

УДК 619:636.22.28:615.37:614.48

КОВАЛЕНКО В.Л., д-р. вет. наук, ст. наук. сп., kovalenkodoktor@gmail.com*Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ***ГАРКАВЕНКО В. М.**, e-mail: gvm77@i.ua*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно санітарної експертизи, м. Київ.***ПОНОМАРЕНКО Г.В.**, канд. вет. н., доцент, gpkh1966@gmail.com**ІГНАТЬЄВА Т.М.**, старший викладач, itm86@bk.ru*Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків***БАЛАЦЬКИЙ Ю.О.**, канд. вет. наук, balatskiyu@ukr.net*Бідоцерківський національний аграрний університет***ЗОЦЕНКО І. А.**, ст. наук. сп.*Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ*

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИВІРУСНОГО ТА ТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ ДЕЗІНФЕКТАНТУ ОРГАСЕПТ НА КУЛЬТУРАХ КЛІТИН СНЕВ, ПТП

Наведені результати досліджень з визначення оцінки токсичного впливу дезінфектанта оргасепт на культури клітин свинячого походження СНЕВ, ПТП, а також його вплив на титр інфекційної активності вакцинного штаму «Клон-В» вірусу хвороби Ауескі (ВХА). При вивченні антивірусного впливу дезінфектанта оргасепт на ВХА штаму Клон-В, тестованого і адаптованого до перецеплювальних клітинних культур СНЕВ та ПТП встановлено, що 0,1–0,5 % розчини оргасепту не виявляють токсичного впливу на культури клітин, але проявляють інактивуєчу дію по відношенню до вірусу хвороби Ауескі. Тому, можливе його використання для профілактичної дезінфекції об'єктів ветеринарної медицини у присутності тварин в рекомендованих дозах та експозиціях.

Ключові слова: дезінфектант, культури клітин, токсичність, вірус хвороби Ауескі.

Вступ. Використання сучасних дезінфікуючих засобів може призвести до численних небажаних наслідків: вони здатні суттєво змінювати мікробний фон, в тому числі і за рахунок пригнічення корисних для тварин мікроорганізмів; можуть чинити шкідливу дію на життєво важливі фізіологічні системи організму. Деякі дезінфікуючі засоби в високих дозах виявляються токсичними, мутагенними, канцерогенними як для тварин, так і для людей.

Основним завданням токсикологічного дослідження є визначення максимально допустимої (або нешкідливої, порогової) концентрації речовин, при якій не виявляються зміни в організмах. При проведенні дослідів з різними тест-об'єктами (клітинами, безхребетними та ін.) встановлюють нешкідливу концентрацію речовини для найбільш чутливого організму, яка служить відправною крапкою для визначення допустимої концентрації цієї речовини [1, 2].

Важлива умова правильного проведення біотестування – використання генетично однорідних лабораторних культур, оскільки вони проходять перевірку чутливості, утримання в спеціальних, обумовлених стандартами лабораторних умовах, що забезпечують необхідну достовірність і відтворюваність результатів досліджень, а також максимальну чутливість до токсичних речовин.

Методи вивчення токсичного впливу на лабораторних тваринах є не гуманними, високо затратними, які не відповідають світовим нормам з біоетичної оцінки експериментів. Тому, застосування методики визначення токсичного впливу на культурах клітин, як альтернатива дослідів з використанням тварин, є досить актуальним в сьогоденній дослідницькій практиці [2, 3, 4].

Методи вивчення антивірусної дії дезінфектантів на віруси, які можуть спричинити захворювання тварин та людини, необхідні в практиці як ветеринарної медицини, так і в багатьох інших сферах господарювання, де необхідним є визначення дії дезінфектанту проти конкретного збудника хвороби – (вірусу) [5, 6].

Використання альтернативних методів дослідження токсичності бактерицидних засобів на культурах клітин можна рекомендувати для: орієнтовної пришвидшеної оцінки токсичності бактерицидних препаратів; установлення нешкідливості засобів захисту тварин під час вибіркового контролю; з метою отримання орієнтовної оцінки токсичності активно діючої речовини, розчинника, наповнювача, тощо на стадії розробки чи за зміни технології виробництва; у випадках, коли препарату є занадто мало для визначення токсичності на лабораторних тваринах; екологічного тестування бактерицидних препаратів, які можуть представляти загрозу для навколишнього середовища [3, 4].

Мета роботи: вивчення противірусного та токсичного впливу дезінфікуючого засобу оргасепт на ВХА штам «Клон-В», який тестований і адаптований до перещеплювальних культур клітин СНЕВ та ПТП.

