

**Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w  
Puławach**

Zakład Chorób Świń



**mgr Małgorzata Juskiewicz**

**Charakterystyka aktywności wirusobójczej wybranych środków  
dezynfekcyjnych w stosunku do wirusa afrykańskiego pomoru świń**

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem  
**prof. dr hab. Grzegorza Woźniakowskiego**

Puławy 2022

## Streszczenie

Afrykański pomór świń (ASF) to zakaźna choroba wirusowa świń, dzików oraz innych gatunków świniowatych, zwalczana na drodze urzędowej, znajdująca się na liście OIE. Chorobę wywołuje wirus ASF (ASFV). Materiał genetyczny ASFV stanowi dwuniciowa cząsteczka DNA, a na podstawie przeprowadzonych dotychczas badań molekularnych wyróżniono 24 genotypy wirusa. Choroba ta charakteryzuje się wysoką śmiertelnością wśród zakażonych świń, jednakże oprócz strat w hodowli trzody chlewnej, również działania administracyjne, w tym ograniczenia w produkcji i międzynarodowym obrocie trzodą chlewną skutkują ogromnymi konsekwencjami finansowymi dla gospodarki państw dotkniętych ASF. Od 2007 r. choroba w sposób niekontrolowany szerzy się w Europie wschodniej. ASF w Polsce stwierdzono po raz pierwszy w 2014 r. u padłego dzika na granicy z Republiką Białorusi, a zasięg występowania choroby oraz liczba potwierdzanych ognisk systematycznie rośnie z roku na rok. Na skutek ciągłego szczyżenia się ASF, do końca 2021 r. w kraju udokumentowano łącznie 488 ognisk w stadach świń oraz 13 041 ognisk u dzików, czego efektem są trudne do oszacowania straty ekonomiczne. Brak komercyjnie dostępnej szczepionki przeciwko ASF ogranicza możliwości kontroli szerzenia się choroby do jej administracyjnego zwalczania poprzez zabijanie i utylizację świń z ognisk tej choroby. W chwili obecnej jedynym środkiem zapobiegania ASF jest wdrażanie i przestrzeganie ścisłych zasad bioasekuracji. Jednym z kluczowych elementów bioasekuracji jest skuteczna dezynfekcja. Choć niektóre kraje posiadają listę zatwierdzonych środków wirusobójczych przeciwko ASFV, to ich skuteczność oparta została jedynie na badaniach z użyciem innych wirusów otoczkowych.

W związku z dotychczasowym brakiem danych dotyczących oceny skuteczności środków dezynfekcyjnych bezpośrednio przeciwko ASFV, tym samym powszechnym stosowaniem środków o niepotwierdzonej skuteczności względem tego wirusa, celem podjętej rozprawy doktorskiej była charakterystyka aktywności wirusobójczej wybranych środków dezynfekcyjnych w stosunku do ASFV. Natomiast w związku z poważnymi konsekwencjami zdrowotnymi, mogącymi mieć miejsce podczas długotrwałego narażenia na toksyczne działanie chemicznych środków dezynfekcyjnych, podjęto się badań nad skutecznością ekstraktów roślinnych, w celu

identyfikacji bezpiecznego i skutecznego w stosunku do ASFV środka na bazie roślinnej.

W ramach realizacji powyższych założeń, wykonano badania *in vitro* ilościowym, zawiesinowym testem wykonanym w oparciu o zmodyfikowaną Normę Europejską PN-EN 14675: 2015 zaadaptowaną do badań nad ASFV. Powyższa norma jest jedyną zaakceptowaną metodą badania chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych w odniesieniu do produktów stosowanych w obszarze weterynarii.

W pierwszym etapie badań podjęto próby oceny skuteczności względem ASFV 4 komercyjnych środków dezynfekcyjnych, które są ogólnie akceptowane jako skuteczne przeciwko ASFV. Tylko 2 z nich, oparte na podchlorynie sodu i peroksymonosiarczanie potasu, potwierdziły skuteczność przeciw ASFV w wybranych stężeniach. Dodatkowo potwierdzono ogromne znaczenie etapów wstępnego czyszczenia przed właściwą dezynfekcją, w celu usunięcia zanieczyszczeń. Ponadto wykazano, iż niemożliwa jest ocena skuteczności środka dezynfekcyjnego w przypadku wystąpienia cytotoksyczności.

W drugim etapie badań przeprowadzono ocenę skuteczności wirusobójczej względem ASFV ośmiu substancji czynnych zalecanych przez OIE; tj.: formaldehydu, podchlorynu sodu, sody kaustycznej, aldehydu glutarowego, fenolu, chlorku benzalkoniowego, peroksymonosiarczanu potasu i kwasu octowego. Większość związków chemicznych powodowała inaktywację wirusa w zalecanych stężeniach. Potwierdzono, że najwyższą skuteczność wykazały: podchloryn sodu, aldehyd glutarowy, i peroksymonosiarczan potasu. Jako jedyny brak skuteczności przeciwko ASFV we wszystkich stężeniach, w warunkach wysokiego zanieczyszczenia, wykazał chlorek benzalkoniowy, będąc skutecznym tylko w jednym badany stężeniu, w warunkach niskiego zanieczyszczenia. Wysoką cytotoksyczność formaldehydu pomimo zastosowanej mikrofiltracji uniemożliwiła ocenę jego skuteczności.

