

**Пошук нових моделей тест-вірусів
для підвищення ефективності експертної оцінки
віруліцидної дії дезінфікуючих засобів**

**С.О. СОЛОВЙОВ, О.П. ТРОХИМЕНКО,
О.О. КОСТЕНКО, І.В. ДЗЮБЛИК**

м. Київ

В роботі висвітлені сучасні вимоги до сертифікації і реєстрації основних груп дезінфікуючих препаратів. Описані основні моделі тест-вірусів і критерії оцінки віруліцидної дії дезінфікуючих засобів в культурі клітин. Як модель для підвищення ефективності експертної оцінки віруліцидної дії дезінфікуючих засобів, запропоновано використовувати ротавірус групи А мавп штаму SA-11. Запропоновано також доповнити стандартні методи реєстрації зменшення інфекційної активності тест-вірусів за ЦПД реєстрацією вірусспецифічних включень з використанням цитофлюориметричного критерію.

Ключові слова: прості віруси, складні віруси, тест-віруси, дезінфектанти, віруліцидна дія, експертна оцінка

Сьогодні, як і десятиріччя тому, залишається надзвичайно актуальним визначення віруліцидної дії дезінфікуючих засобів, що є основною вимогою для їх успішного і коректного практичного застосування у відповідності до призначення. У зв'язку з надходженням в Україну численних дезінфікуючих засобів з різних країн світу, виникає гранична необхідність у стандартизації методичних підходів до їх тестування та дослідження на сучасному рівні їх віруліцидних властивостей, тобто їх впливу на віруси, що знаходяться поза клітинами на об'єктах довкілля. За сучасними критеріями оцінки, дезінфікуючі засоби з віруліцидною дією повинні відповідати деяким вимогам, без виконання яких ні один з них не може бути рекомендовано до застосування [1, 2]. Так, вони повинні мати високу віруліцидну активність, бути безпечними при застосуванні; не пошкоджувати матеріали, які піддають обробці; економічними, стійкими до органічного навантаження, швидко діяти (мати коротку експозицію), не мати різкого запаху, бути вибухо- і пожегобезпечними; простими у приготуванні, використанні, утилізації.

В залежності від основної діючої речовини сучасні дезінфікуючі засоби поділяються на декілька основних груп:

1. Галоїдовмісні, у т.ч. хлоровмісні сполуки.
2. Альдегідовмісні сполуки на основі глутарового альдегіду, формальдегіду, альдегіду янтарної кислоти, гліоксалу.
3. Окисники (кисневмісні, пероксиданти, пероксисполуки).
4. Спирти.

5. Четвертинні амонієві сполуки (ЧАС).
6. Препарати на основі похідних гуанідину.
7. Третинні аміни (амфотензиди).
8. Композиційні препарати на основі різних класів хімічних сполук [1–3].

При експертній оцінці віруліцидної дії дезінфектантів, що пропонуються до застосування, а також при експериментальних дослідженнях віруліцидних властивостей нових речовин-кандидатів у дезінфектанти, необхідно вивчати їх противірусну активність у відповідності до нормативів у спеціалізованих сертифікованих лабораторіях з відповідним Режимом роботи, які мають дозвіл на роботу з вірусами визначеної групи патогенності. Проте створення таких нормативів справа дуже складна і тривала і цьому питанню ВООЗ приділяє велику увагу [4]. Європейський комітет із стандартизації у 2005 р. прийняв та затвердив для обов'язкового використання в країнах Євросоюзу положення про кількісний суспензійний метод тестування на віруліцидну активність хімічних дезінфектантів та антисептиків [5]. Згідно до Європейського законодавства, для характеристики дезінфікуючих засобів рекомендують застосовувати поняття «обмежено віруліцидний» та «віруліцидний», відповідно до їх активності по відношенню до складних і простих вірусів [5]. Це доцільно, оскільки «віруліцидної дії» досягти значно важче, ніж «обмежено віруліцидної», і це потрібно не у всіх випадках. Застосування таких широко вживаних визначень як «інактивууючий віруси», «діючий на» «активний по відношенню до», які зустрічаються при характеристиці дезінфектантів, сьогодні вважаються застарілими і неприйнятними.

