

А. І. БОНДАРЧУК, генеральний директор

ТОВ «Компанія «АРДІ», м. Київ

В. Л. КОВАЛЕНКО, доктор ветеринарних наук

О. Є. ГАЛАТЮК, доктор ветеринарних наук

ННЦ «Інститут бджільництва ім. Прокіповича», м. Київ

А. В. РОЗУМНЮК, кандидат ветеринарних наук

А. І. ЧЕХУН, А. В. ГНАТЕНКО

В. В. НЕСТЕРЕНКОВА, аспірант

Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ

В. П. МОСКАЛЕНКО, кандидат ветеринарних наук

Білоцерківський національний аграрний університет

Ю. В. ШЛАПАК

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

ВИВЧЕННЯ АНТИВІРУСНОГО ВПЛИВУ ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ПРЕПАРАТУ «БІЙОДСАН» НА ПЕРЕЩЕПЛОВАЛЬНИХ КЛІТИННИХ КУЛЬТУРАХ СНЕВ ТА ПТП

Досліджено ефективні концентрації дезінфікуючого засобу «Бійодсан», які проявляють інактивуючу дію щодо вірусу хвороби Ауескі. Засіб можна застосовувати з метою профілактичної дезінфекції об'єктів ветеринарної медицини в рекомендованих дозах та експозиціях. Препарат «Бійодсан» має широкий спектр дії та запобігає токсичному впливу та забрудненню навколишнього середовища, що відіграє важливу роль у науковому і практичному плані для ветеринарної медицини.

Ключові слова: Бійодсан, вірус, культури клітин, дезінфектант.

Вивчення віруліцидності, визначення ефективності різних концентрацій дезінфікуючого препарату в разі дезінфекції об'єктів, що підлягають ветеринарно-санітарному нагляду, має велике значення для широкого застосування нових препаратів у практиці. Тому метою роботи було вивчення токсичного впливу дезінфектанту «Бійодсан» на клітинні культури свинного походження СНЕВ, ПТП, а також титр інфекційної активності вакцинного штаму «Клон-В» вірусу хвороби Ауескі.

Методи вивчення антивірусної дії дезінфектантів на віруси які можуть спричинити захворювання тварин і людини надзвичайно потрібні в практиці ветмедицини й інших сферах господарювання де проводиться дезінфекція проти конкретно визначеного збудника хвороби.

Мета роботи полягала у вивченні антивірусної дії дезінфікуючого препарату «Бійодсан» і підбір нешкідливих його концентрацій до культури клітин СНЕВ та ПТП.

Матеріал і методи дослідження. Об'єктом досліджень був дезінфікуючий препарат «Бійодсан», який являє собою прозору рідину світлого кольору із специфічним запахом йоду. Засіб добре розчинний у воді, має мийні властивості для різних поверхонь, без пошкоджувального ефекту, не викликає корозії металів.

У досліді використані перещеплювальна культура клітин нирки ембріону свині (СНЕВ), та перещеплювальна культура клітин тестикли поросят (ПТП) вирощені на поверхні дна лунки 96-лункового мікропланшету у вигляді моношару.

Для вирощування перещеплювальних ліній було використане середовище RPMI 1640, DMEM, ГЛА, сироватка крові великої рогатої худоби серії 07, фосфатно-сольовий буфер ФСБ. Обидві культури та матеріали для їхнього культивування вироблені і надані компанією НВП «Біо-Тест-Лабораторія». В якості контрольного вірусу використовували вірус хвороби Ауескі штаму «Клон-В», отриманий у Лабораторії вакцинних препаратів.

Роботу з визначення протівірусної дії різних концентрацій «Бійодсан», і параметрів застосування було сплановано та проведено, керуючись загальноприйнятими рекомендаціями щодо застосування [1–5].

Визначення антивірусної дії на віруси різних концентрацій дезінфектанту за допомогою клітинних культур проводили візуальним оцінюванням порівняння з неінфікованим контролем стану моношару культур клітин після контакту з ним вірусу. Останній в необробленому вигляді, здатний чинити цитопатичну дію (ЦПД) на клітини моношару, що проявляється як дегенерація чи загибель клітин або оповзання моношару клітин з поверхні носія.

Критерієм вірусного впливу на культуру клітин – є загибель їхнього моношару. Вірус який не інактивувався під час взаємодії з дезінфектантом зберігає здатність до ЦПД – руйнації клітин первинних і перещеплювальних культур. Як тест-об'єкт використовували перещеплювальну культуру клітин з відомими характеристиками і стабільну протягом не менш як 3-ох послідовних пасажів СНЕВ, ПТП. Для підтримки стандартних умов культивування використовували культуральні 96-лункові стерильні мікропланшети для культур клітин фірми SARSTEDT по одному на кожен культуру, та стерильні 96-лункові мікропланшети цієї ж фірми, для отримання розведень апробованого дезінфектанту.

