

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА ИМЕНИ  
А.А. СМОРОДИНЦЕВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБУ «НИИ ГРИППА ИМ. А.А. СМОРОДИНЦЕВА» МИНЗДРАВА РОССИИ)

УДК 615.281.8

УТВЕРЖДАЮ  
Зам. директора ФГБУ «НИИ гриппа  
им. А.А. Смородинцева»  
Минздрава России по научной работе  
канд. биол. наук  
Д.М. Даниленко  
« » 2023 г.

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ № НИР-ЛХТ-СА-04/2023  
ПО ДОГОВОРУ №29032023 от 29.03.2023 года.

ОЦЕНКА ВИРУЛИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТВОРА ДЛЯ  
ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЖЕВАТЕЛЬНОГО МАРМЕЛАДА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ  
ОРВИ *in vitro*

Руководитель НИР:  
Ведущий научный сотрудник  
лаборатории химиотерапии вирусных инфекций,  
канд. биол. наук \_\_\_\_\_ А.В. Галочкина

Санкт-Петербург, 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>РЕФЕРАТ.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>1. Материалы и методы, используемые при изучении специфической фармакологической активности на моделях <i>in vitro</i> на культуре клеток.....</b>             | <b>9</b>  |
| 1.1. Тестируемый препарат.....  | 9         |
| 1.2. Тест-системы.....  | 9         |
| 1.3. Вирусы.....  | 10        |
| 1.4. Определение вирицидной активности.....   | 11        |
| 1.5 Статистическая обработка данных.....  | 16        |
| <b>2. Результаты исследования вирицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада.....</b>  | <b>17</b> |
| 2.1 Результаты исследования вирицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса гриппа А.....                              | 17        |
| 2.2 Результаты исследования вирицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса гриппа В.....                              | 19        |
| 2.3 Результаты исследования вирицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса респираторно-синцитиального вируса А2..... | 20        |
| 2.4 Результаты исследования вирицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении риновируса.....                                   | 22        |
| 2.5 Результаты исследования вирицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении коронавируса.....                                 | 24        |
| 2.6 Результаты исследования вирицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении аденоvируса.....                                  | 25        |
| 2.7 Результаты исследования вирицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса парагриппа....                             | 27        |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ.....</b>  | <b>31</b> |

## **ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ**

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями, сокращения и обозначения:

**96ЛП** – 96-луночный культуральный планшет

**ВПЧ** – вирус парагриппа человека

**ИФА** – иммуноферментный анализ

**МТТ**–3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолбромид  
(C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>5</sub>S);

**РГА** – реакция гемагглютинации

**РСВ** – респираторно-синцитиальный вирус

**СКРС** – сыворотка крупного рогатого скота

**ТИД<sub>50</sub>** – 50 % тканевая инфекционная доза – доза вируса, вызывающая заражение 50 % клеток

**ТМБ** - тетраметилбензидин

**ЦПД** – цитопатогенное действие

**ФБС** – фетальная бычья сыворотка

**ХОБЛ** – хроническая обструктивная болезнь легких

**DMSO** – диметилсульфоксид

**DPBS** – фосфатно-солевой буферный раствор по протоколу Дульбекко

**PBST** – фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением Tween 20 до 0,05 %

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР, кандидат  
биологических наук

---

подпись, дата

Научный сотрудник

---

подпись, дата

Научный сотрудник

---

подпись, дата

Младший научный сотрудник

---

подпись, дата

Лаборант-исследователь

---

подпись, дата

Лаборант-исследователь

---

подпись, дата

Лаборант-исследователь

---

подпись, дата

Лаборант-исследователь

---

подпись, дата

А.В. Галочкина  
(все разделы)

А.В. Гаршинина

Г.Д. Петухова

Ю.В. Николаева

Д.Н. Гораб

С.С. Шмелева

А.М. Клабуков

Д.Н. Разгуляева

## **РЕФЕРАТ**

**Отчет 36 страниц, 8 таблиц, 20 рисунков, 9 источников.**

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ВИРУЛИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ, ВИРУС ГРИППА, РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНЫЙ ВИРУС, РИНОВИРУС, КОРОНАВИРУС, АДЕНОВИРУС, ВИРУС ПАРАГРИППА, ТЕСТИРОВАНИЕ *IN VITRO*, КУЛЬТУРА КЛЕТОК.

**Объектом исследования** является Раствор для приготовления жевательного мармелада.

**Целью работы** является оценка вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вирусов гриппа типа А и В, респираторно-синцитиального вируса, риновируса, коронавируса, аденоизура и вируса парагриппа.

**В задачи исследования входит:**

1. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса гриппа типа А - штамм A/Aichi/2/68(H3N2) на культуре клеток MDCK.

2. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса гриппа типа В - штамм B/Malaysia/2506/04 на культуре клеток MDCK.

3. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении респираторно-синцитиального вируса - штамм A2 на культуре клеток Нер-2.

4. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении риновируса - штамм рино/1а/Ленинград/78 на культуре клеток Нер-2.

5. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении коронавируса - HCoV-19/Russia/StPetersburg-RII3524VR4/2020 на культуре клеток Vero E6.

6. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении аденоизура - штамм Adenoid 75 группа С на культуре клеток А549.

7. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса парагриппа 3 типа - штамм III v2932 на культуре клеток Нер-2.

В работе использовали следующие методы: иммуноферментный анализ, реакция гемагглютинации, метод визуальной оценки цитопатогенного действия вируса, метод Мосмана (МТТ-тест), суспензионный метод оценки вирулицидной активности.

В ходе выполнения исследования было установлено, что воздействие раствора для приготовления жевательного мармелада на суспензию, содержащую вирус гриппа, респираторно-синцитиальный вирус и вирус парагриппа приводит к снижению титра всех вышеуказанных вирусов ниже предела детекции независимо от наличия белковой нагрузки.

Существенная вирулицидная активность исследуемого раствора при воздействии на риновирус и коронавирус была зафиксирована только в отсутствии белковой нагрузки. При наличии белковой нагрузки в экспериментах с риновирусом и коронавирусом наблюдали отсутствие репликации вируса как в контрольных, так и в опытных образцах.

В экспериментах с аденоовирусом раствор для приготовления жевательного мармелада не снижал титр вируса во всех временных точках исследования независимо от наличия белковой нагрузки.

Таким образом, при обработке вирусодержащих суспензий исследуемым раствором в условиях отсутствия белковой нагрузки в течение 0-60 минут достигается полная инактивация всех исследованных вирусов (вирусов гриппа А и В, парагриппа, респираторно-синцитиального вируса и коронавируса) за исключением аденоовириуса человека 5 типа.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Респираторные вирусные инфекции представляют собой острую проблему для человечества, вызывая ежегодные эпидемии, захватывающие весь земной шар. В частности, гриппом каждый год переболеваю от 5 до 15% населения Земли, а умирают не менее 250 000 человек [1]. Респираторно-синцитиальный вирус является частой причиной развития острых респираторных заболеваний негриппозной этиологии у детей младше 2 лет [2]. Риновирусная инфекция не только ежегодно поражает широкие слои населения, но и является ко-патогеном у многих хронических легочных заболеваний, в частности ХОБЛ (хроническая обструктивная болезнь легких) [3].

Вирусы парагриппа человека (ВПЧ) обычно вызывают заболевания верхних и нижних дыхательных путей у младенцев, маленьких детей, пожилых людей и людей с ослабленной иммунной системой [4]. Аденовирусы чаще всего вызывают респираторные заболевания, которые варьируются от обычной простуды до пневмонии, ларинготрахеобронхита и бронхита [5]. Коронавирус SARS-CoV-2 является причиной пандемии COVID-19 - тяжелого инфекционного респираторного заболевания с высокой смертностью. С момента первых сообщений из Уханя (КНДР) об инфицировании коронавирусом случаи заболеваемости были зафиксированы на всех континентах. На сегодняшний день во всем мире зарегистрировано более 500 миллионов подтвержденных случаев COVID-19 [6].

Несмотря на успехи вакцинопрофилактики, она не может являться абсолютной гарантией защиты потенциального пациента от заболевания в связи с высокой скоростью накопления мутаций у циркулирующих в человеческой популяции вирусов, например, гриппа. Кроме того, для многих вирусов, вызывающих респираторные заболевания, вакцины не разработаны [7].

Таким образом, возникает необходимость в разработке новых средств неспецифической профилактики респираторных инфекций. Настоящая работа посвящена изучению вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада с растительным комплексом суспензионным методом.

Целью настоящего исследования является оценка вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса гриппа типа А и В, респираторно-синцитиального вируса, риновируса, коронавируса, адено-вируса и вируса парагриппа.

**В задачи исследования входит:**

1. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса гриппа типа А - штамм A/Aichi/2/68(H3N2) на культуре клеток MDCK.
2. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса гриппа типа В - штамм B/Malaysia/2506/04 на культуре клеток MDCK.
3. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении респираторно-синцитиального вируса - штамм A2 на культуре клеток Нер-2.
4. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении риновируса - штамм рино/1а/Ленинград/78 на культуре клеток Нер-2.
5. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении коронавируса- HCoV-19/Russia/StPetersburg-RII3524VR4/2020 на культуре клеток Vero E6.
6. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении адено-вируса - штамм Adenoid 75 группа С на культуре клеток А549.
7. Провести тестирование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса парагриппа З типа - штамм III v2932 на культуре клеток Нер-2.

## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

### **1. Материалы и методы, используемые при изучении специфической фармакологической активности на моделях *in vitro* на культуре клеток**

Эксперименты по изучению специфической вирулицидной активности *in vitro* на культуре клеток проводили согласно техническому заданию договора №29032023 от 29.03.2023 г. Все эксперименты были проведены в трех повторах.

#### **1.1. Тестируемый препарат**

##### **1.1.1. Учет и хранение исследуемых препаратов**

Исследуемые препараты подлежат учету и хранению в соответствии с СОП, принятыми в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

|                     |   |
|---------------------|---|
| Наименование        | Раствор для приготовления жевательного мармелада с растительным комплексом. |
| Производитель       | ООО «Фитолон Мед» эксклюзивно для ООО «Стоматологический магазин Ромашка»   |
| Серия               | 01/19.04.2023   |
| Срок годности       | 6 месяцев   |
| Лекарственная форма | раствор   |
| Состав              | См. Приложение №1   |

#### **1.2. Тест-системы**

Для исследования были использованы следующие культуры клеток.

Культура клеток MDCK (клетки почки собаки). Получена из рабочей коллекции клеточных культур лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева». В ходе проведения исследования пассажный уровень после разморозки не превышал 20 пассажей.

Культура клеток Нер-2 (клетки эпидерmoidной карциномы гортани человека). Получена из рабочей коллекции клеточных культур лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева». В ходе проведения исследования пассажный уровень после разморозки не превышал 20 пассажей.

Культура клеток A549 (клетки adenокарциномы легкого человека). Получена из рабочей коллекции клеточных культур лаборатории химиотерапии вирусных инфекций

ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева». В ходе проведения исследования пассажный уровень после разморозки не превышал 20 пассажей.

Культура клеток Vero E6 (клетки почки африканской зеленой мартышки). Получена из рабочей коллекции клеточных культур лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева». В ходе проведения исследования пассажный уровень после разморозки не превышал 20 пассажей.

### **1.3. Вирусы**

#### *1.3.1. Вирус гриппа A*

В работе был использован вирус гриппа типа А, штамм A/Aichi/2/68(H3N2), получен из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций. Был размножен в аллантоисной полости 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов, после чего аллантоисная жидкость из эмбрионов была собрана, осветлена при помощи центрифугирования и расфасована по аликовтам объемом 1 мл. Все аликовты сделаны из единого стока аллантоисной жидкости и одномоментно заморожены при -80 °C.

#### *1.3.2. Вирус гриппа B*

В работе был использован вирус гриппа типа В, штамм B/Malaysia/2506/04, получен из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций. Был размножен в аллантоисной полости 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов, после чего аллантоисная жидкость из эмбрионов была собрана, осветлена при помощи центрифугирования и расфасована по аликовтам объемом 1 мл. Все аликовты сделаны из единого стока аллантоисной жидкости и одномоментно заморожены при -80 °C.

