

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
НАУЧНО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВИРУСОЛОГИИ

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИ Вирусологии МЗ РУз

д.м.н. профессор Э.И.Мусабаев

«05»

2009 г.



Отчет по оценке противовирусной эффективности «Установки для
инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии»
разработанный в ООО «New Medical Technologies» к вирусу гриппа А/Н3N2
на культуре клеток MDCK
(заключительный)

Ташкент - 2009

Реферат

Отчет состоит из 13 с., 3 табл.

Ключевые слова: перевиваемые клетки MDCK, противовирусная активность, вирус гриппа, цитопатическое действие, инаktivация вируса.

Объект исследования – Установка для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии

Цель работы – Оценить противовирусную эффективность «Установки для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» к вирусу гриппа А/Н3N2 на культуре клеток MDCK.

Задачи исследования - Оценить влияния «Установки для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на жизнеспособность и цитопатогенные свойства вируса гриппа А/Н3N2.

Результаты работы - выявлена противовирусная эффективность «Установки для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» к вирусу гриппа А/Н3N2 на культуре клеток MDCK.

Сокращения:

MDCK – Madine Darby Canine Kidney

ЦПД – цитопатическое действие

ЦПД₅₀ – цитопатогенная доза вируса, вызывающая поражение 50% монослоя клеток

DMEM – Дульбеко модифицированная среда Игла

НА – гемагглютинин

НА – нейраминидаза

Испытание противовирусной эффективности «Установки для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» разработанный в ООО «New Medical Technologies» к вирусу гриппа А/Н3N2 на культуре клеток MDCK

НИИ Вирусологии МЗ РУз

Цель исследования

Оценить противовирусную эффективность «Установки для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» к вирусу гриппа А/Н3N2 на культуре клеток MDCK.

Материалы и методы

Культуры клеток. Для определения противовирусной эффективности «Установки для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» к вирусу гриппа А/Н3N2 использовали перевиваемые клетки почек собак – Madine Darby Canine Kidney (MDCK). Клетки были получены из коллекции клеточных культур НИИ Вирусологии.

Вирус

Использовали вирус гриппа А/Н3N2 в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку.

Установка

«Установка для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» предоставлен ООО «New Medical Technologies»

Оборудование и расходные материалы

1. Установка для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии
2. Ламинарный бокс
3. Термостат
4. Микроскоп
5. Механические дозаторы переменного объема (200 мкл и 1000 мкл)
6. Одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером (100 мкл и 1000 мкл)

7. Стерильные 96-луночные планшеты
8. Краситель метиленовый синий сухой
9. Питательные среды
10. Вирус гриппа А/Н3N2
11. Клетки почек собак - MDCK (Madine Darby Canine Kidney)

Введение

Вирусы гриппа относятся к семейству Orthomyxoviridae, роду Influenza virus. На основании различий специфических антигенов - нуклеопротеида (NP) и матриксного белка (М) вирусы гриппа разделены на три типа: А, В и С. Вирус гриппа имеет сферическую структуру и размер 80-120 нанометров. Снаружи вирус покрыт липидной оболочкой. На поверхности вируса находятся выступы гликопротеины – гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (NA). В настоящее время известно 15 подтипов НА и 9 подтипов NA вирусов гриппа типа А. Гемагглютинин обеспечивает способность вируса присоединяться к клетке. Нейраминидаза отвечает, во-первых, за способность вирусной частицы проникать в клетку-хозяина, и, во-вторых, за способность вирусных частиц выходить из клетки после размножения. Сердцевина вируса содержит одноцепочечную отрицательную цепь РНК, состоящую из 8 фрагментов, которые кодируют 10 вирусных белков. Фрагменты РНК имеют общую белковую оболочку, которая объединяет их, образуя нуклеопротеид. В лабораторных условиях вирус гриппа культивируют в перевиваемых культурах клеток почек собак (Madine Darby Canine Kidney - MDCK).

Принцип оценки влияния «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на вирус гриппа А/Н3N2 заключался в следующем:

Опыт первый

В лунки 1-2 чистого 96-луночного планшета заливали 50 мкл раствора 0,01% метиленового синего разведенный в питательной среде. Далее в лунки с метиленовым синим заливали 50 мкл вируса гриппа А/Н3N2 в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку. Планшет вносили в «Установку для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» - время экспозиции 45 мин. После экспозиции планшет вынимали.

