

ВИРУЛИЦИДНОЕ И БАКТЕРИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА «БИ-ДЕЗ[™]» НА ВИРУС БОЛЕЗНИ ТЕШЕНА

Шкромада О.И.

«Сумский национальный аграрный университет», г.Сумы, Республика Украина

В статье приведены результаты исследования вирулицидной активности дезинфектанта «Би-дез[™]» относительно вируса болезни Тешена (Teschovirus) производственный штамм «БУЧАЧ». В результате проведенных испытаний была установлена рабочая концентрация препарата «Би-дез[™]» для уничтожения вируса на поверхности объектов и в суспензиях. Также, была установлена минимальная бактерицидная доза препарата «Би-дез[™]» в отношении E. coli и S. Aureus.

The results of the study disinfectant virucidal activity " Bi-dez[™] " about Teschen disease virus (Teschovirus) production strain "Buhchahc." As a result of the tests was set working concentration of the drug " Bi-dez[™] " for the destruction of the virus on the surface of objects and in suspensions. Also installed was minimal bactericidal dose "B des tm" with respect to E. coli and S. Aureus.

Ключевые слова: вирус, вирулицидное действие, дезинфектант, культура клеток, тест-объекты, экспозиция.

Key words: virus, virucidal effect, disinfectant, cell culture, test objects, the exhibition.

Введение. Энзоотический энцефаломиелит (Teschovirus) – болезнь Тешена, полиомиелит свиней, инфекционный паралич свиней, божья чума, болезнь Тальфана, болезнь Клобука – контагиозная болезнь свиней, характеризующаяся развитием негнойного энцефаломиелита и появлением параличей.

Возбудитель болезни – РНК-содержащий энтеровирус, относящийся к 1, 2, 3 и 5-ой серогруппам, семейства Picornaviridae. Вирус репродуцируется только в культурах клеток свиней с хорошо выраженным цитопатическим эффектом. Он устойчив к эфиру, хлороформу, трипсину, кислотам и щелочам. В 2%-ном растворе поваренной соли остается патогенным в течение 18 недель. Выдерживает нагревание до температуры 56 °С в течение 1 часа, а при минусовых температурах сохраняет активность несколько лет.

Восприимчивы к болезни свиньи всех возрастов и пород, но болеют преимущественно в возрасте 2 – 6 месяцев.

Распространение болезни. К 1964 г. болезнь обнаружили в большинстве стран Западной и Восточной Европы. В 1937-1957 гг. ее регистрировали в США, Бразилии, Канаде, с 1947 г. – в Африке (о-в Мадагаскар). С 1993-1995 гг. случаи заболевания стали выявлять в Азии (Лаос, КНДР), а также вновь в странах Восточной Европы. Болезнь Тешена регистрируется на Украине, в Беларуси и в России.

Источником инфекции являются клинически и латентно больные, а также переболевшие свиньи, в организме которых вирус сохраняется до года. Такие животные выделяют его с экскретами и секретами из носа, рта и фекалиями. Чаще заражение происходит при потреблении корма, воды, мясных отходов или боенских отбросов, загрязненных выделениями больных животных. Возможно и контактное заражение. Болезнь протекает энзоотически, а иногда спорадически. Её возникновению и распространению способствуют резкие перемены погоды, охлаждение и высокая влажность.

Энзоотический энцефаломиелит проявляется в течение года, но чаще всего регистрируется весной и осенью в виде отдельных вспышек.

Инкубационный период длится 7-15, реже до 30 дней. Первые случаи заболевания протекают преимущественно остро и подостро, а в последующем может протекать более длительно и даже хронически. В острой форме заболевание начинается повышением температуры тела (40,5-41,0 °С), вялостью, отсутствием аппетита. Через 1-2 дня температура тела снижается до нормы, и появляются симптомы поражения центральной нервной системы. Поросята возбуждены и совершают произвольные различные движения. У многих отмечается рвота, острый ринит, пенистое кровавое истечение из носа и резко выраженная гиперестезия кожи.

Макроскопически обнаруживают гиперемии и отек головного мозга. Кровеносные сосуды мозговых оболочек и самого мозга расширены и переполнены кровью. В спинном мозге можно обнаружить кровоизлияния. Часто наблюдается бронхит, отек легких, пневмония и переполнение мочевого пузыря мочой. В ряде случаев встречаются точечные и пятнистые кровоизлияния под эпи- и эндокардом, на плевре и слизистой мочевого пузыря.

Диагноз ставится на основании эпизоотологических, клинических данных и результатов лабораторных исследований, включающих выделение вируса в культуре клеток, определение его типовой принадлежности в РДП, ИФ, ИФА и выявление специфических антител в сыворотке крови больных и переболевших животных путем постановки РН и ELISA. В сомнительных случаях ставится биопроба на поросятах.