Результати досліджень.

Для визначення ступеню антивірусного впливу препарату «Бійодсан» на вакцинний штаму вірусу хвороби Ауескі (ВХА) «Клон-В» були приготовані різні концентрації дезінфектанту (0,01%; 0,03; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0%), в мікропланшеті з U-подібним дном. Розведення дезінфектанту проводили фосфатно-сольовим буфером.

Після цього, в готові розведення деззасобів вносили вірусну суспензію ВХА штаму «Клон-В» з активністю (10^7 ТЦД₅₀/см³) – доза вірусу котра за 24–28 год без обробки спричиняла ЦПД в культурах клітин СНЕВ і ПТП. Контакт вірусу з дезінфектантом проводили в титрувальному мікропланшеті протягом 1-ї години. Після контакту вірус+дезінфектант, готові розведення вносили на поверхню клітинного моношару для можливої адсорбції вірусу який не інактивувався деззасобами і залишали для контакту протягом 20 хв. По завершенню терміну контактування, мікропланшет з культурою клітин тричі відмили фосфатно-сольовим буфером, додавали підтримуюче середовище з 2 % сироватки крові великої рогатої худоби і ставили на подальше інкубування. При цьому, було залишено 16 лунк з культурою клітин у кожному мікропланшеті в якості контролю, куди дезінфектант не вносили.

Стан культури клітин оцінювали за допомогою мікроскопу щодоби, упродовж шести діб, а кількість клітин у лунках мікропланшету підраховували на 4-ту, 5-ту і 6-ту добу експерименту.

Для статистичної обробки отриманих результатів досліджень, окрім візуального оцінювання моношару культури клітин, використовували метод підрахунку клітин з кожного носія з культурою клітин, взятого в досліді окремо.

Урахування результатів дослідження проводили до моменту дегенеративних змін у контрольних лунках мікропланшету (6 доба).

Результати цитопатичної дії вірусу на моношар культур клітин, за різних концентрацій дезінфектанту наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Визначення цитопатичної дії вірусу хвороби Ауескі обробленого дезінфектантом на моношар культур клітин, % (n=10)

Дезінфектант	Концентрація (ступінь розведення), %	Культура клітин експозиція 20 хв		Прояв ЦПД вірусу в клітинній культурі експозиція 60 хв			
		СНЕВ	ПТП				
«Бійодсан»	0,01	-	-	+	+	+	+
	0,03	-	-	-	+	+	+
	0,05	-	-	-	-	+	+
	0,1	-	-	-	-	-	+
	0,5	-	-	-	-	-	-
	1,0	-	+	0	0	0	0
	2,0	+	+	0	0	0	0
	3,0	+	+	0	0	0	0

Примітка. (-) – відсутність ЦПД; (+) – наявність ЦПД.

За мікропланшетом проводили щоденне дворазове спостереження шляхом мікроскопування. Візуальне оцінювання стану моношару взятих в експеримент клітинних культур, які вступили у безпосередній контакт з послідовними розведеннями дезінфікуючого засобу, чітко відображало результат взаємодії культура–деззасіб, порівняно з контрольними лунками мікропланшету. В лунках мікропланшету з культурою клітин в які вносили препарат у концентрації меншій за поріг токсичності, моношар залишався неушкодженим і візуально не відрізнявся від такого у контрольних лунках (рис. 1).

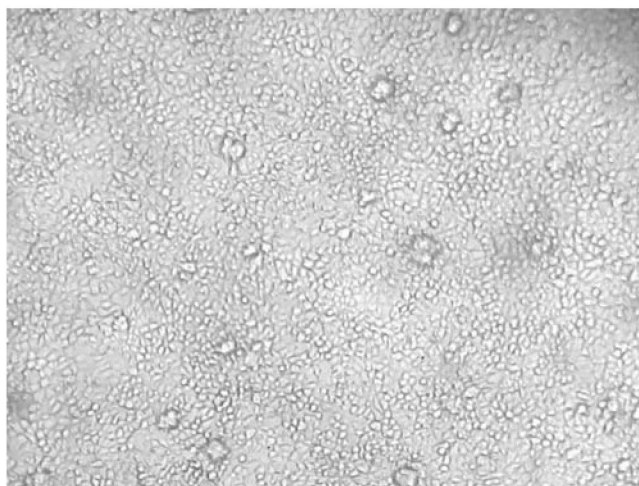


Рис. 1. Культура клітин після обробки 0,5 %-ним розчином «Бійодсан».

