

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: 61.615.035.1-001.891.57

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН НИИ эпидемиологии и
микробиологии имени Пастера




А.А. Тотолян

2020 г.

*Изучение противовирусной активности препарата «ТефлексА»
в отношении коронавируса человека*

Отчет о НИР

Руководитель
исследований, д.б.н.

 В.В. Зарубаев
подпись, дата 28.10.2020

Санкт-Петербург
2020

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель исследования,
д.б.н.


подпись, дата
28.12.2020

В.В. Зарубаев
(введение, заключение,
материалы и методы,
результаты)

Младший научный
сотрудник


подпись, дата
28.12.20

А.А. Мурылева
(проведение
экспериментальной части
работ)

Младший научный
сотрудник


подпись, дата
28.12.2020

Я.Л. Есаулкова
(проведение
экспериментальной части
работ)

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЦПД – цитопатогенное действие

MEM – minimal essential medium

TCID₅₀ – 50% tissue culture infecting dose

РЕФЕРАТ

Отчет 11 с., 1 табл.

Ключевые слова: Тефлекс А, МультиДез для воздуха, МультиДез для поверхностей, коронавирус ОС43, оболочечные вирусы, опыты *in vitro*, вирулицидное действие

Цель исследования: оценка вирулицидной активности дезинфицирующих средств «ТефлексА», МультиДез для воздуха и МультиДез для поверхностей в отношении оболочечных респираторных вирусов человека на примере коронавируса ОС43.

Объекты исследования: образцы дезинфицирующего средства (кожного антисептика) «ТефлексА», дезинфицирующего средства «МультиДез –Тефлекс для поверхностей» и дезинфицирующего средства «МультиДез –Тефлекс для воздуха» производства ООО Софт Протектор.

Методология. Инфекционная активность коронавируса ОС43 была оценена после 5-, 15- и 30-минутной инкубации с исследуемыми образцами при помощи титрования на культуре клеток H23.

Результаты. Инкубация вируса в течение 5 минут с любым из использованных антисептиков приводила к потере инфекционной активности вируса. Для каждого из антисептиков с течением времени отмечалась дальнейшая инактивация вируса вплоть до полной его инактивации.

Заключение. Полученные данные позволяют говорить об эффективности дезинфицирующего средства (кожного антисептика) «ТефлексА» и дезинфицирующих средств «МультиДез –Тефлекс для воздуха» и «МультиДез –Тефлекс для поверхностей» против коронавируса человека и с большой вероятностью – против других оболочечных вирусов человека, включая высокопатогенный коронавирус SARS-CoV-2.

Оглавление

1.	Введение	6
2.	Материалы и методы.....	6
	2.1.Реактивы и приборы.....	6
	2.2.Дизайн исследования.....	7
3.	Результаты исследования.	9
4.	Заключение.....	12

1. Введение

Вирусы представляют собой серьёзную угрозу здоровью, а в тяжёлых случаях и жизни человека. Достаточно упомянуть опасные такие патогены, как ВИЧ, грипп, корь, ряд геморрагических лихорадок и др. Для предотвращения борьбы с таких инфекций применяются вакцины, а для лечения заболеваний – противовирусные препараты. Однако как вакцины, так и средства терапии разработаны далеко не для всех вирусных патогенов человека. В качестве примера можно привести коронавирус COVID-19, вызвавший пандемию в 2019 – 2020 гг. В этих случаях единственной эффективной мерой борьбы с распространением вирусной инфекции является соблюдение карантинных и санитарных мер. В структуре таких мероприятий важную роль играет правильный выбор и применение эффективных и доступных антисептиков и дезинфектантов. Целью настоящего исследования была оценка вирулицидной активности дезинфицирующих средств «ТефлексА», «МультиДез для воздуха» и «МультиДез для поверхностей» в отношении оболочечных респираторных вирусов человека на примере коронавируса OC43.

2. Материалы и методы.

