

## ПРОУЧВАНЕ ДЕЙСТВИЕТО НА ЕЛЕКТРОХИМИЧНО АКТИВИРАН ВОДЕН РАЗТВОР НА НАТРИЕВ ХЛОРИД (АНОЛИТ) ВЪРХУ ВИРУСА НА КЛАСИЧЕСКАТА ЧУМА ПО СВИНЕТЕ

ЕМИЛИЯ ИВАНОВА, СТОИЛ КАРАДЖОВ\*, ГЕОРГИ АТАНАСОВ\*

Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт-София

\*Дружество „Активирани води“ - София

Актуална тенденция в развитието на съвременната дезинфекционна наука и практика не е създаването на нови дезинфекционни средства, а търсене на методи за повишаване на антимикробната активност, за понижаване или пълно премахване на нежеланите ефекти върху хората, животните, околната среда и за разширяване на спектъра на действие на вече съществуващите ( Прилуцкий, В. И., В. М. Бахир, 1995; Hanaoka, K., 2001; Wolf, D., 2009). В пълно съответствие с тази тенденция е електрохимичното активизиране на нискоминерализирани водни разтвори и особено на водни разтвори от натриев хлорид с концентрация до 0.5%. Чрез прилагането на съвременни нанотехнологии при електрохимичното им активизиране се получават дезинфектанти (анолити) с изключителна антимикробна активност. Тя се основава на съдържащите се в тях насцентен (атомен) кислород, хлорен диоксид, водороден пероксид, озон и др. (фиг. 1). Заедно с това електрохимично получените дезинфектанти се отличават и с пълна безвредност за хората, животните и околната среда, тъй като бързо се разпадат до вода и незначителни количества натриев хлорид ( Прилуцкий, В. И., В. М. Бахир, 1995; Bremer, P., 2003; Fenner, D., 2005).

За изучаване на антимикробното действие на анолита са провеждани редица експерименти, като основната им част е насочена към определяне на неговото действие по отношение на различни видове бактерии (Прилуцкий, В. И., В. М. Бахир, 1995; Anonymous, 2007; Fenner, D., 2005; Hanaoka, K., 2001; Wolf, D., 2009). Малко на брой и с недостатъчна задълбоченост са проучванията по отношение на вирусцидното му действие, което прави изключително актуални научните разработки върху възможностите за прилагане на анолита при осъществяването на ефикасен контрол върху вирусни заболявания по хората и животните и главно при особено опасните вирусни инфекции. Една от тях е класическата чума по свинете, която е широко разпространена в различни региони на света, нанасяйки значителни икономически загуби. Причинява се от вирус с обвивка, който принадлежи към род *Pestivirus* на сем. *Flaviviridae*.

Устойчивостта и инактивирането на вируса на КЧС са предмет на обстойни проучвания (Anonymous, 2007; Bremer, P., 2003; Depner, K., Bauer, T. and Liess, B., 1992; Edwards, S., 2000; Haas, B., Ahl, R., Bohm, R. and Strauch, D., 1995; Moening, V., 2000). Въпреки че е по-слабо устойчив на различни външни въздействия от вирусите без обвивка, той запазва за продължителен период от време своята вирулентност: в замразено месо и органен материал – от няколко месеца до една година; в осолено месо – до три години; в изсушени телесни течности и екскрети - от 7 до 20 дни. В гниещи органи умира за няколко дни, а в урина и фекална маса – за 1 – 2 дни. В течна тор той може да издържи 2 седмици при 20 °C и над 6 седмици - при 4 °C (Haas, B., Ahl, R., Bohm, R. and Strauch, D., 1995.). Термичната му устойчивост може да варира в зависимост от щама, но инактивирането зависи най-вече от средата, съдържаща вируса. Въпреки че вирусът на КЧС губи инфективността си в клетъчни култури при 60 °C за 10 min, той може да издържи най-малко 30 min при 68 °C в дефибринирана кръв. Той е относително стабилен при рН 5-10, като динамиката на инактивиращия процес под рН<sub>5</sub> зависи от температурата (Depner, K., Bauer, T. and Liess, B., 1992.).

