

И.Е. Аграновский¹, А.Н.Сергеев², О.В. Пьянков², В.А. Петрищенко²,
А.П. Агафонов², Г.М. Игнатьев², А.И. Бородулин², А.С. Сафатов²

Тестирование нового персонального пробоотборника для обнаружения жизнеспособных вирусов в аэрозоле

¹ Университет Гриффитса, г. Брисбен, Австралия,

² ГНЦ ВБ «Вектор», пос. Кольцово Новосибирской обл., Россия

Поступила в редакцию 20.02.2004 г.

Представлены результаты тестирования нового персонального пробоотборника с использованием вирусов с различной устойчивостью в окружающей среде: грипп, корь, паротит, осповакцина и вирус атипичной пневмонии. Показано, что при пробоотборе даже для довольно лабильного вируса гриппа инактивируется примерно 80% его биологической активности, тогда как для устойчивого вируса осповакцины инаktivация составляет примерно 10%. При нахождении внутри пробоотборника при комнатной температуре в течение 4 ч теряется до 1,5 логарифмов биологической активности вирусов. Показана перспективность использования нового персонального пробоотборника для обнаружения жизнеспособных вирусов в аэрозоле.

Введение

Для выявления биологического аэрозоля в окружающей среде необходимы различные пробоотборники: от стационарных, с большими объемами прокачки воздуха, до легко переносимых персональных компактных устройств с небольшими объемами прокачки, способных работать длительное время. Для вирусосодержащих аэрозолей такие персональные пробоотборники в литературе не описаны.

Цель настоящей работы — тестирование на различных по устойчивости во внешней среде вирусных аэрозолях персонального пробоотборника, разработанного в университете Гриффитса, Брисбен, Австралия [1]. Для получения информации о присутствии в воздухе инфекционного вирусного аэрозоля необходимо, чтобы разработанное устройство обеспечивало, во-первых, минимальную инаktivацию вируса в процессе пробоотбора (при переводе его из воздушной среды в жидкую), и, во-вторых, сохранение его инфекционности в процессе длительного времени работы прибора до момента извлечения пробы. Кроме того, необходимо, чтобы аэрозольные частицы, уловленные пробоотборником, с высокой эффективностью задерживались в нем. Ранее были показаны его высокая эффективность при пробоотборе и обеспечение высокого уровня выживаемости различных бактерий [2, 3]. Данные, полученные в настоящей работе, позволяют оценить перспективность использования разработанного устройства для вирусосодержащих аэрозолей.

Материалы и методы

Персональный пробоотборник

Схема и внешний вид тестируемого персонального пробоотборника представлены на рис. 1. При-

бор изготовлен из термостойкого полиуретана, имеет высоту 140 мм, диаметр 75 мм, толщину стенок 2 мм и состоит из двух коаксиальных полуцилиндрических емкостей. На нижнюю открытую часть внутренней емкости диаметром 45 мм (15 мм от дна пробоотборника) помещается пористая среда, состоящая из полипропиленовых волокон диаметром 12 мкм, упаковочной плотностью 16% и толщиной 6 мм, и приклеивается, чтобы исключить «подтекание» аэрозоля за ее пределы. У выхода из устройства помещен дополнительный фильтр (туманоудалитель), улавливающий крупные капли, которые могут образовываться в процессе барботирования. Для крепления прибора на его задней стенке предусмотрена специальная защелка.

Для обеспечения независимости от направления ветра ряд отверстий для забора воздуха расположен по периметру пробоотборника. Воздушный поток из отверстий движется между коаксиальными цилиндрами вниз к сорбирующей жидкости, меняет направление движения на 180° и проходит через погруженную в жидкость пористую среду. Аэрозольные частицы поглощаются жидкостью, а воздушный поток покидает прибор через 12-мм отверстие в верхней части. Перепад давлений на выходе прибора создается питаемым от батарей портативным насосом (224-PCXR8, SKC, Eighty Four, PA, США), обеспечивающим стабильный расход воздуха через прибор 4 л/мин. Геометрия прибора подобрана таким образом, чтобы минимизировать потери аэрозольных частиц на его стенках [3].

