

Российская академия сельскохозяйственных наук

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

УТВЕРЖДАЮ

Директор института



*Д.В. КОЛБАСОВ*  
*16 июля 2013 г.*

ОТЧЕТ

ИСПЫТАНИЙ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СРЕДСТВА  
«ИНТРА МУЛЬТИ-ДЕЗ» (INTRA MULTI-DES) ООО «РАМОНЬ АГРО»  
(ОРГАНИЗАЦИЯ-ПРОИЗВОДИТЕЛЬ «INTRACARE B.V.»/  
«ИНТРАКЕА Б.В», НИДЕРЛАНДЫ) В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ  
АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Покров, 2013

## РЕФЕРАТ

Отчет на 10 стр., 2 табл.

«ИНТРА МУЛЬТИ-ДЕЗ», E. COLI, ST. AUREUS, ВИРУС АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, БАКТЕРИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ, ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ, ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ, БИОПРОБА

**Объект исследований:** дезинфицирующее средство «Интра Мульти-Дез» («Intra Multi-Des») ООО «Рамонь Агро» (организация производитель: фирма «Intracare B.V.» / «Интракеа Б.В.», Нидерланды).

**Цель работы:** изучение дезинфицирующего действия средства «Интра Мульти-Дез» в отношении вируса АЧС.

В лабораторных условиях исследованы бактериостатическая и минимальная бактерицидная концентрации средства «Интра Мульти-Дез» 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, 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 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 «Интра Мульти-Дез» («Intra Multi-Des») ООО «Рамонь Агро» (организация производитель: фирма «Intracare B.V.»/ «Интракеа Б.В.», Нидерланды).

Средство представляет собой прозрачную жидкость желтоватого цвета со слабым специфическим запахом. Содержит в своем составе в качестве действующих веществ 10% четвертичных аммониевых соединений, 8% глутарового альдегида, 3,2% формальдегида; рН 1% водного раствора составляет 4,1. Срок годности средства при соблюдении условий хранения составляет 24 месяца с даты изготовления.

### **2 ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Определить спектр антимикробного действия средства «Интра Мульти-Дез» в отношении тест-микробов 1,2 групп устойчивости.

Определить дезинфицирующую активность средства «Интра Мульти-Дез» 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 № 1 от 28.06.2013 г. с ООО «Рамонь Агро» в период с 20 сентября 2013 года по 31 октября 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 «Интра Мульти-Дез».

Дезинфицирующее действие средства «Интра Мульти-Дез» 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 «Интра Мульти-Дез» и влияния на их уровень высокомолекулярного белка**

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия средства «Интра Мульти-Дез» 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 «Интра Мульти-Дез» 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 МФ ( $10^6$  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 см<sup>3</sup> с 1-2-х суточной культурой клеток А<sub>1</sub>С<sub>2</sub>. Инфицированную культуру А<sub>1</sub>С<sub>2</sub> инкубировали в СО<sub>2</sub> инкубаторе при (37±0,5)°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 ГАЕ<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

#### **5.4 Оценка дезинфицирующего действия средства «Интра Мульти-Дез» 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 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 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. Испытуемые 1,5 – 2,0 %-ные растворы средства «Интра Мульти-Дез» равномерно наносили методом орошения на тест-объекты, из расчета 0,3 л/м<sup>2</sup> площади.

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

С обработанных растворами дезинфектанта тест-объектов, испытуемые материалы отбирали через 1-3 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 5 животных: 4 – 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 «Интра Мульти-Дез» 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 «Интра Мульти-Дез».

Таблица 1 Антимикробная активность дезсредства «Интра Мульти-Дез» 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 «Интра Мульти-Дез» 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* – 0,0039 %;
- МБК *E. coli* – 0,0312 %;
- МПК *S. aureus* – 0,0009 %;
- МБК *S. aureus* – 0,0312%.

При добавлении высокомолекулярного белка происходит снижение бактерицидной активности средства: белковый индекс для *E. coli* и *S. aureus* колеблется от 2 до 16.

При определении инфекционной активности вируса АЧС изолят 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</sub>/мл (гемадсорбирующих единиц).



Дезинфицирующее действие 1,5-2,0 %-ных растворов средства «Интра Мульти-Дез» 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 дезсредства «Интра Мульти-Дез» в отношении вируса АЧС с использованием биопробы представлены в таблице 2.

Таблица 2 Определение дезинфицирующего действия средства «Интра Мульти-Дез» 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
1	1,5	0,3	1,0	1/1
2	2,0	0,3	3,0	0/3
3	Контроль			1/1

Из данных таблицы 2 видно, что при орошении средством «Интра Мульти-Дез» тест-объектов, контаминированных вирусом АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза, поверхности из бетона обеззараживались 2,0 %-ным раствором при экспозиции 3,0 часа с нормой расхода дезсредства 0,3 л/м<sup>2</sup>.

Зараженный суспензией смыва с тест-объекта, контаминированного вирусом АЧС и обработанного 1,5 %-ным раствором дезсредства с экспозицией 1 час и нормой расхода 0,3 л/м<sup>2</sup> подсвинок, заболел на 11-е сутки с характерной клинической картиной АЧС и погиб через 3 суток после появления клинических признаков.

Контрольное животное пало на 7 сутки после заражения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дезинфектант «Интра Мульти-Дез» 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 % от исходной.

При испытаниях на сельскохозяйственных животных (биопроба) установлено, что полное обеззараживание тест-поверхностей, имитирующих объекты животноводческих помещений (шероховатые поверхности из бетона) и контаминированных вирулентным эпизоотическим изолятом вируса АЧС с белковой защитой в виде свиного навоза (20% органических веществ в вируссодержащей жидкости), было достигнуто при однократном орошении 2,0 %-ным раствором дезинфектанта «Интра Мульти-Дез» при экспозиции 3,0 часа с нормой расхода 0,3 л/м<sup>2</sup>.

Дезинфицирующее средство «Интра Мульти-Дез» 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. с целью полной инактивации вируса АЧС и предотвращения его распространения.

Руководитель испытаний:

Зав. лаб. «Экспериментальной микробиологии»

доктор биологических наук, профессор



Сеязнинов Ю. О.