



Изпитване за вирусоцидно действие

на UV-C бактерициден модул 95 W

Протокол № 028/09.10.2020

Департамент по Вирусология, Институт по Микробиология
Българска Академия на Науките (София, България)

Ръководител на изследователския екип:
Нели Миленова Вилхелмова-Илиева, доктор

2020
София, България

Въведение

Цел на изследването

Настоящото изследване е проведено с цел да се проучи антивирусния ефект на UV-C бактерициден модул 95 W спрямо вируси с различна структура. Подбрани са вирусни модели, с които да се демонстрира въздействие както спрямо обвити вируси (херпесен и грипен вирус), така и спрямо „голи“ вируси (адено и полио вируси). Подбраните модели се различават и по типа на наследствения им материал - ДНК съдържащи (херпесен и адено вируси) и РНК съдържащи (грипен и полио вируси).

Експериментални условия

Период на изследване: юни – октомври 2020 г.

Метод за определяне на вирусосидния ефект: титриране на вируса чрез определяне на специфичен цитопатичен ефект

Контактно време: 30 минути, 60 минути, 90 минути и 120 минути

Изследвани вируси: Herpes simplex virus, Influenza virus A, Adenovirus-5 и Poliovirus-1

Тествана система

UV-C бактерициден модул 95 W

Материали

Клетки

Монослойна клетъчна култура Madin-Darbey bovine kidney (MDBK) (Национална банка за индустриални микроорганизми и клетъчни култури, София) изолирани от телешки бъбрек.

Madin-Darby canine kidney (MDCK) клетки получени от кучешки бъбрек са закупени от ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA).

Човешки епителни клетки тип 2 (Human epithelial type2 - HEp-2), произхождащи от човешки ларингеален карцином, са получени от Национална банка за индустриални микроорганизми и клетъчни култури, София.

Клетъчните линии MDBK, MDCK и HEp-2 са култивирани в среда DMEM, съдържаща: 10% фетален говежди серум (FBS) (Gibco BRL, САЩ), 10 mM HEPES буфер (Merck, Германия) и антибиотици (пеницилин 100 IU/ml, стрептомицин 100 µg/ml) в CO₂ инкубатор (HERA cell 150, Heraeus, Germany) при 37° C, 5% CO₂.

Вируси

Херпес симплекс вирус тип 1 (Herpes simplex virus, HSV-1 от семейство *Herpesviridae*), чувствителен към ACV, щам Victoria (получен от проф. Стефан Дундаров, Национален център по заразни и паразитни болести, София). Вируса е реплициран в монослойна клетъчна култура MDBK в поддържаща хранителна среда (DMEM, Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK), съдържаща 0.5% FBS. Инфекциозният титър на вирусния сток е 10^{7.5} CCID₅₀ (50% cell culture infectious doses).

Грипен вирус - Influenza virus A/Panama/2007/99/H₃N₂ - (IAV/H₃N₂) (семейство *Orthomyxoviridae*) от колекцията за клетъчни култури на Института по Микробиология „Стефан Ангелов“ – Българска Академия на Науките (София, България) е изолиран от алантоисна течност на инокулирани с вируса 10-дневни кокоши ембриони, инкубирани на 37°C; инфекциозен вирусен титър 10^{6.0} CCID₅₀/ml. Изследването на вирусоцидният ефект *in vitro* се провежда при заразяване на клетки MDCK.

Аденовирус (Adenovirus-5) (семейство *Adenoviridae*) от колекцията на Института по Микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН (София, България) е култивиран в HEp-2 клетки с поддържаща хранителна среда DMEM, 10 mM

HEPES буфер, 0,5% FBS, антибиотици (penicillin 100 IU/ml и streptomycin 100 µg/ml); инфекциозния вирусен титър е - $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml.

Полиовирус - Poliovirus-1 (PV-1) (щам LSc-2ab) (*Enterovirus C*, от семейство *Picornaviridae*) от колекцията на Института по Микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН (София, България) реплициран в клетки HEp-2 съдържащи поддържаща хранителна среда DMEM съдържаща 10 mM HEPES буфер, 0,5% FBS, антибиотици (penicillin 100 IU/ml и streptomycin 100 µg/ml); инфекциозен вирусен титър - 10^7 TCID₅₀/ml.