#### *1.3.3. Респираторно-синцитиальный вирус*

В работе был использован респираторно-синцитиальный вирус, штамм А2 получен из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций. Был размножен на культуре клеток Нер-2, после чего клеточная суспензия была собрана и расфасована по аликовтам объемом 500 мкл. Все аликовты сделаны из единого стока, одномоментно заморожены и хранились при -80 °C.

#### *1.3.4. Риновирус*

В работе был использован риновирус штамм рино/1а/Ленинград/78. Вирус получен из Государственной Коллекции Вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, далее был размножен и накоплен на культуре клеток Нер-2, после чего клеточная

сусpenзия была собрана и расфасована по аликовтам объемом 1 мл. Все аликовты сделаны из единого стока, одномоментно заморожены и хранились при -80 °C.

#### *1.3.5. Парагрипп*

В работе был использован вирус парагриппа 3 типа, штамм III v2932 получен из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций. Был размножен на культуре клеток Нер-2, после чего клеточная сусpenзия была собрана и расфасована по аликовтам объемом 500 мкл. Все аликовты сделаны из единого стока, одномоментно заморожены и хранились при -80 °C.

#### *1.3.6. Аденовирус*

В работе был использован Аденовирус 5 штамм Adenoid 75 группа С получен из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций. Был размножен на культуре клеток A549, после чего клеточная сусpenзия была собрана и расфасована по аликовтам объемом 500 мкл. Все аликовты сделаны из единого стока, одномоментно заморожены и хранились при -80 °C.

#### *1.3.7. Коронавирус*

В работе был использован коронавирус НСоВ-19/Russia/StPetersburg-RII3524VR4/2020 получен из рабочей коллекции отдела вирусологии Института Экспериментальной Медицины. Был размножен на культуре клеток Vero E6, после чего клеточная сусpenзия была собрана и расфасована по аликовтам объемом 500 мкл. Все аликовты сделаны из единого стока, одномоментно заморожены и хранились при -80 °C.

### **1.4. Определение вирулицидной активности**

Вирулицидную активность исследуемого препарата оценивали согласно МУ Роспотребнадзора 3.5.2431-08.

#### *1.4.1. Определение вирулицидной активности в отношении вируса гриппа*

К аллантоисной жидкости, содержащей  $10^{6,5}$  IgТИД<sub>50</sub> вируса гриппа, добавляли тестируемое средство (не разведённое) в соотношении 1:9 (1 объем вируса и 9 объемов средства) без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС). В качестве отрицательного контроля использовали смесь вируса и поддерживающей среды в соотношении 1:9 без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС).

Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре при периодическом перемешивании в течение 0, 15, 30 и 60 минут, после чего в каждом образце определяли количество вируса с помощью титрования на культуре клеток.

Из опытных и контрольных образцов готовили серию 10-кратных разведений ( $10^{-1} - 10^{-7}$ ) на поддерживающей среде (питательная среда Игла МЕМ с двойным набором аминокислот+1% ципрофлоксацина+8 мкг/мл трипсина+2 mM L-глутамина), затем переносили их в 96ЛП с однократно промытыми поддерживающей средой клетками MDCK и инкубировали в течение 1 часа. Лунки, соответствующие контролю клеток, заполняли той же средой. По истечении 1 часа из 96ЛП удаляли содержимое, однократно промывали и вносили поддерживающую среду в объеме 200 мкл/лунку. Далее планшеты инкубировали в течение 72 часов при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После окончания срока инкубации культуральную жидкость в объеме 100 мкл из каждой лунки планшета переносили в планшеты с U-образным дном для иммунохимических реакций и добавляли по 100 мкл на лунку 1% суспензии куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Планшеты выдерживали 1 час при комнатной температуре, после чего визуально оценивали наличие или отсутствие гемагглютинации в лунках.

Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [8] и выражали в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД<sub>50</sub>) на 100 мкл объема.

#### *1.4.2. Определение вирулицидной активности в отношении респираторно-синцитиального вируса*

К культуральной жидкости, содержащей  $10^{5,5}$  lgТИД<sub>50</sub> респираторно-синцитиального вируса А2, добавляли тестируемое средство (не разведённое) в соотношении 1:9 (1 объем вируса и 9 объемов средства) без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС). В качестве отрицательного контроля использовали смесь вируса и поддерживающей среды в соотношении 1:9 без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС).

Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре при периодическом перемешивании в течение 0, 15, 30 и 60 минут, после чего в каждом образце определяли количество вируса с помощью титрования на культуре клеток.

Из опытных и контрольных образцов готовили серию 10-кратных разведений ( $10^{-1} - 10^{-7}$ ) на поддерживающей среде (питательная среда DMEM +1%

ципрофлоксацина+2%ФБС+2 mM L-глутамина), затем переносили их в 96ЛП с клетками Нер-2 и инкубировали в течение 1 часа. Лунки, соответствующие контролю клеток, заполняли той же средой. По истечении 1 часа из 96ЛП удаляли содержимое, однократно промывали и вносили поддерживающую среду в объеме 200 мкл/лунку. Далее пластины инкубировали в течение 6 суток при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

По окончании срока инкубации титр вируса определяли с помощью иммуноферментного анализа. Для проведения анализа опытный 96ЛП фиксировали холодным 80% ацетоном в течение 15 минут, после чего ее промывали с помощью буфера DPBS. Далее в 96ЛП вносили раствор первичных мышиных антител к белку F респираторно-синцитиального вируса, после чего инкубировали в течение 1 часа при 37 °C.

Далее 96ЛП промывали буфером PBST и вносили вторичные антимышиные антитела, после чего снова инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. Далее антитела отмывали DPBS и вносили субстрат-хромогенную смесь с ТМБ. Через 5 минут реакцию останавливали с помощью 0,1M серной кислоты и оценивали оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм. Лунки, в которых значение абсорбции превышало таковое в лунках с контролем клеток, считались зараженными.

Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [8] и выражали в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД<sub>50</sub>) на 100 мкл объема.

#### *1.4.3. Определение вирулицидной активности в отношении риновируса*

К культуральной жидкости, содержащей 10<sup>3,5</sup> lgТИД<sub>50</sub> риновируса, добавляли тестируемое средство (не разведённое) в соотношении 1:9 (1 объем вируса и 9 объемов средства) без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС). В качестве отрицательного контроля использовали смесь вируса и поддерживающей среды в соотношении 1:9 без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС).

Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре при периодическом перемешивании в течение 0, 15, 30 и 60 минут, после чего в каждом образце определяли количество вируса с помощью титрования на культуре клеток.

Из опытных и контрольных образцов готовили серию 10-кратных разведений (10<sup>-1</sup> – 10<sup>-7</sup>) на поддерживающей среде (питательная среда DMEM +1% ципрофлоксацина+2%ФБС+2 mM L-глутамина+15 mM MgCl<sub>2</sub>), затем переносили их в

96ЛП с клетками Нер-2 и инкубировали в течение 1 часа. Лунки, соответствующие контролю клеток, заполняли той же средой. По истечении 1 часа из 96ЛП удаляли содержимое, однократно промывали и вносили поддерживающую среду в объеме 200 мкл/лунку. Далее планшеты инкубировали в течение 6 суток при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

После окончания срока инкубации титр вируса определяли методом ЦПД. ЦПД вируса на культуре клеток оценивали визуально под инвертированным микроскопом. «+» отмечали наличие вирусиндукционной деструкции монослоя, «-» отсутствие ЦПД.

Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [8] и выражали в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД<sub>50</sub>) на 100 мкл объема.

#### *1.4.4. Определение вирулицидной активности в отношении парагриппа*

К культуральной жидкости, содержащей 10<sup>4,5</sup> лгТИД<sub>50</sub> вируса парагриппа 3 типа, добавляли тестируемое средство (не разведённое) в соотношении 1:9 (1 объем вируса и 9 объемов средства) без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС). В качестве отрицательного контроля использовали смесь вируса и поддерживающей среды в соотношении 1:9 без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС).

Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре при периодическом перемешивании в течение 0, 15, 30 и 60 минут, после чего в каждом образце определяли количество вируса с помощью титрования на культуре клеток.

Из опытных и контрольных образцов готовили серию 10-кратных разведений (10<sup>-1</sup> – 10<sup>-7</sup>) на поддерживающей среде (питательная среда DMEM +1% ципрофлоксацина+2% ФБС+2 mM L-глутамина), затем переносили их в 96ЛП с клетками Нер-2 и инкубировали в течение 1 часа. Лунки, соответствующие контролю клеток, заполняли той же средой. По истечении 1 часа из 96ЛП удаляли содержимое, однократно промывали и вносили поддерживающую среду в объеме 200 мкл/лунку. Далее планшеты инкубировали в течение 6 суток при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

По окончании срока инкубации титр вируса определяли с помощью иммуноферментного анализа. Для проведения анализа опытный 96ЛП фиксировали холодным 80% ацетоном в течение 15 минут, после чего его промывали с помощью буфера DPBS. Далее в 96ЛП вносили раствор первичных мышиных антител к белку вируса парагриппа, после чего инкубировали в течение 1 часа при 37 °С.

Далее 96ЛП промывали буфером PBST и вносили вторичные антимышьиные антитела, после чего снова инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. Далее антитела отмывали DPBS буфером и вносили субстрат-хромогенную смесь с ТМБ. Через 5 минут реакцию останавливали с помощью 0,1M серной кислоты и оценивали оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм. Лунки, в которых значение абсорбции превышало таковое в лунках с контролем клеток, считались зараженными.

Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [8] и выражали в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД<sub>50</sub>) на 100 мкл объема.

#### *1.4.5. Определение вирулицидной активности в отношении аденоовириуса*

К культуральной жидкости, содержащей 10<sup>4,5</sup> IgТИД<sub>50</sub> аденоовириуса, добавляли тестируемое средство (не разведённое) в соотношении 1:9 (1 объем вируса и 9 объемов средства) без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС). В качестве отрицательного контроля использовали смесь вируса и поддерживающей среды в соотношении 1:9 без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС).

Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре при периодическом перемешивании в течение 0, 15, 30 и 60 минут, после чего в каждом образце определяли количество вируса с помощью титрования на культуре клеток.

Из опытных и контрольных образцов готовили серию 10-кратных разведений (10<sup>-1</sup> – 10<sup>-7</sup>) на поддерживающей среде (питательная среда DMEM +1% ципрофлоксацина+2 mM L-глутамина), затем переносили их в 96ЛП с клетками А549 и инкубировали в течение 1 часа. Лунки, соответствующие контролю клеток, заполняли той же средой. По истечении 1 часа из 96ЛП удаляли содержимое, однократно промывали и вносили поддерживающую среду в объеме 200 мкл/лунку. Далее планшеты инкубировали в течение 6 суток при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

После окончания срока инкубации из 96ЛП удаляли содержимое и вносили раствор MTT (метилтетразолиум бромид) на поддерживающей среде в концентрации 0,5 мкг/мл, после чего инкубировали в течение 1,5 часов при температуре 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. По окончании срока инкубации раствор MTT удаляли, растворяли осадок в DMSO и определяли оптическую плотность раствора при длине волны 570 нм. Лунки считали зараженными, если оптическая плотность превышала 1/2 от оптической плотности в контроле.

Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [8] и выражали в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД<sub>50</sub>) на 100 мкл объёма.

*1.4.6. Определение вирулицидной активности в отношении коронавируса (выполнено отделом вирусологии Института Экспериментальной Медицины, Санкт-Петербург)*

К культуральной жидкости, содержащей 10<sup>4,5</sup> lgТИД<sub>50</sub> коронавируса, добавляли тестируемое средство (не разведённое) в соотношении 1:9 (1 объем вируса и 9 объемов средства) без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС). В качестве отрицательного контроля использовали смесь вируса и поддерживающей среды в соотношении 1:9 без белковой нагрузки и с белковой нагрузкой (с добавлением 40% инактивированной СКРС).

Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре при периодическом перемешивании в течение 0, 15, 30 и 60 минут, после чего в каждом образце определяли количество вируса с помощью титрования на культуре клеток.

Из опытных и контрольных образцов готовили серию 10-кратных разведений (10<sup>-1</sup> – 10<sup>-7</sup>) на поддерживающей среде (питательная среда DMEM +1% цiproфлоксацина+2%ФБС+2 mM L-глутамина), затем переносили их в 96ЛП с клетками Vero E6 и инкубировали в течение 1 часа. Лунки, соответствующие контролю клеток, заполняли той же средой. По истечении 1 часа из 96ЛП удаляли содержимое, однократно промывали и вносили поддерживающую среду в объеме 200 мкл/лунку. Далее планшеты инкубировали в течение 3 суток при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

После окончания срока инкубации титр вируса определяли методом ЦПД. ЦПД вируса на культуре клеток оценивали визуально под инвертированным микроскопом. «+» отмечали наличие вирусиндукцированной деструкции монослоя, «–» отсутствие ЦПД.

Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [8] и выражали в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД<sub>50</sub>) на 100 мкл объёма.

## **1.5 Статистическая обработка данных**

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета Microsoft Office Excel. Для графического представления данных титрования полученные результаты логарифмировали и представляли в виде диаграммы, отражающей среднее арифметическое значений титров для каждой временной точки и стандартное отклонение.

## **2. Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада**

### **2.1 Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса гриппа А**

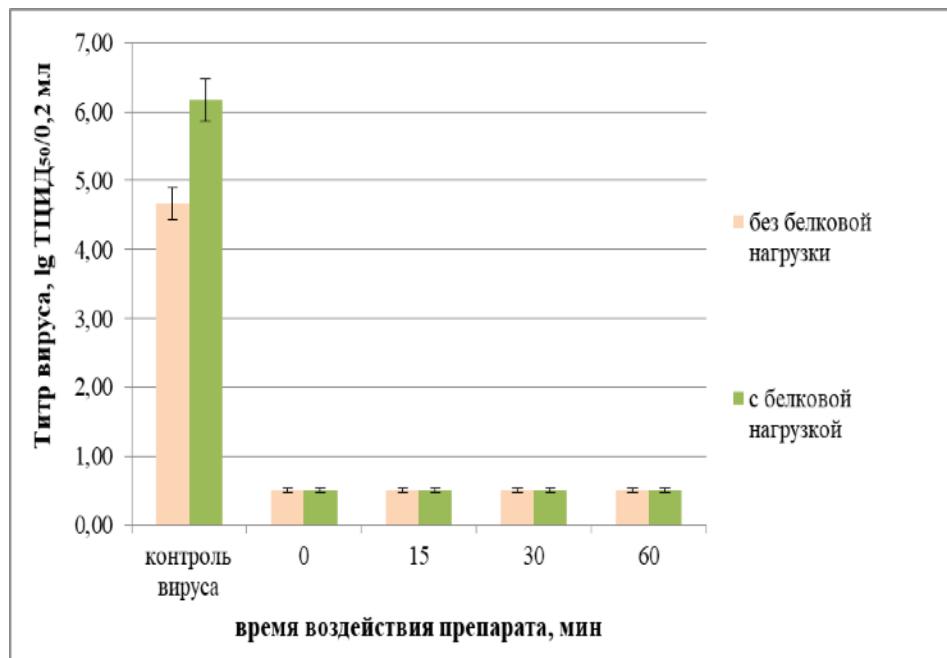
В ходе проведения эксперимента оценивали титр вируса непосредственно после смешивания вируса с исследуемым препаратом, а также через 0, 15, 30 и 60 минут после начала инкубации. Результаты представлены в таблице 1, а также на рисунках 1, 2.

**Таблица 1** – Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса гриппа А суспензионным методом

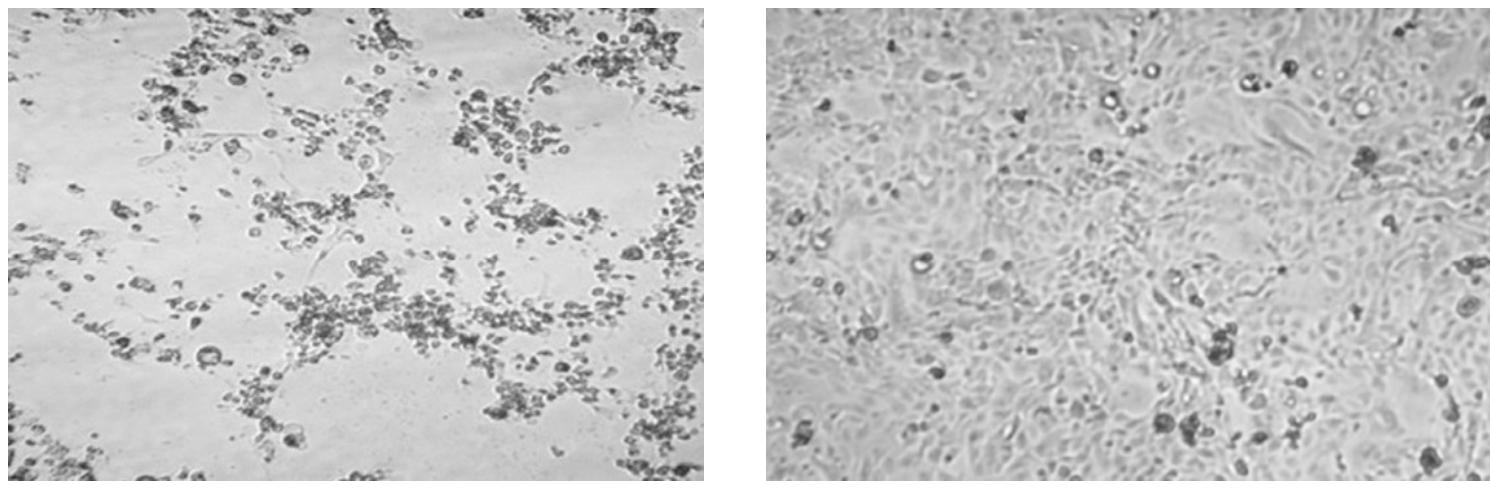
| Время воздействия препарата, минут | Белковая нагрузка | Среднее значение титра, lgТИД <sub>50</sub> | Разница по сравнению с контролем | % снижения инфекционной активности по сравнению с контролем |
|------------------------------------|-------------------|---|----------------------------------|---|
| Контроль вируса                    | Нет               | 4,67±0,58                                   | –                                | –   |
| 0                                  |                   | 0,5±0,0                                     | 4,17                             | 99,99   |
| 15                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 4,17                             | 99,99   |
| 30                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 4,17                             | 99,99   |
| 60                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 4,17                             | 99,99   |
| Контроль вируса                    | Есть              | 6,17±1,15                                   | –                                | –   |
| 0                                  |                   | 0,5±0,0                                     | 5,67                             | 100   |
| 15                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 5,67                             | 100   |
| 30                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 5,67                             | 100   |
| 60                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 5,67                             | 100   |

---

\*точка 0 подразумевает, что серия 10-кратных разведений была сделана из смеси вируса и исследуемого препарата немедленно после приготовления, что занимает несколько секунд, во время которых начинается контакт вируса и препарата



**Рисунок 1 – Результаты исследования вирулицидной активности исследуемого раствора в отношении вируса гриппа А сусpenзионным методом с белковой и без белковой нагрузки**



**Рисунок 2 – Воздействие исследуемого раствора на вирус гриппа типа А**  
**А – Инфицированная клеточная культура MDCK, 3 сутки после заражения**  
**Б - Клеточная культура MDCK после инактивации вируса гриппа исследуемым раствором**

Из данных, представленных в таблице и на графике, следует, что исследуемый раствор вызывал полную инактивацию (ниже предела детекции – 0,5 lg ТИД<sub>50</sub>) вируса гриппа А, начиная с точки 0 независимо от наличия белковой нагрузки.

## 2.2 Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса гриппа В

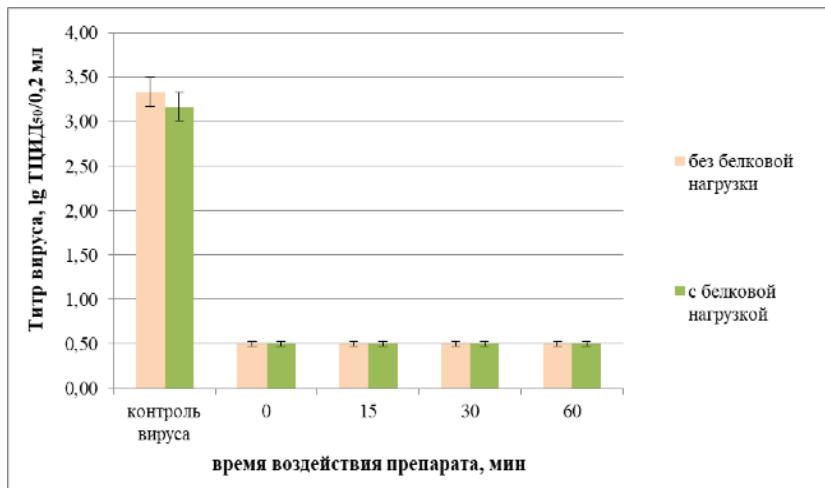
В ходе проведения эксперимента оценивали титр вируса непосредственно после смешивания вируса с исследуемым препаратом, а также через 0, 15, 30 и 60 минут после начала инкубации. Результаты представлены в таблице 2, а также на рисунках 3 и 4.

**Таблица 2** – Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса гриппа В суспензионным методом

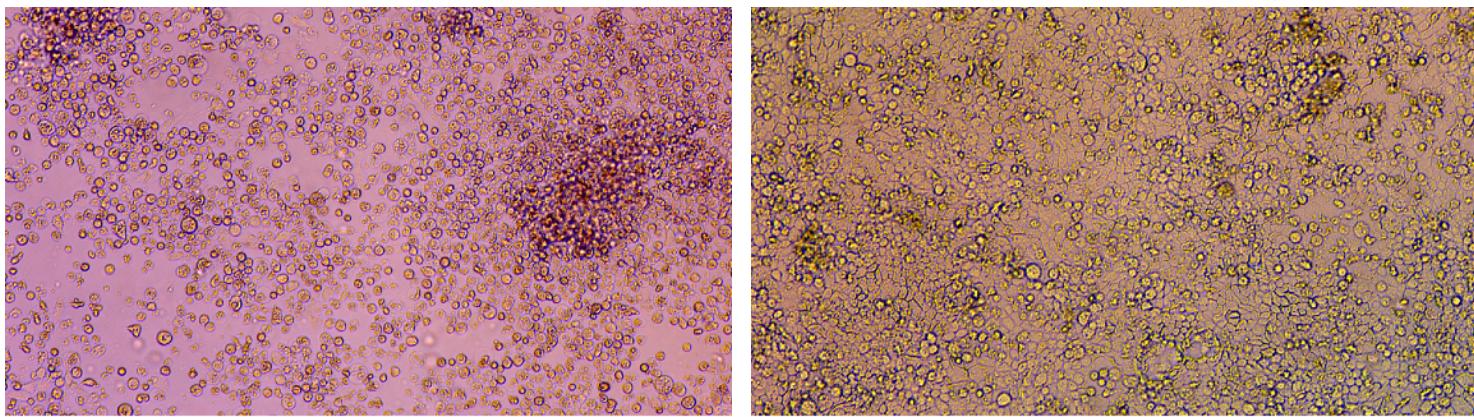
| Время воздействия препарата, минут | Белковая нагрузка | Среднее значение титра, lgТИД <sub>50</sub> | Разница по сравнению с контролем | % снижения инфекционной активности по сравнению с контролем |
|------------------------------------|-------------------|---|----------------------------------|---|
| Контроль вируса                    | Нет               | 3,33±0,29                                   | –                                | –   |
| 0                                  |                   | 0,5±0,0                                     | 2,83                             | 99,85   |
| 15                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 2,83                             | 99,85   |
| 30                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 2,83                             | 99,85   |
| 60                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 2,83                             | 99,85   |
| Контроль вируса                    |                   | 3,17±0,29                                   | –                                | –   |
| 0                                  | Есть              | 0,5±0,0                                     | 2,67                             | 99,78   |
| 15                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 2,67                             | 99,78   |
| 30                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 2,67                             | 99,78   |
| 60                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 2,67                             | 99,78   |

---

\*точка 0 подразумевает, что серия 10-кратных разведений была сделана из смеси вируса и исследуемого препарата немедленно после приготовления, что занимает несколько секунд, во время которых начинается контакт вируса и препарата



**Рисунок 3 – Результаты исследования вирулицидной активности исследуемого раствора в отношении вируса гриппа В супензионным методом с белковой и без белковой нагрузки**



A

B

**Рисунок 4 – Воздействие исследуемого раствора на вирус гриппа типа В**  
**А – Инфицированная клеточная культура MDCK, 3 сутки после заражения**  
**Б - Клеточная культура MDCK после инактивации вируса гриппа исследуемым раствором**

Из данных, представленных в таблице, на графике и фото, следует, что исследуемый раствор вызывал полную инактивацию вируса гриппа В, начиная с точки 0 независимо от наличия белковой нагрузки.