В лабораторию направляют спинной мозг, кору головного мозга или мозжечок, отобранные от свиней с нервными явлениями на ранней стадии их проявления и кусочки эпителия слизистой ободочной кишки, так как на 5 – 7-е сутки энтеровирусный антиген обнаруживается лишь в эпителии слизистой кишечника.

Материалы и методы исследований. С целью определения эффективной вирулицидной концентрации «Би-дез[™]» относительно вируса болезни Тешена (Teschovirus) производственный штамм «БУЧАЧ» на уровне 15-75 пассажей в культуре чувствительной клеточной линии СПЕВ, патогенной для

восприимчивых сельскохозяйственных животных и непатогенный для человека.

Вирус болезни Тешена должен вызывать заболевание и смерть поросят при интрацеребральном заражении, с характерными клиническими признаками болезни Тешена через 3-7 суток после заражения.

Для определения эффективности вирулицидной концентрации «Би-дез™» по отношению к вирусу болезни Тешена (*Teschovirus*) производственный штамм «БУЧАЧ» использовали суспензию вирусосодержащего материала, который получали после размножения вируса на культурах клеток СПЕВ. Для опыта использовали по 6 матрасов.

Вирусосодержащую жидкость смешивали с равным объемом раствора дезинфектанта «Би-дез™», выдерживали 15, 30, 60 мин. При этом использовали 0,1%, 0,25%, 0,5% и 1% растворы дезпрепарата.

Эффективность обеззараживания поверхностей тест-объектов от вируса болезни Тешена и бактерий *E. coli* и *S. Aureus* дезинфектантом проверяли в следующем порядке: на простерилизованную поверхность тест-объектов наносили стерильной пипеткой 1 - 2 см³ суспензии вируса Тешена производственный штамм «БУЧАЧ». Контаминированные тест-объекты оставляли в кюветах горизонтально и вертикально, подсушивали 1-2 часа та с помощью опрыскивателя увлажняли поверхность исследуемым дезинфицирующим раствором с учетом концентрации, экспозиции и количества использованного дезинфектанта. При этом использовали такие концентрации дезинфектанта «Би-дез™» 0,1 % 0,25 %, 0,5 % и 1,0 %.

Результаты исследований. В качестве контроля для обработки тест-объектов использовали стерильную воду. Через определенное время с поверхности тест-объектов делали смывы стерильной марлевой салфеткой с контрольных и опытных проб.

К пробе жидкости (10 - 50 см³) добавляли 0,05 М трис-буфер (pH 9,0), который добавляли в объеме 1 - 2 см³ и встряхивали на протяжении 5 мин. Смесь центрифугировали при 1500 об/мин. 15 - 20 мин., надосадочную жидкость использовали для определения остаточной инфекционности. Надосадочную жидкость и питательную среду (на основе инактивированной сыворотки крови крупного рогатого скота) вносили для определения цитопатического действия в монослой культуры клеток СПЕВ. Проявление цитопатического действия (ЦПД) в монослое культуры клеток СПЕВ будет проявляться в виде округления клеток, образования симпластов, многоядерных клеток и появления зернистости. Степень дегенерации клеток оценивали по 4-бальной шкалой в крестах: ++++ - деструкция всех клеток (клетки отделяются от стекла и плавают в среде); +++ - рядом с полной дегенерацией встречаются отдельные неповрежденные клетки; ++ - деструкция половины клеток; + - дегенерация меньше половины клеток. Отсутствие дегенерации - клетки культуры не отличаются от контрольной (не зараженной вирусом) культуры. Для подтверждения цитопатического эффекта использовали РН (реакцию нейтрализации) (табл. 1).

Таблица 1 - Эффективность инактивации вируса болезни Тешена (*Teschovirus*) производственный штамм «БУЧАЧ» с помощью дезинфектанта «Би-дез™» на поверхности тест-объектов, М±m, n = 6

Экспозиция (мин.)	Концентрация дезпрепарата, %			
	0,1	0,25	0,5	1,0
15	46,28 % ± 0,12	99,50 % ± 0,26**	100 %	100 %
30	91,03 % ± 1,06	100 %	100 %	100 %
60	94,06 % ± 0,42*	100 %	100 %	100 %

Примечание. Вероятность разницы: *P≤0,05; **P≤0,01.

Определение эффективности уничтожения вируса болезни Тешена дезинфектантом проводили методом обеззараживания тест-объектов и суспензионным методом согласно рекомендаций [3, 4].

Необходимо указать, что в результате проведенных исследований изменений в культуре клеток СПЕВ не выявлено. Это свидетельствует об эффективности дезинфекционного средства на вирус, который находился на поверхности тест-объекта.