Поряд з цим, візуально було виявлені дослідні лунки з ознаками цитопатичної дії та дегенеративними змінами моношару; в контролі – ЦПД не відмічали. Причиною дегенеративних змін у культурі клітин була концентрація дезінфектанту, що виявилась токсичною для даного виду культури клітин (рис. 2).

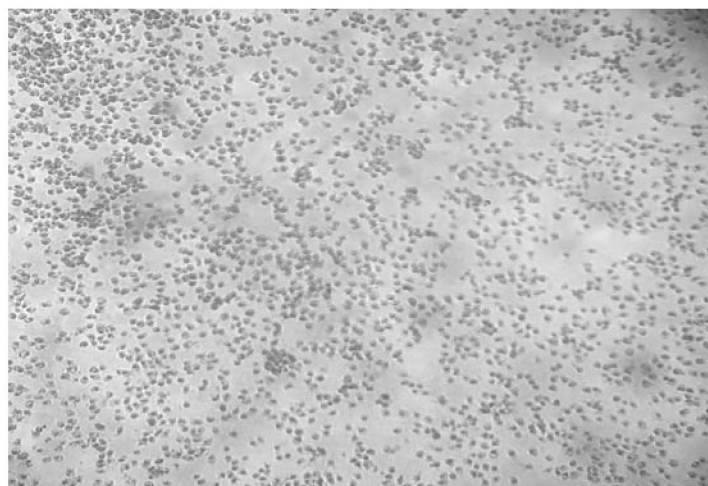


Рис. 2. Прояв ЦПД у культурі клітин після обробки 1,0 %-ним розчином «Бійодсан»

«Бійодсан» у 1,0 %-ній концентрації, на культурі клітин ПТП та СНЕВ викликав цитопатичну дію, тому данні концентрації не оцінювали відносно впливу дезінфектантів на вірус хвороби Ауескі.

У результаті проведених досліджень з визначення токсичної дії засобів після пересіву культури клітин за впливу 0,5 %-ного розчину «Бійодсан» було встановлено, що препарат у цій і нижчих концентраціях не впливає на зміну моношару культури (табл. 2).

Таблиця 2

Визначення проліферативної здатності культури клітин ПТП та СНЕВ після їх обробки дезінфектантом «Бійодсан» на 6 добу. (M±m, n=8),

Дезінфектант	Концентрація (ступінь розведення), %	Культура клітин СНЕВ	Кількість клітин після пересіву на 4 добу інкубування СНЕВ	Культура клітин ПТП	Кількість клітин після пересіву на 4 добу інкубування ПТП	Ступінь токсичності
«Бійодсан»	0,05	-	11270±51,2	+	13250±23,1	Нетоксичний
	0,1	+	10080±42,1*	+	11130±12,6*	Нетоксичний
	0,5	-	6131±31,5	-	6820±14,4	Нетоксичний
	1,0	-	525±21,7	-	631±13,5	Токсичний
	2,0	-	67±2,3	+	83±1,7	Токсичний
контроль клітин (в лунках мікроплан-шету)			17230±45,3		18205±61,2	

Примітка. * – $p \leq 0,05$, порівняно з контролем; (-) – відсутність ЦПД; (+) – наявність ЦПД.

Наступними дослідженнями встановлено, що 0,5 % розчин «Бійодсан» проявляв інактивуючу дію на вірус хвороби Ауескі. Тому препарат у цій концентрації можна рекомендувати для проведення дезінфекції з метою профілактики вірусних захворювань.

Після 6 днів спостереження, дослідження припинили у зв'язку з дегенеративними змінами в контролі клітинної культури (старіння клітинного моношару).

Висновки.

1. Встановлено, що 0,5 %-ний розчин «Бійодсан» на первинних та перещеплювальних культурах клітин: нирках ембріона свині та тестикулах поросят – інактивує вірус хвороби Ауескі.

2. Методом оцінки токсичності дезінфікуючих засобів *in vitro* виявлено, що у концентрації $\leq 0,5$ % «Бійодсан» не шкідливий для культури клітин ПТП та СНЕВ.

3. Перспективами подальших досліджень є вивчення впливу дезінфектанту «Бійодсан» на інші патогенні мікроорганізми, які небезпечні для тварин і людей.

