

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ ПТИЦЕВОДСТВА  
(ГНУ ВНИВИП Россельхозакадемии)

УТВЕРЖДАЮ:  
Генеральный директор  
ООО «Биоветзащита»



А.Г.Балановский

« 27 » декабря 2013 г.

УТВЕРЖДАЮ:  
Директор ГНУ ВНИВИП  
доктор ветеринарных наук,  
член-корреспондент  
Россельхозакадемии



Э.Д.Джавадов

« 26 » декабря 2013 г.

ОТЧЁТ

по договору № 38 от 06.09.2013 г. на тему:

**«Исследование дезинфицирующей активности  
средства «Вирулен» в отношении возбудителей  
инфекционных болезней птиц различной  
этиологии»**

Исполнители:

Зам. директора по науке,  
кандидат ветеринарных наук

М.Е.Дмитриева

Заведующая отделом микробиологии,  
кандидат ветеринарных наук

О.Б.Новикова

Аспирант отдела микробиологии

С.Ю.Шолиев

Научный сотрудник лаборатории  
фармакологии и токсикологии

М.А.Занько

Санкт-Петербург – Ломоносов  
2013 г.

## Введение

Важной задачей ветеринарной дезинфекции является поиск и внедрение в практику средств, эффективных в отношении многих возбудителей инфекционных болезней животных, которые при этом будут доступными и недорогими. Одна из причин поиска новых дезинфицирующих средств состоит в том, что сам микробный фон постоянно изменяется, адаптируясь к традиционным дезинфектантам. Таким образом, изыскание и создание новых дезинфицирующих средств приобретает всё большую актуальность, поэтому необходимо изучить новые препараты с улучшенными свойствами, учитывая современные требования экологической и санитарной безопасности.

Целью наших исследований явилось изучение бактерицидных и вирицидных свойств дезинфицирующего средства «Вирулен». Перед исполнителями были поставлены следующие задачи:

- изучить активность препарата «Вирулен» в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц *in vitro* методом серийных разведений.
- изучить вирицидную активность дезинфицирующего средства «Вирулен» в отношении возбудителей ньюкаслской болезни (НБ), болезни Гамборо (инфекционная бурсальная болезнь) (ИББ) и инфекционного бронхита кур (ИБК);
- определить концентрации рабочих растворов в отношении заявленных возбудителей;
- определить эффективное время экспозиции дезинфицирующего раствора.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами была изучена антимикробная активность Вирулена в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц *in vitro*. Работу проводили на 16 культурах 9 видов возбудителей, в том числе: *Salmonella*

*typhimurium* – 1 культура; *Salmonella gallinarum-pullorum* – 1; *Salmonella enteritidis* – 3; *Escherichia coli* – 4 культуры; *Proteus vulgaris* – 2, *Pseudomonas aeruginosa* – 2, *Staphylococcus citreus* – 1, *Staphylococcus epidermidis* – 1; *Staphylococcus aureus* – 1.

Используемые в работе культуры возбудителей были выделены из трупов павших и вынужденно убитых цыплят, кур и индеек разного возраста, из помёта клинически здоровых птиц, из воздуха птицеводческих помещений птицефабрик различного технологического направления разных регионов России и стран СНГ, и штаммы из музея отдела микробиологии ВНИВИП.

Антимикробную активность Вирулена определяли методом последовательных серийных разведений. Для этого в 13 стерильных пробирок разливали по 2 мл жидкой питательной среды (мясопептонный бульон, МПБ). В первую пробирку вносили 2 мл 10%-ного раствора препарата. Содержимое перемешивали и 2 мл переносили во вторую пробирку и так далее до 10-й пробирки, из которой 2 мл удаляли. Таким образом, в первой пробирке концентрация препарата составляла 5%, во второй – 1,5%, в третьей - 1,25%, в четвёртой - 0,625%, в пятой - 0,3125%, в шестой - 0,15625%, в седьмой - 0,078125%, в восьмой - 0,0390625%, в девятой - 0,01953125% и в десятой - 0,009765625%.

