

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
(ФАНО РОССИИ)**

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

УТВЕРЖДАЮ
Директор института



Д.В. КОЛБАСОВ
«08» сентября 2015 г.

ОТЧЕТ

**ИСПЫТАНИЙ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СРЕДСТВА
«ФОРБИЦИД» («FORBICID») ПРОИЗВОДСТВА ООО «ПК «ВОРТЕКС»
В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**

Вольгинский, 2015

РЕФЕРАТ

Отчет на 10 стр., 2 табл.

«ФОРБИЦИД» («FORBICID»), E. COLI, ST. AUREUS, ВИРУС
АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, БАКТЕРИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ,
ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ, ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ,
БИОПРОБА

Объект исследований: дезинфицирующее средство для объектов
ветеринарного надзора и профилактики инфекционных болезней
животных «Форбицид» («Forbicid»).

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

В лабораторных условиях исследованы бактериостатическая и
минимальная бактерицидная концентрации средства «Форбицид»
(«Forbicid») 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.

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 для объектов ветеринарного надзора и профилактики инфекционных болезней животных «Форбицид» («Forbicide») производства ООО «ПК«Вортекс». Применяется для проведения дезинфекции животноводческих, птицеводческих, звероводческих, рыбоводческих помещений; помещений убойных цехов, санитарных боен, инкубаторов, яйцекладов, подсобных хозяйств; технологического и холодильного оборудования; вспомогательных объектов животноводства; инвентаря и оборудования по уходу за животными; транспортных средств для перевозки животных, кормов, продукции; производственных помещений пищевой, перерабатывающей промышленности; для заправки дезбарьеров. Средство представляет собой прозрачный раствор светло-жёлтого цвета, содержащий в качестве действующих веществ: глутаровый альдегид-10,7%, дидецилдиметиламмоний хлорид-8%, алкилдиметилбензиламмония хлорид-17,0%. Срок годности средства при соблюдении условий хранения - 3 года.

2. ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определить спектр антимикробного действия средства «Форбицид» («Forbicide») в отношении тест-микроорганизмов 1, 2 групп устойчивости.

Определить дезинфицирующую активность средства «Форбицид» («Forbicide») 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 № 23/15 от 29.06.15 г. в период с 21 июля по 7 сентября 2015 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 «Форбицид» («Forbucid»).

Дезинфицирующее действие средства «Форбицид» («Forbucid») на вирус АЧС с использованием тест-объектов (впитывающие поверхности) 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 «Форбицид» («Forbucid») и влияния на их уровень высокомолекулярного белка

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия средства «Форбицид» («Forbucid») 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 «Форбицид» («Forbucid») 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 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°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-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°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 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 см³ с 1-2-х суточной культурой клеток А₄С₂. Инфицированную культуру А₄С₂ инкубировали в СО₂ 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 $\lg \text{ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$.

5.4. Оценка дезинфицирующего действия средства «Форбицид» («Forbicide») in vivo

При исследованиях с вирусом, использовали вирулентный эпизоотически значимый вирус АЧС. На стерильные тест-объекты, имитирующие объекты животноводческих помещений (невпитывающие поверхности из металла и пластика), наносили по 0,3 л вирусосодержащей жидкости на 1 м^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. Испытуемый 1,0 % раствор средства «Форбицид» («Forbicide») равномерно наносили методом орошения на тест-объекты из бетона с нормой расхода $300 \text{ мл}/\text{м}^2$.

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

С обработанных растворами дезинфектанта тест-объектов из бетона испытуемый материал 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. 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 «Форбицид» («Forbicide») 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 «Форбицид» («Forbicide»).

Таблица 1 - Антимикробная активность средства «Форбицид» («Forbicide») 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 средство «Форбицид» («Forbicide») 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* – 0,0039 %.

При добавлении высокомолекулярного белка происходит снижение бактерицидной активности средства в 2-8 раз.

При определении инфекционной активности вируса АЧС изолят Ставрополь в виде вирусоносительной крови установлено, что титр вируса в культуре клеток А₄С₂ составляет 7,00 lg ГАЕ₅₀/мл (гемадсорбирующих единиц).

Дезинфицирующее действие 1,0 %-ного раствора средства «Форбицид» («Forbicide») в отношении вируса АЧС, которым были контаминированы впитывающие тест-поверхности из бетона, определяли в экспериментах на свиньях. При этом норма расхода дезсредства при обработке тест-объектов составляла 0,3 л/м².

Результаты испытаний дезинфицирующего действия средства «Форбицид» («Forbicide») в отношении вируса АЧС с использованием биопробы представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Определение в биопробе дезинфицирующего действия средства «Форбицид» («Forbicide») при обеззараживании тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС.

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

Из данных таблицы 2 видно, что при орошении средством «Форбицид» («Forbicide») тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза, впитывающие поверхности из бетона обеззараживались 1,0 %-ным раствором при экспозиции 0,5 часа (принимая исходный препарат за 100 %) – животные этой опытной группы оставались клинически здоровыми в течение всего срока наблюдения.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дезинфектант «Форбицид» («Forbicide») 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 0,0078 и 0,0039 % от исходной, соответственно, без добавления белковой нагрузки. При добавлении белковой нагрузки бактерицидная активность средства снижается в 2-8 раз.

При испытаниях на сельскохозяйственных животных (биопроба) установлено, что полное обеззараживание впитывающих тест-поверхностей, имитирующих объекты животноводческих помещений (шероховатые впитывающие поверхности из бетона), контаминированных вирулентным эпизоотическим изолятом вируса АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза (20% органических веществ в вируссодержащей жидкости), было достигнуто после однократного орошения 1,0 %-ным раствором дезинфектанта «Форбицид» («Forbicide») при экспозиции 0,5 часа при норме расхода 0,3 л/м².

Дезинфицирующее средство «Форбицид» («Forbicide») 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» (за исключением п.п. 9 и 10), утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ РФ 16.07.2002 г. с целью полной инактивации вируса АЧС и предотвращения его распространения.

Руководитель испытаний:

Зав. лаб. Экспериментальной микробиологии

доктор биологических наук, профессор

 Селянинов Ю.О.

Ответственный исполнитель

Зав. лаб. Музейных штаммов

Доктор ветеринарных наук, профессор

 Балышев В.М.