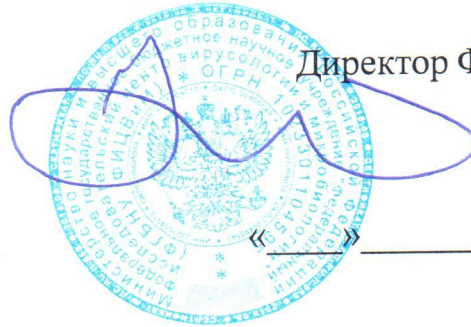


**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии»
(ФГБНУ ФИЦВиМ)**

УТВЕРЖДАЮ»



Директор ФГБНУ ФИЦВиМ

Д.В.Колбасов

_____ 20 г.

Отчет

**«Исследование дезинфицирующей активности средства OXYWIN в
отношении возбудителя гриппа птиц»**

Вольгинский, 2023

РЕФЕРАТ

Отчет на 10 страницах, содержит 3 таблицы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ОХУWIN, вирус гриппа птиц, дезинфицирующее действие, лабораторные испытания.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ: представленный образец дезинфицирующего средства ОХУWIN производства компании ООО «ГЛОБАЛ КЕМИКАЛ».

Средство представляет собой мелкогранулированный порошок розово-серого цвета с характерным запахом. В качестве действующих веществ содержит: калий пероксомоносульфат, неорганические буферные системы, органические кислоты и поверхностно-активные вещества.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: изучение дезинфицирующего действия средства «ОХУWIN» в отношении вирулентного вируса гриппа птиц на контаминированных поверхностях, имитирующих объекты птицеводческих помещений. Изучение бактерицидного в отношении тест-микроорганизмов I, II групп устойчивости к действию химических веществ в лабораторных условиях.

В лабораторных условиях испытана эффективность дезинфицирующего действия средства, при обеззараживании контаминированных вирусом гриппа птиц поверхностей, имитирующих объекты птицеводческих помещений с подтверждением полноты инаktivации вируса на куриных эмбрионах. Исследованы бактериостатическая и минимальная бактерицидная концентрации средств с использованием тест-микроорганизмов 1, 2 групп устойчивости

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 или удаление из них патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Основное назначение дезинфекции – разорвать эпизоотическую цепь путем воздействия на ее важное звено – фактор передачи возбудителя болезни от источника инфекции к восприимчивому организму.

В последние годы на рынке дезинфицирующих средств представлен большой ассортимент препаратов отечественного и импортного производства. Но при всем многообразии дезинфицирующих средств, количество компонентов, входящих в их состав, весьма ограничено, при чем 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. Проблема внедрения новых высокоэффективных дезинфектантов приобрела особую актуальность в связи с распространением на территории ряда европейских стран и РФ высокопатогенного гриппа птиц, представляющего угрозу птицеводству страны.

Учитывая то, что для большого количества дезинфектантов не изучена их вирулицидная активность в отношении вируса гриппа птиц, целесообразно проведение работ по обеспечению ветеринарной дезинфекционной практики протестированными высокоэффективными дезсредствами.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Испытания выполнены в рамках договора № 22/21 от 23 декабря 2021г. согласно руководству Р 4.2.2643-10 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности», «Методическим указаниям о порядке испытания новых дезинфицирующих средств для ветеринарной практики», утвержденным ГУВ Госагропрома СССР в 1987 г. и методическим указаниям МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

ОЦЕНИВАЕМЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Инфекционная активность вируса гриппа птиц штамм А/курица/Сергиев-Посад/1/17 (H5N8) в куриных эмбрионах.

Дезинфицирующее действие средства ОХУWIN на вирус гриппа птиц с использованием тест-объектов (впитывающие – бетон) и выделение вируса гриппа птиц в куриных эмбрионах 9-11 суточного возраста.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Материалы:

- Вирус гриппа птиц штамм А/курица/Сергиев-Посад/1/17 (H5N8), инфекционная активность $9,75 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.
- Тест-микроорганизмы (*E. coli* штамм К-12 и *S. aureus* штамм 209-Р)
- Образец средства «ОХУWIN».
- Куриные эмбрионы 9 – 11 суточного возраста.

2. Методы

2.1 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.

2.2 Определение бактериостатической, бактерицидной активности дезинфекционных средств и влияния на их уровень высокомолекулярного белка

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия средства ОХУWIN 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 «ОХУWIN» 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 ДТСБ нормальной сыворотки крови лошади в конечной концентрации 40 %.

2.3 Определение инфекционной активности вируса гриппа птиц (ВГП) в куриных эмбрионах (КЭ)

Для определения инфекционной активности ВГП готовили десятикратные последовательные разведения вирусосодержащей экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) на физиологическом растворе с 10^{-1} по 10^{-9} . Затем каждым разведением проводили заражение КЭ. Зараженные КЭ инкубировали при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 72 часов. Через 72 часа от всех КЭ отбирали ЭЭЖ и ставили реакцию гемагглютинации (РГА). Титр вируса рассчитывали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и выражали в $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

2.4 Оценка дезинфицирующего действия средства OXYWIN

При исследованиях с вирусом, использовали вирулентный эпизоотически значимый ВГП. На стерильные тест-объекты имитирующие объекты птицеводческих помещений (шероховатые впитывающие поверхности из бетона) наносили по $1,5 \text{ см}^3$ вирусосодержащей жидкости на 100 см^2 площади. В качестве механической защиты вируса использовали не содержащую вирус ЭЭЖ. Смесь равномерно распределяли по поверхности тестов, после чего их подсушивают 1 час. Испытуемые растворы дезинфицирующего средства (согласно таблице 1) равномерно наносили методом орошения на тест-объекты из расчёта $0,3 \text{ л}/\text{м}^2$ площади.