Содержимое 11-й пробирки служило контролем роста культуры исследуемого микроорганизма, 12-й – контролем препарата, а 13-я - контролем стерильности питательной среды. Во все пробирки, кроме 12-й и 13-й, вносили 0,1 мл исследуемой суточной бульонной культуры возбудителя. Посевы инкубировали в термостате при температуре +37,5°C 24 часа, после чего делали пересев культуры на твердую питательную среду (скошенный мясопептонный агар, МПА) для учёта роста колоний культур возбудителей.

Учёт результатов проводили при наличии роста в пробирках с контрольными культурами и отсутствии роста в контрольных пробирках с препаратом и средой.

Результаты учитывали визуально по появлению роста культур в пробирках с МПБ (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 препарата изучали по окончании исследований по определению бактериостатического действия. Для этого из пробирок, в которых видимый рост отсутствовал, по 0,2 мл высевали на МПА. Посевы инкубировали при 37°C. Учёт результатов проводили через 24 часа инкубирования, и затем через 5 суток.

Минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) определяли по наименьшей концентрации препарата, при которой отсутствовал рост микроорганизмов на МПА.

## РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### **1. Изучение эффективности дезинфицирующего средства «Вирулен» в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц**

Антимикробную активность Вирулена изучали на жидких и плотных питательных средах. Минимальные подавляющую (бактериостатическую) и бактерицидную концентрации (МПК и МБК) определяли методом серийных разведений в МПБ с последующим высевом на МПА.

Результаты определения антимикробной активности Вирулена представлены в таблице 1.

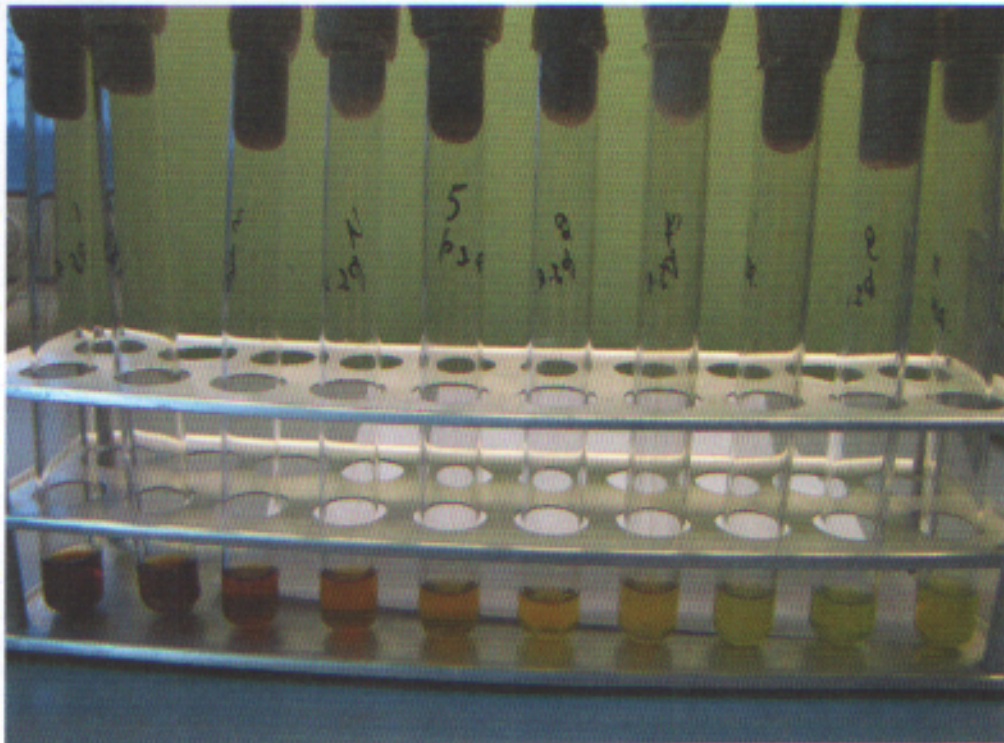
Из полученных и приведенных данных видно, что в отношении кокковой микрофлоры (золотистый, лимонно-жёлтый и белый стафилококки) и одной культуры кишечной палочки Вирулен показал ярко выраженную бактерицидную активность (полное отсутствие роста как на МПБ, так и на МПА) в 0,01953125% концентрации препарата (9-я пробирка). В отношении культур сальмонелл, кишечной палочки, протей Вирулен эффективен в

0,15625-0,0390625% концентрации (6-7-я пробирки). Лишь у двух культур синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) МБК (минимальная бактерицидная активность) составила 0,3125% (5-я пробирка).