Культуры клеток выращивали в 96-луночном планшете на питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, глутамина и антибиотиков. Для размножения клеток планшет инкубировали в термостате при температуре 37°C. Для исследований использовали односуточные культуры клеток. После сформирование 90% конфлюэнтности монослоя культуры клеток питательную среду удаляли из планшеты. После экспозиции планшета в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» соблюдая точность в нумерации содержимое лунки переносили в лунки планшета с засеянными культурами клеток MDCK. В лунки 1-2 (*опытная*) вносили инактивированный вирус гриппа А/Н3N2 в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку с 0,01% метиленовым синим. В лунки 4-6 (*контроль вируса*) вносили не инактивированный вирус гриппа А/Н3N2 в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку, а в лунки 7-8 (*контроль клеток*) вносили поддерживающую среду. Планшет инкубировали в термостате при 37⁰С в течении 1 часа, для взаимодействия и адсорбции вируса с клетками. Если вирус жизнеспособен он должен поражать клетки, что проявится ЦПД. После 1 час инкуба содержимое всех лунок удаляли и отмывали раствором Хенкса и вносили поддерживающую среду и инкубировали в термостате при температуре 37 °С. Цитопатическое действие наблюдали в течение 6 дней.

Учёт результатов проводился по наличию ЦПД на растущие клетки при просмотре в инвертированном микроскопе. Степень ЦПД определяли по изменению морфологии клеток (замедление роста, округление и сморщивание клеток, нарушению целостности монослоя и появлению очагов дегенерированных клеток) по 4-х плюсовой системе. По наличию ЦПД в культуре клеток определялось эффективность инактивации вируса.

а) 0 – отсутствие лизиса, сохранение целостности и жизнеспособности всех клеток на дне лунки. Данный результат является свидетельством отсутствия или полной инактивации вирусов;

б) 1+ - лизис и разрушение до 25% клеток, сохранение слабой степени цитопатогенной активности вирусов;

в) 2+ - лизис и разрушение до 50% клеток, сохранение умеренной степени цитопатогенной активности вирусов;

г) 3+ - лизис и разрушение до 75% клеток, сохранение значимой степени цитопатогенной активности вирусов;

д) 4+ - лизис и разрушение до 100% клеток, полное сохранение цитопатогенной активности вирусов.

		Концентрация раствора метиленового синего 0,01%			Контроль вируса гриппа А/Н3N2		Контроль клеток						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Вирус гриппа А/Н3N2	А												
	В												
	С	0	0		4+	4+		0	0				
	Д	0	0		4+	4+		0	0				
	Е	0	0		4+	4+		0	0				
	Ф	0	0		4+	4+		0	0				
	Г												
	Н												

Условные обозначения:

0 – отсутствие ЦПД вирусов;

4+ - лизис и разрушение до 100% клеток, полное сохранение ЦПД вирусов;
Контроль вируса гриппа А/Н3N2 – интактный вирус без воздействия на установке;
Контроль клеток - клетки MDCK без воздействия вирусов.

Результаты первого опыта

ЦПД наблюдали в течении 6 дней.

Лунки 1 и 2 (*опытная*) - после инкубации с инактивированным вирусом гриппа А/Н3N2 с 0,01% раствором метиленового синего в течении 45 минут. Лизис и разрушение клеток не был отмечен (0),

Лунки 4 и 5 (*контроль вируса*) - после инкубации с интактным вирусом гриппа А/Н3N2. Клетки подверглись лизису 100% (4+).

Лунки 7 и 8 (*контроль клеток*) - после инкубации с интактной культурой клеток MDCK без воздействия вирусов. Клетки сохранили свою нормальную структуру и жизнеспособность (0).

***Вывод 1:** Экспозиция вируса гриппа А/Н3N2 в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» с 0,01% раствором метиленового синего в течение 45 минут способствовало полной инактивации вируса.*

Опыт второй. Второй опыт проведен с целью подтверждения результатов первого опыта.

В лунки 1-2 чистого 96-луночного планшета заливали 50 мкл раствора 0,01% метиленового синего разведенный в питательной среде. Далее в лунки с метиленовым синим заливали 50 мкл вируса гриппа А/Н3N2 в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку. Планшет вносили в «Установку для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» - время экспозиции 45 мин. После экспозиции планшет вынимали.

Культуры клеток выращивали в 96-луночном планшете на питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, глутамина и антибиотиков. Для размножения клеток планшет инкубировали в термостате при температуре 37°C. Для

исследований использовали односуточные культуры клеток. После сформирование 90% конfluence монослоя культуры клеток питательную среду удаляли из планшета. После экспозиции планшета в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» соблюдая точность в номерации содержимое лунки переносили в лунки планшета с засеянными культурами клеток MDCK. В лунки 1-2 (*опытная*) вносили инактивированный вирус гриппа А/Н3N2 в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку с 0,01% метиленовым синим. В лунки 4-6 (*контроль вируса*) вносили не инактивированный вирус гриппа А/Н3N2 в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку, а в лунки 7-8 (*контроль клеток*) вносили поддерживающую среду. Планшет инкубировали в термостате при 37⁰С в течении 1 часа, для взаимодействия и адсорбции вируса с клетками. Если вирус жизнеспособен он должен поражать клетки, что проявится ЦПД. После 1 час инкуба содержимое всех лунок удаляли и отмывали раствором Хенкса и вносили поддерживающую среду и инкубировали в термостате при температуре 37 °С. Цитопатическое действие наблюдали в течение 5 дней.