Перед началом пробоотбора вирусосодержащих аэрозолей в прибор заливались 50 мл раствора Хэнкса, содержащего 100 усл. ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, либо тот же раствор Хэнкса с антибиотиками и 2%-й по объему инаktivированной при 56 °С в течение 30 мин сыворотки

крупного рогатого скота. Для предотвращения образования пены при барботировании в раствор, содержащий сыворотку, добавлялось 0,03% антивспенивателя М-30 Dow-Corning (30%-й раствор диметилполисилоксана в воде).

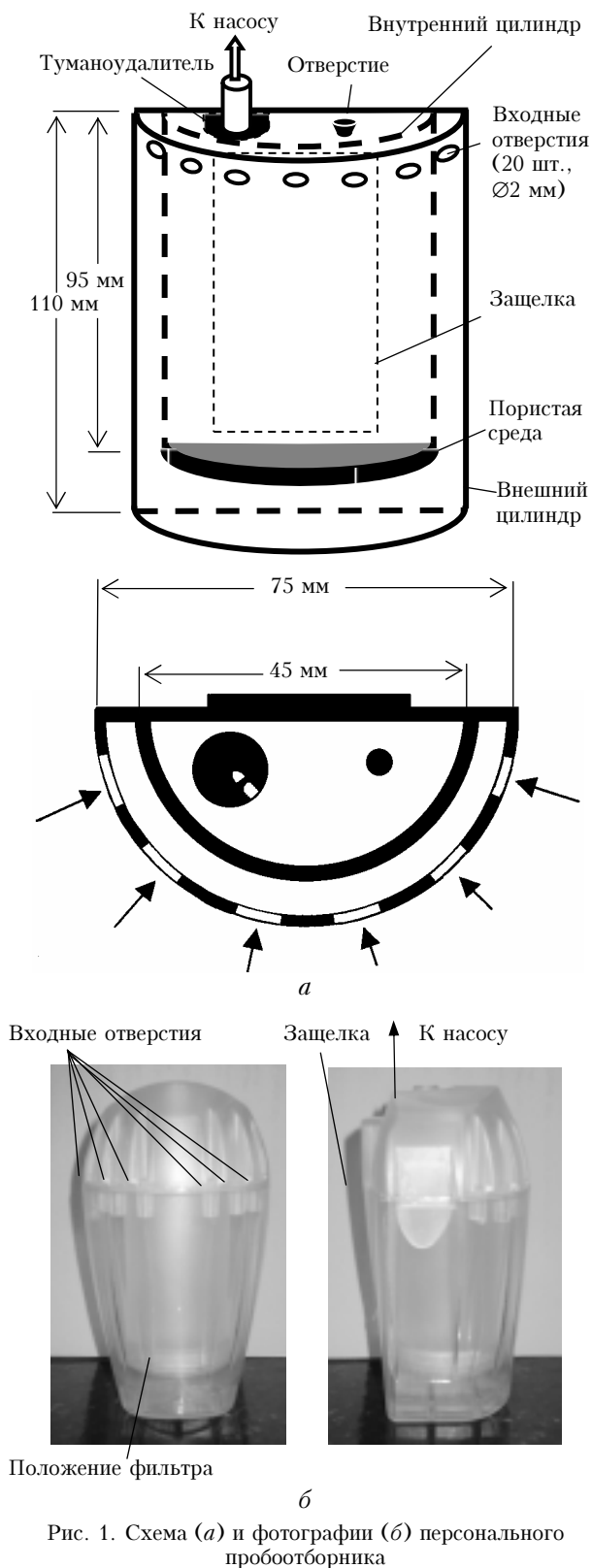


Рис. 1. Схема (а) и фотографии (б) персонального пробоотборника

Вирусы. Эксперименты были проведены со следующими вирусами, для которых основной путь распространения в природе — аэрозольный: грипп, корь, паротит, оспавакцина и атипичная пневмония.