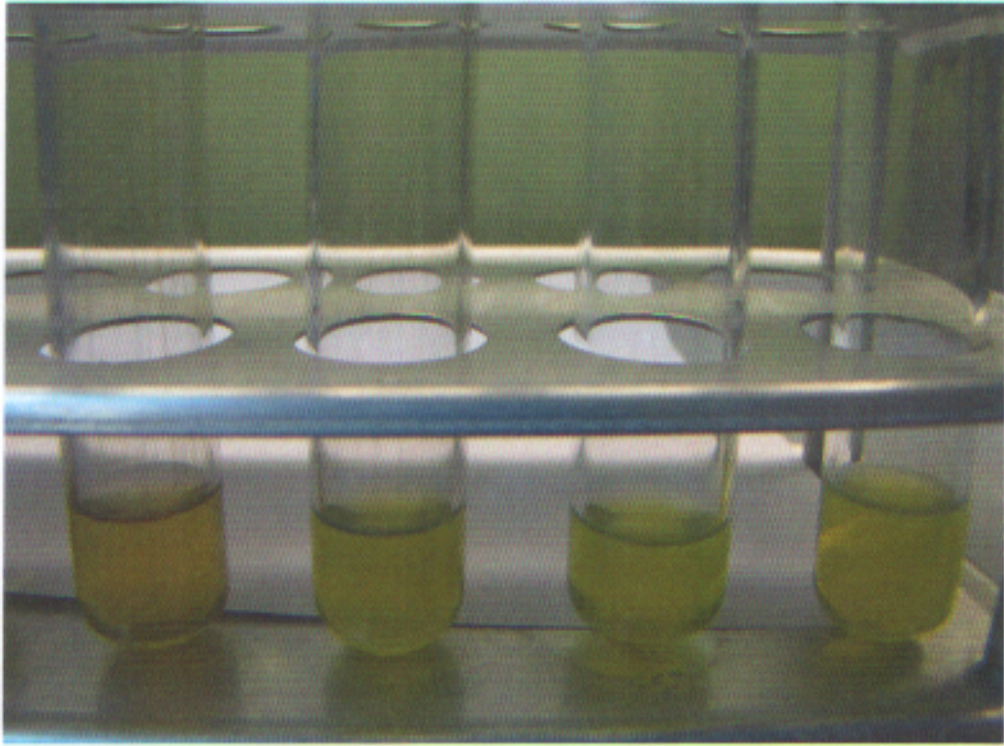
**Заключение.** Полученные данные по изучению эффективности Вирулена *in vitro* в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц свидетельствуют о высокой активности препарата в отношении этих культур. В отношении большинства культур энтеробактерий и стафилококков Вирулен показал выраженную бактерицидную активность в 0,15625-0,01953125% концентрации препарата.

Таким образом, применение Вирулена в птицеводстве для дезинфекции объектов ветеринарного надзора является весьма перспективным.