2.1. Реактивы и приборы

Культура клеток H23, аденокарцинома легкого человека (ATCC® CRL-5800);

Коронавирус человека, штамм OC43,

Полная среда RPMI-1640, содержащая 2 mM L-глутамина, 250 мг/л гентамицина, 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота;

Физиологический раствор (0.9% раствор NaCl в дистиллированной воде, стерильный, Биолот, Санкт-Петербург, Кат. № 1.2.1.3);

Флаконы для клеточных культур 25 мл (Corning, США)

96-луночные планшеты (Corning, США, Кат. № 3585);

Наконечники для автоматических пипеток 20-200 мкл;

Ламинарный бокс, второго класса защиты (БОВ-001-АМС, Миасс, Россия);

CO₂- инкубатор MCO-175 (Panasonic, Япония);

2.2. Дизайн исследования.

Клетки H23 сеяли во флаконы для клеточных культур или в 96-луночные планшеты и инкубировали 24 часа в атмосфере 5% CO₂ при 36°C до формирования монослоя. Вирус наращивали в монослое клеток во флаконах для клеточных культур в течение 72 ч при 36°C в атмосфере 5% CO₂.

В работе использовали следующие образцы антисептических средств, предоставленные Заказчиком:

Тефлекс А (антисептик), концентрация действующего вещества 0,8%

МультиДез Тефлекс для воздуха, дата изготовления 14 декабря 2020 г.;

МультиДез Тефлекс для поверхностей, дата изготовления 14 декабря 2020 г.

Для анализа противовирусной активности 1 мл каждого из образцов смешивали в 1,5 мл пробирке с 0,1 мл вирусосодержащей жидкости (исходный титр вируса 5×10⁶ TCID₅₀/мл). В контрольную пробирку вместо антисептика вносили 0,1 мл физиологического раствора. Пробирки инкубировали при комнатной температуре в течение 5, 15 или 30 минут, после чего в вирусосодержащей жидкости определяли инфекционную активность вируса как описано ниже. В каждой группе образцов использовали по три аналитические параллели.

Титрование вируса. Из исследуемой вирусосодержащей жидкости готовили серию 10 кратных разведений (10⁻¹ – 10⁻⁷) на среде MEM. Этими разведениями заражали клетки и инкубировали в термостате в течение 72 часов. Титр вируса определяли по результатам реакции гемагглютинации (РГА, см. далее). 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 коронавируса OC43 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°C в течение 1 ч, после чего визуально проводили учет результатов. За титр вируса принимали наибольшее разведение вирусосодержащего материала, при котором наблюдалась положительная

реакция гемагглютинации. Положительным считали 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 $M \pm SE$, где M – среднее значение, SE – ошибка эксперимента. Полученные данные сравнивали между собой в парах «вирус с антисептиком – контроль вируса» с помощью критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

3. Результаты исследования.

Результаты определения инфекционного титра вируса гриппа до и после инкубации с образцами антисептиков суммированы в табл.1.

Таблица 1. Влияние инкубации с образцами антисептиков в течение 5 минут на инфекционную активность коронавируса ОС43.

Образец	Срок инкубации, мин	Максимальное разведение с положительной гемагглютинацией			Инфекционный титр вируса (lg TCID ₅₀ /0.2 мл) после инкубации с образцами антисептиков	p
КВ	0	6	6	5	5.5±0,7	---
	5	6	5	6	5.5±0,7	---
	15	5	6	6	6,0±0,0	---
	30	5	5	5	5.0±0,0	---
Тефлекс А 0,8%	5	2	2	2	2.0±0.0	0,0082
	15	1	1	1	1.0±0.0	0,0051
	30	0	0	0	0.0±0.0	<0,0001
МультиДез Тефлекс для воздуха	5	1	1	2	1.3±0.6	0,0008
	15	1	1	0	0.7±0.6	0,0004
	30	0	0	0	0.0±0.0	<0,0001
МультиДез Тефлекс для поверхностей	5	0	0	1	0.3±0.6	0.0003
	15	0	0	0	0.0±0.0	0.0034
	30	0	0	0	0.0±0.0	<0.0001

Как видно из представленных результатов, инкубация вируса в течение 5 минут с любым из использованных антисептиков приводила к потере инфекционной активности вируса. Для каждого из образцов с течением времени отмечалась дальнейшая инактивация вируса вплоть до полной его инактивации (титр вируса ниже предела порога детекции).

Для наглядности морфология клеточного монослоя после культивирования контрольного вируса и вируса, инкубированного с антисептиком, представлена на рис.1.

