2</sup>. Подсвинки опытных групп не заболели в течение всего срока наблюдения (21 сут).

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

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ


Дезинфицирующее средство Ника-АЛЬВЕТ 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 0,0312 и 0,0078 % от исходной 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 референс штаммом «Ставрополь 01/08» с белковой защитой в виде свиного навоза (20% органических веществ в вируссодержащей жидкости), было достигнуто после однократного орошения 0,5 %-ным раствором дезинфицирующего средства Ника-АЛЬВЕТ при экспозиции 1 час и 1,0 %-ным раствором при экспозиции 15 мин и выше с нормой расхода 0,3 л/м<sup>2</sup>. Дезинфицирующее средство Ника-АЛЬВЕТ обладает вирулицидным

действием в отношении вируса АЧС в концентрации 0,5 % при экспозиции 1 час и 1,0 % при экспозиции 15 мин и выше с нормой расхода 0,3 л/м<sup>2</sup> и может в данных режимах применяться в очагах заражения АЧС для дезинфекции объектов животноводства в соответствии с действующими инструктивными документами с целью полной инаktivации вируса АЧС и предотвращения его распространения.

Руководитель испытаний:

главн. научн. сотр.

доктор биологических наук, профессор  Селянинов Ю.О.