Вирусы кори и паротита. Штамм *Edmonston* вируса кори был получен из коллекции вирусов ATCC (VR-24, 4/92). Штамм *Enders* вируса паротита был получен из той же коллекции вирусов (VR-106, 14D, 02/92). Клеточная культура *Vero* для определения биологической активности этих вирусов получена из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор». Биологическую активность этих вирусов определяли по бляшкообразованию (БОЕ) [4, 5]. Для этого 100 мкл десятикратных разведений вируса в среде Эрла, содержащей антибиотики, вносились на монослой клеток *Vero* в 24-луночные плашки (Costar, Pleasanton, CA), и вирус адсорбировался на них в течение 1 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе (в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂). Плашки встряхивались каждые 10–15 мин, и через 1 ч монослой отмывался от вируса и заливался 2 мл жидкого агара (1%-й агар Difco на среде RPMI-1640, содержащей 2% FCS и антибиотики). Через 6 дней нахождения в CO₂-инкубаторе монослои прокрашивались 0,001%-м нейтральным красным и проводился подсчет числа образовавшихся бляшек. Величина титра вируса в БОЕ/мл вычислялась стандартными методами [6]. Точность определения биологической активности вирусов описанным методом составляла примерно 0,3–0,4 логарифма определяемой величины.

Вирус атипичной пневмонии. Вирус атипичной пневмонии, штамм *Frankfurt 1*, был получен из Института Медицинской вирусологии Университета Франкфурта, Германия. Биологическая активность вируса определялась по его цитопатическому действию на монослой культуры клеток *Vero*. Для этого клетки в 96-луночных плашках (Costar, Pleasanton, CA) инокулировались 10-кратными разведениями вируса и после адсорбции в течение 1 ч при 37 °С клетки отмывались от вируса и заливались поддерживающей средой RPMI-1640 с 1%-й фетальной бычьей сывороткой. Через 48 ч монослой частично разрушался вирусом, что позволяло определять величину 50%-й цитопатической дозы (ТЦПД₅₀) согласно методу, описанному в работе [7]. Точность определения биологической активности вируса описанным методом составляла примерно 0,5 логарифма определяемой величины.

Вирус гриппа. Штамм вируса гриппа *A/Aichi/2/68* (H3N2) был получен из Московского Института вирусологии им. Ивановского и прошел 12 пассажей на мышках и 2 пассажа на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Культивирование вируса в аллонтаисной жидкости 9–11-дневных РКЭ позволяло получить концентрацию в 10⁸–10⁹ 50%-х эмбрионинфицирующих доз (ЭИД₅₀) в 1 мл вирусаллонтаисной жидкости (ВАЖ), которая в дальнейшем использовалась в экспериментах. Биологическую активность вируса в образцах определяли на 9–11-дневных РКЭ в единицах ЭИД₅₀ по методу, описанному в [4]. Точность определения

биологической активности вируса описанным методом составляла примерно 0,3–0,4 логарифма определяемой величины.

Вирус осповакцины. Использовали вирус вакцины штамм ЛИВП с0355 к0602, полученный из Института вирусных препаратов АМН РФ, г. Москва, в 1986 г., прошедший 10 пассажей на развивающихся куриных эмбрионах. Вирусосодержащий материал в концентрации 10^7 БОЕ/мл был получен путем роллерного культивирования вируса вакцины на перевиваемой культуре клеток 4647 (клетки почки эмбриона зеленой мартышки) с последующим 3-кратным замораживанием-оттаиванием инфицированной культуры клеток в поддерживающей питательной среде Eagle MEM (Cat. № 11-100-22, ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH, USA). До начала работ исходную вирусосодержащую суспензию хранили при температуре минус 70 °С. Определение биологической активности вируса также проводили по количеству БОЕ. Для этого монослои клеток 4647 в стеклянных бутылках инокулировались 0,2 мл 10-кратных разведений вирусосодержащей суспензии. После 1 ч инкубации при 37 °С монослой заливался поддерживающей средой, содержащей 2,4% агара (Difco) и 0,001% нейтрального красного (553-24-2, Cat. #102438, ICN, USA). Клетки инкубировались в темной комнате в течение 48 ч при 37 °С, после чего подсчитывалось число образовавшихся бляшек. Точность определения биологической активности вируса описанным методом составляла примерно 0,1 логарифма определяемой величины.