В Росії, Білорусі та інших країнах пострадянського простору сьогодні приділяється належна увага розробці відповідних критеріїв оцінки віруліцидної активності дезінфікуючих засобів. В Україні Наказом МОЗ № 231 від 08.04.09. затверджені методичні рекомендації по визначенню віруліцидної дії дезінфікуючих засобів, створені за безпосередньою участю співробітників кафедри вірусології НМАПО ім. П.Л. Шупика [6].

Визначення віруліцидної дії дезінфікуючих засобів здійснюється з обов'язковим використанням моделей простих і складних вірусів. Прості віруси (поліовіруси, віруси Коксаки А, В, ЕСНО, віруси гепатиту А, адено- ротавіруси, та ін.) не мають суперкапсидної оболонки, тому вони надзвичайно стійкі до дії зовнішніх чинників фізичної та хімічної природи, в тому числі і до дії кислот, лугів, більшості детергентів, четвертинних амонієвих солей, дезінфекційних засобів.

Складні віруси (грипу, парагрипу, кору, червоної висипки, гепресу, ВІЛ тощо) мають багату на ліпіди суперкапсидну оболонку, тому вони відносно швидко інактивуються під впливом різноманітних фізико-хімічних факторів, органічних розчинників, альдегідів, спиртів та інших дезінфікуючих засобів.

Модельні віруси або тест-віруси повинні бути адаптованими до культивування в культурі клітин і викликати в них характерну тканинну цитопатичну дію, мати високий вихід при культивуванні в чутливій культурі клітин (інфекційний титр повинен бути не нижчим за 5-8 lgТЦД₅₀/мл); і бути безпечними для персоналу лабораторії. Тому, як тест-віруси при дослідженні віруліцидної дії дезінфікуючих засобів використовують: Вірус грипу, типу А – складний РНК-геномний вірус, представник родини ортоміксовірусів, відносно чутливий до дії зовнішніх чинників; Поліовірус 2 типу, вакцинний штам Себіна (Р712(ch-2ab) – простий РНК-геномний вірус, представник родини пікорнавірусів, стійкий до дії зовнішніх чинників; Аденовірус типу 2 – простий ДНК-геномний вірус, представник родини аденовірусів, стійкий до дії зовнішніх чинників.

Для вивчення віруліцидної дії дезінфікуючих засобів використовують перещеплювальні клітинні лінії: MDCK – культура клітин нирки собаки, чутлива до тест-вірусу грипу типу А; RD – культура клітин рабдоміосаркоми людини, чутлива до тест-вірусу поліомієліту 2 типу; НЕР-2 штам Сінцинати – культура клітин аденокорціноми гортані людини, чутлива до тест-вірусів поліомієліту 2 типу, аденовірусу типу 2; Vero – культура клітин нирки африканської зеленої мавпи, чутлива до тест-вірусів поліомієліту 2 типу штам, аденовірусу типу 2.

Критерієм оцінки ефективності дезінфікуючих засобів у заданих концентраціях і тривалості експозиції при оціночних (сертифікаційних) дослідженнях є повна відсутність ознак репродукції вірусу за умов дотримання необхідного титру (4-5 lg ТЦД₅₀/мл), або зниження інфекційного титру тест-вірусу(ів) не менше ніж на 4 lg ТЦД₅₀/мл в порівнянні з контролем [6]. У скринінгових дослідженнях (пошук нових дезінфектантів) мінімальною величиною зниження інфекційного титру тест-вірусу за час експозиції, яка свідчить про наявність віруліцидної дії, вважають 2 lg ТЦД₅₀/мл.

Загальну віруліцидну ефективність розраховують як різницю між титром вірусу в присутності дезінфектанту і його титром в присутності розчинника:

$$E = T_k - T_d,$$

де E – загальна віруліцидна ефективність; T_к – титр вірусу в контролі; T_д – титр вірусу в суміші вірус/дезінфектант.