Методи

Определяне на инфекциозен вирусен титър по метода на крайното разреждане

Клетките се посяват в 96-ямкови плаки с изходна гъстота 4×10^5 кл/ml. След формиране на конфлуентен монослой клетките се заразяват с 0.1 ml вирусна суспензия в десетократни разреждания. С всяко разреждане на вируса са инокулирани по четири ямки. След 1 час адсорбция неадсорбирания вирус се отстранява и се прибавя по 0.1 ml/ямка поддържаща среда. Плаките се инкубират на 37° C, 5% CO₂ в продължение на 48 часа. Чрез микроскопско наблюдение на клетъчния монослой се отчита цитопатичния ефект (ЦПЕ), индуциран от съответния вирус. Инфекциозния вирусен титър се определя по метода на Reed и Muench (1938).

Влияние на UV-C бактерициден модул 95 W върху извънклетъчните вириони

Използвани са две постановки на експеримента.

При първата еднакви части от вирусната изходна суспензия на изследваните вируси се поставят в 6-ямкова плака и плаките се оставят отворени в затворен бокс с кубатура 30 m³. Инкубират се така в присъствието на включения UV-C бактерициден модул 95 W в продължение на 30, 60, 90 и 120 мин. След това на всяка проба се определя инфекциозния вирусен титър по метода на крайното разреждане на Reed и Muench. Резултатите се сравняват с тези от вирусната контрола – същите обеми вирусна суспензия инкубирани за горепосочените интервали в друг стерилен бокс без да са били под влиянието на бактерицидния модул и се определя Δlg.

При втората постановка вирусните проби и вирусните контроли бяха предварително изсушени, за да се избегне евентуален протективен ефект спрямо бактерицидния модул, който би оказала хранителната среда, в която се съхранява вирусния сток. Изсушените проби (в 6-ямкови плаки) бяха инкубирани за същите интервали от време (30, 60, 90 и 120 мин.) в присъствието на бактерицидния модул. След това им беше определен инфекциозния вирусен титър и беше сравнен с този на вирусните контроли (изсушен вирусен сток, инкубиран за същите интервали от време в отделен стерилен бокс) и беше определен Δlg .

Получените стойности за Δlg показват степента на вирусоцидното действие. Стойности по-ниски от $\Delta lg < 1.0$ се смятат за статистически недостоверни (не се наблюдава ефект), $\Delta lg = 1.0 - 1.6$ се приема, че има гранични стойности (ефекта е слаб) и въздействие показващо стойност на $\Delta lg \geq 1.7$ се приема за статистически значим (наблюдава се отчетлив ефект).

Резултати

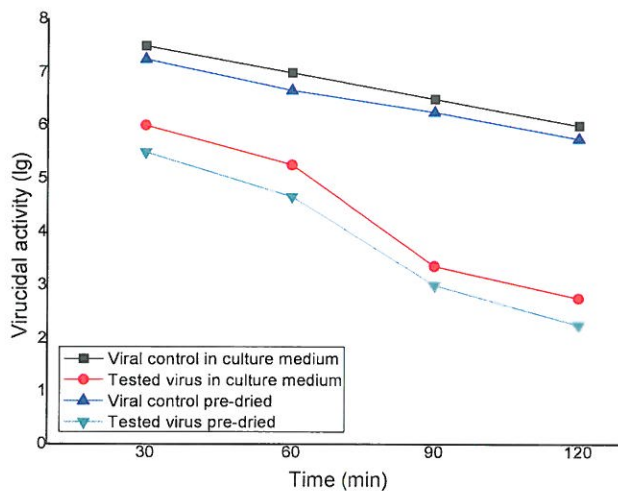
Влияние на UV-C бактерициден модул 95 W върху извънклетъчните вириони на *Herpes simplex virus*

Ефектът от влиянието на бактерицидния модул спрямо жизнеността на херпес симплекс вирионите е представено на Фиг.1, Табл. 1 и 2. На Фиг.1 са представени кривите време на въздействие / вирусен инфекциозен титър. Представени са както вирусните контроли от двете постановки на експеримента (в хранителна среда и изсушен вирус), така и вирусите подложени на действието на модула. При контролите се наблюдава известно понижение на вирусния титър с увеличаване на времето на експеримента, което е очаквано, понеже вирусите са вътреклетъчни паразити и могат да съществуват само в живи клетки. Извън клетките те запазват своята жизненост само определено време, като с увеличаване на времето им на съществуване извън клетката тяхната жизненост естествено намалява. Това налага използването на вирусните контроли, за да се изключи ефекта от очакваното понижение на вирусния титър извън клетката.

Забелязва се леко понижение на вирусните титри на вирусната контрола и пробата при втората постановка на експеримента, което най-вероятно се дължи на липсата на хранителна среда, която запазва жизнеността на вирусите по-дълго време.