Учёт результатов проводился по наличию ЦПД на растущие клетки при просмотре в инвертированном микроскопе. Степень ЦПД определяли по изменению морфологии клеток (замедление роста, округление и сморщивание клеток, нарушению целостности монослоя и появлению очагов дегенерированных клеток) по 4-х плюсовой системе. По наличию ЦПД в культуре клеток определялось эффективность инактивации вируса.

а) 0 – отсутствие лизиса, сохранение целостности и жизнеспособности всех клеток на дне лунки. Данный результат является свидетельством отсутствия или полной инактивации вирусов;

б) 1+ - лизис и разрушение до 25% клеток, сохранение слабой степени цитопатогенной активности вирусов;

в) 2+ - лизис и разрушение до 50% клеток, сохранение умеренной степени цитопатогенной активности вирусов;

г) 3+ - лизис и разрушение до 75% клеток, сохранение значимой степени цитопатогенной активности вирусов;

д) 4+ - лизис и разрушение до 100% клеток, полное сохранение цитопатогенной активности вирусов.

	Концентрация раствора метиленового синего 0,01%			Контроль вируса гриппа А/Н3N2		Контроль клеток							
	А	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	В												
Вирус гриппа А/Н3N2	С	0	0		4+	4+		0	0				
	Д	0	0		4+	4+		0	0				
	Е	0	0		4+	4+		0	0				
	Ф	0	0		4+	4+		0	0				
	Г												
	Н												

Условные обозначения:

0 – отсутствие ЦПД вирусов;

4+ - лизис и разрушение до 100% клеток, полное сохранение ЦПД вирусов;

Контроль вируса гриппа А/Н3N2 – интактный вирус без воздействия на установку;

Контроль клеток - клетки MDCK без воздействия вирусов.

Результаты второго опыта

ЦПД наблюдали в течении 5 дней.

Лунки 1 и 2 (*опытная*) - после инкубации с инактивированным вирусом гриппа А/Н3N2 с 0,01% раствором метиленового синего в течении 45 минут. Лизис и разрушение клеток не был отмечен (0),

Лунки 4 и 5 (*контроль вируса*) - после инкубации с интактным вирусом гриппа А/Н3N2. Клетки подверглись лизису 100% (4+).

Лунки 7 и 8 (*контроль клеток*) - после инкубации с интактной культурой клеток MDCK без воздействия вирусов. Клетки сохранили свою нормальную структуру и жизнеспособность (0).

Вывод 2: Экспозиция вируса гриппа А/Н3N2 в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» с 0,01% раствором метиленового синего в течение 45 минут способствовало полной инактивации вируса.

Опыт третий. Третий опыт проведен с целью подтверждения результатов второго опыта.

В лунки 1-2 чистого 96-луночного планшета заливали 50 мкл раствора 0,01% метиленового синего разведенный в питательной среде. Далее в лунки с метиленовым синим заливали 50 мкл вируса гриппа А/Н3N2 в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку. Планшет вносили в «Установку для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» - время экспозиции 45 мин. После экспозиции вируса планшет вынимали. Для подтверждения инактивации вируса был проведен ПЦР анализ в режиме реального времени. Выявлена РНК вируса гриппа типа А. Это связано с тем, что при инактивации вируса в исследуемой жидкости может оставаться остаточные неинфекционные вирусные частицы, которые могут обнаруживаться с помощью ПЦР.

Культуры клеток выращивали в 96-луночном планшете на питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, глутамина и антибиотиков. Для размножения клеток планшет инкубировали в термостате при температуре 37°C. Для исследований использовали односуточные культуры клеток. После сформирование 90% конфлюэнтности монослоя культуры клеток питательную среду удаляли из планшета. После экспозиции планшета в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» соблюдая точность в номерации содержимое лунки переносили в лунки планшета с засеянными культурами клеток MDCK. В лунки 1-2 (*опытная*) вносили инактивированный вирус гриппа А/Н3N2 в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку с 0,01% метиленовым синим. В лунки 4-6

(контроль вируса) вносили не инактивированный вирус гриппа А/Н3N2 в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку, а в лунки 7-8 (контроль клеток) вносили поддерживающую среду. Планшет инкубировали в термостате при 37⁰С в течении 1 часа, для взаимодействия и адсорбции вируса с клетками. Если вирус жизнеспособен он должен поражать клетки, что проявится ЦПД. После 1 час инкуба содержимое всех лунок удаляли и отмывали раствором Хенкса и вносили поддерживающую среду и инкубировали в термостате при температуре 37 °С. Цитопатическое действие наблюдали в течение 6 дней.

