

Святченко В.А.¹, Баяндин Р.Б.¹, Брызгин А.А.², Золин В.В.¹, Гаврилова Е.В.¹, Агафонов А.П.¹, Максюттов Р.А.¹

Оценка эффективности инактивации вируса SARS-CoV-2 на ускорителе ИЛУ-10

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), Российская Федерация, р.п. Кольцово

² Институт ядерной физики имени Г.И. Будкера СО РАН (ИЯФ СО РАН), Российская Федерация, г. Новосибирск.

В декабре 2019 года из Китая начали поступать сообщения о случаях респираторного заболевания неизвестной этиологии среди жителей города Ухань, административный центр провинции Хубэй. Всемирная Организация здравоохранения (ВОЗ) для обозначения агента, вызвавшего вспышку заболевания, использовала термин «новый коронавирус 2019». Впоследствии было показано, что новый коронавирус является ближайшим родственником коронавируса SARS (гомология около 80%), вызвавшего эпидемию так называемой «атипичной пневмонии» в 2003 году, Группа Международного комитета 11 февраля 2020 года присвоила вирусу новое имя – SARS-CoV-2 [1]. Официальное название болезни, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, стало коронавирусная болезнь COVID-19 (Coronavirus Disease) [2]. Анализ генома выявил тесную связь вируса SARS-CoV-2 с двумя коронавирусами летучих мышей и коронавирусом панголина. Эпидемиологические исследования связали появление нового коронавируса с оптовым рынком Huanan Seafood и указали на его зоонозное происхождение [3, 4, 5]. Заболевание стремительно распространилось по миру и уже через 6 месяцев регистрировалось в более чем 180 странах, число заболевших превысило 10 млн. человек, а умерших – 500 тысяч. Эволюционные генетические исследования показали, что попадание вируса от животных (возможно, летучих мышей) к людям, произошло в ноябре или в начале декабря 2019 года.

Вирионы коронавируса имеют сферическую форму диаметром 60–140 нм. Поверхность вириона покрыта булавовидными отростками (S-гликопротеин) длиной около 20 нм, придающими им неповторимую форму короны, безошибочно распознаваемой при электронно-микроскопическом исследовании.

В работе была исследована возможность достижения полной инактивации вируса SARS-CoV-2 с использованием установки ИЛУ-10. Импульсный линейный ускоритель электронов ИЛУ-10 используется для стерилизации различных медицинских изделий разового пользования (шприцы, системы переливания крови и др.), фармацевтического сырья и готовых лекарственных форм, показана перспективность его использования для деконтаминации препаратов крови и для электронно-лучевого синтеза лекарственных средств [6].

Вирус: С целью исследования остаточной инфекционной активности вируса SARS-CoV-2 готовили четыре последовательных 10-кратных разведений осветленной культуральной вирусосодержащей жидкости (КВЖ). КВЖ получали культивированием вируса SARS-CoV-2 на монослойной клеточной культуре Vero E6. Исходный инфекционный титр вируса составлял $6.3 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ (50% тканевая цитопатогенная доза). Разведения вируса в объеме 0.5 мл были помещены в герметичные криопробирки (контрольные и опытные). Криопробирки были помещены в 50 мл полипропиленовые пробирки и заморожены при -40°C в термосе.

Всего в работу было взято 5 пробирок с десятикратным разведением от 0 до -4 разведения, которые были обработаны на установке ИЛУ-10 (опытные), и 5 пробирок, которые не были обработаны на установке ИЛУ-10 (контрольные).

Клетки: Vero E6 (получены из Коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Ростовая среда (РС): Игла MEM (Gibco) с добавлением эмбриональной сыворотки КРС (Gibco) до 10 % и 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Gibco).

Поддерживающая среда (ПС): Игла MEM (Gibco) с добавлением эмбриональной сыворотки КРС (Gibco) до 2 % и 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Gibco).

Ускоритель ИЛУ-10: мощность до 50 кВт, энергия 5 МэВ. Рабочий режим работы: энергия 5 МэВ, ток пучка импульсный 350 мА; средний ток 4.3 мА; ширина сканирования 80 см; скорость конвейера 2.3 см/сек. Суммарная доза облучения 25 кГр.

Обработка вируса на установке ИЛУ-10:

Предварительно была проведена проверка сохранения целостности криопробирок и пробирки на 50 мл при облучении на ускорителе ИЛУ-10. Все пробирки сохранили целостность при штатном облучении на установке ИЛУ-10.

Пробирки с исходной концентрацией (0-е разведение) и разведениями от -1 до -4 вируса SARS-CoV-2 помещали в установку ИЛУ-10 и обрабатывали β -лучами при рабочем режиме работы.