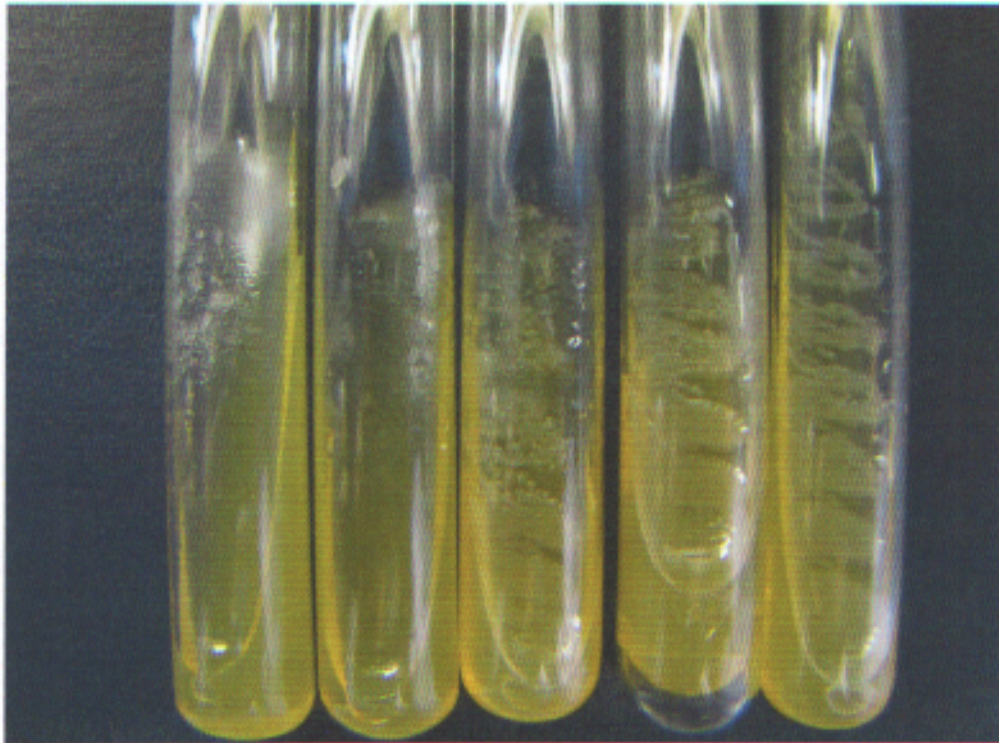
**Фото 1. Определение бактерицидных свойств Вирулена в отношении культуры *Pseudomonas aeruginosa* методом серийных разведений (рост на МПБ)**



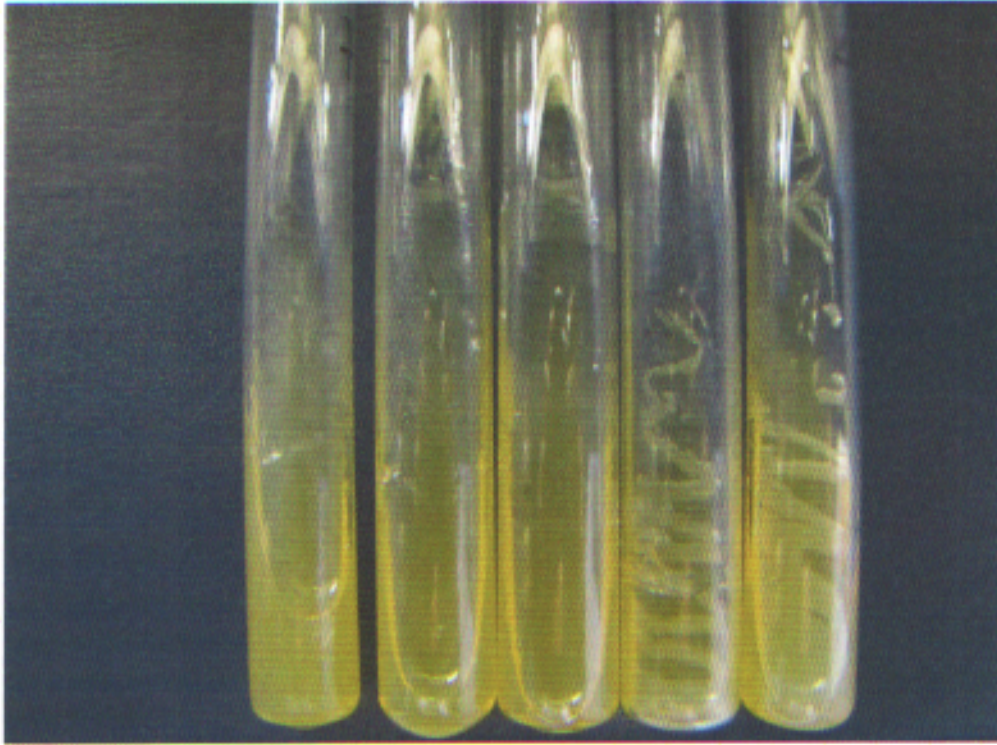
**Фото 2. Определение бактерицидных свойств Вирулена в отношении культуры *Pseudomonas aeruginosa* методом серийных разведений (рост на МПБ, 7-10 пробирки)**



**Фото 3. Определение бактерицидных свойств Вирулена в отношении культуры *Salmonella gallinarum-pullorum* методом серийных разведений (рост на МПА, 7-10 пробирки и контроль)**



**Фото 4. Определение бактерицидных свойств Вирулена в отношении культуры *Escherichia coli-1* методом серийных разведений (рост на МПБ, 7-10 пробирки и контроль)**



## РЕЗУЛЬТАТЫ ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1. Определение токсичности препарата на СПФ-эмбрионах.