На контрольные тест-объекты вместо раствора средства наносят такое же количество воды, которую использовали для приготовления раствора препарата.

С тест-объектов, обработанных испытуемыми растворами препаратов, материал для исследования отбирают через соответствующий период времени (согласно таблице 1).

Вирусный материал соскабливали, добавляли по 4,5 см³ физиологического раствора, экстрагируют при комнатной температуре в течение 30 минут, затем центрифугируют 15 мин. при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость используют для заражения куриных эмбрионов.

Надосадочную жидкость с одного тест-объекта вводили 8 куриным эмбрионам и 8 КЭ использовали в качестве контроля. Зараженные КЭ инкубировали при 37⁰С в течение 72-96 часов. Овоскопию зараженных КЭ проводили ежедневно. КЭ, павшие в течение 24 часов после заражения отбраковывали (неспецифическая гибель). Павшие КЭ в последующие сроки инкубации помещали в холодильник. По окончании инкубации оставшиеся живыми КЭ также помещали в холодильник не менее чем на 12 часов.

С ЭЭЖ охлаждённых КЭ ставили РГА для выявления вируса. С этой целью с каждого КЭ берут каплю ЭЭЖ и помещали на предметное стекло, затем к этой ЭЭЖ добавляют по капле 1-2%-ных куриных эритроцитов и компоненты смешивают покачиванием стекла. Смесь ЭЭЖ и эритроцитов оставляют на контакт при комнатной температуре в течение 10-15 минут и учитывают результаты реакции.

Дезинфекцию признавали эффективной, если при заражении КЭ материалом с исследуемых тест-объектов не отмечали гибели КЭ и результат исследования ЭЭЖ в реакции гемагглютинации был отрицательным.

Схема проведения оценки эффективности препарата OXYWIN

| <i>Впитывающие (бетон)</i> | |
|-------------------------------|------------------|
| Время (час) | Концентрация (%) |
| 2 | 4, 6, 8 |
| <i>Невпитывающие (металл)</i> | |
| 2 | 4, 6, 8 |

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Антимикробную активность дезинфицирующих средств 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 2 представлены результаты определения бактериостатического и бактерицидного действия средства OXYWIN.

Таблица 2

Антимикробная активность средства OXYWIN 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 |
| <i>E. coli</i> K12 | б/с | 0,125 | 0,5 |
| | б/ц | 0,125 | 0,5 |
| <i>S. aureus</i> 209-Р | б/с | 0,125 | 0,5 |
| | б/ц | 0,125 | 0,5 |

Примечание: б/с - бактериостатическая активность; б/ц - бактерицидная активность.

В результате проведенных испытаний установлено, что средство OXYWIN обладает антимикробной активностью в отношении тест-культур грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*S. aureus*) микроорганизмов в следующих концентрациях, принимая средство за 100 % вещество (таблица 2):

МПК_{E.coli} – 0,125 %;

МБК_{E.coli} – 0,5 %;

МПК_{S.aureus} – 0,125 %;

МБК_{S.aureus} – 0,5 %;

При добавлении высокомолекулярного белка происходит снижение бактерицидной активности средства в 4 раза.

Исследование эффективности образца средства OXYWIN в отношении вируса гриппа птиц (ВГП) проводили в соответствии с техническим заданием по схеме, представленной в таблице 1. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результат оценки дезинфицирующего действия
препарата OXYWIN в отношении ВГП

| Экспозиция (час) | Концентрация (%) | Результат |
|-------------------------------|------------------|--------------------------|
| <i>Впитывающие (бетон)</i> | | |
| 2 | 4,0 | <i>Эффективен</i> |
| | 6,0 | <i>Эффективен</i> |
| | 8,0 | <i>Эффективен</i> |
| <i>Невпитывающие (металл)</i> | | |
| 2 | 4,0 | <i>Эффективен</i> |
| | 6,0 | <i>Эффективен</i> |
| | 8,0 | <i>Эффективен</i> |

Результаты, представленные в таблице 3 свидетельствуют о том, что препарат OXYWIN при обработке впитывающей шероховатой и невпитывающей поверхностей с белковой нагрузкой эффективен в отношении ВГП в виде 4, 6 и 8 % рабочего раствора при экспозиции 2 (два) часа. При обработке тест-объектов в данных режимах падеж КЭ не отмечен, результат РГА отрицательный.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дезинфицирующее средство OXYWIN 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 0,125 % от исходной, без добавления белковой нагрузки.

Дезинфицирующее средство «OXYWIN» полностью обеззараживает тест-поверхности имитирующие объекты птицеводческих помещений (впитывающие шероховатые поверхности из бетона) и транспортные средства (невпитывающие поверхности из металла), контаминированные вирулентным вирусом гриппа птиц с белковой нагрузкой при однократном орошении 4,0 % и выше рабочим раствором при экспозиции 2 (часа) и более при норме расхода 0,3 л/м².

Дезинфицирующее средство OXYWIN может в данных режимах применяться в очагах заражения вирусом гриппа птиц для дезинфекции объектов в соответствии с действующими инструктивными документами.

Руководитель испытаний:

Заведующий НЭО
кандидат ветеринарных наук



С.П.Живодеров

Исполнители:

Микробиолог



Е.Н.Глухарева

Микробиолог

Н.К.Бобровская