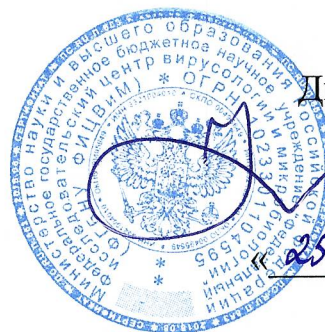


Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии»
(ФГБНУ ФИЦВиМ)

УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБНУ ФИЦВиМ

Д.В.Колбасов



« 25 » июля 2023 г.

Отчет

«Исследование дезинфицирующей активности средства OXYWIN в
отношении возбудителя африканской чумы свиней»

Вольгинский, 2023

РЕФЕРАТ

Отчет на 11 страницах, содержит 3 таблицы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ОХУWIN, вирус африканской чумы свиней, 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 африканской чумы свиней на контаминированных поверхностях, имитирующих объекты свиноводческих 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 африканской чумы свиней поверхностей, имитирующих объекты свиноводческих помещений с подтверждением полноты инаktivации вируса в культуре клеток лейкоцитов свиней. 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 активностью 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 АЧС на территории ряда европейских стран и РФ.

Вирус АЧС контролируется путем выбраковки инфицированных свиней и соблюдением норм биобезопасности, и в настоящее время это наиболее эффективный способ остановить распространение инфекции.

Учитывая то, что для большого количества дезинфектантов не изучена их вирулицидная активность в отношении вируса АЧС, 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 АЧС штамм Ставрополь 01/08 в культуре клеток лейкоцитов свиней.

Дезинфицирующее действие средства ОХУWIN на вирус африканской чумы свиней с использованием тест-объектов (впитывающие – бетон) и выделение вируса АЧС в культуре клеток лейкоцитов свиней.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Материалы:

- Вирус африканской чумы свиней штамм Ставрополь 01/08 (вирусодержащая кровь с активностью $10^{6,5}$ ГАЕ₅₀/см³).
- Тест-микроорганизмы (*E. coli* штамм К-12 и *S. aureus* штамм 209-Р)
- Образец средства «ОХУWIN».
- Культура клеток лейкоцитов свиней (ЛС).

2. Методы

2.1 Получение культур тест-микроорганизмов

В пробирки со скошенным дрожжевым триптон-соевым агаром (ДТСА) заседали 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 OXYWIN 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 «OXYWIN» 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 Получение первичной культуры клеток лейкоцитов свиней

Образцы гепаринизированной крови берут из краниальной полой вены от подсвинков ж.м. 20-25 кг, наслаивали на градиент Фиколла–Гипака и центрифугировали (22°C, 400×g, 30 мин). Клетки из интерфазы собирали и промывали сбалансированным физиологическим раствором Хенкса три раза путем центрифугирования (4°C, 400×g, 5 мин). В качестве питательной среды (рН 7,60–7,65) используется 0,1% гидролизат лактальбумина в физиологическом растворе Earle's с добавлением 10% сыворотки донорской свиной крови. Первичную культуру клеток ЛС распределяют по 24-луночным пластиковым микропанелям или культуральным флаконам и инкубируют в инкубаторе с CO₂ в следующих условиях: концентрация CO₂ 5%, относительная влажность 90% и температура (37,0±0,5)°C.

2.4 Определение инфекционной активности вируса АЧС

Для определения инфекционной активности вируса АЧС готовят десятикратные последовательные разведения вирусосодержащего материала на физиологическом растворе с 10⁻¹ по 10⁻⁸ по четыре лунки для каждого десятикратного разведения с помощью реакции гемадсорбции. Результаты учитывают по наличию явления гемадсорбции через 5-7 дней. Титры вируса рассчитывают в соответствии с методом, описанным Б.А. Кербером в модификации И.П. Ашмарина, и выражали в 50% гемадсорбирующих единицах на мл.

2.5 Оценка дезинфицирующего действия средства OXYWIN

При исследованиях с вирусом, использовали вирулентный эпизоотически значимый вирус АЧС. На стерильные тест-объекты имитирующие объекты свиноводческих 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 среду Игла MEM, содержащую 40% сыворотки крови КРС. 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 $0,3 \text{ л/м}^2$ 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 $4,5 \text{ см}^3$ физиологического раствора, экстрагируют при комнатной температуре в течение 30 минут, затем центрифугируют 15 мин. при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость используют для инокуляции культуры клеток ЛС.

Экстрактом с каждого тест-объекта по 0,5 мл инфицируется 8 лунок для каждого показателя, 8 лунок – контроль в 24-луночных культуральных панелях с монослоем клеток. После внесения надосадочной жидкости в лунки плашка инкубируется в течение 1 часа при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ с 5% CO_2 в инкубаторе (“контакт”), после чего производится добавление 0,5 мл среды Игла MEM с 5% FBS и 1% суспензии эритроцитов свиньи в каждую лунку. Плашку с культурой клеток инкубируют при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ с 5% CO_2 в течение 120-144 часов.

Учёт результатов производится через 120-144 часов после внесения образцов. Учёт результатов:

- наличие гемадсорбции свидетельствует о присутствии в образце вируса АЧС;

- отсутствие явления гемадсорбции подтверждает отсутствие вируса АЧС в образце. В данном случае проводится три последовательных пассажа в культуре клеток ЛС.

Дезинфекцию признавали эффективной, если при заражении культуры клеток ЛС материалом с исследуемых тест-объектов не отмечали гемадсорбции в течение 3 пассажей.

Таблица 1

Схема проведения оценки эффективности
дезинфицирующего средства ОХУWIN

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

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 ОХУWIN.

Таблица 2

Антимикробная активность дезинфицирующего средства ОХУWIN 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
E. coli K12	б/с	0,125	0,5
	б/ц	0,125	0,5
S. aureus 209-P	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 ОХУWIN обладает антимикробной активностью в отношении тест-культуры 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 ОХУWIN в отношении вируса АЧС проводили в соответствии с техническим заданием по схеме, представленной в таблице 1. Результаты представлены в таблице 3.

Результат оценки дезинфицирующего действия
препарата ОХУWIN в отношении вируса АЧС

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

Результаты, представленные в таблице 3 свидетельствуют о том, что дезинфицирующее средство ОХУWIN при обработке впитывающей шероховатой и невпитывающей поверхностей с белковой нагрузкой эффективен в отношении вируса АЧС в виде 2, 4 и 6 % рабочего раствора при экспозиции 2 (два) часа. При обработке тест-объектов в данных режимах не отмечали гемадсорбции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дезинфицирующее средство ОХУWIN 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 «ОХУWIN» полностью обеззараживает тест-поверхности имитирующие объекты свиноводческих помещений (впитывающие шероховатые поверхности из бетона) и транспортные средства (невпитывающие поверхности из металла), контаминированные

вирулентным вирусом АЧС с белковой нагрузкой при однократном орошении 2,0 % 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 АЧС для дезинфекции объектов в соответствии с действующими инструктивными документами.

Руководитель испытаний:

Заведующий НЭО

Кандидат ветеринарных наук

И.О.



С.П. Живодеров

Исполнители:

Старший научный сотрудник

Кандидат биологических наук



М.В. Нефедьева