Нами були вивчені практичні аспекти застосування ротавірусу мавп штам SA-11 як тест-вірусу для підвищення ефективності експертної оцінки віруліцидної дії дезінфікуючих засобів. Його перевагою є те, що це простий РНК-геномний вірус, представник групи А роду Ротавірусів родини Реовіріде. Морфологічною особливістю ротавірусів є наявність

трьох білкових капсидів, які оточують серцевину вірусу, що містить його геном – двох ланцюгову фрагментовану РНК. Така будова робить ротавірус надзвичайно стійким до фізико-хімічних чинників довкілля (температури, висушування, УФ-опромінювання, дії сильних кислот та лугів, спиртів, миючих засобів а також до дезінфектантів). І хоча Європейський комітет із стандартизації пропонує використовувати для оцінки віруліцидної дії дезінфікуючих засобів вірус діареї телят, що також дуже стійкий у навколишньому середовищі, ми вважаємо, що саме ротавірус групи А мавп штам SA-11 може стати адекватною моделлю патогенного для людини тест-вірусу, що викликає гостру кишкову інфекцію.

Ротавірус SA-11 культивують у присутності трипсину в кінцевій концентрації 5–10 мкг/мл. Його інфекційну активність визначають за цитопатичною дією (ЦПД) в культурі клітин. Використовуючи власний багаторічний досвід та дані методичної літератури, для виявлення і оцінки інфекційного титру ротавірусу SA-11 (а також й інших тест-тест вірусів), ми пропонуємо застосувати більш простий, ефективний та інформативний, в порівнянні з ЦПД, цитофлюориметричний критерій – реєстрацію вірусспецифічних включень в препаратах клітин, забарвлених флюорохромом акрединовим оранжевим (АО) [7]. Особливістю АО є його метахроматичність, тобто здатність одночасно існувати в розчині як у формі мономеру, так і димеру. Метахроматичність виявляється при взаємодії барвника з нуклеїновими кислотами. (НК). При обробці фіксованих клітин АО при рН 4,0–5,0 мономери барвника зв'язуються з дволанцюговими НК (забарвлюючи ДНК або дволанцюгову РНК у зелений колір з максимумом флюоресценції при 530 нм). Димери зв'язуються переважно з одноланцюговими НК, забарвлюючи РНК у жовтий колір з максимумами флюоресценції 640 нм. [8].

При люмінесцентному мікроскопічному дослідженні клітинних моношарів, інфікованих ротавірусом, серед інтактних клітин виявляються інфіковані клітини з вірусспецифічними включеннями. Вони здебільшого трикутної або дуже видовженої форми з розмитими контурами клітинної мембрани, мають яскраво зелене, чітко окреслене ядро з одним або кількома жовтими ядерецями. Цитоплазма інфікованих клітин забарвлена в жовто-коричневі та червонуваті кольори різної інтенсивності з вкрапленням неясних зеленкуватих поліморфних структур (імовірно вірусреплікативних комплексів, з великим вмістом дволанцюгової ротавірусної РНК). Не інфіковані клітини мають округлу або полігональну (в залежності від виду культури клітин) форми з чітко окресленою клітинною мембраною, мають яскраво зелене ядро з одним або декількома жовтими ядерецями та цитоплазму, забарвлену у темно-жовтий або коричнюватий колір.

Використання цитофлюориметричного критерію дозволяє простіше і значно об'єктивніше виявляти поодинокі інфіковані клітини з вірусспецифічними включеннями серед великої кількості неінфікованих клітин. Застосування цього методу надає дослідникові ряд суттєвих переваг, зокрема: робить можливим використання вихідної суспензії вірусу з низьким титром (4,0–5,0 Іг ТЦД₅₀/мл); підвищує чутливість методу, виявляючи інфіковані клітини у розведеннях, де ЦПД вірусу вже не спостерігається; скорочує термін одержання остаточних результатів досліджень до 24–48 годин [9].

Таким чином, сьогодні при розробці методів стандартизації експертних досліджень віруліцидної дії дезінфікуючих засобів та створенні нормативної документації щодо них в Україні ми пропонуємо внести до переліку тест-вірусів ротавірус групи А мавп штам SA-11. Для підвищення ефективності оцінки віруліцидної дії дезінфікуючих засобів ми пропонуємо доповнити стандартні методи реєстрації зниження інфекційної активності тест-вірусів за ЦПД методом реєстрації вірусспецифічних включень з використанням цитофлюориметричного критерію.