Проведение экспериментов по барботированию

Для определения выживаемости отобранного в персональный пробоотборник вируса во время длительного пробоотбора в сорбирующую жидкость добавлялось известное количество вирусосодержащей суспензии, после чего прибор включался на просос фильтрованного воздуха с объемным расходом 4 л/мин. Через 1, 2 и 4 ч из пробоотборника брались по 0,1 мл жидкости и определялась ее биологическая активность по методам, описанным выше.

Проведение аэрозольного эксперимента

Схема экспериментальной установки для проведения аэрозольных экспериментов с новым персональным пробоотборником представлена на рис. 2.

Аэрозоль создавался с помощью 3-поточного распылителя типа Коллисона (BGI Inc., Waltham, MA) из вирусосодержащей суспензии потоком сухого фильтрованного воздуха с объемным расходом 6 л/мин. Для оценки величины инактивации вируса в процессе пробоотбора в диспергатор добавлялась флуоресцентная метка (раствор уранина – $C_{20}H_{10}Na_2O_2$, Fluka AG, Switzerland) в концентрации 10^{-4} г/мл. Далее аэрозоль смешивался с потоком сухого фильтрованного воздуха с объемным расходом 10 л/мин для создания ламинарного потока в проточной аэрозольной камере. В экспери-

ментах была использована проточная горизонтальная аэрозольная камера со средней скоростью потока 10 см/с [8]. Температура в камере во время экспериментов составляла 24–27 °С и относительная влажность примерно 50%. Средний диаметр аэрозольных частиц в камере составлял примерно 1 мкм.

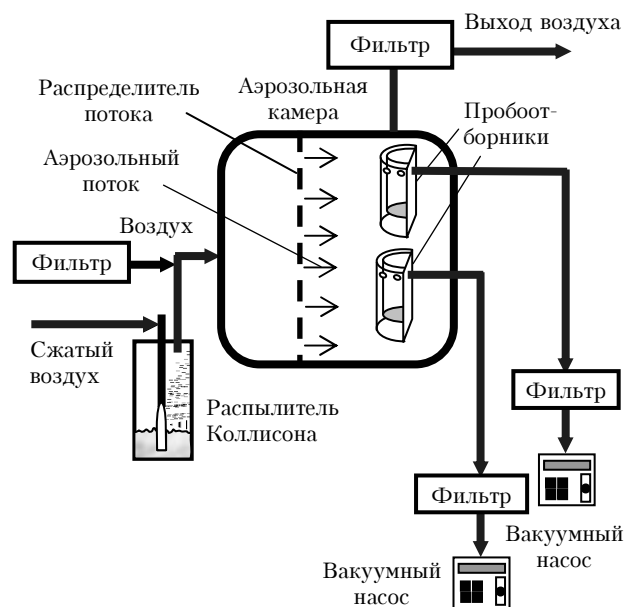


Рис. 2. Схема проведения аэрозольного эксперимента

Два персональных пробоотборника помещались в камеру и отделялись от вакуумного насоса, обеспечивавшего объемный расход через них 4 л/мин, двумя последовательно соединенными фильтрами для предотвращения выхода инфекционного аэрозоля в окружающую среду. Отбор осуществлялся при непрерывно работающем генераторе аэрозоля в течение 5 мин. Для снижения уровня инактивации вируса в воздуховодах длина соединительных трубок была сокращена до возможного минимума. Отобранные образцы вирусосодержащего аэрозоля анализировались на биологическую активность по описанным выше методикам и на содержание в них флуоресцентной метки на флуориметре Perkin-Elmer-1000. Интенсивность флуоресценции уранина измеряли при $\lambda_{фл} = 520$ нм (возбуждение при $\lambda_{возб} = 472$ нм).

Результаты и обсуждение

Определение сохранения инфекционности вируса в персональном пробоотборнике в процессе длительного пробоотбора проводилось в два этапа. На первом этапе в качестве сорбирующей жидкости в персональный пробоотборник заливался раствор Хэнкса с антибиотиками, однако в ряде экспериментов инактивация вируса в процессе длительного барботирования превышала два порядка величины. Поэтому на втором этапе экспериментов в качестве сорбирующей жидкости для лабильных вирусов был использован раствор, содержащий сыворотку

и антивспениватель, описанный в разделе «Материалы и методы». Полученные во всех экспериментах результаты суммированы в табл. 1. Все измерения выполнены при температуре (25 ± 2) °С и относительной влажности примерно 50%.