Матеріали та методи досліджень. Досліди проводили в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів. В дослідженнях були вивчені методи [1, 5] оцінки токсичного та віруліцидного впливу дезінфектанту на перещеплюваній культурі клітин нирки ембріону свині (СНЕВ), та культурі клітин тестикул поросят (ПТП), а також вплив на зміну титру інфекційної активності вакцинного штаму «Клон-В» вірусу хвороби Ауескі з активністю (10^7 ТЦД₅₀/см³ – доза вірусу, яка за 24 – 28 годин без обробки спричиняла ЦПД в культурах клітин СНЕВ і ПТП).

Об'єктом досліджень був дезінфікуючий засіб оргасепт (діючі речовини: молочна кислота 15,0 %, бензалконіум хлорид 5,0 %; наночастинки аргентум. Роботу та параметри застосування було сплановано і проведено, керуючись настановою щодо застосування препарату в 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 та 1,0 % за експозиції 60 хвилин.

Критеріями токсичного впливу були: показники статистично достовірного зниження індексу проліферації клітинних культур в порівнянні з контролем (слабка токсичність); пригнічення на деякий час або повна втрата здатності клітин розмножуватись (сильна токсичність) і вплив дезінфікуючого засобу на культуру клітин, що супроводжується моментальними видимими деструктивними змінами в клітинах культури (відлущування клітин з поверхні носія), а її сильну фіксацію до поверхні носія, або коагуляцію, можна охарактеризувати як надтоксичність.

У кожному мікропланшеті в якості контролю залишили по 16 лунок з культурою клітин, куди дезінфікуючий засіб не вносили (табл. 1). За культурами клітин в мікропланшетах проводили щоденне дворазове спостереження шляхом мікроскопування.

Результати досліджень та їх обговорення. Візуальне оцінювання стану моношару взятих в експеримент клітинних культур, вступивших у безпосередній контакт з послідовними розведеннями дезінфектанту, чітко відображало результат взаємодії культура клітин - дезінфектант порівняно з контрольними лунками мікропланшета. В лунках мікропланшета з культурою клітин, в які вносили препарат в концентрації меншій за поріг токсичності, моношар залишався неушкодженим і візуально не відрізнявся від контрольних лунок з культурою клітин.

Поряд з тим, при візуальному оцінюванні були також виявлені лунки з культурою клітин з ознаками цитопатичної дії та дегенеративними змінами моношару в порівнянні з контролем. Причиною дегенеративних змін в культурі клітин була концентрація дезінфектанту, яка виявилась токсичною для даного виду культури клітин (табл. 1).

Урахування результатів дослідження проводили до моменту дегенеративних змін в контрольних лунках мікропланшету.

Оргасепт в 1,0 % концентрації в культурах клітин СНЕВ та ПТП чинив цитопатичну дію, тому дану концентрацію не оцінювали відносно впливу дезінфектанту на вірус хвороби Ауескі.

Візуальне оцінювання стану моношару взятих в експеримент клітинних культур, що вступили у безпосередній контакт з послідовними розведеннями дезінфікуючого засобу чітко відображало результат взаємодії культура клітин -деззасіб порівняно з контрольними лунками мікропланшету. В лунках мікропланшету з культурою клітин, в які вносили препарат в концентрації меншій за поріг токсичності моношар залишався неушкодженим і візуально не відрізнявся від контрольних лунок з культурою.

Таблиця 1

Визначення цитопатичної дії вірусу хвороби Ауескі обробленого дезінфікуючими засобами на моношар культур клітин, n=8

Дезінфікуючий засіб	Концентрація дослідних розчинів %	Культура клітин експозиція 20 хв		Прояв ЦПД вірусу хвороби Ауескі обробленого деззасобом, експозиція 60 хв			
		СНЕВ	ПТП	кількість лунок			
Оргасепт	0,025	-	-	+	+	+	+
	0,05	-	-	-	-	+	+
	0,1	-	-	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-	-
	1,0	+	+	0	0	0	0

Примітка: (-) – відсутність цитопатичної дії; (+) – відображена цитопатична дія препарату на клітину.

Поряд з тим, при візуальному оцінюванні були також виявлені лунки з культурою клітин з ознаками цитопатичної дії та дегенеративними змінами моношару в порівнянні з контролем. Причиною дегенеративних змін в культурі клітин була концентрація дезінфектанту, яка виявилась токсичною для даного виду культури клітин.

В результаті проведених досліджень з визначення токсичної дії засобу після пересіву культури клітин за впливу 0,1 % розчину оргасепту було встановлено, що препарат в даній концентрації не впливав на зміну клітинного моношару культури порівняно з контролем (табл. 1)

Наступними дослідженнями встановлено, що 0,1 – 0,5 %-ві розчини оргасепту проявляли інактивуючу дію на вірус хвороби Ауескі. Тому, препарат в даних концентраціях можна рекомендувати для проведення дезінфекції з метою профілактики вірусних захворювань.