Результаты проведенных исследований приведены в таблице 1. Из этой таблицы видно, что «Би-дез™» в 0,1% концентрации через 15 мин. не полностью инактивирует вирус, а только на 46,28 %; через 30 мин. дезинфектант уничтожает вирус на 91,03 %, а через 1 час – на 94,06 %.

При обработке тест-объектов 0,25 % раствором дезпрепарата через 15 мин. Наблюдалась гибель вируса на 99,50 %, а через 30 мин. и 1 час – вирус болезни Тешена уничтожен на 100 %.

При обработке поверхностей 0,5 % и 1 % раствором «Би-дез™» уже через 15 мин. осуществлялась полная инактивация вируса. После заражения смывами, которые были взяты через 30 мин. и 1 год. с обработанных 0,5 % и 1 % раствором поверхностей изменений в тест-системах (культурах клеток СПЕВ) вируса не выявлено.

При проведении исследований суспензионным методом ставили цель определить эффективную вирулицидную концентрацию дезинфекционного средства «Би-дез™» для инактивации вируса болезни Тешена. Исследования проводили согласно существующей методики [4].

В исследованиях определения вирулицидной активности дезинфектанта «Би-дез™» использовали такие концентрации: 0,1% 0,25 %, 0,5 % и 1,0 %.

Также в качестве тест-вируса использовали клетки СПЕВ, в которых происходило размножение вируса болезни Тешена. Вирусосодержащую жидкость смешивали с равным объемом раствора «Би-дез™», выдерживали 15, 30, 60 мин.

После указанной экспозиции пробы разводили 10-тикратно в физиологическом растворе и вносили для определения цитопатического действия в монослой культуры клеток СПЕВ. Проявление цитопатического действия (ЦПД) в монослое культуры клеток СПЕВ будет проявляться в виде

округления клеток, образования симпластов, многоядерных клеток и появления зернистости. Для подтверждения цитопатического эффекта использовали РН (реакцию нейтрализации).

Результаты проведенных исследований наведены в таблице 2.

Таблица 2 - Инактивация вируса болезни Тешена при воздействии дезинфектанта «Би-дез™», М±m, n = 6

Экспозиция (мин.)	Концентрация «Би-дез™», %			
	0,1	0,25	0,5	1
15	$10^{9,30 \pm 0,18}$	$10^{6,8 \pm 0,53}$	0	0
	45,67±0,35*	99,56±0,38**	100	100
30	$10^{8,6 \pm 0,62}$	0	0	0
	92,00±0,42**	100	100	100
60	$10^{7,2 \pm 0,42}$	0	0	0
	95,00±0,73**	100	100	100

Примечание. Вероятность разницы: *P≤0,05; **P≤0,01.

Выходной титр вируса болезни Тешена $10^{9,3} \text{ ЕД}_{50}/\text{см}^3$;

В числителе указанная остаточная инфекционность вируса в $\lg \text{ЕД}_{50}/\text{см}^3$;

В знаменателе –эффективность инактивации вируса, %.

Исходя из данных таблицы 2 можно сделать вывод, что 0, 1 раствор дезинфектанта «Би-дез™» через 15 мин. инактивирует не полностью, а только на 45,76 % вирусные частицы; через 30 мин. в этой же концентрации «Би-дез™» инактивирует вирус на 92 %, а через 1 ас. – на 95 %. При действии 0,25 % раствора «Би-дез™» через 15 мин. уничтожается 99,56 % вирусных частиц болезни Тешена, а через 30 мин. и 1 час. препарат в той же концентрации полностью проходит инактивация вируса.

Следует указать, что в концентрации 0,5 % и 1,0 % «Би-дез™» имеет выраженную вирулицидную активность и способен на протяжении 15, 30 и 60 мин полностью инактивировать вирус болезни Тешена.

Определение эффективности действия дезинфектанта «Би-дез™» на E.coli и S.aureus проводили в первую очередь и при положительном результате испытания продолжали проводить с участием патогенных штаммов микроорганизмов. Результаты исследований приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Эффективность использования препарата «Би-дез™» при обеззараживании поверхностей тест-объектов, инфицированных E. coli ATCC 25922

Название тест-объекта	Концентрация дезинфектанта, %	Экспозиция			
		через 10 мин.	через 40 мин.	через 60 мин.	через 10 сут.
Бетон	0,1	+	+	+	+
	0,25	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Кирпич	0,1	+	+	+	+
	0,25	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Кафельная плитка	0,1	-	+	+	+
	0,25	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Нержавеющая сталь	0,1	-	+	+	+
	0,25	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-

Примечание: "+" – наличие роста, "-" – отсутствие роста

Исследования проводили с различными концентрациями дезинфектанта при разных температурных режимах, способах и кратности нанесения на тест-объекты до тех пор, пока не была установлена минимальная бактерицидная концентрация и экспозиция дезсредства для данных микроорганизмов. В качестве тест-объектов использовали нержавеющую сталь, кафельную плитку (7,07 ×

7,07 см²), бетон, кирпич раз мером (7,07×7,07×7,07 см³).

