

Số : 332 /CD-VR

V/v: Báo cáo thử nghiệm nước sát trùng NaOClean

Hà Nội, ngày 23 tháng 2 năm 2019

**BÁO CÁO PHÂN TÍCH KẾT QUẢ
THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG CỦA SẢN PHẨM NƯỚC SÁT TRÙNG
NAOCLEAN ĐỐI VỚI MỘT SỐ VIRUS, VI KHUẨN**

1. Nội dung:

- Đánh giá tác dụng của sản phẩm nước sát trùng ở nồng độ NaOClean ở nồng độ 100 ppm
- Đánh giá tác dụng của sản phẩm nước sát trùng khi tiếp xúc với một số loại virus, vi khuẩn trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (25°C).
- Đánh giá tác dụng của sản phẩm nước sát trùng khi trộn với huyền dịch virus, vi khuẩn (đã biết nồng độ) theo tỷ lệ thể tích 10 phần nước sát trùng / 1 phần huyền dịch virus, vi khuẩn.

2. Nguyên vật liệu:

- Nước sát trùng được tạo ra từ phản ứng điện phân không có màng ngăn Muối ăn (NaCl) bằng máy NaOClean (Model DES 10K) với hoạt chất Clo hoạt tính & NaOCL ở nồng độ 100ppm
- Các chủng virus, vi khuẩn gây bệnh ở vật nuôi bao gồm: ASFV (*Asfarvirus*); PRRSV (*Arterivirus*); FMDV (*Picornavirus*); PEDV (*Coronavirus*) và vi khuẩn gây bệnh Tụ huyết trùng (*Pasteurella multocida*). Các chủng virus, vi khuẩn là giống chuẩn đã phân lập và xác định nồng độ.
- Môi trường nuôi cấy thích hợp với các chủng virus, vi khuẩn trên.
- Nguyên liệu cho phản ứng Realtime PCR, Realtime RT-PCR để định lượng virus, vi khuẩn trước và sau nuôi cấy.
- Nguyên liệu cần thiết khác.

3. Phương pháp thử nghiệm:

- Huyền dịch có chứa mầm bệnh là virus, vi khuẩn (đã xác định nồng độ) được trộn với nước sát trùng theo tỷ lệ thể tích 10 phần nước sát trùng / 1 phần huyền dịch virus, vi khuẩn (1000 ul nước sát trùng / 100 ul huyền dịch mầm bệnh).
- Ủ ở nhiệt độ phòng (25°C) trong thời gian 30 phút.
- Chuyển 300 ul hỗn dịch sau xử lý vào mỗi giếng của đĩa nuôi tế bào thích hợp với từng loại virus. Trong đĩa đã có sẵn 1,2 ml môi trường nuôi cấy tế bào. Mỗi loại virus sử dụng 3 giếng để nuôi cấy.
- Bố trí các giếng đối chứng virus (virus pha loãng cùng nồng độ trong MEM, không trộn với nước sát trùng), đối chứng sát trùng (không trộn virus) và đối

chứng tế bào (không có virus và nước sát trùng) với cùng điều kiện nuôi cấy như trên.

- Với vi khuẩn *Pas. multocida*, cấy chuyên hỗn dịch sau xử lý lên môi trường thạch máu phù hợp với vi khuẩn.
- Bố trí đĩa thạch đối chứng vi khuẩn chỉ nuôi cấy vi khuẩn được pha loãng cùng nồng độ, không xử lý sát trùng. Bố trí đĩa thạch máu đối chứng sát trùng chỉ cấy nước sát trùng không trộn với vi khuẩn.
- Nuôi cấy đĩa tế bào, đĩa thạch ở điều kiện thích hợp. Hằng ngày kiểm tra hình thái tế bào, phát hiện bệnh tích đặc trưng của tế bào; kiểm tra tình trạng môi trường nuôi cấy vi khuẩn, tìm khuẩn lạc đặc trưng.
- Thu dịch nuôi tế bào (trước và sau khi nuôi cấy), khuẩn lạc (nếu có) để làm xác chẩn bằng phương pháp thích hợp.