Обнаружено, что при барботировании в течение 4 ч после попадания в пробоотборник в наименьшей степени инактивируется вирус осповакцины (титр падает примерно в 2 раза), а другие вирусы теряют за то же время 2–2,5 логарифма активности. При введении в сорбирующую жидкость бычьей сыворотки и антивспенивателя это падение удастся уменьшить примерно до одного порядка величины.

Определение степени инактивации вируса при пробоотборе проведено для двух существенно различных по устойчивости вирусов – вируса гриппа и вируса осповакцины. Для вируса гриппа биологическая активность исходной суспензии в генераторе аэрозоля составляла $10^{7,7}$ ЭИД₅₀/мл, а флуоресцентная метка в суспензии была в концентрации $1,63 \cdot 10^6$ ед./мл. Соответственно в исходной суспензии на 1 флуоресцентную единицу приходилось примерно 30,7 ЭИД₅₀. Для вируса осповакцины биологическая активность исходной суспензии в генера-

торе аэрозоля составляла $10^{6,2}$ БОЕ₅₀/мл, а флуоресцентная метка в суспензии была в концентрации $0,6 \cdot 10^6$ ед./мл. Соответственно в исходной суспензии на 1 флуоресцентную единицу приходилось примерно 2,64 БОЕ. Результаты экспериментов по измерению выживаемости вирусов в процессе пробоотбора приведены в табл. 2 и 3.

Из данных, приведенных в табл. 2 и 3, видно, что в процессе пробоотбора вирус гриппа сохраняет примерно 20% своей активности, в то время как вирус осповакцины – до 90%. Сравнение полученных результатов с опубликованными результатами исследований с использованием данного персонального пробоотборника показывает, что в целом бактериальные аэрозоли, особенно аэрозоли спорных форм и грибных спор, более устойчивы при отборе в прибор, чем вирусные аэрозоли [2, 3]. Так, например, 8-часовой пробоотбор аэрозолей бактерий и спор гриба показал, что даже для наименее устойчивых из них грам-отрицательных бактерий *Pseudomonas fluorescens* выживаемость в приборе составляет $(61 \pm 20)\%$, тогда как для спор *Bacillus subtilis var. niger* и *Aspergillus versicolor* эти величины достигают (95 ± 9) и $(97 \pm 6)\%$ соответственно.

Таблица 1

Изменение биологической активности вирусов, находящихся в персональном пробоотборнике, при различных временах барботирования через него фильтрованного воздуха

| Вирус | Единицы измерения биологической активности | Биологическая активность вируса в приборе в зависимости от времени барботаж в часах | | | | |
|----------------------------|--|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Корь* | Log ₁₀ БОЕ/мл | 6,4 ± 0,4 | 5,1 ± 0,5 | 4,7 ± 0,4 | 4,4 ± 0,5 | 4,2 ± 0,6 |
| Паротит* | Log ₁₀ БОЕ/мл | 5,7 ± 0,4 | 4,5 ± 0,5 | 4,1 ± 0,6 | 3,8 ± 0,4 | 3,4 ± 0,4 |
| Корь | Log ₁₀ БОЕ/мл | 6,3 ± 0,5 | 5,8 ± 0,4 | 5,6 ± 0,4 | – | 4,9 ± 0,5 |
| Паротит | Log ₁₀ БОЕ/мл | 5,6 ± 0,3 | 5,2 ± 0,5 | 5,0 ± 0,5 | – | 4,6 ± 0,4 |
| Осповакцина* | Log ₁₀ БОЕ/мл | 4,2 ± 0,1 | 4,1 ± 0,1 | 3,9 ± 0,1 | – | 3,3 ± 0,1 |
| Грипп* | Log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл | 5,9 ± 0,4 | 4,5 ± 0,4 | 4,0 ± 0,4 | – | 3,7 ± 0,4 |
| Грипп | Log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл | 6,1 ± 0,4 | 5,9 ± 0,4 | 5,7 ± 0,4 | – | 5,5 ± 0,4 |
| Вирус атипичной пневмонии* | Log ₁₀ ТЦПД ₅₀ /мл | 4,3 ± 0,7 | –** | 3,1 ± 0,3 | – | 1,8 ± 0,4 |
| Вирус атипичной пневмонии | Log ₁₀ ТЦПД ₅₀ /мл | 4,2 ± 0,7 | – | 3,4 ± 0,5 | – | 2,4 ± 0,6 |