Учёт результатов проводился по наличию ЦПД на растущие клетки при просмотре в инвертированном микроскопе. Степень ЦПД определяли по изменению морфологии клеток (замедление роста, округление и сморщивание клеток, нарушению целостности монослоя и появлению очагов дегенерированных клеток) по 4-х плюсовой системе. По наличию ЦПД в культуре клеток определялась эффективность инактивации вируса.

- а) 0 – отсутствие лизиса, сохранение целостности и жизнеспособности всех клеток на дне лунки. Данный результат является свидетельством отсутствия или полной инактивации вирусов;
- б) 1+ - лизис и разрушение до 25% клеток, сохранение слабой степени цитопатогенной активности вирусов;
- в) 2+ - лизис и разрушение до 50% клеток, сохранение умеренной степени цитопатогенной активности вирусов;
- г) 3+ - лизис и разрушение до 75% клеток, сохранение значимой степени цитопатогенной активности вирусов;
- д) 4+ - лизис и разрушение до 100% клеток, полное сохранение цитопатогенной активности вирусов.

Также учет результатов проводили по выявлению РНК вируса методом ПЦР в режиме реального времени.

		Концентрация раствора метиленового синего 0,01%			Контроль вируса гриппа А/Н3N2		Контроль клеток						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Вирус гриппа А/Н3N2	A												
	B												
	C	0	0		4+	4+		0	0				
	D	0	0		4+	4+		0	0				
	E	0	0		4+	4+		0	0				
	F	0	0		4+	4+		0	0				
	G												
	H												

Условные обозначения:

0 – отсутствие ЦПД вирусов;

4+ - лизис и разрушение до 100% клеток, полное сохранение ЦПД вирусов;

Контроль вируса гриппа А/Н3N2 – интактный вирус без воздействия на установку;

Контроль клеток - клетки MDCK без воздействия вирусов.

Результаты третьего опыта

ЦПД наблюдали в течении 6 дней.

Лунки 1 и 2 (*опытная*) - после инкубации с инактивированным вирусом гриппа А/Н3N2 с 0,01% раствором метиленового синего в течении 45 минут. Лизис и разрушение клеток не был отмечен (0),

Лунки 4 и 5 (*контроль вируса*) - после инкубации с интактным вирусом гриппа А/Н3N2. Клетки подверглись лизису 100% (4+).

Лунки 7 и 8 (*контроль клеток*) - после инкубации с интактной культурой клеток MDCK без воздействия вирусов. Клетки сохранили свою нормальную структуру и жизнеспособность (0).

На 6 день наблюдения монослой клеток зараженный инактивированным вирусом лунки 1-2 (*опыт*) был разрушен механическим путем. Были собраны клеточные суспензии из лунок 1-2 (*опытная*) с инактивированным вирусом и не инактивированным вирусом лунки 4-6 (*контроль вируса*) для подтверждения инактивации вируса. Проведен ПЦР

анализ в режиме реального времени на грипп типа А. РНК вируса гриппа не было обнаружено в суспензии клеток лунок 1-2 (*опытная*), было обнаружено в суспензии клеток 4-6 (*контроль вируса*).

Вывод 3: Экспозиция вируса гриппа А/Н3N2 в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» с 0,01% раствором метиленового синего в течение 45 минут способствовало полной инактивации вируса.

Заключение

По результатам испытаний противовирусной эффективности «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на активность вируса гриппа А/Н3N2 на культуре клеток MDCK

«Установка для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» разработанный ООО «New Medical Technologies» обеспечивает полную инактивацию вируса гриппа А/Н3N2 на культуре клеток MDCK (*первый, второй и третий опыт*). После экспозиции 45 мин в установке с 0,01% раствором метиленового синего вирус гриппа А/Н3N2 инактивировался, что выразалось в полной потере цитопатогенности, инвазивности и репликативной активности. Об этом свидетельствует отрицательный результат ПЦР исследований на 6й день наблюдения (*третий опыт*).

Функциональность «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» подтвердилась для инактивации вируса гриппа А/Н3N2 на культуре клеток MDCK.

Директор института
д.м.н., профессор

Исполнитель
Врач вирусолог



 Мусабаев Э.И.

Ибадуллаева Н.С.