В следствие того, что вирусологические исследования по определению дезинфицирующей активности исследуемого препарата в отношении указанных возбудителей проводятся на СПФ развивающихся куриных эмбрионах (далее РЭК), в первую очередь необходимо было определить токсичность препарата.

Для проведения данного исследования из исходного препарата получали разведения на стерильном физиологическом растворе в последовательной концентрации: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%. Исходный препарат и полученные его разведения в дозе 0,2 см<sup>3</sup> инокулировали в аллантоисную полость РЭК. На каждое разведение препарата использовали по 10 эмбрионов, оставив 10 незадействованных эмбрионов в качестве контроля. Затем эмбрионы были заложены на инкубацию при t°C 37,0 ± 0,5°C для дальнейшего развития. Учет проводился путем овоскопирования РЭК каждые 24ч в течение 7 дней с последующей выбраковкой павших от интоксикации эмбрионов.

По результатам исследования были определены токсические для РЭК концентрации препарата: 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, вызвавшие 100% падеж эмбрионов уже через 24ч инкубации. Концентрации 0,1- 0,4% были выбраны для дальнейших исследований.

## 2. Исследование вироцидной активности дезинфицирующего препарата «Вирулен» в заданных концентрациях.

С целью исследования вироцидной активности препарата «Вирулен» необходимо определяли минимальную концентрацию рабочего раствора препарата и необходимое время для его экспозиции, достаточные для нейтрализации указанных выше возбудителей.

При изучении антивирусных свойств препарата были использованы СПФ-эмбрионы кур 10-дневного срока инкубации и вакцинные штаммы вирусов НБ шт. «Ла-Сота»; ИББ шт. «52/70»; ИБК шт. «Чапаевский».

В процессе исследований был использован метод заражения эмбрионов в аллантоисную полость и на хорио-аллантоисную оболочку в случае с болезнью Гамборо. Препарат из его исходного раствора был разведен в стерильном физиологическом растворе в соответствии с установленными концентрациями, не оказывающими летального токсического воздействия на эмбрионы, от 0,1% до 0,4% в трех повторностях, соответственно количеству заявленных вирусных возбудителей.

### 2.1 Исследование вироцидной активности препарата «Вирулен» в отношении возбудителя ньюкаслской болезни.

В каждое из подготовленных разведений был внесен одинаковый объем живого вируса НБ, с конечным разведением  $1 \cdot 10^{-6}$ . В качестве контроля использовалось указанное разведение вируса в стерильном физиологическом растворе.

Заражение эмбрионов проводилось в два этапа: спустя 30 мин после контакта вируса с препаратом и 60 мин. Затем эмбрионы были заложены на инкубацию при  $t^{\circ}\text{C } 37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  на 96ч. По окончании инкубационного срока эмбрионы охлаждались при  $t^{\circ}\text{C } 4,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Аллантоисная жидкость из каждого эмбриона исследовалась в реакции гемагглютинации (РГА). Результаты реакции (количество положительно реагирующих проб) представлены в таблице.

Концентрация препарата в растворе	Экспозиция	
	30 мин	60 мин
0,1%	10 пол.	9 пол.
0,2%	7 пол.	3 пол.
0,3%	5 пол.	2 пол.
0,4%	5 пол.	-
НБ контроль	10 пол.	10 пол.

Таким образом, проведенные исследования показали, что исследуемый дезинфектант «Вирулен» в отношении вируса ньюкаслской болезни работает в концентрации не менее 0,4% при экспозиции 1 час.



## **2.2 Исследование вироцидной активности препарата «Вирулен» в отношении возбудителя болезни Гамборо.**

Во вторую серию разведений был внесен одинаковый объем живого вируса ИББ, с конечным разведением 1:50. В качестве контроля использовалось указанное разведение вируса в стерильном физиологическом растворе.