Одночасно визначали й ступінь проліферації клітин після дії на них досліджуваного деззасобу. Спостерігали за культурою клітин за допомогою мікроскопування з 1 по 6 добу до завершення експерименту, а підрахунок кількості клітин в лунках мікропланшету проводили з 4 по 6 добу включно. Час формування моношару в дослідних носіях з культурою клітин або відсутність такого факту взагалі в порівнянні з контрольною культурою є визначальним при оцінюванні ступеню токсичного впливу дезінфектанту. 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. Після 6-ї доби спостереження були припиненні в зв'язку з дегенеративними змінами в контролі культури клітин, викликаними старінням клітинного моношару.

Після пересіву (зняття моношару культури клітин для подальшого їх розмноження) були отримані такі результати. Під впливом оргасепту в 0,1 %-вій концентрації на 4 добу кількість клітин СНЕВ складала $14730,0 \pm 21,1$, на 6 добу $15910,0 \pm 34,3$ ($p \leq 0,05$). В досліді з контролем спостерігали $16202,0 \pm 24,3$ клітин СНЕВ.

Такі ж самі результати з культурою клітин ПТП де під впливом оргасепту в 0,1 % концентрації на 4 добу кількість клітин ПТП складала $17520,0 \pm 24,9$ ($p \leq 0,05$), на 6 добу $18350,0 \pm 24,3$. В досліді з контролем спостерігали $19050,0 \pm 34,4$ клітин ПТП. У даних випадках спостерігали нетоксичний вплив дезінфікуючого засобу.

Висновки та перспективи подальших досліджень

1. Дезінфікуючий засіб оргасепт в концентрації 0,1 – 0,5 %, виявляє не токсичний для культури клітин, але має інактивуєчу дію по відношенню до вірусу хвороби Ауескі.

2. Оргасепт можна його застосовувати для профілактичної дезінфекції об'єктів ветеринарної медицини у присутності тварин в рекомендованих дозах та експозиціях.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Методичні рекомендації з визначення та контролю антивірусних властивостей в системі *in vitro*. / Клестова З.С., Зоз О.С.// К.: Біг енд смол, 2009. – 33 с.
2. Методичні рекомендації “Токсикологічний контроль нових засобів захисту тварин”, затв. Головним управлінням ветеринарної медицини Мінсільгоспроду України 16.12.1996. – 34 с.
3. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия) / Под ред. И. В. Саноцкого. – М.: – Медицина. – 1970. – 343 с.
4. Методичні підходи щодо контролю дезінфікуючих засобів для ветеринарної медицини. Монографія / За ред. В.Л. Коваленко, В.В. Недосеков. – К.: 2011. – 224 с.
5. Методи контролю дезінфікуючих засобів./ Довідник / За ред. В.Л. Коваленко. – К.: 2014. – 160 с.
6. Дейнека С.Е. Сравнительная экспрессоценка *in vitro* степени токсичности и опасности ряда солей металлов // Гигиена населенных мест. – К., 1999. – Вып. 35. – С. 549 - 555.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВИРУСНОГО И ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНФЕКТАНТА ОРГАСЕПТ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК СПЭВ, ПТП / Коваленко В.Л., Гаркавенко В. Н., Пономаренко Г. В., Игнатъева Т.М., Балацький Ю.А., Зоценко И. А.

Приведенны результаты исследований по определению оценки токсического воздействия дезинфектанта оргасепт на культуры клеток свиного происхождения СПЭВ, ПТП, а также его влияние на титр инфекционной активности вакцинного штамма «Клон-В» вируса болезни Ауески. При изучении противирусного влияния дезинфектанта оргасепт на ВБА штамма Клон-В, тестируемого и адаптированного к перевиваемым культурам клеток СПЭВ и ПТ., Установлено, что 0,1-0,5 % растворы оргасепт проявляют не токсичное влияние на культуры клеток, но проявляют инактивирующе воздействие по отношению к вирусу болезни Ауески (ВБА). Поэтому возможно их использование для профилактической дезинфекции объектов ветеринарной медицины в присутствии животных в рекомендованных дозах и экспозициях.

Ключевые слова: дезинфектант, культуры клеток СПЭВ, ПТП, токсичность, вирус болезни Ауески.

RESEARCH OF ANTIVIRUS AND TOXIC INFLUENCE DEZINFEKTANT ORGASPET IN CELLS CULTURE PKEV, CTP / Kovalenko V. L., Garkavenko V.M., Ponomarenko G.V., Ihnatieva T.M., Balatskyi Y.O., Zotsenko I.A.

Introduction. Toxicity research methods with the use of laboratory animals are inhumane, cost-intensive and inconsistent with the international standards of biotic evaluation of experiments. Therefore, a cell

culture-based toxicity research method are more efficient in the nowadays research scientific practice than conducting experiments on animals.

The goal of the work. Examine of disinfectant Orgasept toxicity and antiviral actions on virus strain “Klon-B” of Aujeszky disease having been tested and adapted to continuous culture cells of PKEV and CTP.

Materials and methods. A disinfection agent Orgasept (15 % lactic acid, 5,0 % benzylalkonium chloride, argenticum nanoparticles) was the object of the research. The process and framework of the research were laid out and carried out according to recommendations of the usage. Its cache concentrations were action on during 60 min.

In experiments used: continuous versenised culture cells of pig embryo kidney (PKEV) and continuous cell cultures of pig testicles (CTP) grown as monolayer on bottom microplate.

For growing of continuous cell lines used of RPMI-1640, DMEM, GLA medius, blood serum of cattle.

Results of research and discussion. Orgasept in 1,0 % concentration on cell cultures of PKEV and CTP caused of cytotoxic effect that is why this concentration did not evaluate regarding disinfectant influence on virus of Aujeszky disease. In microplate wells with cell cultures in which added the means in less concentrations as toxicity threshold the cell monolayer remained unhurt and visually did not different from control wells with culture.

As a result of our studies to determine the toxic effects of product after cell culture passaging by exposure of 0.1 % solution of Orhasept was found that the drug concentration did not affect the change in culture monolayer compared to control.

Subsequent studies found that 0,1 - 0,5 % - Orhasept solutions showed of inactivating effect on Aujeszky disease virus. Therefore, the drug in these concentrations can be recommended for disinfection to prevent of viral diseases.

For statistical analysis of the research results, in addition to visual evaluation of cell culture monolayer, the method of cells counting on each carrier with cell culture, taken in the experiment separately. Influenced of 0,1 % Orhasept concentration for 4 days on PKEV number of cells was $14730,0 \pm 21,1$, for 6 days $15910,0 \pm 34,3$. In the control experiment observed $16202,0 \pm 24,3$ PKEV cells.

The same results with PTP cell culture where influenced of Orhasept in 0.1% concentration for 4 day PTP number of cells was $17520,0 \pm 24,9$, for 6 days $18350,0 \pm 24,3$. In the control experiment observed $19050,0 \pm 34,4$ cells of PTP. In these cases, the observed unotoxic effect of this disinfectant.

Conclusions. The disinfecting agent Orgasept with 0,1 – 0,5% concentration exposes no toxicity on cell cultures and an inactivating affect on Suid herpesvirus. Therefore, it can be applied for a preventive disinfection on veterinary medicine objects with animals in recommended doses and expositions.

Keywords: *disinfectants, culture cells, toxicity, Aujeszky disease virus (ADV).*

REFERENCES

1. Klestova Z.S., Zoz O.S. (2009). *Metodichni rekomendatsiyi z viznachennya ta kontrolyu antivirusnih vlastivostey v sistemi in vitro [1. Metodichni rekomendatsii s viznachennya that control antivirusnih vlastivostey in sistemi in vitro]*. K. Big end smol, 33. [in Ukrainian]
2. *Toksikologichniy kontrol novih zasobiv zahistu tvarin [Toksikologichny control novih zasobiv tvarin Zahist]*. Metodichni rekomendatsiyi. (1996), 34 [in Ukrainian]
3. Sanotskyi I. V. (1970). *Metody opredeleniya toksichnosti i opasnosti himicheskikh veshchestv (toksikometriya) [Methods for determining the toxicity and hazards of chemicals (Toximeter)]*. M. Meditsina. 343 [in Russian]
4. Kovalenko V.L., Nedosekov V.V. (2011). *Metodichni pidhodi shchodo kontrolyu dezinfikuyuchih zasobiv dlya veterinarnoyi meditsini [Metodichni pidhodi shchodo control dezinfikuyuchih zasobiv for veterinarnoi medicine]*. Monografiya. K. 224. [in Ukrainian]
5. Kovalenko V.L.. (2014). *Metodi kontrolyu dezinfikuyuchix zasobiv [Control methods disinfectants]* Dovidnik – Directory., 160[in Ukrainian]
6. Deyneka S.E. (1999). *Sravnitel'naya ekspressotsenka in vitro stepeni toksichnosti i opasnosti ryada soley metallov [Ekspressotsenka Comparative in vitro toxicity and danger of a number of metal salts]*. *Gigiena naseleennyh mest – Hygiene of inhabited places*. K. 35. 549 – 555. [in Ukrainian]