Според Linton et al. (1987), Sands et al. (1979) и Springthorpe et al. (1990) ефикасна дезинфекция при вирусите, чиято инфекциозност се свързва с елементи от обвивката, се постига чрез разтварящите мазнини дезинфекционни средства, повърхностно активни дезинфектанти или мастни киселини, органични разтворители (етер или хлороформ), детергенти, протеази и общи дезинфектанти. Все още се смята, че 2%-ов разтвор на натриев хидроксид е най-подходящ при дезинфекциране на контаминирани с тях помещения. Според Wittmann (1967) за постигане на ефикасна дезинфекция е необходимо необратимо да се увреди нуклеиновата им киселина.

Целта на настоящото проучване бе да се установи вирусцидното действие на анолит в различни разреждания върху вируса на класическата чума по свинете в клетъчнокултурална и органна суспензии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Лабораторните изпитвания извършихме в Националната референтна лаборатория „Класическа и африканска чума по свинете”, секция „Екзотични и особено опасни инфекции” на НДНИВМИ – София.

Експериментите проведохме с анолит, получен чрез електролизния апарат “Wasserionisierer Hybrid PWI 2100”, оборудван с 4 покрити с платина титаниеви електроди. Дезинфектантът беше с pH 3,2 и ОВП 1070 mV. За неговото получаване използвахме 0.3% разтвор на химически чист натриев хлорид в дестилирана вода. Взаимодействието на анолита с вирусната суспензия осъществихме при температура на разтвора от 22 °C.

Използвахме чувствителна към вируса на КЧС клетъчна култура от свински произход: постоянна клетъчна линия РК-15.

За заразяване на клетъчните култури използвахме клетъчнокултурален тест вирус 2.3 Bulgaria с титър  $10^{7.25}$  TCID<sub>50</sub>/ml и органна суспензия от вътрешни органи (далак, бъбрек, лимфен възел) на диво прасе, произхождащо от последното регистрирано огнище на КЧС в Р. България през 2009 г. Титърът на установения вирус в суспензията беше  $10^{4.75}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

За установяване на вирусоцидно действие приготвените за заразяване на клетъчните култури инокулуми (клетъчнокултурален вирус) обработихме със следните разреждания на анолит в стерилна дестилирана вода: 1:1 (50%), 1:2 (33.33%), 1:3 (25%), 1:4 (20%). С тези разреж-

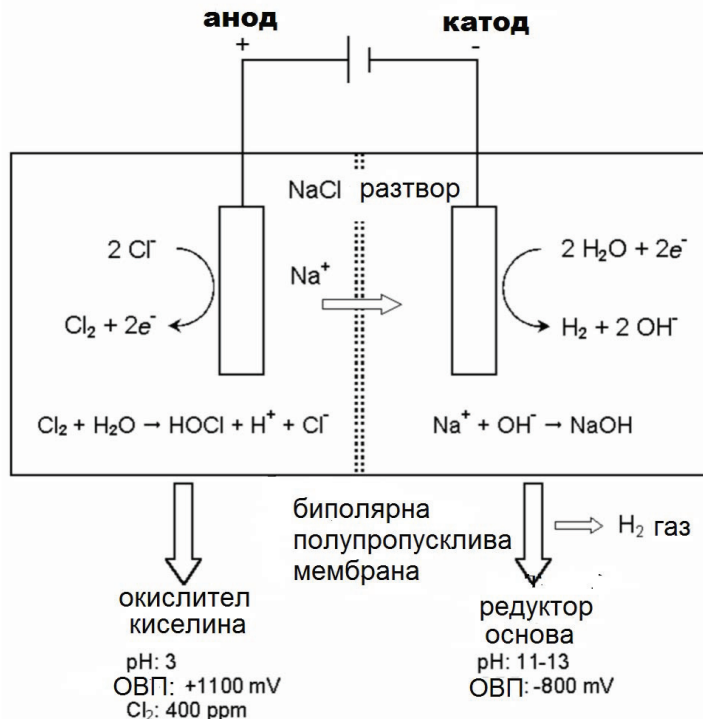
дания смесвахме инокулумите в съотношение 1:1 /100 µl вирусна суспензия и 100 µl от съответната концентрация на анолит. Времето на действие съобразихме с периода, методологично необходим за „захващане” на евентуално присъстващ вирус върху клетъчната култура. При заразяване на клетъчен монослой сместа отстранявахме след изтичане на експозиционния срок от 1 h. При заразяване на клетъчна суспензия не отстранявахме сместа.