* В качестве сорбирующей жидкости использовался раствор Хэнкса с антибиотиками, в других экспериментах в раствор добавлялись сыворотка и антивспениватель.

** Здесь и далее тире обозначает, что измерения не проводились.

Таблица 2

Данные по изменению инфекционности вируса гриппа в процессе пробоотбора на персональный пробоотборник

| | Интенсивность флуоресценции в пробе, ед./мл | Концентрация вируса в пробе, ЭИД ₅₀ /мл | % живого вируса в пробе |
|----------|---|--|-------------------------|
| Прибор 1 | 8 | 31 | 12,7 |
| Прибор 2 | 6 | 50 | 27,1 |
| Среднее | 7 | 40,5 | 19,9 |

Таблица 3

Данные по изменению инфекционности вируса осповакцины в процессе пробоотбора на персональный пробоотборник

| | Интенсивность флуоресценции в пробе, ед./мл | Концентрация вируса в пробе, БОЕ/мл | % живого вируса в пробе |
|----------|---|-------------------------------------|-------------------------|
| Прибор 1 | 21 | 47 | 84,8 |
| Прибор 2 | 6 | 15 | 94,0 |
| Среднее | 13,5 | 31 | 89,4 |

Вместе с тем необходимо еще раз отметить, что в настоящее время изученный прибор – единственный персональный пробоотборник, рабочие характеристики которого определены для вирусосодержащих аэрозолей. Показано, что даже простая замена дистиллированной воды в приборе на сорбирующую жидкость заметно улучшает выживаемость вируса в нем. Возможно, применение других сред и доработка технических решений (например, предувлажнение отбираемого аэрозоля) позволят также увеличить выживаемость вирусов в процессе пробоотбора.

Таким образом, необходимо заключить, что проведенная работа показала возможность использования нового персонального пробоотборника для обнаружения жизнеспособных вирусов в аэрозоле.

Авторы считают своей приятной обязанностью выразить благодарность докторам Н.В. Доегг и Н.Ф. Рабенан из Института Медицинской вирусологии Университета Франкфурта (Германия) за предоставленный ими вирус атипичной пневмонии, а также Г.А. Буряк и В.М. Генералову за плодотворное обсуждение настоящей работы.

1. *Agranovski I., Myojo T., Braddock R.D.* Comparative study of the performance of nine filters utilized in filtra-

tion of aerosols by bubbling // *Aerosol Sci. Tech.* 2001. V. 35. № 4. P. 852–859.

2. *Agranovski I., Agranovski V., Grinshpun S., Reponen T., Willeke K.* Collection of Airborne Microorganisms into Liquid by Bubbling Through Porous Medium // *Aerosol Sci. Tech.* 2002. V. 36. № 4. P. 502–509.
3. *Agranovski I., Agranovski V., Grinshpun S., Reponen T., Willeke K.* Development and Evaluation of a New Personal Sampler for Viable Airborne Microorganisms // *Atmos. Environ.* 2002. V. 36. № 5. P. 889–898.
4. *Вирусология. Методы* / Под ред. Б. Мейхи. М.: Мир, 1988. 344 с.
5. *Fujinami R.S., Oldstone M.B.A.* Failure to cleave measles virus fusion protein in lymphoid cells: a possible mechanism for viral persistence in lymphocytes // *J. Exp. Med.* 1981. V. 154. N 5. P. 1489–1499.
6. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1962. 180 с.
7. *Guy J.S., Breslin J.J., Breuhaus B., Vivrette S., Smith L.G.* Characterization of a Coronavirus Isolated from a Diarrheic Foal // *J. