

**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 средств
DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS в отношении возбудителя
гриппа птиц»**

Вольгинский, 2021

РЕФЕРАТ

Отчет на 8 страницах, содержит 2 таблицы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS, вирус гриппа птиц, дезинфицирующее действие, лабораторные испытания.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ: представленные образцы дезинфицирующих средств DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS, производитель ООО «МК - АГРОТОРГ».

Средства представляют собой прозрачные жидкости светло-коричневого цвета. В качестве действующих веществ содержат:

- DEZMIX-QX - четвертичные аммониевые соединения (14,5% алкилдиметилбензиламмония хлорида), 8,5 % глутарового альдегида, 3,5% полигексаметиленгуанидина;
- ДЕЗОМИГ WINS - четвертичные аммониевые соединения (15,0% алкилдиметилбензиламмония хлорида), 15,0 % глутарового альдегида, 5,0% полигексаметиленгуанидина;

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: изучение дезинфицирующего действия средств DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS в отношении вирулентного вируса гриппа птиц на контаминированных поверхностях, имитирующих объекты птицеводческих помещений.

В лабораторных условиях испытана эффективность дезинфицирующего действия средств, при обеззараживании контаминированных вирусом гриппа птиц поверхностей, имитирующих объекты птицеводческих помещений с подтверждением полноты инактивации вируса на куриных эмбрионах.

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 микроорганизмом. Основное назначение дезинфекции – разорвать эпизоотическую цепь путем воздействия на ее важное звено – фактор передачи возбудителя болезни от источника инфекции к восприимчивому организму.

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 по территории России, Польши, Китая, Германии, Венгрии, Великобритании, Бельгии и многих других стран высокопатогенного гриппа птиц, представляющего угрозу птицеводству.

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 большого количества дезинфицирующих средств 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 № 31/20 от 10 ноября 2020 г. 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.

Минимальные бактериостатическая и бактерицидная концентрации средств DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS.

Дезинфицирующее действие средств DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS 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 ЭИД₅₀/см³.
- Тест-микроорганизмы (*E. coli* штамм K-12 и *S. aureus* штамм 209-P)
- Образцы средств DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS.
- 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 10³ – 10⁶ /мл. Посевы инкубировали при температуре (36±1)°С в течение 18-20 ч. Суточные культуры контролировали на отсутствие контаминаントов. 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 дезинфицирующих средств и влияния на их уровень высокомолекулярного белка

Предварительную оценку бактерицидного и бактериостатического действия средств DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS 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 средств DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS готовили их 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 K-12 и *S. aureus* штамм 209-P) доводили до 0,5 ЕД МФ (10^6 м.т./мл).

В приготовленные разведения средства вносили инокулум 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 вируссодержащей экстрактрамбриональной жидкости (ЭЭЖ) на физиологическом растворе с 10^{-1} по 10^{-9} . Затем каждым разведением проводили заражение КЭ. Зараженные КЭ инкубировали при температуре $37\pm0,5^\circ\text{C}$ 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 средств DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS

При исследованиях с вирусом, использовали вирулентный эпизоотически значимый ВГП. На стерильные тест-объекты имитирующие объекты птицеводческих помещений (шероховатые впитывающие поверхности из бетона) и транспорт (металл) наносили по $1,5 \text{ см}^3$ вируссодержащей 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 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 $4,5 \text{ см}^3$ физиологического раствора, экстрагируют при комнатной температуре в течение 30 минут, затем центрифугируют 15 мин. при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость используют для заражения куриных эмбрионов.

Надосадочную жидкость с одного тест-объекта вводили 4 куриным эмбрионам и 4 КЭ использовали в качестве контроля. Зараженные КЭ инкубировали при 37°C 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.

Таблица 1

Схема проведения оценки эффективности дезсредств DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS в отношении вируса гриппа птиц

Тест-объект (впитывающий - бетон)	Концентрация, %	Экспозиция, мин.		
		5	30	60
DEZMIX-QX	0,5	5	30	60
	1,0			
ДЕЗОМИГ WINS	0,5	5	30	60
	1,0			

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 и 3 представлены результаты изучения бактериостатического и бактерицидного действия средств DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS.

Таблица 2
Антимикробная активность средства DEZMIX-QX 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	0,0156	0,0625
	б/ц	0,0312	0,0625
<i>S. aureus</i> 209-P	б/с	0,0009	0,0078
	б/ц	0,0156	0,0312

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

В результате проведенных испытаний установлено, что средство DEZMIX-QX 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*} – 0,0156 %;

МБК_{*E.coli*} – 0,0312 %;

МПК_{*S.aureus*} – 0,0009 %;

МБК_{*S.aureus*} – 0,0156 %;

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

Таблица 3

Антимикробная активность средства ДЕЗОМИГ WINS 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	0,0312	0,0312
	б/ц	0,0312	0,25
<i>S. aureus</i> 209-P	б/с	0,0009	0,0039
	б/ц	0,0078	0,0312

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

В результате проведенных испытаний установлено, что средство ДЕЗОМИГ WINS 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} – 0,0312 %;

МБК_{E.coli} – 0,0312 %;

МПК_{S.aureus} – 0,0009 %;

МБК_{S.aureus} – 0,0078 %;

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

Исследование эффективности средств DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS в отношении вируса гриппа птиц (ВГП) проводили в соответствии с техническим заданием по схеме, представленной в таблице 1. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4

Дезинфицирующая активность средств DEZMIX-QX И ДЕЗОМИГ WINS в отношении вируса гриппа птиц

Тест-объект (Впитывающие- бетон)	Концентрация, %	Экспозиция, мин.		
		5	30	60
DEZMIX-QX	0,5	<i>Не эффективен</i>	<i>Не эффективен</i>	Эффективен
	1,0	<i>Не эффективен</i>	Эффективен	
ДЕЗОМИГ WINS	0,5	<i>Не эффективен</i>	<i>Не эффективен</i>	Эффективен
	1,0	Эффективен		

Результаты, представленные в таблице 4 свидетельствуют о том, что дезинфицирующее средство DEZMIX-QX при обработке впитывающей шероховатой поверхности с белковой нагрузкой эффективно в отношении ВГП в виде 0,5% рабочего раствора при экспозиции 60 минут и более, в виде 1,0% рабочего раствора при экспозиции 30 минут и более.

Дезинфицирующее средство ДЕЗОМИГ WINS при обработке впитывающей шероховатой поверхности с белковой нагрузкой эффективно в отношении ВГП в виде 0,5% рабочего раствора при экспозиции 60 минут и более или в виде 1,0% рабочего раствора при экспозиции 5 минут и более.

При обработке тест-объектов в данных режимах падеж КЭ не отмечен, результат РГА отрицательный.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дезинфицирующее средство DEZMIX-QX 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 0,0156 % от исходной, соответственно, без добавления белковой нагрузки.

Дезинфицирующее средство ДЕЗОМИГ WINS 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, соответственно, без добавления белковой нагрузки.

Дезинфицирующее средство DEZMIX-QX полностью обеззараживает тест-поверхности имитирующие объекты птицеводческих помещений (впитывающие шероховатые поверхности из бетона), контаминированные вирулентным вирусом гриппа птиц с белковой нагрузкой при однократном орошении 0,5% рабочим раствором при экспозиции 60 минут и более, в виде 1,0% рабочего раствора при экспозиции 30 минут и более; при норме расхода 0,3 л/м².

Дезинфицирующее средство ДЕЗОМИГ WINS полностью обеззараживает тест-поверхности имитирующие объекты птицеводческих помещений (впитывающие шероховатые поверхности из бетона), контаминированные вирулентным вирусом гриппа птиц с белковой нагрузкой при однократном орошении 0,5% рабочим раствором при экспозиции 60 минут и более, в виде 1,0% рабочего раствора при экспозиции 5 минут и более; при норме расхода 0,3 л/м².

Дезинфицирующие средства DEZMIX-QX и ДЕЗОМИГ WINS могут 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 НЭО

Н.К. Бобровская

Микробиолог НЭО

Е.Н. Глухарева