Федеральное бюджетное учреждение науки

«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

УДК: 615
Инв. №

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
_____ А.А. Тотолян
«___»_____ 2019 г.
М.П.

Изучение противовирусной активности средства дезодорирующего «Блокатор» (детский)

Руководитель работ
канд. биол. наук _____ В.В. Зарубаев
подпись, дата 24.09.2019г.

Санкт-Петербург
2019

1. Введение.

С целью оценки протективных свойств дезодорирующего средства «Блокатор» (детский) как способа инактивации возбудителей воздушно- капельных вирусных инфекций было проведено исследование его вирулицидного действия в отношении респираторных вирусов человека, нанесённых на поверхность стекла.

2. Материалы и методы.

2.1. Реактивы и приборы

- Культура клеток MDCK, нормальный эпителий почки собаки; женская особь, кокер-спаниель (ATCC; Кат. № CCL-34);
- Культура клеток Vero, почечный эпителий зеленой мартышки (ATCC; Кат. № CCL-81)
- Вирус гриппа: штамм A/Puerto Rico/8/34 (H1N1
- - Аденовирус человека 5 типа
- Полная среда MEM, содержащая 2 mM L-глутамина, 250 мг/л гентамицина, 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (PAA, Австрия Кат. №E15-825);
- Физиологический раствор (0.9% раствор NaCl в дистиллированной воде, стерильный, Биолот, Санкт-Петебург, Кат. № 1.2.1.3);
- Раствор трипсина 0,1 мг/мл (Sigma. США, T1426);
- 96-луночные планшеты (Corning, США, Кат. № 3585);
- 24- луночные планшеты (Orange Scientific, Китай, Кат. № 5530300)
- Наконечники для автоматических пипеток 20-200 мкл;
- Ламинарный бокс, второго класса защиты (БОВ-001-АМС, Миасс, Россия);
- CO_2- инкубатор MCO-175 (Sanyo, Япония);

2.2. Дизайн исследования

Подготовка инфекционного материала.

Для культивирования вируса гриппа использовали культуру клеток MDCK, для культивирования аденовируса – линию Vero. Вирусы культивировали в клетках соответствующих линий в течение 72 часов и использовали в качестве исходного

инфекционного материала.

Вируссодержащий материал наносили в объёме 0,1 мл на поверхность стеклянной чашки Петри в двух параллельных образцах и высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 10 минут. Чашки Петри с нанесёнными пробами помещали в стеклянный эксикатор с притёртой крышкой. Упаковку дезодорирующего средства «Блокатор» (детский) помещали в эксикатор с пробами вирусов. Крышку закрывали и выдерживали экспериментальные образцы в течение 5 или 30 минут при комнатной температуре. Контрольные пробы вирусов обрабатывали таким же образом в отсутствии средства «Блокатор» (детский).

По истечении указанного срока крышку открывали, извлекали чашки Петри с нанесёнными пробами и смывали отдельно каждую из проб 4 раза по 250 мкл среды для культур клеток. В полученных пробах определяли инфекционный титр вирусов, как описано ниже.

Титрование вируса и оценка противовирусного действия образцов

Клетки соответствующих линий рассевали в 96-луночный планшет в количестве 10^4 кл./лунку и объеме 100 мкл/лунку полной среды МЕМ. Инкубацию проводили в течение суток в CO_2-инкубаторе при 37°С в 5% атмосфере CO_2 до формирования монослоя. Непосредственно перед экспериментом клетки промывали средой МЕМ, дальнейшие манипуляции проводили в бессывороточной среде.

Для определения инфекционной активности вируса в культуре клеток из культуральной жидкости готовили серию десятикратных разведений от 10^{-1} до 10^{-7}, вносили в лунки с монослоем клеток соответствующей линии и инкубировали в течение 72 часов в атмосфере 5% CO_2 при 37°С. Титр вируса гриппа определяли по результатам реакции гемагглютинации (РГА, см. далее), титр аденовируса – по наличию вирусспецифического ЦПД. Каждую из концентраций исследуемого препарата и препаратов сравнения испытывали в двух параллельных лунках. Противовирусную активность образцов оценивали по снижению титра вируса в опытных лунках планшетов по сравнению с контрольными (группа контроля вируса).

Реакция гемагглютинации (РГА)

Для определения наличия вируса гриппа в культуральной жидкости проводили реакцию гемагглютинации. Для этого культуральную жидкость переносили в лунки

планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Планшеты инкубировали при 20°С в течение 1 ч, после чего визуально проводили учет результатов. За титр вируса принимали наибольше разведение вируссодержащего материала, при котором наблюдалась положительная реакция гемагглютинации. Положительным считают результат реакции, при котором эритроциты равномерно покрывали всё дно лунки. При отрицательной реакции эритроциты в виде маленького диска или «пуговки» располагаются в центре дна анализируемой лунки планшета. Титр вируса в каждом из экспериментальных образцов определяли по методу Рида и Менча.

Статистическая обработка результатов. Результаты измерения инфекционного титра вирусов представляли в виде M±SE, где M – среднее значение, SE – ошибка эксперимента. Полученные данные сравнивали между собой с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p<0,05$.

3. Результаты исследования и обсуждение

Данные по изучению влияния дезодорирующего средства «Блокатор» (детский) на инфекционную активность респираторных вирусов человека суммированы в табл. 1 и на для наглядности представлены на рис.1.

Таблица 1. Инактивирующая активность дезодорирующего средства «Блокатор» (детский) в отношении респираторных вирусов человека.

Вирус	Титр вируса в пробах, lg ID_{50}/0.2 мл				
	Исходный титр	Титр после инкубации, мин			Эффективность, % (5 мин/30 мин)
		0	5	30	
Грипп	6,5±0,0	6,0±0,5	5,5±0,0	4,5±0,5*	68/97
AdV5	5,5±0,0	4,5±0,0	3,5±0,0*	3,5±0,0*	90/90
Примечание: * различия с группой контроля значимы при $p<0,05$					

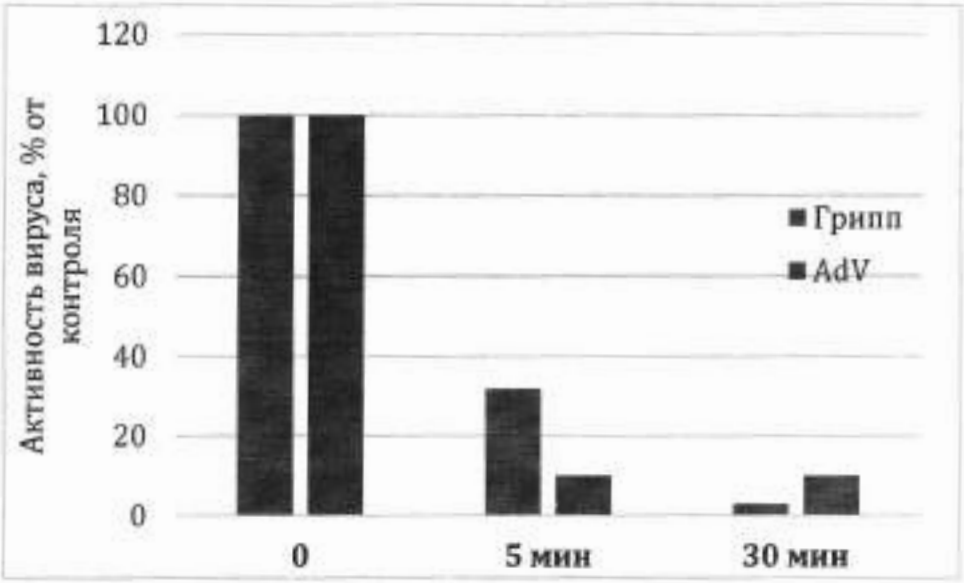

Рис.1. Влияние дезодорирующего средства «Блокатор» (детский) на инфекционную активность респираторных вирусов человека.

Как следует из представленных данных, исходный титр вирусов в инфекционном материале составлял 5,5 – 6,5 lg ID_{50}/0.2 мл в зависимости от вируса. Высушивание на воздухе (столбец «0» в табл.1) приводило к потере

инфекционности, что следует объяснять его инактивацией при высыхании частиц материала, негативно влияющем на биологические свойства вирионов.

Инкубация с дезодорирующим средством «Блокатор» (детский) также приводила к подавлению вирусной репродукции. Через 30 мин инкубации снижение инфекционной активности вируса гриппа составило 97%, аденовируса - 90%.

4. Заключение.

Проведено испытание дезодорирующего средства «Блокатор» (детский) как средства инактивации респираторных вирусов человека на поверхности стекла.

Изученные вирусы (грипп и аденовирус человека) оказались примерно в равной степени чувствительными к инкубации. Активность аденовируса после 30 минут обработки упала на 90%, вируса гриппа – на 97%. Таким образом, дезодорирующее средство «Блокатор» (детский) является эффективным способом инактивации респираторных вирусов человека.