Резултатите и от двете постановки са със сходни стойности. Това добре се вижда като се проследят стойностите на $\Delta\lg$ представени на Табл.1 и 2, като малко по-силен ефект се наблюдава при втората постановка (с предварително изсушаване на вируса). При първата постановка на първия изследван интервал 30 мин. Ефекта е слаб ($\Delta\lg = 1.5$), като на 60 мин от въздействието ефекта е значителен и се увеличава с времето на въздействие, достигайки $\Delta\lg = 3.25$ на 120 минута. При втората постановка ефект се наблюдава още на 30 минута с $\Delta\lg = 1.75$ и също се увеличава с времето на въздействие. На 120 минута от въздействието получаваме най-силния наблюдаван ефект ($\Delta\lg = 3.5$) сравнен с ефекта получен от всички изследвани вируси.

От получения резултат можем да заключим, че тествания UV-C бактерициден модул 95 W оказва най-голямо въздействие спрямо ДНК-ови обвити вируси.



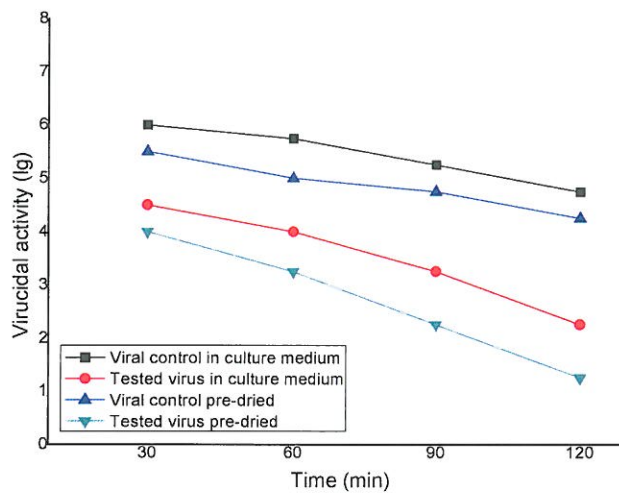
Фиг.1 Влияние на UV-C бактерициден модул 95 W върху извънклетъчните вириони на Herpes simplex virus

Влияние на UV-C бактерициден модул 95 W върху извънклетъчните вириони на Influenza virus A

Влиянието на бактерицидния модул спрямо жизнеността на грипен вирус (Influenza virus A) е представено на Фиг.2, Табл. 1 и 2. На Фиг.2 са представени кривите време на въздействие – ефект от двете постановки на експеримента. На таблици 1 и 2 са представени $\Delta\lg$ при сравняване на получения ефект от понижението на вирусните титри сравнени в титрите на

вирусните контроли. И при двете постановки на изследването ефекта е слаб на 30 мин. от действието с $\Delta\lg = 1.5$ и става значителен на 60 мин ($\Delta\lg = 1.75$). С увеличаване на времето на въздействие ефекта се засилва, като най-висока стойност на $\Delta\lg = 3.0$ се наблюдава на 120 мин от влиянието при втората постановка (с предварително изсушен вирус).

От получения резултат може да се направи извода, че бактерицидния модул в значителна степен инактивира и РНК-ови обвити вируси.

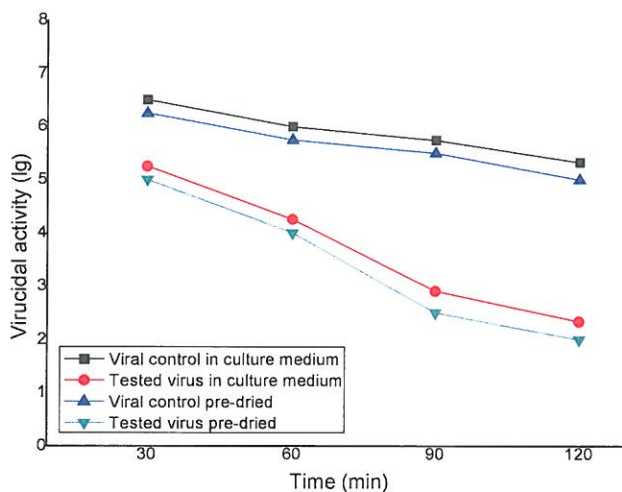


Фиг.2 Влияние на UV-C бактерициден модул 95 W върху извънклетъчните вириони на Influenza virus A

Влияние на UV-C бактерициден модул 95 W върху извънклетъчните вириони на Adenovirus-5

На фигура 3 са представени кривите време на въздействие – ефект, който оказва бактерицидния модул върху вирулентността на извънклетъчните вириони на аденовирус, а резултатите са представени като $\Delta\lg$ на таблици 1 и 2. От таблиците се вижда, че на 30 минута от въздействието не се забелязва значителен ефект ($\Delta\lg = 1.25$) и отчетлив ефект се отчита на 60 минута ($\Delta\lg = 1.75$). При по-продължителните интервали на въздействие ефекта се засилва и е леко по-отчетлив отколкото при грипния вирус, но по-слаб отколкото при херпесния вирус.

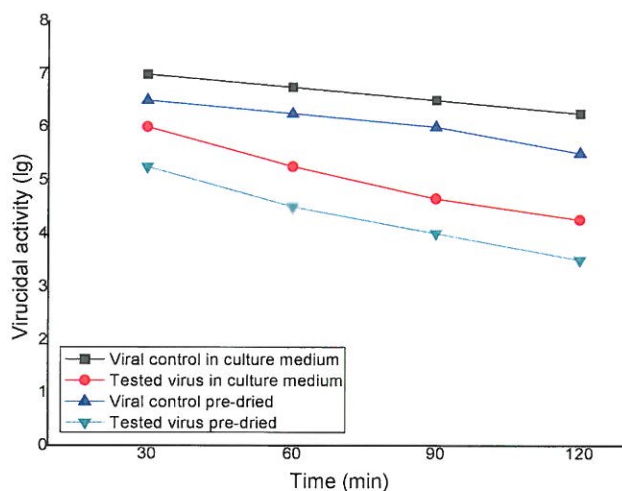
От наблюдаваните резултати може да се заключи, че тествания UV-C бактерициден модул има подчертан инактивиращ ефект върху жизнеността на необвити ДНК-ови вируси.



Фиг.3 Влияние на UV-C бактерициден модул 95 W върху извънклетъчните вириони на Adenovirus-5

Влияние на UV-C бактерициден модул 95 W върху извънклетъчните вириони на Poliovirus-1

Кривите, с които е представено действието на бактерицидния модул 95 W спрямо извънклетъчни вириони на полиовирус са представени на фиг. 4.



Фиг.4 Влияние на UV-C бактерициден модул 95 W върху извънклетъчните вириони на Poliovirus-1

Получените ΔI_g от вирусните инфекциозни титри на пробите и контролите са представени на таблици 1 и 2. И при двете използвани постановки не се наблюдава статистически значим ефект на 30-та мин. При първата постановка и на 60 мин. ефекта е слаб ($\Delta I_g = 1.5$), докато при втората се наблюдава отчетливо влияние ($\Delta I_g = 1.75$). На 90 и 120 мин. инхибирането на вирусните частици се засилва леко в сравнение със 60 мин (до $\Delta I_g = 2$). Вирусоцидната активност спрямо полиовирусните вириони е очевидна, но при всички проведени експерименти с всички изследвани вируси това е най-слабата отчетена активност.

От така получените резултати може да се направи извода, че UV-C бактерициден модул 95 W проявява най-слаба вирусоцидна активност спрямо необвити РНК-ови вируси.

Таблица 1. Влияние на UV-C бактерициден модул 95 W върху извънклетъчните вириони в хранителна среда

Вирус	Вирусоцидна активност ΔI_g			
	30 мин.	60 мин.	90 мин.	120 мин.
HSV-1	1.5	1.75	3.15	3.25
Influenza	1.5	1.75	2.0	2.5
Adeno	1.25	1.75	2.85	3.0
Polio	1.0	1.5	1.85	2.0

Таблица 2. Влияние на UV-C бактерициден модул 95 W върху извънклетъчните вириони при предварително изсушаване

Вирус	Вирусоцидна активност ΔI_g			
	30 мин.	60 мин.	90 мин.	120 мин.
HSV-1	1.75	2.0	3.25	3.5
Influenza	1.5	1.75	2.5	3.0
Adeno	1.25	1.75	3.0	3.0
Polio	1.25	1.75	2.0	2.0

Заклучение

При изследването на вирусоцидната активност на UV-C бактерициден модул 95 W, подаден за изпитване от Атра - 96 ООД, беше установено значително понижаване на инфекциозните вирусни титри при 60 минути и по-продължително действие на модула в затворено помещение.

Действието на UV-C модула беше определено спрямо четирите основни структурни типа вируси: ДНК – обвити (представени от Herpes simplex virus); РНК – обвити (Influenza virus A); ДНК – необвити (Adenovirus-5) и РНК – необвити (Poliovirus-1).

От получените резултати може да се заключи, че UV-C бактерициден модул 95 W може да се използва за намаляване на количеството на инфекциозните вирусни частици в помещения, с което може значително да се намали предаването и разпространението на вирусни заболявания причинени от обвити и необвити вируси.

Провел изследването:
/д-р Нели Вилхелмова-Илиева/

Директор на
Института по микробиология:
/ Проф. Пенка Петрова, дн /