Опытные и контрольные пробирки хранились и транспортировались в идентичных условиях.

Определение жизнеспособности вируса:

Субконфлюэнтные культуры Vero E6, культивируемые на 96-луночных культуральных планшетах, инфицировали КВЖ из опытных и контрольных пробирок, внося в лунки по 50 мкл вирусосодержащей жидкости. Каждую экспериментальную точку выполняли в четырех повторях (4 лунки на каждое разведение исследуемых образцов). Инфицированные клетки инкубировали 3 суток при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Регистрацию цитопатического эффекта на клетки осуществляли микроскопией и с использованием МТТ-теста выполняемого по методике, описанной Niks M. & Otto M [7]. Культуральную среду удаляли, в лунки добавляли 200 мкл среды без сыворотки и вносили 10 мкл раствора МТТ (исходная концентрация 5 мг/мл в фосфатном буфере) и дополнительно инкубировали микропланшеты в течении 6 ч. По окончании инкубации среду удаляли и добавляли по 150 мкл DMSO для растворения образовавшихся в результате реакции синих кристаллов формазана. Оптическую плотность растворенного в DMSO формазана измеряли на микропланшетном спектрофотометре Multiscan при длине волны 492 нм (OD₄₉₂). Цитолитическую активность опытных и контрольных образцов в отношении клеток Vero E6 выражали в lgТЦД₅₀/мл.

Было проведено определение концентрации коронавируса SARS CoV-2 в исходной контрольной пробирке (0-е разведение). Инфекционный титр неразведенного контрольного (не облученного на установке ИЛУ-10) образца составил 5.83 lgТЦД₅₀/мл. При титровании опытного образца из пробирки с 0-м разведением наличия инфекционного вируса не обнаружено. При инфицировании клеток образцами из опытных пробирок с разведениями (с 0-го по -4) вирус специфического цитопатического действия не выявлено на всем сроке инкубирования, при том, что контрольные образцы проявили выраженную цитолитическую активность, проявившуюся в полной гибели клеточного монослоя (Таблица 1).

Таблица 1. Результаты оценки остаточной инфекционной активности коронавируса SARS CoV-2

№ п/п	Разведение вируса SARS-CoV-2/ Расчетная концентрация вируса lg ТЦД ₅₀ /мл	Сохранность монослоя при микроскопии/OD ₄₉₂	
		Опыт	Контроль
1	0 5.83 lg ТЦД ₅₀ /мл	+++/1,27±0,18	---/0,17±0,10
2	-1 4.83 lg ТЦД ₅₀ /мл	+++/1,30±0,20	---/0,20±0,08
3	-2 3.83 lg ТЦД ₅₀ /мл	+++/1,20±0,15	---/0,15±0,10
4	-3 2.83 lg ТЦД ₅₀ /мл	+++/1,25±0,21	---/0,18±0,09
5	-4 1.83 lg ТЦД ₅₀ /мл	+++/1,27±0,16	---/0,15±0,12

Примечания:

+++ -полная сохранность монослоя;

--- - полная деградация монослоя.

Отсутствие инфекционного вируса SARS-CoV-2 в опытных пробах также подтверждено выполнением двух «слепых» пассажей на высокочувствительной культуре клеток Vero E6.

Таким образом, исследование показало, что обработка β-облучением коронавируса SARS-CoV-2 в установке ИЛУ-10, работающей в рабочем режиме, обеспечивает полную инактивацию находящегося в культуральной среде инфекционного вируса SARS-CoV-2 в исследованном диапазоне концентраций.

Список литературы

1. Guo, Y.R., Cao, Q.D., Hong, Z.S., Tan, Y.Y., Chen, S.D., Jin, H.J., Tan, K.S., Wang, D.Y., Yan, Y., 2020. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. *Military Medical Research* 7 (1), 1–10.
2. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 64[EB/OL].[2020-03-24]. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200324-sitrep-64-covid-19.pdf?sfvrsn=703b2c40_2.
3. Novel, C.P.E.R.E., 2020. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi= Zhonghua liuxingbingxue zazhi* 41 (2), 145.; Perlman, 2020;
4. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2020. Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Increased Transmission Beyond China—Fourth Update (PDF, 14th February);
5. World Health Organization (WHO), 2020a. WHO Director-General’s Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19—11 March 2020. (11 March)
6. Брызгин А А, Куксанов Н К, Салимов Р А "Ускорители электронов для промышленного применения, разработанные в ИЯФ им. Г.И. Будкера СО РАН" УФН 188 672–685 (2018)
7. M. Niks, M. Otto M. Towards an optimized MTT assay // *J. Immunol. Meth.* 1990. Vol. 130, № 1. P. 149-151.