Chủng virus/ vi khuẩn	Nồng độ xử lý sát trùng	Môi trường nuôi cấy	Phương pháp kiểm tra	
			Hình thái/ CPE	Xác chẩn
ASFV (Asfarvirus)	10 ^{5.0} HAD50/ml	Tế bào PAM	HAD	Realtime PCR
PRRSV (Arterivirus)	10 ^{5.0} TCID50/ml	Tế bào MARC 145	CPE	Realtime RT- PCR
FMDV (Picornavirus)	10 ^{5.0} TCID50/ml	Tế bào BHK21	CPE	Realtime RT- PCR
PEDV (Coronavirus)	10 ^{5.0} TCID50/ml	Tế bào Vero	CPE	Realtime RT- PCR
Tụ huyết trùng (<i>Pas. multocida</i>)	10 ^{8.0} CFU/ml	Thạch máu	Khuẩn lạc đặc trưng	Hình thái khuẩn lạc

4. Kết quả thử nghiệm.

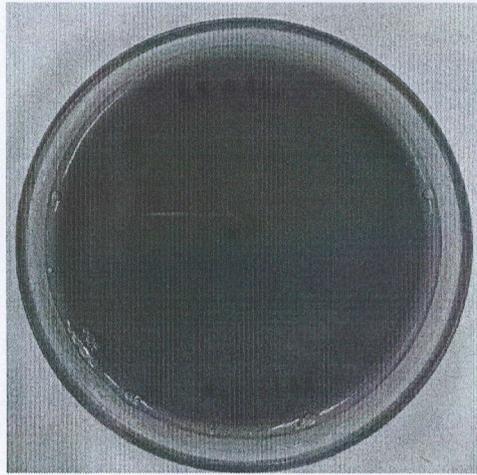
a. Tác động của nước sát trùng lên các loại môi trường nuôi cấy

Sau thời gian theo dõi, các loại tế bào dùng để nuôi cấy virus (PAM, MARC 145, BHK 21, Vero) vẫn phát triển bình thường, không có hiện tượng tế bào chết hay biến đổi hình thái do tác động của nước sát trùng. Đĩa thạch máu đối chứng sát trùng cũng không có biến đổi về tình trạng. Như vậy, nước sát trùng NaOCl không làm ảnh hưởng đến trạng thái bình thường của các loại môi trường nuôi cấy, đặc biệt là các loại tế bào.

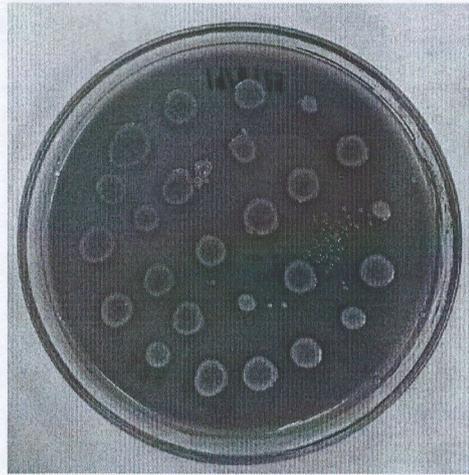
b. Tác dụng của nước sát trùng lên sự phát triển của vi khuẩn *Pas. multocida*:

Sau khi nuôi cấy 24 giờ, đĩa thạch cấy vi khuẩn đã qua xử lý sát trùng không có bất cứ khuẩn lạc nào mọc lên (ảnh A). Trong khi ở đĩa vi khuẩn đối chứng không có sát trùng, khuẩn lạc đặc trưng của vi khuẩn *Pas. multocida* phát triển rất tốt (ảnh B). Như vậy nước sát trùng NaOCl có khả năng vô hoạt 100% lượng vi khuẩn trong thời gian 30 phút, với tỷ lệ thể tích xử lý 10 phần nước sát trùng / 1 phần vi khuẩn.





A



B

c. Tác dụng của nước sát trùng lên sự phát triển của các loại virus

Bảng 1: Kết quả nuôi cấy tế bào:

Giếng nuôi cấy	Loại virus thử nghiệm			
	<i>ASFV</i>	<i>FMDV</i>	<i>PRRSV</i>	<i>PEDV</i>
Virus xử lý sát trùng	HAD (-)	CPE (1+)	CPE (-)	CPE (2+)
Đối chứng virus	HAD (3+)	CPE (4+)	CPE (4+)	CPE(4+)
Đối chứng sát trùng	Tế bào bình thường	Tế bào bình thường	Tế bào bình thường	Tế bào bình thường
Đối chứng tế bào	Tế bào bình thường	Tế bào bình thường	Tế bào bình thường	Tế bào bình thường

- Với virus ASF đã được xử lý sát trùng, giếng nuôi không xuất hiện bệnh tích tế bào đặc trưng (HAD âm tính), trong khi virus đối chứng phát triển tốt, gây bệnh tích tế bào ở mức độ cao (HAD 3+).
- Với virus FMD đã được xử lý sát trùng, giếng nuôi xuất hiện bệnh tích tế bào tại một số điểm với diện tích nhỏ (CPE 1+). Virus đối chứng phát triển tốt với bệnh tích tế bào mức độ rất cao chiếm toàn bộ bề mặt giếng. (CPE 4+).
- Với virus PRRS đã được xử lý sát trùng, giếng nuôi không có bệnh tích tế bào (CPE âm tính). Virus đối chứng không qua xử lý sát trùng phát triển tốt, gây bệnh tích tế bào ở mức độ rất cao (CPE 4+).
- Với virus PED, giếng nuôi xuất hiện bệnh tích tế bào với chiếm diện tích nhỏ (CPE 2+). Virus đối chứng phát triển tốt, gây bệnh tích tế bào gần như toàn bộ bề mặt giếng (CPE 4+).