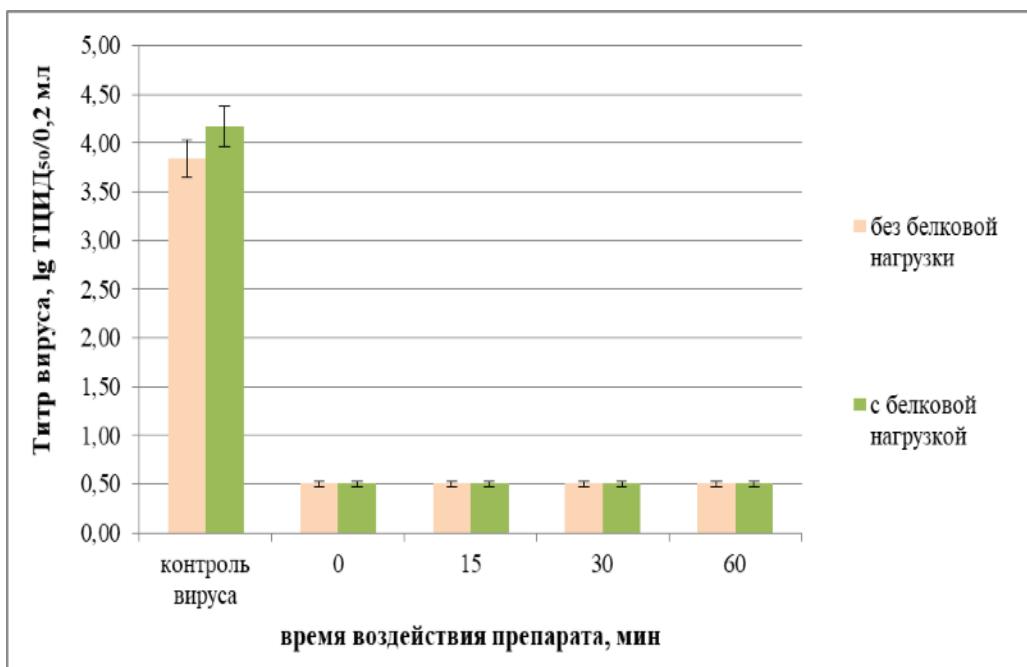
### **2.3 Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса респираторно-синцитиального вируса А2**

В ходе проведения эксперимента оценивали титр вируса непосредственно после смешивания вируса с исследуемым препаратом, а также через 0, 15, 30 и 60 минут после начала инкубации. Результаты представлены в таблице 3, на рисунках 5 и 6.

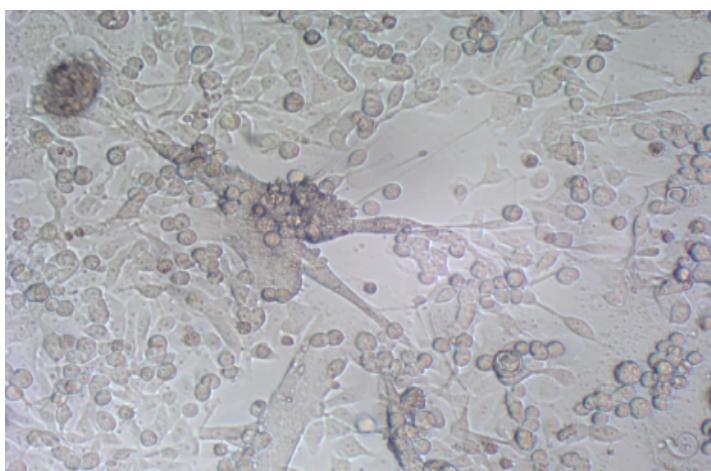
**Таблица 3 – Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении РСВ А2 супензионным методом**

| Время воздействия препарата, минут | Белковая нагрузка | Среднее значение титра, $\lg \text{ТИД}_{50}$ | Разница по сравнению с контролем | % снижения инфекционной активности по сравнению с контролем |
|------------------------------------|-------------------|---|----------------------------------|---|
| Контроль вируса                    | Нет               | 3,83±0,29                                     | –                                | –   |
| 0                                  |                   | 0,5±0,0                                       | 3,33                             | 99,95   |
| 15                                 |                   | 0,5±0,0                                       | 3,33                             | 99,95   |
| 30                                 |                   | 0,5±0,0                                       | 3,33                             | 99,95   |
| 60                                 |                   | 0,5±0,0                                       | 3,33                             | 99,95   |
| Контроль вируса                    |                   | 4,17±0,76                                     | –                                | –   |
| 0                                  | Есть              | 0,5±0,0                                       | 3,67                             | 99,98   |
| 15                                 |                   | 0,5±0,0                                       | 3,67                             | 99,98   |
| 30                                 |                   | 0,5±0,0                                       | 3,67                             | 99,98   |
| 60                                 |                   | 0,5±0,0                                       | 3,67                             | 99,98   |

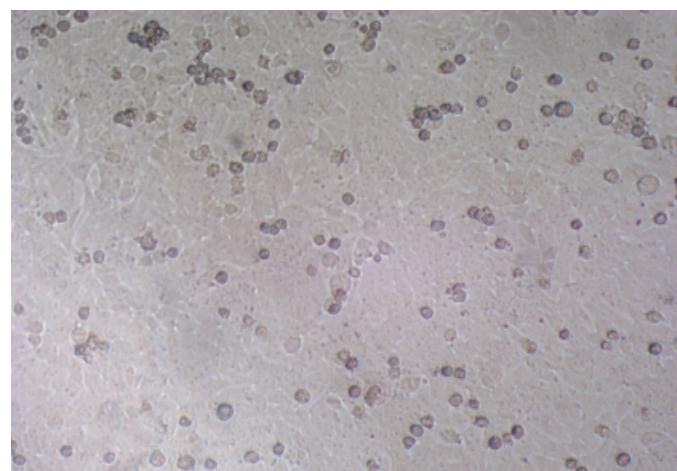
\*точка 0 подразумевает, что серия 10-кратных разведений была сделана из смеси вируса и исследуемого препарата немедленно после приготовления, что занимает несколько секунд, во время которых начинается контакт вируса и препарата



**Рисунок 5 – Результаты исследования вирулицидной активности исследуемого раствора в отношении PCB A2 суспензионным методом с белковой и без белковой нагрузки**



А



Б

**Рисунок 6 – Воздействие исследуемого раствора на PCB A2**

А – Инфицированная клеточная культура Нер-2, 6 сутки после заражения  
Б - Клеточная культура Нер-2 после инактивации PCB A2 исследуемым раствором

Из данных, представленных в таблице, на графике и фото, следует, что исследуемый раствор вызывал полную инактивацию PCB A2, начиная с точки 0, независимо от наличия белковой нагрузки.

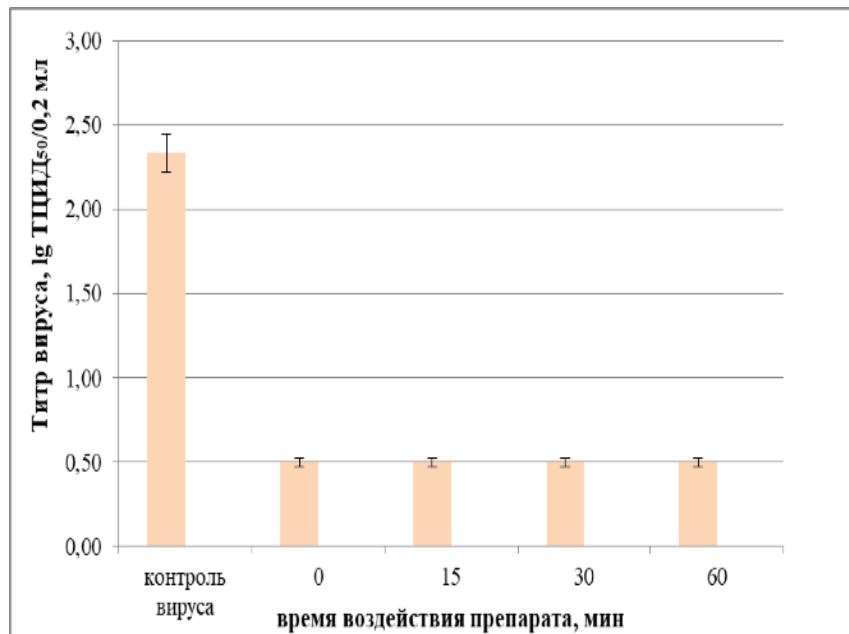
#### **2.4 Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении риновируса**

В ходе проведения эксперимента оценивали титр вируса непосредственно после смешивания вируса с исследуемым препаратом, а также через 0, 15, 30 и 60 минут после начала инкубации. Результаты представлены в таблице 4, на рисунках 7 и 8.

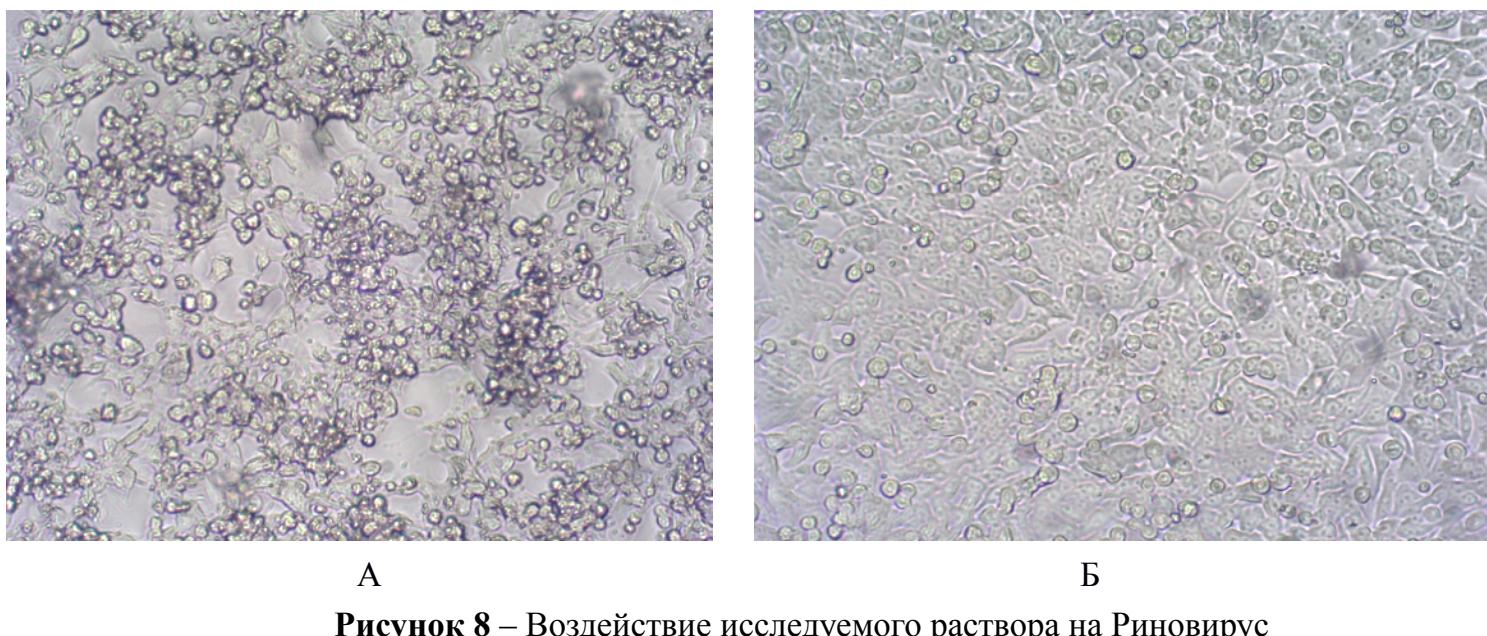
**Таблица 4 – Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении риновируса супензионным методом**

| Время воздействия препарата, минут | Белковая нагрузка | Среднее значение титра, IgТИД <sub>50</sub> | Разница по сравнению с контролем | % снижения инфекционной активности по сравнению с контролем |
|------------------------------------|-------------------|---|----------------------------------|---|
| Контроль вируса                    | Нет               | 2,33±0,29                                   | –                                | –   |
| 0                                  |                   | 0,5±0,0                                     | 1,83                             | 98,53   |
| 15                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 1,83                             | 98,53   |
| 30                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 1,83                             | 98,53   |
| 60                                 |                   | 0,5±0,0                                     | 1,83                             | 98,53   |