За установяване на вирусоцидно действие на анолита върху вирус КЧС в органна суспензия използвахме различна постановка: инокулумът смесвахме директно с концентриран анолит в съотношения анолит към инокулум съответно: 1:1; 3:1; 7:1 и 15:1.

Известно е, че растежът на вируса не предизвиква цитопатичен ефект, затова за демонстрация на присъствието му използвахме имунопероксидазно боядисване на плаките (Anonymous, 2008; Anonymous, 2007; Bremer, P., 2003; European Commission, 2002; European Commission, 2003; Paton, D. J., I. Greiser-Wilke, 2003)

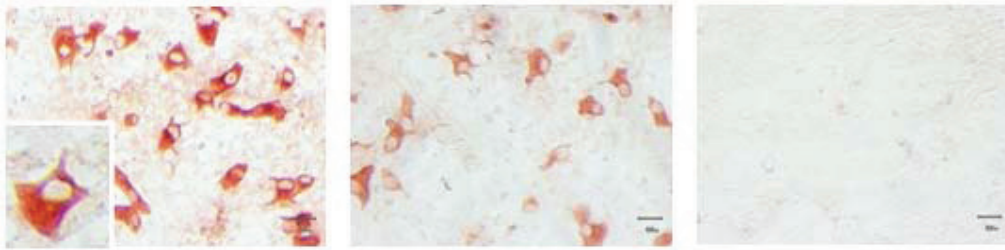
Клетките фиксирахме и вирусния антиген откривахме след свързване със специфично антитяло, маркирано с пероксидаза.

От органите отделяхме 1 cm<sup>3</sup> тъкан, която хомогенизирахме в хаванче с 9 ml съдържаща антибиотик среда за клетъчни култури, за да се получи 10% органна суспензия. Добавяхме стерилен пясък за подобряване на хомогенизацията. Препаратите оставяхме на стайна температура за 1 h. Центрофугирахме за 15 min при 2500 g. Супернатантата използвахме за заразяване на клетките.



Фиг. 1. Схема на електролизния мембранен метод за получаване на кисел и алкален разтвор при електрохимичното активиране на натриев хлорид

Fig. 1. Schematic diagram of a membrane electrolysis process for the preparation of an acid and an alkali solution in the electrochemical activation of sodium chloride



Фиг. 2. Установено присъствие на вирусен антиген (вляво) и отрицателна контрола (вдясно).

Fig. 2. Established presence of viral antigen (left) and negative control (right).

Таблица 1. Вирусцидно действие на анолит върху клетъчнокултурална суспензия на вируса на КЧС при заразяване на клетъчен монослой РК-15.

Table 1. Virucidal action of anolyte on CSFV cell culture suspension in inoculation to the cell monolayer PK-15.

Заразяване на КК с: infection suspension cell culture:	Разреждания на анолит: dilutions anolyte	Общ обем на инокулума: total volume of inoculum	Концентрация на анолита в %: concentration of the anolyte in%	Брой ямки: number of wells	Резултат: положителен/отрицателен: result: positive / negative:
Вирус 200 $\mu$ l virus	-	200 $\mu$ l		4	4/0
Вирус 100 $\mu$ l virus	1:1 100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	25	4	0/4
Вирус 100 $\mu$ l virus	1:2 100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	16,51	4	2/2
Вирус 100 $\mu$ l virus	1:3 100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	12,5	4	3/1
Вирус 100 $\mu$ l virus	1:4 100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	10	4	3/1

Таблица 2. Вирусцидно действие на анолит върху клетъчнокултурална суспензия на вируса на КЧС при заразяване на клетъчна суспензия РК-15.

Table 2. Virucidal action of anolyte on CSFV cell culture suspension in inoculation to the cell suspension PK-15.

Заразяване на КК с: infection suspension cell culture:	Разреждания на анолит: dilutions anolyte	Общ обем на инокулума: total volume of inoculum	Концентрация на анолита в %: concentration of the anolyte in%	Брой ямки: number of wells	Резултат: положителен/отрицателен: result: positive / negative:
Вирус 200 $\mu$ l virus	-	200 $\mu$ l		4	4/0
Вирус 100 $\mu$ l virus	1:1 100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	25	4	0/4
Вирус 100 $\mu$ l virus	1:2 100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	16,51	4	2/2
Вирус 100 $\mu$ l virus	1:3 100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	12,5	4	3/1
Вирус 100 $\mu$ l virus	1:4 100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	10	4	3/1

Таблица 3. Вирусцидно действие на анолит върху органна суспензия, съдържаща вирус на КЧС при заразяване на клетъчен монослой РК-15.

Table 3. Virucidal action of anolyte on CSFV organ suspension in inoculation to the cell monolayer PK-15.

Заразяване на КК с: infection suspension cell culture:	Разреждания на инокулума с анолит: dilutions of inoculum with anolyte:	Общ обем на инокулума: total volume of inoculum	Концентрация на анолита в % concentration of the anolyte in%	Брой ямки: number of wells	Резултат: положителен/отрицателен: result: positive / negative:
Вирус 200 µl virus	-	200 µl		4	4/0
Вирус 100 µl virus	1:1 100 µl	200 µl	50	4	0/4
Вирус 50 µl virus	3:1 100 µl	200 µl	75	4	0/4
Вирус 25 µl virus	7:1 100 µl	200 µl	87	4	0/4
Вирус 12,5 µl virus	15:1 100 µl	200 µl	94	4	0/4

В случай на цитотоксичен ефект успоредно приготвихме 1:10 и 1:100 разреждания на хомогенатите.

От суспензиите в многоямкови (24-ямкови) плаки прибавяхме по 200 µl инокулум към клетки с покритие 50-80 %.

Клетъчните култури инкубирахме при 37 °C за 1 h с цел «захващане» на евентуално присъстващ вирус, изплаквахме се еднократно с PBS и добавяхме прясна среда.

Алтернативно плаката напълвахме директно (в клетъчна суспензия), тъй като при предварителните изследвания се установи, че анолитът не предизвиква цитотоксичен ефект.

Клетъчните култури инкубирахме за 72 – 96 h при 37 °C в CO<sub>2</sub> инкубатор.

По същия начин процедирахме с положителните и отрицателните контроли. Като положителна контрола залагахме референтен щам на вируса на КЧС.

Фиксацията на плаките извършвахме термично за 3 h при 80 °C в сушилен шкаф. При обработката използвахме първично моноклонално анти тяло С 16, разрежено 1:50 и вторично анти тяло РАМПО, разрежено 1:50. За имунопероксидазно оцветяване използвахме 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и АЕС (диметилформамид и 3 – аминок – 9 – етилкарбазол) в ацетатен буфер.

Комплексът анти тяло-антиген визуализирахме чрез реакцията на пероксидазата със субстрата. В инфектираните клетки (положителна реакция) цитоплазмата на клетките се оцветяваха в тъмно червено-кафеникав цвят. Неинфектираните клетки бяха безцветни. (фиг. 2).

### Полимеразно-верижна реакция в реално време

Клетъчнокултуралните и органната суспензия изследвахме за наличие на геном на вируса на КЧС чрез полимеразно-верижна реакция в реално време (real-time RT-PCR, one step, TagMan), едностъпков по Протокол на

Референтната лаборатория за КЧС на ЕС. За екстракция на РНК използвахме теста QIAamp Vital RNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany. Първоначалният обем на материала беше 140 µl, а обеът за елюция - 60 µl. За амплификация използвахме тест Qiagen OneStep RT-PCR Kit в общ обем 25 µl и темплейт обем 5 µl. В реакцията включихме праймери А 11 и А14, и сонда TaqMan Probe – FAM – Tamra. Изследванията проведохме с термоциклираща машина Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System с температурен режим за обратна транскрипция 50 °C - 30:00 min, инактивация на обратната транскриптаза и активация на Taq 95 °C - 15:00 min, денатурация 95 °C - 00:10 min, удължаване 60 °C - 00:30 min при 40 цикъла (Anonymous, 2008)

### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В табл. 1 са отразени резултатите от изследванията, проведени в НРЛ за установяване вирусцидното действие на анолит върху клетъчнокултурална (КК) суспензия на вируса на КЧС при заразяване на клетъчен монослой РК-15.

При обработка на вирусния инокулум с анолит в разреждане 1:1 вирусен растеж липсва и в 4-те заразени ямки на плаката, при разреждане 1:2 растеж липсва в 2 от ямките, другите 2 ямки отчетохме като положителни. При обработка с анолит в разреждания 1:3 и 1:4 резултатът е идентичен: липса на растеж в една от заразните ямки на плаката и слаб растеж – в останалите три.

В табл. 2 са отразени резултатите от изследванията, проведени в НРЛ за установяване вирусцидното действие на анолит върху клетъчнокултурална суспензия на вируса на КЧС при заразяване на клетъчна суспензия РК-15.

При обработка на вирусния инокулум с анолит в разреждане 1:1 вирусен растеж липсва и в 4-те заразени

ямки на плаката, при разреждане 1:2 растеж липсва в 2 от ямките, другите 2 ямки отчетохме като положителни. При обработка с анолит в разреждания 1:3 и 1:4 резултатът е идентичен: липса на растеж в една от заразените ямки на плаката и слаб растеж – в останалите три.

Резултатите, получени при заразяване на клетъчен монослой и на клетъчна суспензия, са идентични.

В табл. 3 са отразени резултатите от изследванията, проведени в НРЛ за установяване вирусоцидното действие на анолит върху органна суспензия, съдържаща вирус на КЧС при заразяване на клетъчен монослой РК-15.

При обработка на вирусния инокулум (органна суспензия) с анолит във всички разреждания липсва вирусен растеж и в 4-те заразени ямки на плаката.

По всяка вероятност анолитът влияе разрушително върху обвивката на вируса на КЧС, където са разположени основните му антигени (протеини). Изследванията на вирусните инокулуми, използвани в изпитванията, чрез полимеразно-верижна реакция в реално време, доказват наличие на геном (нуклеинова киселина) в тях и след обработката с анолит.

Доказва се и известно скъсяване на времето (намален брой амплификационни цикли), необходимо за образуването на флуоресцентен сигнал, респективно положителна реакция за геном, тясно корелиращо с експозицията при обработката на вирусните инокулуми. Колкото по-продължителна е експозицията на обработка с анолит, толкова по-рано в реакцията се отчита наличие на РНК на вируса. Според нас това е косвено доказателство, че анолитът разрушава обвивката на вируса, което от своя страна улеснява екстракцията на нуклеиновата киселина и по-бързото ѝ отчитане чрез флуоресцентния сигнал.

Все още липсват достатъчно убедителни данни относно влиянието на различни концентрации от анолит върху вирусните частици. Проведените от руски и немски изследователи експерименти са главно с концентриран анолит (**Прилуцкий, В. И., В. М. Бахир**, 1995; **Fenner, D.**, 2005; **Wolf, D.**, 2009) Полученият от тях пълен вирусциден ефект потвърждава нашето становище за силно изразено вирусоцидно действие на електрохимично активиран воден разтвор на натриев хлорид. Различията в получените от нас резултати се дължат на използваните при нашите експерименти по-ниски концентрации на активно действащо вещество. Съществено значение отдаваме на факта, че на нас ни се отдаде да определим граничната концентрация (25%) на добре проявено вирусоцидно действие. Интерес представляват по-нататъшни проучвания с цел намаляване на времето на действие, както и провеждане на експерименти при наличие на защитаваш вирусите биофилм.

#### ИЗВОДИ

Анолитът не влияе върху растежа на клетъчна култура РК-15.

Анолитът, приложен в концентрация от 25%, проявява силно вирусоцидно действие върху клетъчнокултурален вирус и по-слаба противовирусна активност в концентрации от 16.51%, 12.5% и 10%.

Анолитът упражнява силно вирусоцидно действие,

приложен в концентрации от 50%, 75%, 87% и 94%, върху намиращите се в органна суспензия вируси на КЧС.

