

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

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера

А.А. Тотолян

2020 г.

М.П.



**Исследование вируцидных свойств масок САЙВЕР, произведенных ООО
«Второе Дыхание ТМ» и их зависимость от сроков эксплуатации**

Руководитель
исследований, д.б.н.


В.В. Зарубаев
подпись, дата
10.12.2020

Санкт-Петербург

2020

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель
исследования,
д.б.н.


подпись, дата

В.В. Зарубаев

(введение, заключение,
материалы и методы,
результаты)

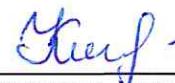
Лаборант-исследователь


подпись, дата

М.А. Мисюрина

(проведение
экспериментальной
части работ)

Научный сотрудник


подпись, дата

Р.А. Кадырова

(проведение
экспериментальной
части работ)

Оглавление

1. Введение.....	4
2. Материалы и методы.....	4
2.1. Реактивы и приборы	4
2.2. Дизайн исследования.	4
2.3. Титрование вируса.....	5
2.4. Реакция гемагглютинации (РГА).....	5
2.5. Статистическая обработка результатов.....	5
3. Результаты исследования.....	6
4. Заключение.	7
Приложение 1. Расшифровка образцов для тестирования	8

1. Введение.

Целью настоящего исследования было изучение противовирусных свойств образцов материалов масок «САЙВЕР», с вирулицидным компонентом в отношении вируса гриппа. Производитель: ООО «Второе дыхание ТМ», г. Челябинск. Назначение: защита от воздушно-капельных инфекций".

2. Материалы и методы.

2.1. Реактивы и приборы

Культура клеток MDCK, почка собаки (ATCC; Кат. № CCL-34);

Вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)

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-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 MDCK 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 48 ч при 36°C.

В работе использовали образцы материалов масок, предоставленные Заказчиком:

Образцы ткани: 2.1; 2.2; 2.3

4.1; 4.2; 4.3

5.1; 5.2; 5.3

6.1; 6.2; 6.3

7.1; 7.2; 7.3

Образцы пластика: 3.1; 3.2; 3.3

8.1; 8.2; 8.3

На образцы тканевого материала масок размером 2×2 см наносили 0,5 мл вируссодержащей жидкости и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. По истечении этого срока образцы ткани вымачивали три раза в 0,5 мл в среде для клеток, после чего в вируссодержащей жидкости определяли инфекционную активность вируса как описано ниже. На пластиковые поверхности твердых образцов материалов наносили по 0,5 мл вируссодержащей жидкости, выдерживали при комнатной температуре 10 мин, после чего с поверхности делали смывы тремя порциями по 0,5 мл среды для клеток. Инфекционную активность вируса определяли в смывах, как описано ниже. В качестве материалов негативного контроля использовали марлю и стекло. В каждой группе образцов использовали три параллели.

2.3. Титрование вируса.

Из исследуемой вируссодержащей жидкости готовили серию 10 кратных разведений ($10^{-1} - 10^{-7}$) на среде МЕМ. Этими разведениями заражали клетки и инкубировали в термостате в течение 72 часов. По окончании срока инкубации наличие вируса в лунках определяли при помощи реакции гемагглютинации (РГА, см. ниже).

2.4. 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°C в течение 1 ч, после чего визуально проводили учет результатов. За титр вируса принимали наибольшее 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. За титр вируса принимали величину наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную РГА. Титр выражали в логарифмах 50% инфекционной дозы вируса ($\lg \text{TCID}_{50}$).

2.5. 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 материалом – вирус с материалом отрицательного контроля» 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 материалов масок суммированы в табл.1-2.

Таблица 1. Влияние инкубации с образцами тканевых материалов масок на инфекционную активность вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).

Образец	Инфекционный титр вируса (\lg TCID ₅₀ /0.2 мл) после инкубации с материалом масок	P*
Контроль вируса	7,0±0,0	----
Марля	6.8±0,4	1.0000
2.1 – 2.3	0.2±0,4	<0.0001
4.1 – 4.3	1.5±0,5	<0.0001
5.1 – 5.3	6.5±0,5	0.2618
6.1 – 6.3	5.7±0,5	0.0017
7.1 – 7.3	5.7±0,5	0.0017

* Значение p при сравнении по критерию Стьюдента с группой негативного контроля

Как видно из представленных результатов, инкубация вируса с контрольным образцом марли не приводила к снижению инфекционной активности патогена. Экспозиция вируса с образцами материала масок в течение 10 минут влияла на инфекционную активность вируса в разной степени. Так, инкубация с образцами 2 и 4 приводила к резкой потере инфекционной активности вируса. Степень ее снижения составила 5,5 – 6,8 порядка, что является показателем высокой эффективности материала. В то же время инкубация с материалами 5 не влияла достоверно на активность вируса, с образцами 6 и 7 достоверно снижала его титр на 1,3 \lg TCID₅₀/0.2 мл ($p=0.0017$).

Таблица 2. Влияние инкубации с образцами пластиковых материалов масок на инфекционную активность вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).

Образец	Инфекционный титр вируса (lg TCID ₅₀ /0.2 мл) после инкубации с материалом масок	P*
Контроль вируса	5.7±0.5	----
Стекло	5.3±0.5	1.0000
3.1 – 3.3	5.3±0.5	1.0000
8.1 – 8.3	5.2±0.4	0.5497

* Значение *p* при сравнении по критерию Стьюдента с группой негативного контроля

4. Заключение.

В экспериментах *in vitro* проведено тестирование вирулицидной активности образцов материалов масок, предоставленных Заказчиком. Показано, что предоставленные материалы масок 2 и 4 в модельных условиях продемонстрировали высокую вирулицидную активность в отношении вируса гриппа, снижая его инфекционную активность за 10 минут на 5,5 – 6,8 порядка. Образцы 6 и 7 снижали вирусную активность в меньшей степени (1,3 порядка), контакт с образцами 5, 5 и 8 не приводил к достоверным изменениям в активности вируса по сравнению с контрольными материалами.

Основываясь на полученных данных и учитывая неспецифический характер противовирусного действия представленных образцов, можно с высокой вероятностью предполагать их эффективность также и в отношении других вирусных патогенов.

Приложение 1. Расшифровка образцов для тестирования

Дыхательные блоки:

2 месяца использования – 2.1,2.2,2.3

4 месяца использования – 4.1,4.2,4.3

6 месяцев использования – 6.1,6.2,6.3

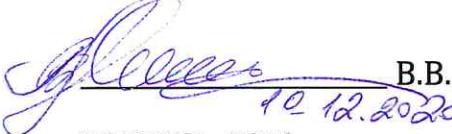
П-пропиленовые адаптеры новые – 3.1,3.2, 3.3

П-пропиленовые адаптеры б/у – 8.1,8.2,8.3

Ткань airmesh новая – 5.1,5.2

Ткань airmesh б/у – 7.1,7.2, 7.3

Руководитель
исследований, д.б.н.



10.12.2020

В.В. Зарубаев

подпись, дата