Список використаної літератури:

1. Ветеринарна дезінфекція. Інструкція та методичні рекомендації Якубчак О. М., Хоменко В. І., Мідик С. В та ін. – К.: Біопром, 2010 – 152 с.
2. Коваленко В. Л. Розробка і контроль дезінфікуючого засобу. Монографія / За ред. В. Л. Коваленка, Д. А. Засекіна. – К.: 2013. – 166 с.
3. Коваленко В. Л. Методичні підходи щодо контролю дезінфікуючих засобів для ветеринарної медицини. Монографія / За ред. В. Л. Коваленка, В. В. Недосков. – К.: 2011. – 224 с.
4. Методичні рекомендації щодо визначення вірусцидної активності дезінфектантів відносно вірусів ньюкаслської хвороби птиці / І. І. Бойко, В. Л. Коваленко, О. М. Якубчак [та ін.] – Київ, 2006. – 12 с.
5. Коваленко В. Л. Метод визначення ступеню токсичності дезінфікуючих засобів *in vitro* на первинних та перещеплювальних культурах клітин / В. Л. Коваленко, В. І. Білоконь, В. Г. Скрипник. – Київ, 2011. – 18 с.

ИЗУЧЕНИЯ АНТИВИРУСНОГО ВЛИЯНИЯ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА «БИЙОДСАН» НА КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК СПЭВ И ПТП / А. І. Бондарчук, В. Л. Коваленко, А. Е. Галатюк, А. В. Розумнюк, А. І. Чехун, А. В. Гнатенко, Т. С. Ямцун, В. В. Нестеренкова, В. П. Москаленко, Ю. В. Шлапак

Исследованы эффективные концентрации дезинфицирующего средства «Бийодсан», которые проявляют инактивирующее действие в отношении вируса болезни Ауески. Средство можно использовать с целью профилактической дезинфекции объектов ветеринарной медицины в рекомендованных дозах и экспозициях. Препарат «Бийодсан» имеет широкий спектр действия, не токсичен и не загрязняет окружающую среду, играет важную роль в научном и практическом плане для ветеринарной медицины.

Ключевые слова: Бийодсан, вирус, культуры клеток, дезинфектант.

STUDY OF THE EFFECT OF ANTI-VIRUS DISINFECTANTS “BIYODSAN” CELL CULTURE PK AND PTP / A. Bondarchuk, V. Kovalenko, A. Galatyuk, A. Rozumnyuk, A. Chekhun, A. Gnatenko, T. Yamtsun, V Nesterenkova, V. Moskalenko, V. Slapac

Investigated effective disinfectant concentration «Biyodsan» that exhibit inactivating effect on Aujeszky's disease virus. The tool can be used for prophylactic disinfection facilities veterinary medicine in recommended doses and exposure.

Purpose was to study the antiviral activity disinfectants «Biyodsan» and his selection harmless concentrations to cell cultures SNEV and TAP.

Material and methods. The object of research was disinfectants «Biyodsan», which is a transparent liquid light color with a specific smell of iodine. Treatment is readily soluble in water, has a washing properties for different surfaces without damaging effect, not cause corrosion of

metals.

In the experiment used peresheplyvalna culture swine embryonic kidney cells (SNEV), and cell culture peresheplyvalna testicles piglets (TAP) grown on the surface of the bottom-hole 96-well microplate in a monolayer. To determine the degree of influence of antiviral drug «Biyodsan» on the vaccine strain of Aujeszky's disease (VHA) «Clone-B» were made different disinfectant concentrations (0.01%, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0%) in a microplate U-shaped bottom. Cultivation was carried out disinfectant phosphate-buffered saline. State of cell culture was evaluated by microscope every day, for six days, and the number of cells in a microplate wells were counted on the 4th, 5th and 6th day of the experiment. For microplate was performed two times daily observation by microscoping. Visual assessment of the state of monolayer experiment undertaken in cell cultures that came in contact with serial dilutions of disinfectant, clearly reflects the interaction of culture-dezzasib compared with control-hole microplate. In microplate wells with cell culture that contributed to the preparation at a concentration lower threshold for toxicity monolayer remained intact and visually no different from that in control wells. At the same time, it was visually detected Research holes with signs of cytopathic effects and degenerative changes monolayer; in control - CPS is noted. Cause degenerative changes in the cell culture was disinfectant concentration that proved toxic for this type of cell culture. As a result of investigations to determine the toxic effects of drugs after replanting cell culture under the influence of 0.5% solution «Biyodsan» it was found that the drug in the lower concentrations and not the change in monolayer culture. Subsequent studies found that 0.5% solution «Biyodsan» showed inactivating effect on Aujeszky's disease virus. Therefore, the drug in this concentration can be recommended for disinfection to prevent viral diseases. After 6 days of observation, the study stopped due to degenerative changes in the control of cell culture (aging cell monolayer). The drug «Biyodsan» has a wide range of actions, and prevents toxic effects and environmental pollution, which plays an important role in scientific and practical terms for veterinary medicine.

Keywords: Biyodsan virus, cell culture, disinfectant.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук **І. М. Полупан.**

Рукопис надійшов 19.09.2014 року.