В концентрации над 50% анолитът успешно може да се използва за постигане на ефикасна дезинфекция при повърхности във вирусологични лаборатории.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1. Прилуцкий, В. И., В. М. Бахир**, 1995. „Электрохимически активированная вода: Аномальные свойства, механизм биологического действия“ Москва
- 2. Anonymous**, 2008. „OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for Terrestrial Animals“, 6<sup>th</sup> ed.
- 3. Anonymous**, 2007. „EU Diagnostic Manual for Classical Swine Fever (CSF) Diagnosis: Technical part“, (Third draft June).
- 4. Bremer, P.**, 2003. „Untersuchungen zur viruziden Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln bei verschiedenen Temperaturen“ Inaugural-Dissertation.
- 5. Depner, K., Bauer, T. and Liess, B.**, 1992. „Thermal and pH stability of pestiviruses“. Rev. Sci. Tech. 11, 885-893.
- 6. Edwards**, 2000. „Survival and inactivation of classical swine fever virus“. Veterinary Microbiology 73, 175-181.
- 7. European Commission**, 2002. „Commission Decision of February 2002 approving a diagnostic manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of CSF“, (2002/106/EC), Chapter VII. Off.J.Eur.Union, L39, 71-88.
- 8. European Commission**, 2003. „Diagnostic techniques and vaccines for FMD, CSF, AI and some other important OIE List A diseases. In Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare“, Brussels, 1-150.
- 9. Fenner, D.**, 2005. „Antimicrobial activity of electrolyzed oxidizing water using standard in-vitro test procedures for the evaluation of chemical disinfectants“ Inaugural-Dissertation.
- 10. Haas, B., Ahl, R., Bohm, R. and Strauch, D.**, 1995. „Inactivation of viruses in liquid manure“. Rev. Sci. Tech. 14, 435-445.
- 11. Hanaoka, K.**, 2001. „Antioxidant effects of reduced water produced by electrolysis of sodium chloride solutions“ Journal of Applied Electrochemistry 31: 1307-1313
- 12. Linton, A. H., Hugo, W. B., Russel, A. D.**, 1987. „Disinfection in veterinary and farm animal practice“. Blackwell Scientific Publications; Oxford.
- 13. Moenning, V.**, 2000. „Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy“, Vet. Microbiology, 73, 93-102.
- 14. Paton, D. J., I. Greiser-Wilke**, 2003. „Classical swine fever – an update“, Res.inVet.Sci., 75, 169-178.
- 15. Sands, J. A., Landin, P., Auperin, D.**, 1979. „Enveloped virus inactivation by fatty acid derivatives“, Antimicrob. Agents Chemother., 15; 134-136.
- 16. Springthorpe, U. S., Sattar, S. A.**, 1990. „Chemical disinfection of virus-contaminated surfaces“. Crit.Rev. Environ.Control; 20; 169-229
- 17. Van Den Bossche, G., Strauch, D.**, 1991. „Zur Wirksamkeit von Flächendesinfektionsmitteln und ihrem Einsatz in der Tierhaltung“. BL- Journal, 1; 110-126.
- 18. Wittmann, G.**, 1967. „Die Inaktivierung des MKS-

Virus unter besonderer Berücksichtigung der Tenazität“  
Sonderabdruck der ”Schweizer Archiv für Tierheilkunde”.  
Bd.109, 6, 313-323.

19. Wolf, D., 2009. „Probleme und Perspektiven der  
Nutzung elektrodiaphragmatisch hergestellter Desinfekti-  
onsmittel“ . Dr.-Ing. genehmigte Dissertation.

STUDY ON INFLUENCE OF ELECTROCHEMICALLY ACTIVATED  
AQUEOUS SODIUM CHLORIDE SOLUTION (ANOLYTE) OVER  
THE CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS

*E. Ivanova , S. Karadzhov\*, G. Atanasov\**

*National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute “Prof. Dr. Georgi Pavlov“, Sofia*

*\*Company “Activated Water”, Sofia*

SUMMARY

Under laboratory conditions cell culture and organ suspensions of Classical swine fever virus were treated with anolyte. By inoculating them with to cell cultures quality was reported (displayed) viral presence (presence of viral antigen) using the immunoperoxidase technique.

It was found that: anolyte did not affect the growth of the cell culture PK-15; viral growth in cell culture virus infection to a cell monolayer was affected in the greatest degree by the anolyte in 1:1 dilution and less by the other dilutions; viral growth in cell culture virus infection to a cell suspension was affected by the anolyte in dilution 1:1 in the greatest degree and less by the other dilutions; virus growth in organ suspension virus infection to a cell monolayer was affected by the anolyte in all dilutions applied.

**Key words:** *anolyte, cell culture, CSF virus, disinfection.*