W związku z potencjalnym zagrożeniem wynikającym ze stosowania chemicznej dezynfekcji, która w większości przypadków, wykazuje działanie toksyczne, drażniące lub żrące, kolejnym etapem badań była identyfikacja ekstraktów roślinnych mogących wykazywać działanie wirusobójcze przeciwko ASFV. Do badań wybrano 14 ekstraktów roślinnych. Wyniki badań wykazały, że większość testowanych ekstraktów roślinnych była nieskuteczna wobec ASFV, choć początkowo wodno-glikolowe ekstrakty z kozieradki, pokrzywy zwyczajnej i mięty pieprzowej, powodowały wysoką redukcję miana wirusa. Jednakże, w przypadku 1,05% ekstraktu

z mięty pieprzowej, wykazano wysoką aktywność wirusobójczą, zarówno w warunkach niskiego, jak i wysokiego zanieczyszczenia.

Reasumując, podjęte w ramach rozprawy doktorskiej badania pozwoliły dotychczas, po raz pierwszy na świecie, wskazać najskuteczniejsze substancje chemiczne, których dominująca obecność w składzie środka dezynfekcyjnego w połączeniu z jego prawidłowym stosowaniem zapewnia skuteczność procesów dezynfekcji. Dodatkowym elementem innowacyjności przedstawionej rozprawy są badania przeprowadzone nad wirusobójczością naturalnych ekstraktów roślinnych, które mogą w przyszłości stanowić jeden ze składników ekologicznych preparatów dezynfekcyjnych.

## Summary

African swine fever (ASF) is an infectious and notifiable viral disease of pigs, wild boars and other porcine species. The disease is controlled by the administrative measures and it is listed by the OIE. An etiological agent of the disease is the ASF virus (ASFV). The genetic material of ASFV is a double-stranded DNA, and, based on the molecular tests carried out so far, 24 genotypes have been distinguished. The disease is characterized by a high mortality rate among infected pigs, however, in addition to loss in pig farming, also administrative measures, including restrictions of production and international pig trade, generate huge financial consequences for the economy of ASF-affected countries. Since 2007, the disease has spread uncontrollably in the Eastern Europe. ASF in Poland was for the first time detected in 2014 in dead wild boar found on the border with the Republic of Belarus, and the range of the disease as well as the number of confirmed outbreaks have been systematically increasing from year to year. As a result of the continuous ASF expansion, a total of 488 outbreaks in domestic pigs and 13,041 in wild boar were confirmed in the country by the end of 2021, resulting in economic losses that are difficult to estimate. The lack of a commercially available vaccine against ASF limits the ability to control the spread of the disease to administrative measures by stamping-out and disposal of pigs from the disease outbreaks. Currently, the only measures of preventing ASF are the implementation and adherence to strict biosecurity rules. One of the key elements of properly implemented biosecurity is an effective disinfection. Although some countries have a list of virucidal products approved for the use against ASFV, their effectiveness was only estimated directly, based only on testing them against other enveloped viruses. Due to the lack of data on the evaluation of the efficacy of disinfectants against ASFV available so far, resulting in the common use of agents with unconfirmed efficacy against this virus, the objective of the doctoral dissertation was to characterize the virucidal activity of selected disinfectants against ASFV. However, due to the serious health consequences that can occur during long-term exposure to the toxic effects of chemical disinfectants, an additional effort was made to investigate the effectiveness of plant extracts to identify a safe and effective ASFV plant-based alternative. As a part of the implementation of the above assumptions, *in vitro* tests were performed with a quantitative suspension test based on the modified European Standard PN-EN 14675: 2015, adapted to ASFV research. This standard is the only accepted method for testing chemical disinfectants and antiseptics for products used in the veterinary field. In the first phase of the study, attempts were made to evaluate the efficacy of 4 commercial

disinfectants against ASFV, which are generally accepted as effective against ASFV. Only 2 of them, based on sodium hypochlorite and potassium peroxymonosulfate, confirmed the effectiveness against ASFV at selected concentrations. In addition, the great importance of pre-cleaning steps preceding an actual disinfection in order to remove contaminants has been confirmed. In the second stage of the study, eight active substances recommended by the OIE were evaluated for their virucidal efficacy against ASFV, including formaldehyde, sodium hypochlorite, caustic soda, glutaraldehyde, phenol, benzalkonium chloride, potassium peroxymonosulfate, and acetic acid. Most of the chemicals inactivated the virus at the recommended concentrations. It was confirmed that the highest effectiveness was demonstrated by sodium hypochlorite, glutaraldehyde, caustic soda, and potassium peroxymonosulfate. The only disinfectant lack of efficacy against ASFV at all concentrations in the conditions simulating high contamination was benzalkonium chloride, which was effective only at one concentration tested under low contamination conditions. Despite the microfiltration applied, the high cytotoxicity of formaldehyde made it impossible to assess its effectiveness. Due to the potential risk of using chemical disinfection, which in most cases is toxic, irritating, or corrosive, the next step was to identify plant extracts that could have virucidal activity against ASFV. Fourteen plant extracts were selected for the study. The results showed that most of the plant extracts tested were ineffective against ASFV, although initially the water-glycolic extracts of fenugreek, nettle, and peppermint caused a high reduction in viral load. However, after exclusion of the impact of an extract carrier, only 1.05% peppermint extract exhibited high virucidal activity under both low and high contamination conditions. To sum up, the research undertaken as a part of the doctoral dissertation, has allowed for the first time in the world to identify the most effective chemical substances, the dominant presence of which in the composition of the disinfectant together with its correct application ensure the effectiveness of disinfection processes. An additional element of the innovation of the presented dissertation is research on the virucidal activity of natural plant extracts, which may in the future be one of the components of ecological disinfectants.