Література

1. Носик Н.Н. Современные подходы к изучению и оценке вирулицидной активности дезинфицирующих средств / Н.Н. Носик, Д.И. Носик, П.Г. Дерябин, Е.Б. Иванова // Дезинфекционное дело. – 2004. – № 1. – С. 54–57.
2. Веткина И.Ф. Современный подход к выбору дезинфицирующих средств в системе профилактики внутрибольничных инфекций (вби) / И.Ф. Веткина, Л.В. Комаринская, И.Ю. Ильин, М.В. Соловьева // ФАРМиндекс-Практик. – 2005. – Вып. 7. – С. 13–20.
3. Испытание и определение эффективности действия дезинфицирующих средств на вирусы // Журн. Федеративного здравоохранения. – Исследование. – Защита здоровья. – 2004. – № 47. – С. 62–66.
4. WHO Guidelines on Viral Inactivation and Removal Procedures intended to assure Viral Safety of Human Blood Plasma Products. – Geneva, 2002.
5. NEN-EN 14476 [en]. – Chemical disinfectants and antiseptics. – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine. – Test methods and requirements (phase 2/step1). CEN. 2005.
6. Марієвський В.Ф. Визначення віруліцидної активності дезінфікуючих засобів. [Методичні рекомендації]. / В.Ф. Марієвський, В.І. Задорожна, В.І. Бондаренко [та інші]. – Режим доступу: www.zakon.nau.ua/doc/?uid=1039.9281.
7. Максимович М.Б. Методическое письмо по использованию цитоморфологического критерия для ускорения лабораторной диагностики аденовирусных заболеваний, а также с целью титриции аденовирусов и нейтрализующих антител / М.Б. Максимович, М.С. Парфенова. – Одеса, 1969. – 19 с.
8. Основы гистохимии. [Учебное пособие]. – Режим доступу: www.window.edu.ru/window_catalog/pdf2txt.
9. Трохименко О.П. Нові аспекти використання цитофлюориметричного критерію для лабораторної діагностики ротавірусної інфекції / О.П. Трохименко, С.О. Соловійов, І.В. Дзюблик, О.В. Обертинська // Зб. праць НМАПО. – К., 2010. – № 19. – Кн.1.

Поиск новых моделей тест-вирусов для повышения эффективности экспертной оценки вирулицидного действия дезинфицирующих средств

**С.А. СОЛОВЬЕВ, Е.П. ТРОХИМЕНКО,
О.О. КОСТЕНКО, И.В. ДЗЮБЛИК**

В работе освещены современные требования к сертификации и регистрации основных групп дезинфицирующих препаратов. Описаны основные модели тест-вирусов и критерии оценки вирулицидного действия дезинфицирующих средств в культуре клеток. В качестве модели тест-вируса для повышения эффективности экспертной оценки вирулицидного действия дезинфицирующих средств, предложено использовать ротавирус группы А обезьян штамм SA-11. Предложено также дополнить стандартные методы оценки снижения инфекционной активности тест-вирусов по ЦПД регистрацией вирусспецифических включений с использованием цитофлюориметрического критерия.

Ключевые слова: *простые вирусы, сложные вирусы, тест-вирусы, дезинфектанты, вирулицидное действие, экспертная оценка*

Research of new test-virus model to improve efficiency expert evaluation of virucidal effect of disinfectants

**S. SOLOVYOV, E. TROKHIMENKO,
O. KOSTENKO, I. DZYUBLIK**

The paper highlights the modern requirements for certification and registration of key groups of disinfectants. The basic model of the test-viruses and criteria for evaluating virucidal effect of disinfectants in cell culture were described. As a model for improving the effectiveness of expert evaluation of virucidal effect of disinfectants, it was proposed to use simian rotavirus group A strain SA-11. It was also proposed to complete the standard methods of registration to reduce the infectivity of the test-viruses for CPE detection of virus-specific inclusions using cytofluorimetric criterion.

Key words: *simple viruses, complex viruses, test-virus, disinfectants, virucidal effect, expert evaluation*

УДК 616.988.73-39-07

Варианты клинических проявлений и диагностика орнитоза

Ю.А. СОТНИК, И.Л. БОНДАРЕВА, Е.А. СЛЮСАРЬ

г. Донецк

В работе приведены данные обследования 93 пациентов с диагнозом орнитоз. Рассмотрены варианты клинических проявлений орнитоза, трудности клинической диагностики и важность эпидемиологического анамнеза в постановке диагноза.

Ключевые слова: *орнитоз, варианты проявлений орнитоза*

Опубликованные данные и собственные наблюдения свидетельствуют о том, что истинная заболеваемость орнитозом существенно выше