

Тест система: оценка снижения репродукции вируса SARS-CoV2 в клеточной культуре Vero E6

Мишень/тест-система	Клеточная культура
Клеточная линия (при наличии)	Vero E6
Метод детекции	Визуально
Активность	Ингибирование бляшкообразования
Методы контроля	Положительный контроль: молнупиравир Отрицательный контроль: ДМСО

Краткое описание тест-системы

Клеточная культура Vero E6 (почечный эпителий зеленой мартышки), чувствительна к заражению вирусом SARS-CoV2.

Протокол

Оценка эффективности препарата проводится по снижению количества образованных вирусом негативных колоний («бляшек») в присутствии препарата по сравнению с отрицательным контролем.

№	Процесс	Комментарии
1	Посев клеточной культуры на 6-луночный планшет	За сутки до начала эксперимента
2	Контроль конfluenceности монослоя	Визуально, с использованием светового микроскопа
3	Преинкубация препарата с клеточной культурой	1 час, при 5% CO ₂ и t= 37°C
4	Инкубация вируса с клеточной культурой	2 часа, при 5% CO ₂ и t= 37°C
5	Удаление инокулята, промывание монослоя поддерживающей средой и добавление твердой покровной среды с содержанием 0.9% агара	
6	Инкубация клеточной культуры под покровной средой	3-6 суток в зависимости от штамма при 5% CO ₂ и t= 37°C
7	Удаление покровной среды, фиксация и окрашивание клеток	
8	Подсчет количества бляшек в каждой лунке	

Интерпретация результатов

По окончании эксперимента подсчитывают количество бляшек в каждой лунке. Титр вируса (Т) рассчитывают по формуле:

$$T = \frac{N_{\text{бляшек}} \times Dil}{V}$$

где $N_{\text{бляшек}}$ – среднее арифметическое количество бляшек, Dil – разведение вирусосодержащего материала, V – объем заражающей дозы.

Показателем эффективности препарата является существенное снижение титра вируса по сравнению с отрицательным контролем.

Ссылки на методику или ее аналоги, описанные в литературе (при наличии)

- 1- Mendoza EJ, Manguiat K, Wood H, Drebot M. Two Detailed Plaque Assay Protocols for the Quantification of Infectious SARS-CoV-2. *Curr Protoc Microbiol.* 2020 Jun;57(1):eCPMC105. doi: 10.1002/cpmc.105. PMID: 32475066; PMCID: PMC7300432.
- 2- Lin, YC., Malott, R.J., Ward, L. *et al.* Detection and quantification of infectious severe acute respiratory coronavirus-2 in diverse clinical and environmental samples. *Sci Rep* **12**, 5418 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09218-5>
- 3- Case J. B., Bailey A.L., Kim A.S., Chen R. E., Diamond M. S. Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2, *Virology*, V. 548, 2020, P. 39-48, ISSN 0042-6822, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.05.015>.

Препарат сравнения, использованный для валидации методики; результаты валидации

Молнупиравир – полная элиминация вирусной репродукции при использовании в максимальной нетоксичной концентрации (титр вируса = 0).

Дополнительные характеристики

Количество вещества для проведения одного исследования	20 мг
Производительность тест-системы	8 веществ в неделю

Организация

ФГБУ «НИИ гриппа им.А.А.Смородинцева» Минздрава России, г.Санкт-Петербург, ул.проф. Попова, 15/17

Контактное лицо

Штро Анна Андреевна, эл. почта: anna.shtro@influenza.spb.ru