Như vậy, qua phương pháp nuôi cấy virus trên tế bào, nước sát trùng NaOClean có thể vô hoạt hoàn toàn virus ASF và virus PRRS; vô hoạt một phần virus FMD và virus PED.

Kết quả xác chẩn và định lượng virus bằng Realtime PCR và Realtime RT-PCR cho thấy:

- Giá trị Ct của các mẫu virus đã xử lý tương đương với giá trị Ct của các mẫu virus đối chứng tương ứng. Điều này cho thấy nước sát trùng NaOClean không phá hủy DNA, RNA của các virus.

THỜI
AM
JOAN
J. Y
SUON
TAN

Bảng 2: Kết quả định lượng virus (giá trị Ct)

Giếng nuôi cấy		Loại virus thử nghiệm			
		ASFV	FMDV	PRRSV	PEDV
Virus xử lý sát trùng	Trước nuôi cấy	27,85	29,17	28,02	28,63
	Sau nuôi cấy	34,52	25,04	29,18	23,14
Đối chứng virus	Trước nuôi cấy	27,22	28,91	27,18	28,59
	Sau nuôi cấy	17,59	16,54	16,44	16,89

- Với virus ASF và PRRS đã xử lý sát trùng, giá trị Ct trước khi nuôi cấy thấp hơn giá trị Ct sau khi nuôi cấy, cho thấy nồng độ DNA, RNA của virus không tăng lên trong giếng nuôi, tức là không có virus mới được nhân lên trong giếng nuôi. Với các giếng virus đối chứng, giá trị Ct sau khi nuôi cấy giảm khoảng 10 đơn vị so với trước khi nuôi cấy, cho thấy các virus đối chứng phát triển tốt, tăng hàm lượng khoảng 1000 lần.
- Với virus FMD đã xử lý sát trùng, chênh lệch Ct trước và sau nuôi cấy là 4,13. Điều này cho thấy virus không bị xử lý triệt để, vẫn tăng khoảng 8 lần về hàm lượng. So sánh trong cùng điều kiện nuôi cấy, virus FMD đối chứng tăng hàm lượng khoảng 5300 lần (chênh lệch giá trị Ct là 12,37 giữa trước và sau nuôi cấy).
- Với virus PED đã xử lý sát trùng, chênh lệch Ct trước và sau nuôi cấy là 5,49, tức là virus hàm lượng virus đã tăng lên khoảng 45 lần trong giếng nuôi. So sánh với virus đối chứng, chênh lệch Ct là 11,7 giữa trước và sau nuôi cấy, tức là virus phát triển rất tốt, tăng hàm lượng khoảng 3300 lần.

Như vậy, trong thử nghiệm này, nước sát trùng NaOCl có khả năng vô hoạt hoàn toàn virus ASF và virus PRRS. Nước sát trùng có tác dụng vô hoạt không hoàn toàn lượng virus FMD và virus PED trong thử nghiệm, làm giảm rõ rệt mức độ tăng trưởng của virus khi so sánh với đối chứng virus không qua xử lý.

5. Kết luận:

- Nước sát trùng NaOCl, với hoạt chất Clo hoạt tính & NaOCl ở nồng độ 100ppm, có khả năng vô hoạt hoàn toàn virus ASF gây bệnh Dịch tả lợn Châu Phi và virus PRRS gây bệnh Tai xanh ở lợn.
- Nước sát trùng NaOCl có khả năng vô hoạt hoàn toàn vi khuẩn gây bệnh Tụ huyết trùng Pas. Multocida khi tiếp xúc với vi khuẩn trong 30 phút với tỷ lệ thể tích 10 phần nước sát trùng / 1 phần huyền dịch vi khuẩn.
- Nước sát trùng NaOCl có tác dụng vô hoạt một phần, hạn chế rõ rệt khả năng nhân lên trên môi trường tế bào của virus FMD gây bệnh Lở mồm long móng loài guốc chẵn và virus PED gây bệnh tiêu chảy thành dịch ở lợn.
- Nước sát trùng NaOCl với hoạt chất Clo hoạt tính & NaOCl ở nồng độ 100ppm không gây ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào nuôi cấy hoặc trạng thái của thạch nuôi cấy vi khuẩn trong thử nghiệm.

QUYỀN GIÁM ĐỐC
CHUYÊN CHẨN ĐOÁN THÚ Y TRUNG ƯƠNG

Ngô Văn Bắc