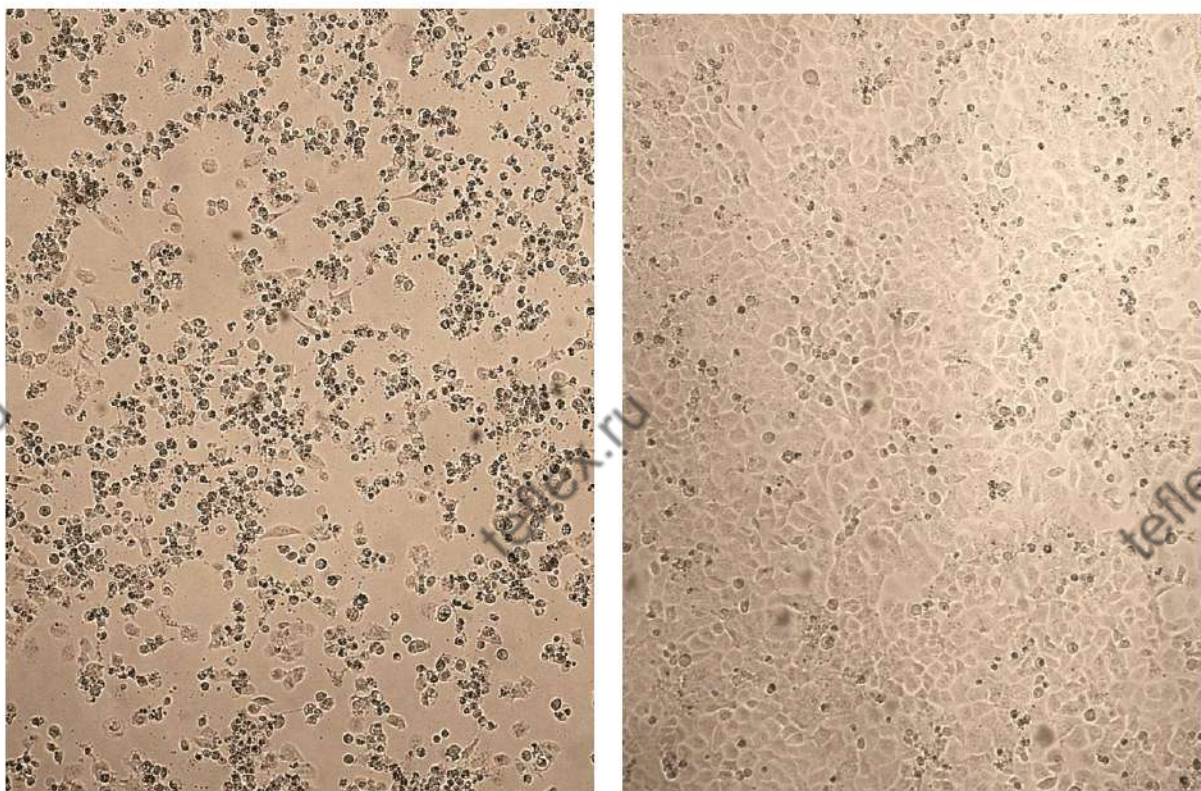


Рис.1. Морфология клеток H23 после 72 часов культивирования в них коронавируса человека OC43, предварительно инкубированного в течение 15 минут с культуральной средой (контроль, а) и с 0,8% раствором тefлекса А (б). Ув. 40×. (а) - полная цитодеструкция, свидетельствующая о наличии жизнеспособного инфекционного вируса. (б) – интактный монослой клеток, свидетельствующий об отсутствии инфекционной активности в вирусном материале, обработанном Тefлексом А.

В качестве модельного вируса в настоящем исследовании был использован коронавирус OC43, филогенетически и структурно родственный новому высокопатогенному коронавирусу SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19 2019-2020 гг. Основываясь на полученных данных, можно с высокой вероятностью предполагать эффективность изученных образцов растворов Теффлекса в отношении всех перечисленных вирусных патогенов.

4. Заключение.

Полученные данные позволяют говорить об эффективности дезинфицирующего средства (кожного антисептика) «ТефлексА» и дезинфицирующих средств «МультиДез – Тефлекс для поверхностей» и «МультиДез – Тефлекс для воздуха» против коронавируса человека и с большой вероятностью – против других оболочечных вирусов человека, включая высокопатогенный коронавирус SARS-CoV-2.