Заражение эмбрионов проводилось на хорио-аллантаисную оболочку так же в два этапа: спустя 30 мин после контакта вируса с препаратом и 60 мин. Инкубация 120 ч. Учет результатов проводился по патологоанатомическим изменениям эмбрионов.

По окончании срока инкубации производилось вскрытие предварительно охлажденных эмбрионов и их детальный осмотр, который выявил характерные для данной инфекции патологические изменения у 100% эмбрионов: отек хорио-аллантаисной оболочки, отек брюшины, т.н. «воробьиные лапки» и ярко выраженные мелкоточечные кровоизлияния в печени эмбрионов.

Таким образом, опыт показал, что исследуемые нами концентрации не оказывают вироцидного воздействия на вирус болезни Гамборо.

## **2.3 Исследование вироцидной активности препарата «Вирулен» в отношении возбудителя инфекционного бронхита кур.**

В третью серию разведений был внесен одинаковый объем живого вируса ИБК, с конечным разведением  $1 \cdot 10^{-3}$ . В качестве контроля так же использовалось указанное разведение вируса в стерильном физиологическом растворе. Заражение производилось в аллантаисную полость. Инкубация 8 суток. Учет проводился по патологоанатомическим характерным изменениям эмбрионов: отставание в развитии – карликовость, скрученность эмбриона в клубок, специфический падеж на 2-3 сутки инкубации.

В данном опыте после вскрытия пат. изменения наблюдались в группах с концентрацией препарата 0,1%, 0,2% в обеих экспозициях и 0,3% с экспозицией 30 мин. В остальных группах характерных изменений не наблюдалось, эмбрионы соответствовали своим срокам развития.

### **Заключение по результатам вирусологических исследований.**

Таким образом, проведенные исследования показали, что:

1. для нейтрализации вируса ньюкаслской болезни необходимо применять раствор «Вирулена» в концентрации не менее 0,4% с экспозицией не менее 1 часа.
2. для нейтрализации вируса инфекционного бронхита кур можно применять 0,4% раствор с экспозицией 20 – 30 мин, и 0,3% с экспозицией 1 час.
3. в исследуемых концентрациях препарат «Вирулен» вирус болезни Гамборо не инактивирует, как и большинство средств, используемых для дезинфекции. Учитывая биологические и физико-химические свойства возбудителя, единственным методом профилактики болезни Гамборо

является вакцинация. Профилактические общие ветеринарно-санитарные мероприятия против болезни Гамборо (тотальная дезинфекция, принцип «все пусто – все занято», введение карантина и др.) малоэффективны.

#### **Заключение по результатам исследования препарата «Вирулен»**

Препарат «Вирулен» обладает высокой активностью в отношении основных возбудителей инфекционных болезней птиц бактериальной этиологии. В отношении большинства культур энтеробактерий и стафилококков Вирулен показал выраженную бактерицидную активность. Вирулен также обладает вироцидной активностью против парамиксо- и коронавирусов.

Таким образом, показатели эффективности применения Вирулена для дезинфекции птицеводческих помещений соответствуют требованиям, предъявляемым к качеству проведения дезинфекции объектов ветеринарного надзора.

Таблица 1.

**Результаты определения антимикробной активности Виртулена  
в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц**

Вид культуры (16 культур 9 видов)	Рост на питат. ТАТ- среде	Концентрация раствора препарата Виртулен									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,3125%	0,15625%	0,3125%	0,0390625 %	0,01953125 %	0,009765625 %
1. <i>Salmonella typhimurium</i>	МТБ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	МТА	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+
2. <i>Salmonella gallinarum-pullorum</i>	МТБ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	МТА	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+
3. <i>Salmonella enteritidis-1</i>	МТБ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	МТА	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
4. <i>Salmonella enteritidis-2</i>	МТБ	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	МТА	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
5. <i>Salmonella enteritidis-3</i>	МТБ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	МТА	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
6. <i>Escherichia coli-1</i>	МТБ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	МТА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7. <i>Escherichia coli-2</i>	МТБ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	МТА	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
8. <i>Escherichia coli-3</i>	МТБ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	МТА	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9. <i>Escherichia coli-4</i>	МТБ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	МТА	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
10. <i>Proteus vulgaris-1</i>	МТБ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	МТА	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
11. <i>Proteus</i>	МТБ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	МТА	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