\*точка 0 подразумевает, что серия 10-кратных разведений была сделана из смеси вируса и исследуемого препарата немедленно после приготовления, что занимает несколько секунд, во время которых начинается контакт вируса и препарата



**Рисунок 7 – Результаты исследования вирулицидной активности исследуемого раствора в отношении риновируса супензионным методом без белковой нагрузки**



**Рисунок 8 – Воздействие исследуемого раствора на Риновирус**  
 А – Инфицированная клеточная культура Нер-2, 6 сутки после заражения  
 Б - Клеточная культура Нер-2 после инактивации риновируса исследуемым раствором

Из данных, представленных в таблице, на графике и фото, следует, что исследуемый раствор вызывал полную инактивацию риновируса, начиная с точки 0, без белковой нагрузки. При наличии белковой нагрузки происходило полное ингибирование репликации вируса в лунках контроля и опытных образцах, что не дало возможности оценить наличие вирулицидных свойств раствора в данных условиях.

## 2.5 Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении коронавируса

В ходе проведения эксперимента оценивали титр вируса непосредственно после смешивания вируса с исследуемым препаратом, а также через 0, 15, 30 и 60 минут после начала инкубации. Результаты представлены в таблице 5, на рисунках 9 и 10.

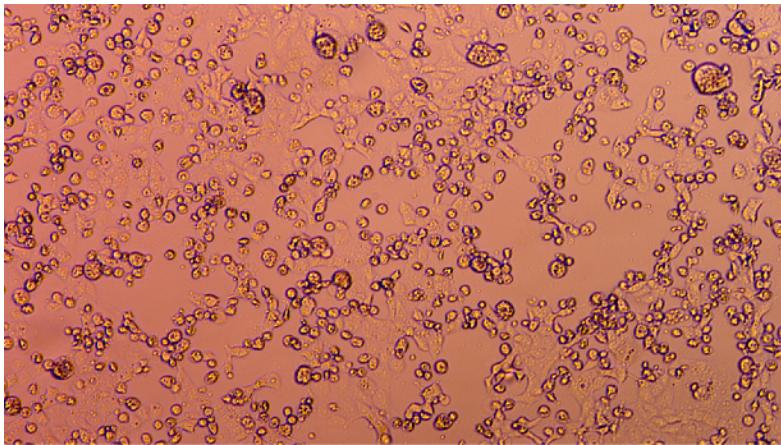
**Таблица 5** – Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении коронавируса супензионным методом

| Время воздействия препарата, минут | Белковая нагрузка | Среднее значение титра, $\lg TID_{50}$ | Разница по сравнению с контролем | % снижения инфекционной активности по сравнению с контролем |
|------------------------------------|-------------------|--|----------------------------------|---|
| Контроль вируса                    | Нет               | 2,83±0,29                              | –                                | –   |
| 0                                  |                   | 0,5±0,0                                | 2,33                             | 99,54   |
| 15                                 |                   | 0,5±0,0                                | 2,33                             | 99,54   |
| 30                                 |                   | 0,5±0,0                                | 2,33                             | 99,54   |
| 60                                 |                   | 0,5±0,0                                | 2,33                             | 99,54   |

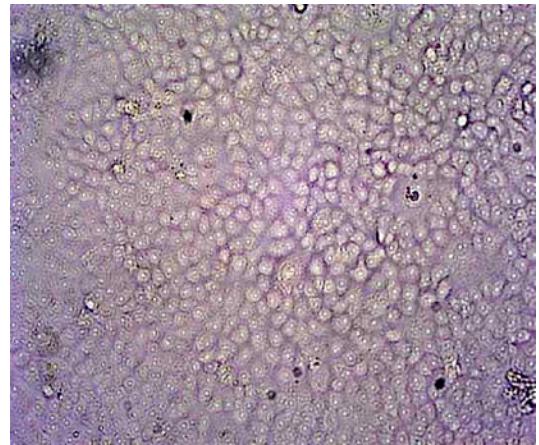
\*точка 0 подразумевает, что серия 10-кратных разведений была сделана из смеси вируса и исследуемого препарата немедленно после приготовления, что занимает несколько секунд, во время которых начинается контакт вируса и препарата



**Рисунок 9** – Результаты исследования вирулицидной активности исследуемого раствора в отношении коронавируса супензионным методом без белковой нагрузки



A



B

**Рисунок 10 – Воздействие исследуемого раствора на коронавирус**

А – Инфицированная клеточная культура Vero E6, 2 сутки после заражения

Б - Клеточная культура Vero E6 после инактивации коронавируса исследуемым раствором

Из данных, представленных в таблице, на графике и фото, следует, что исследуемый раствор вызывал полную инактивацию коронавируса, начиная с точки 0, без белковой нагрузки. При наличии белковой нагрузки происходила блокировка репликации вируса в лунках контроля и опытных образцах, что не дало возможности оценить наличие вирулицидных свойств раствора в данном эксперименте.

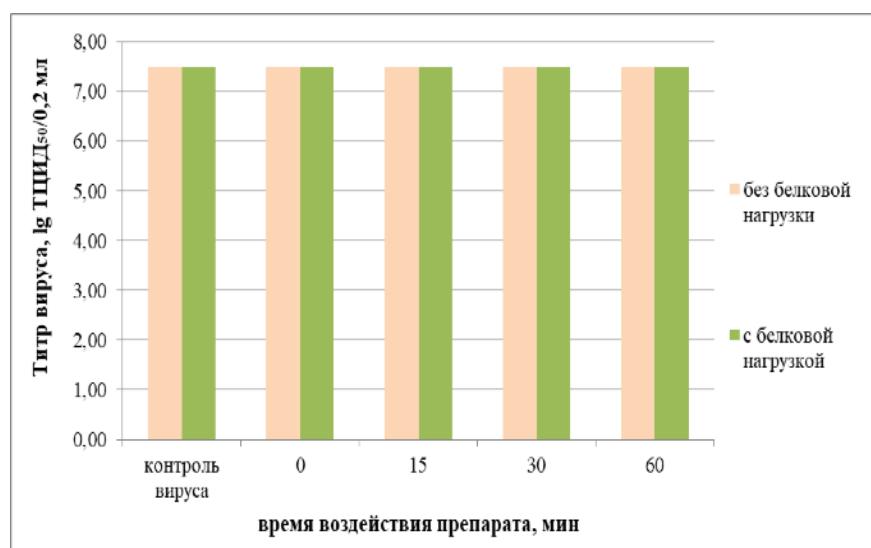
## 2.6 Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении аденоовируса

В ходе проведения эксперимента оценивали титр вируса непосредственно после смешивания вируса с исследуемым препаратом, а также через 0, 15, 30 и 60 минут после начала инкубации. Результаты представлены в таблице 6, на рисунках 11 и 12.

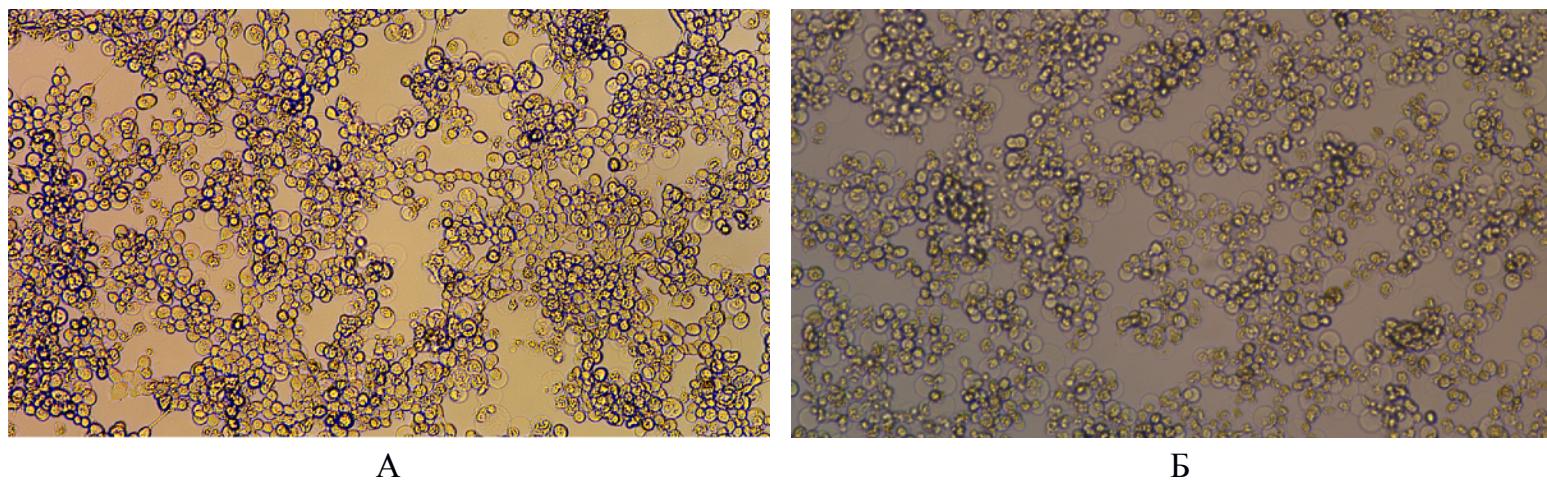
**Таблица 6 – Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении аденоовируса суспензионным методом**

| Время воздействия препарата, минут | Белковая нагрузка | Среднее значение титра, IgТИД <sub>50</sub> | Разница по сравнению с контролем | % снижения инфекционной активности по сравнению с контролем |
|------------------------------------|-------------------|---|----------------------------------|---|
| Контроль вируса                    | Нет               | >7,5  | –                                | –   |
| 0                                  |                   | >7,5  | 0,00                             | 0,00  |
| 15                                 |                   | >7,5  | 0,00                             | 0,00  |
| 30                                 |                   | >7,5  | 0,00                             | 0,00  |
| 60                                 |                   | >7,5  | 0,00                             | 0,00  |
| Контроль вируса                    | Есть              | >7,5  | –                                | –   |
| 0                                  |                   | >7,5  | 0,00                             | 0,00  |
| 15                                 |                   | >7,5  | 0,00                             | 0,00  |
| 30                                 |                   | >7,5  | 0,00                             | 0,00  |
| 60                                 |                   | >7,5  | 0,00                             | 0,00  |

\*точка 0 подразумевает, что серия 10-кратных разведений была сделана из смеси вируса и исследуемого препарата немедленно после приготовления, что занимает несколько секунд, во время которых начинается контакт вируса и препарата



**Рисунок 11** – Результаты исследования вирулицидной активности исследуемого раствора в отношении аденоовириуса супензионным методом с белковой и без белковой нагрузки



**Рисунок 12** – Воздействие исследуемого раствора на аденоовириус  
А – Инфицированная клеточная культура А549, 5 сутки после заражения  
Б - Клеточная культура А549 после воздействия исследуемого раствора на аденоовириус

Из данных, представленных в таблице, на графике и фото, следует, что исследуемый раствор не инактивировал аденоовириус во всех временных точках независимо от наличия белковой нагрузки.

## **2.7 Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса парагриппа**

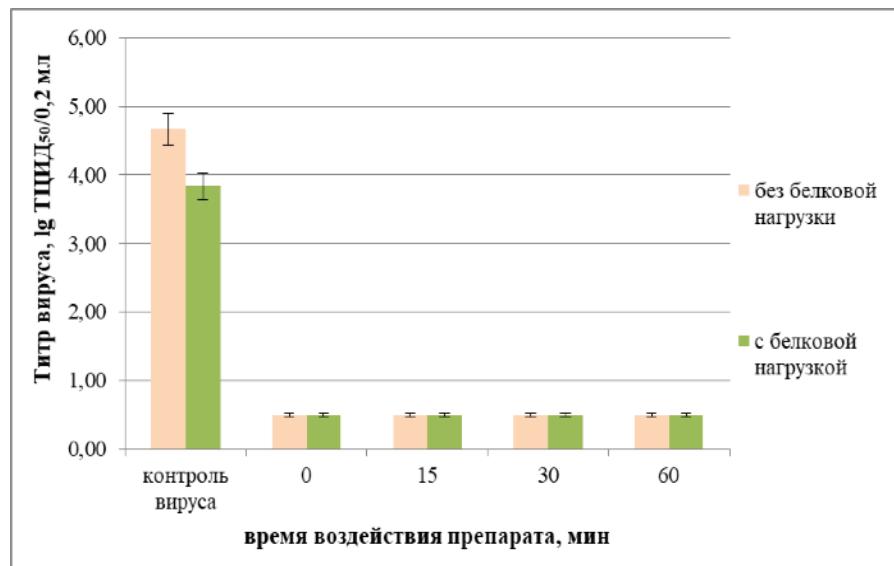
В ходе проведения эксперимента оценивали титр вируса непосредственно после смешивания вируса с исследуемым препаратом, а также через 0, 15, 30 и 60 минут после начала инкубации. Результаты представлены в таблице 7, на рисунок 13 и 14.

**Таблица 7 – Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вируса парагриппа супензионным методом**

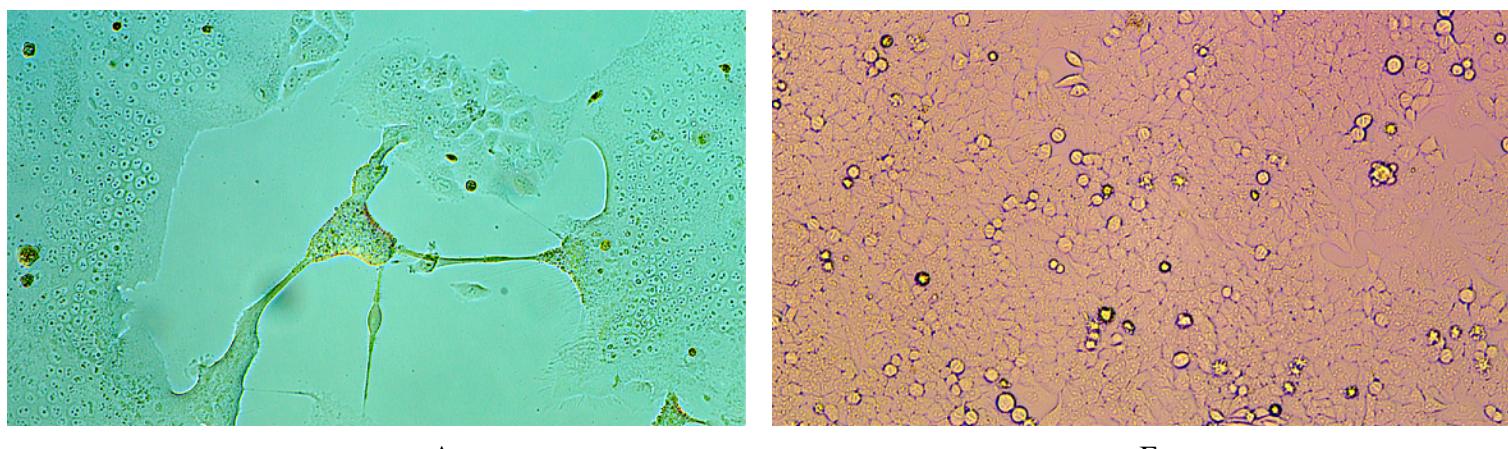
| Время воздействия препарата, минут | Белковая нагрузка | Среднее значение титра, $\lg\text{ТИД}_{50}$ | Разница по сравнению с контролем | % снижения инфекционной активности по сравнению с контролем |
|------------------------------------|-------------------|--|----------------------------------|---|
| Контроль вируса                    | Нет               | 4,67±0,58                                    | –                                | –   |
| 0                                  |                   | 0,5±0,0                                      | 4,17                             | 99,99   |
| 15                                 |                   | 0,5±0,0                                      | 4,17                             | 99,99   |
| 30                                 |                   | 0,5±0,0                                      | 4,17                             | 99,99   |
| 60                                 |                   | 0,5±0,0                                      | 4,17                             | 99,99   |
| Контроль вируса                    |                   | 3,83±0,29                                    | –                                | –   |
| 0                                  | Есть              | 0,5±0,0                                      | 3,33                             | 99,95   |
| 15                                 |                   | 0,5±0,0                                      | 3,33                             | 99,95   |
| 30                                 |                   | 0,5±0,0                                      | 3,33                             | 99,95   |
| 60                                 |                   | 0,5±0,0                                      | 3,33                             | 99,95   |

---

\*точка 0 подразумевает, что серия 10-кратных разведений была сделана из смеси вируса и исследуемого препарата немедленно после приготовления, что занимает несколько секунд, во время которых начинается контакт вируса и препарата



**Рисунок 13 – Результаты исследования вирицидной активности исследуемого раствора в отношении вируса парагриппа супензионным методом с белковой и без белковой нагрузки**



**Рисунок 14 – Воздействие исследуемого раствора на Парагрипп 3 типа**  
**А – Инфицированная клеточная культура Нер-2, 24 часа после заражения**  
**Б - Клеточная культура Нер-2 после инактивации вируса парагриппа**  
**исследуемым раствором**

Из данных, представленных в таблице и на графике, следует, что исследуемый раствор вызывал полную инактивацию вируса парагриппа, начиная с точки 0, независимо от наличия белковой нагрузки.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Было проведено исследование вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вирусов гриппа типа А и В, респираторно-синцитиального вируса, риновируса, коронавируса, аденоовируса и вируса парагриппа.

Показано, что раствор для приготовления жевательного мармелада обладает выраженной вирулицидной активностью в отношении всех исследуемых вирусов, за исключением аденоовируса. В опытах без белковой нагрузки происходила полная инактивация исследуемых вирусов во всех временных точках забора материала (0, 15, 30 и 60 минут), за исключением аденоовируса. В опытах с белковой нагрузкой у риновируса и коронавируса наблюдали отсутствие репликации вируса на культуре клеток, как в контрольных лунках, так и в лунках с исследуемым образцом. В связи, с чем невозможно оценить наличие вирулицидных свойств у данных вирусов при белковой нагрузке. В опытах с белковой нагрузкой у аденоовируса было показано отсутствие вирулицидной активности у исследуемого раствора.

Поскольку, согласно методическим указаниям по оценке вирулицидной активности дезинфицирующих средств [9], «*эффективным считают средство (субстанцию), обеспечивающее инактивацию вируса при времени воздействия не более 60 мин*», то представляется возможным утверждать, что раствор для приготовления жевательного мармелада обладает эффективной вирулицидной активностью в отношении вирусов гриппа типа А и В, респираторно-синцитиального вируса, риновируса, коронавируса, а также вируса парагриппа при исследовании супензионным методом.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Gasparini R., Amicizia D., Lai P.L., Bragazzi N.L., Panatto D. Compounds with anti-influenza activity: present and future of strategies for the optimal treatment and management of influenza. Part I: influenza life-cycle and currently available drugs// Journal of preventive medicine and hygiene – 2014 - V55(3) - P.69-85.
2. Карпова Л. С., Смородинцева Е. А., Сысоева Т. И., Столярова Т. П., Поповцева Н. М., Столяров К. А., Даниленко Д. М., Цыбалова Л. М. Распространенность РС-вирусной инфекции и других ОРВИ не гриппозной этиологии у детей и взрослых в регионах России в 2014–2016 годах // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика – 2018 - № 2 (99), С.16-26.
3. David A. Jans and Reena Ghildyal (eds.), *Rhinoviruses: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1221, DOI 10.1007/978-1-4939-1571-2, © Springer Science+Business Media - New York – 2015.
4. Центр по контролю и профилактике заболеваний: официальный сайт. URL: <https://www.cdc.gov/parainfluenza/symptoms.html> (дата обращения: 04.05.2023).
5. Центр по контролю и профилактике заболеваний: официальный сайт. URL: <https://www.cdc.gov/adenovirus/index.html> (дата обращения: 04.05.2023).
6. Электронный ресурс для врачей и пациентов: официальный сайт. URL: <https://www.uptodate.com/contents/covid-19-epidemiology-virology-and-prevention>(дата обращения: 04.05.2023).
7. Острые респираторные заболевания // Дрейзин Р.С., Астафьевая Н.В. – М.:Медицина, 1991. – С.52-67.
8. Reed, L.J. A simple method of estimating fifty percent endpoints // L.J. Reed, H. Muench / American Journal of Epidemiology. – 1938. – V.27. – P. 493-497.
9. Изучение и оценка вирулицидной активности дезинфицирующих средств: Методические указания—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010 – 39 с.

## **ПРИЛОЖЕНИЕ**

### **1. Описание исследуемого препарата, описание образцов для анализа и состав образцов для анализа**

**Описание исследуемого препарата:** Пастилки для жевания, рассасывания, проглатывания в целом виде; или другого способа применения местно в полости рта или внутрь, размером 2\*2\*1 см; правильной формы, квадратные по большим размерам и слаженные с одной стороны, однородные с включениями, темно-зеленого цвета, не прозрачные, **Рисунок 15.**



**Описание образцов для анализа:** Раствор-суспензия однородный с включениями, темно-зеленого цвета, не прозрачный.

#### **Состав образцов для анализа:**

Стевия - 4,5%

Гуммиарабик - 6%

Ксилит - 1%

Сорбитол - 2%

Сок пихты - 4,5%

Имбирь - 0,75%

Кверцетин - 0,15%

Хвойный экстракт - 0,15%

Хлорофилл из шпината - 0,18%

Хлорофилл - 0,07%

Экстракт ламинарии - 0,04%

Паста хвойная - 0,15%

Лимонная кислота - 0,46%

Бензоат натрия - 0,23%

Ароматизатор натуральный ананас - 0,05%

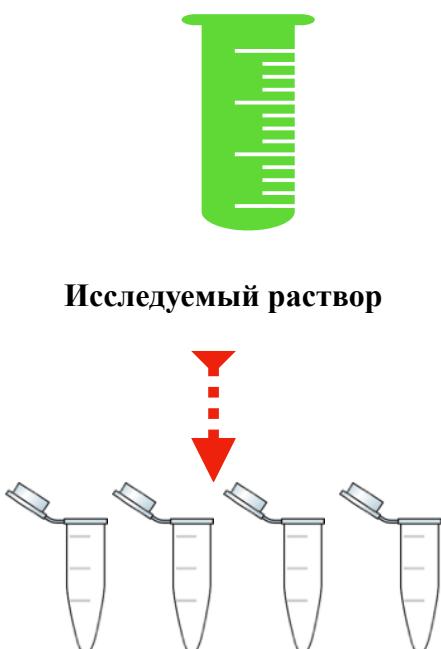
Ароматизатор натуральный клубника - 0,05%

**Объем образца - 100 мл**

## 2. Дизайн исследования

**Этап 1.** Внесение в пробирки исследуемого раствора

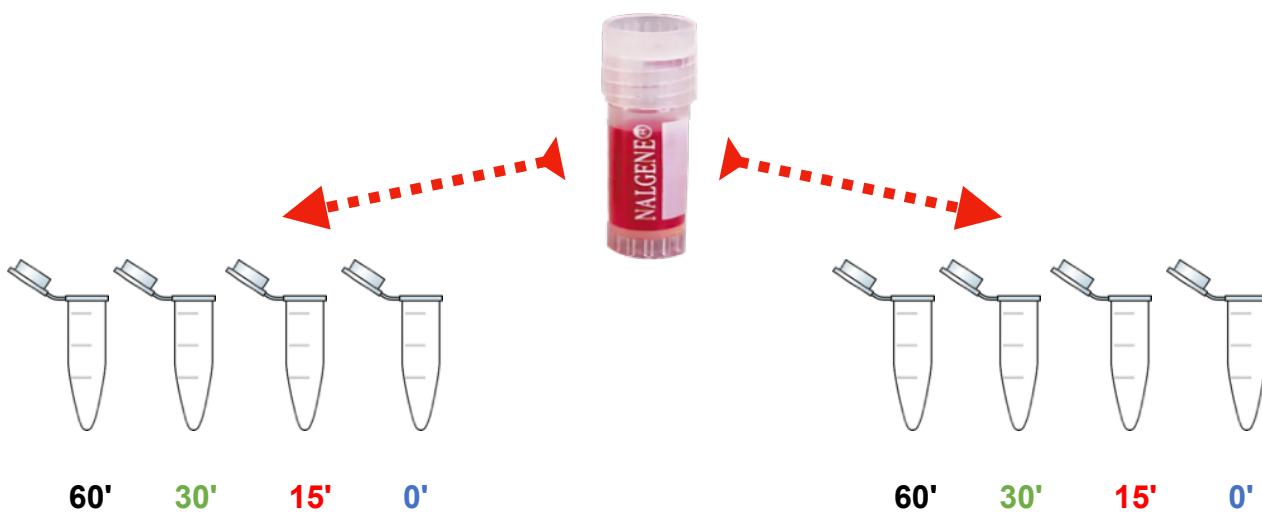
**Опыт без белковой нагрузки**



**Опыт с белковой нагрузкой**



**Этап 2.** Последовательное внесение тест-вируса в пробирки и инкубация содержимого пробирок 0, 15, 30 и 60 минут



Белковая нагрузка - стандартизированное загрязнение, инактивированная сыворотка КРС из расчета 40 % ее концентрации в смеси вирус - дезинфектант.

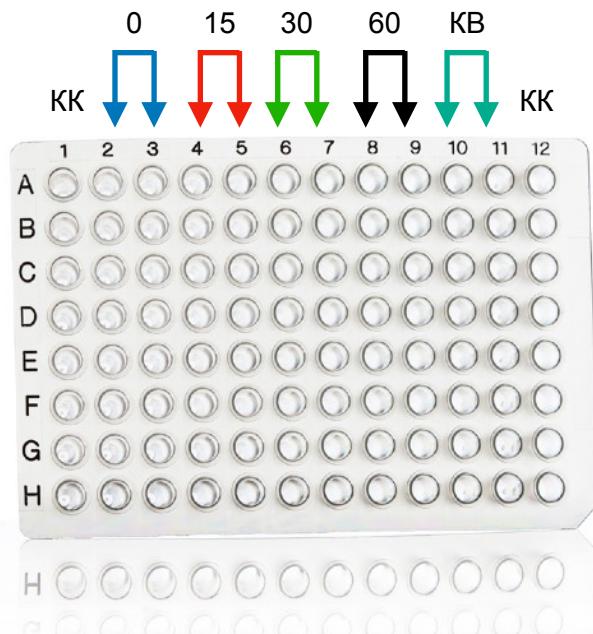
### Этап 3. Определение тест-вируса на чувствительной культуре клеток в 96-луночном планшете

3.1 Сброс ростовой среды с 96-луночных планшетов с клетками

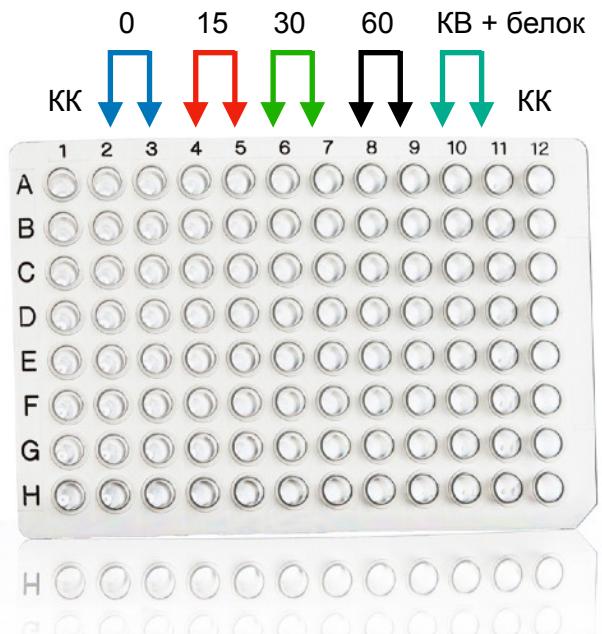
3.2 Внесение 270 мкл поддерживающей среды

3.3 Внесение 30 мкл из каждого эпендорфа в ряд A1-A12 по 2 повтора на каждую пробирку

3.4 Растировка по 30 мкл с ряда А по ряд G. Столбцы 1 и 12, а также ряд H – клеточный контроль



Планшет без белковой нагрузки



Планшет с белковой нагрузки

3.5 Инкубация 1 час при +37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе



\*КВ (Контроль вируса)

3.6 Сброс среды с исследуемым раствором (однократная промывка средой) и внесение среды по 200 мкл в весь планшет

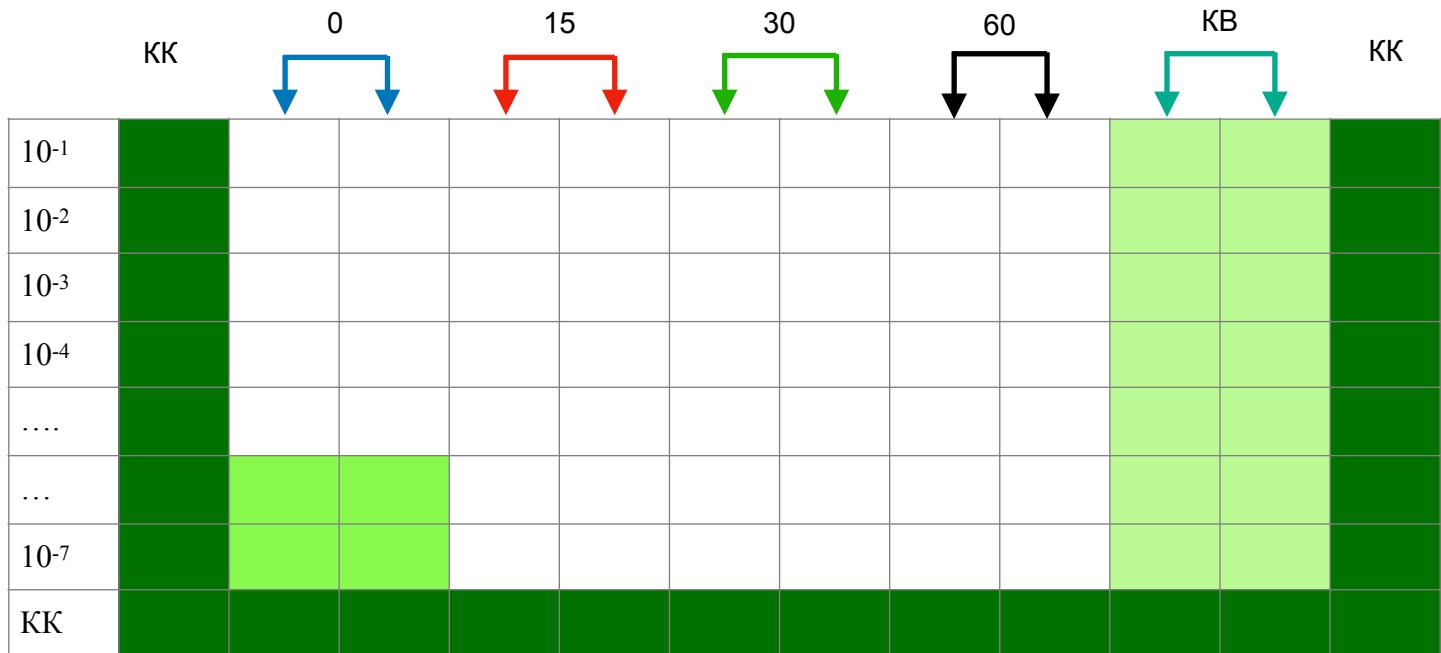
### 3.7 Инкубация от 3 до 6 суток при +37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в зависимости от тест-вируса



### 3.8 Оценка результатов эксперимента

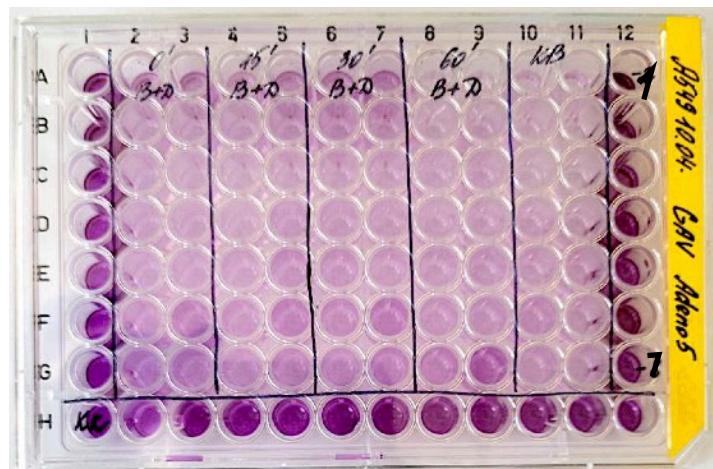
| Тест-вирус       | Срок инкубации, сутки | Метод детекции вируса |
|------------------|-----------------------|-----------------------|
| Грипп А          | 3                     | РГА                   |
| Грипп В          | 3                     | РГА                   |
| Аденовирус       | 5                     | МТТ                   |
| Риновирус        | 6                     | ЦПД                   |
| PCB A2           | 6                     | ИФА                   |
| Парагрипп 3 типа | 6                     | ИФА                   |
| Коронавирус      | 3                     | ЦПД                   |

Цветовой градиент, обозначающий снижение концентраций препарата и вируса при раститровке в планшете.



\*KK – контроль клеток (=отрицательный контроль)

**3. Фотографии рабочих планшетов, оценка вирулицидной активности в отношении вирусов на культуре клеток после добавления исследуемого раствора для приготовления жевательного мармелада без белковой нагрузки/с белковой нагрузкой**

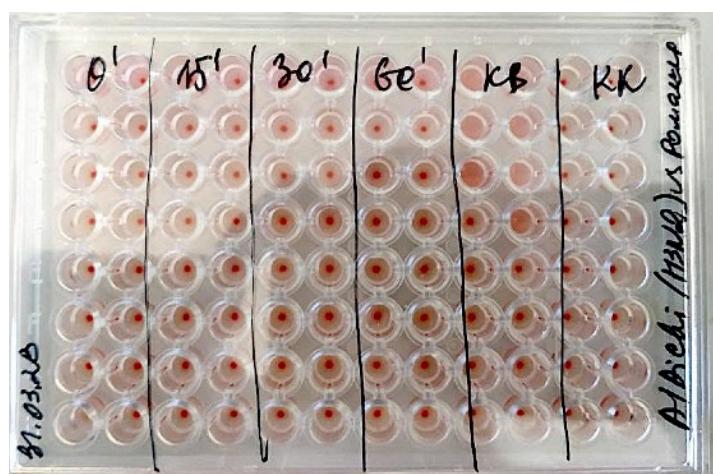


А

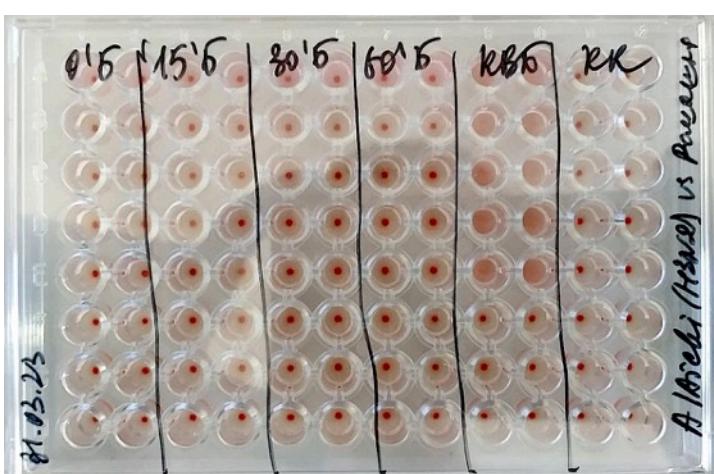


Б

**Рисунок 16.** Оценка вирулицидной активности в отношении аденоовириуса 5 типа на культуре клеток А549 методом МТТ. А - без белковой нагрузки, Б - с белковой нагрузкой

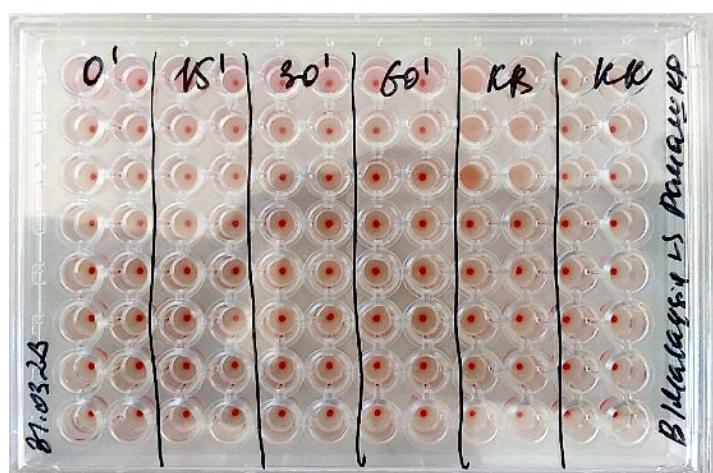


А

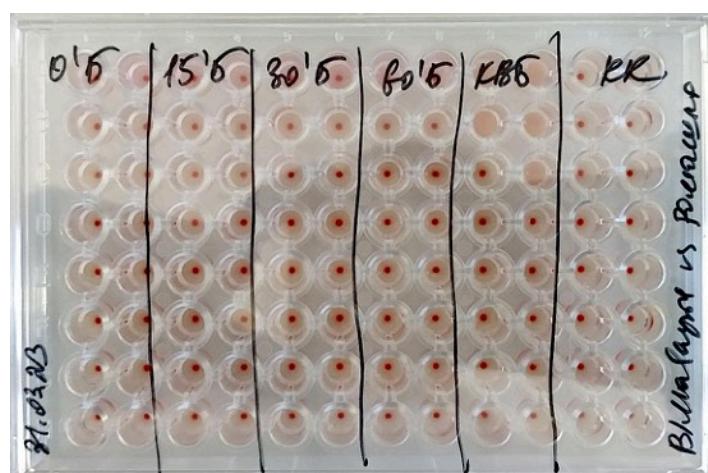


Б

**Рисунок 17.** Оценка вирулицидной активности в отношении вируса гриппа А на культуре клеток MDCK методом РГА. А - без белковой нагрузки, Б - с белковой нагрузкой

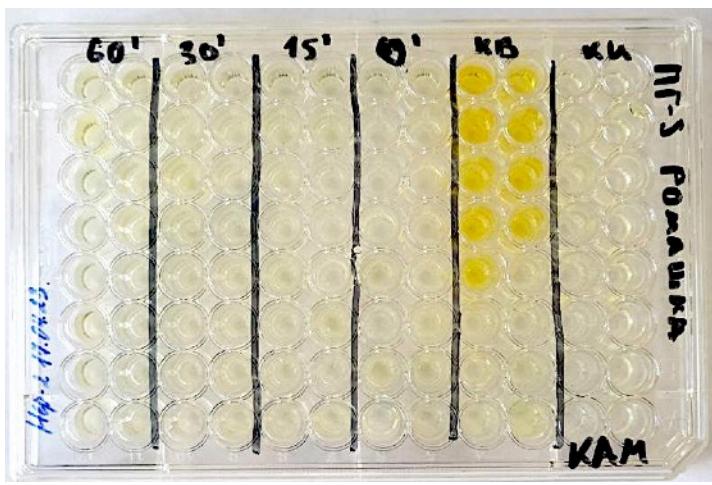


А



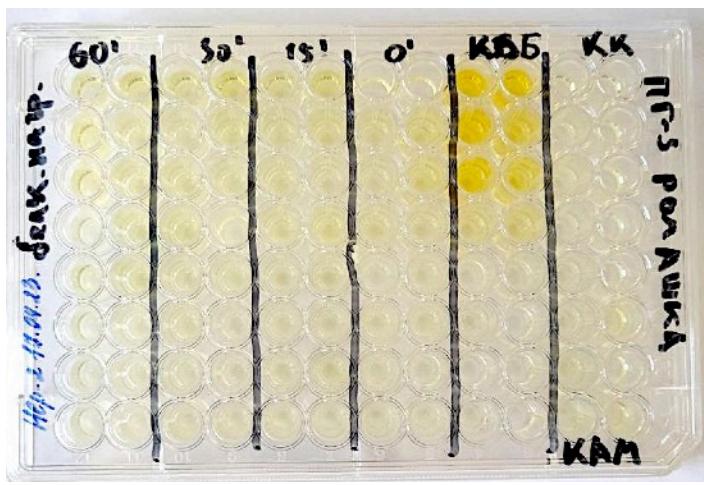
Б

**Рисунок 18.** Оценка вирулицидной активности в отношении вируса гриппа В на культуре клеток MDCK методом РГА. А - без белковой нагрузки, Б - с белковой нагрузкой

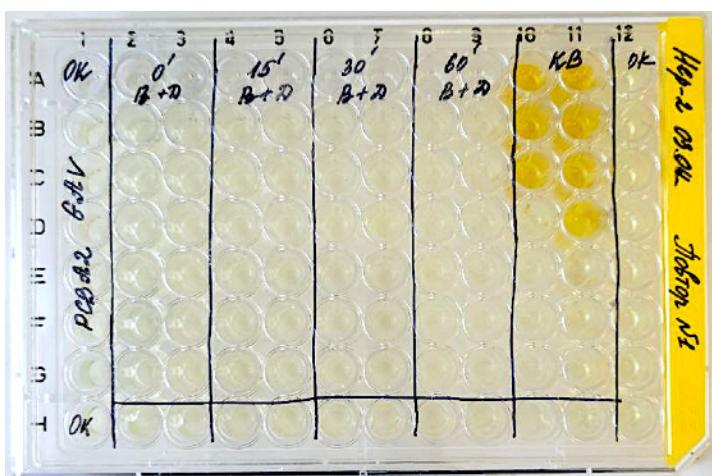


А

**Рисунок 19.** Оценка вирулицидной активности в отношении вируса парагриппа типа 3 на культуре клеток Нер-2 методом ИФА. А - без белковой нагрузки, Б - с белковой нагрузкой

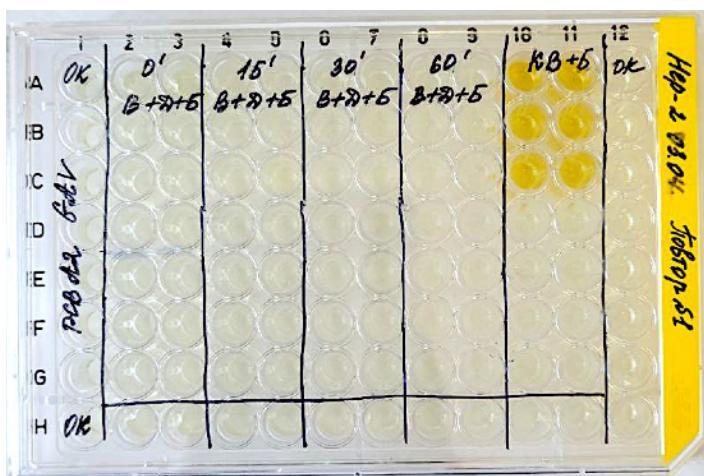


Б

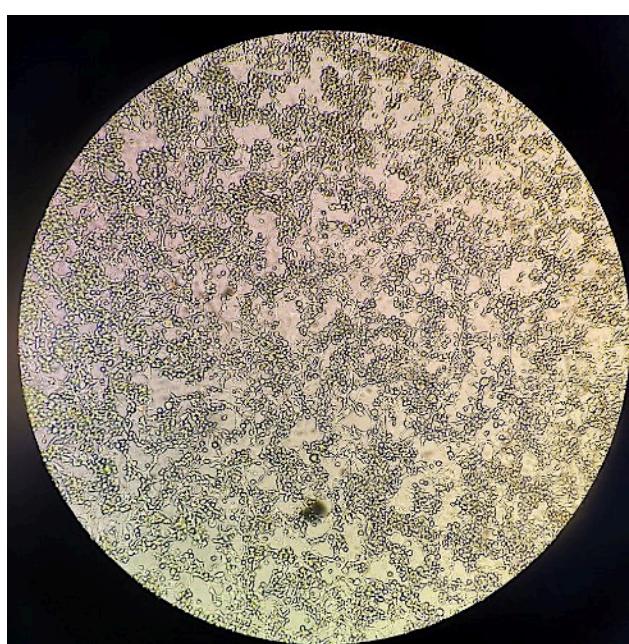


А

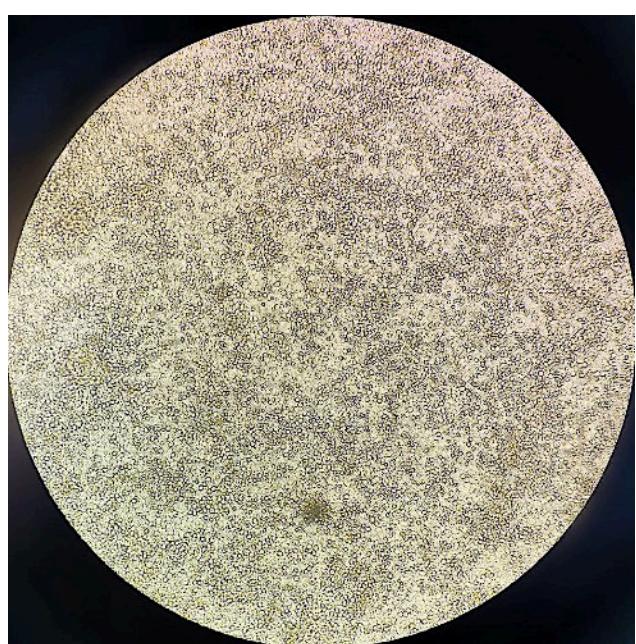
**Рисунок 20.** Оценка вирулицидной активности в отношении респираторно-синцитиального вируса на культуре клеток Нер-2 методом ИФА. А - без белковой нагрузки, Б - с белковой нагрузкой



Б



А



Б

**Рисунок 20.** Визуальная оценка вирулицидной активности исследуемого раствора на культуре клеток Нер-2 в одной из лунок опытного планшета. А - ЦПД риновируса в одной лунке контроля вируса, Б - клеточная культура Нер-2 после инактивации вируса парагриппа исследуемым раствором в одной из лунок