Оценку качества дезинекции проводили через 24-48 часов согласно методике. Исходя из данных таблицы 3, можно сделать вывод, что дезинфектант задерживает рост *E. coli* ATCC 25922 только на гладких поверхностях тест-объектов (нержавеющая сталь, кафельная плитка). На шершавых поверхностях (бетон и кирпич) *E. coli* продолжает расти. Начиная с 0,25 % концентрации препарат «Би-дез™» через 10 минут после обработки полностью уничтожает *E. coli* ATCC 25922 на всех поверхностях тест-объектов. После взятия смывов с поверхности тест-объектов через 40 мин., 1 час и 10 суток после обработки *E. coli* не обнаружено.

Следует заметить, что после обработки тест-объектов 0,1 % раствором «Би-дез™», инфицированных *S. aureus* ATC 25923, после взятия смывов с поверхности этих объектов наблюдали рост *S. aureus* на питательной среде (таблица 4).

Таблица 4 – Эффективность использования препарата «Би-дез™» при обеззараживании поверхностей тест-объектов, инфицированных *S. aureus* ATC 25923

Название тест-объекта	Концентрация дезинфектанта, %	Экспозиция			
		через 10 мин.	через 40 мин.	через 60 мин.	через 10 сут.
Бетон	0,1	+	+	+	+
	0,25	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Кирпич	0,1	+	+	+	+
	0,25	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Кафельная плитка	0,1	-	+	+	+
	0,25	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Нержавеющая сталь	0,1	-	+	+	+
	0,25	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-

Примечание: "+" – наличие роста, "-" – отсутствие роста

Учитывая полученные данные (таблица 3), можно сделать вывод, что дезинфектант начиная с 0,25 % концентрации и выше задерживает рост *S. aureus* ATC 25923 на протяжении всего периода исследования (10 мин., 40 мин., 1 час. и 10 сут).

Объяснить длительную дезинфекцию на поверхности бетона и кирпича можно тем, что при длительной экспозиции «Би-дез™» проникает вглубь, сквозь поры материалов, что является очень важным при обеззараживании животноводческих объектов.

Таким образом, дезинфектант «Би-дез™», начиная с 0,25 % концентрации уже через 10 мин. полностью инактивирует микроорганизмы *E. coli* ATCC 25922 и *S. Aureus* ATC 25923 на поверхностях тест-объектов.

Заключение. Таким образом, проанализировав данные, полученные по двум различным методикам, можно утверждать, что 0,1 % раствор дезинфектанта «Би-дез™» недостаточно эффективен для уничтожения вируса. Однако 0,25 % раствор дезинфектанта «Би-дез™» полностью убивает вирус болезни Тешена через 30 мин., а начиная с 0,5 % концентрации – уже через 15 мин. (таблицы 1, 2).

Дезинфектант «Би-дез™», начиная с 0,25 % концентрации уже через 10 мин. полностью инактивирует микроорганизмы *E. coli* ATCC 25922 и *S. Aureus* ATC 25923 на поверхностях тест-объектов (таблицы 3, 4).

Литература. 1. Бірта Г.О. Ветеринарно-санітарні заходи у господарствах по виробництву продукції свиного тваринництва / Г.О. Бірта // Ефективне тваринництво – 2008. - № 2. – С. 34-36. 2. Коломыцев А. Болезнь Тешена: проблемы и меры борьбы / А. Коломыцев, А. Стржаков, О. Андреева // Животноводство России – 2003. - № 4. – С. 20-26. 3. Методические указания о порядке испытания новых дезинфицирующих средств для ветеринарной практики. Утв. ГУВ Госагропрома СССР. – 1987. – С. 158. 4. Методичні рекомендації щодо визначення вірусної активності дезінфектантів відносно вірусів ньюкаслської хвороби птиці / І.І. Бойко, О.М. Якубчук, В.І. Хоменко та ін. – Київ, 2006. – 12 с. 5. Фотіна Г. А. Визначення бактерицидних властивостей дезінфікуючого препарату «Броадез-плюс» / Г. А. Фотіна, А. В. Березовський // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: 36. наук. пр. Харківської ДЗВА. – Харків, 2007. – Вип.15 (40), Ч.2, Т.1. – С. 91-95.

VIRUCIDAL AND BACTERICIDAL ACTION PREPARATION «BI-DEZ™» FOR THE VIRUS TESCHEN DISEASE

Shkromada Oksana Ivanovna

«Sumy National Agrarian University», Sumy, Republic of Ukraine

E. mail: skromadaO@yandex.ru.

Адресс: 40021, Республика Украина, г. Сумы, ул. Г. Кондратьева 160/5 кв. 15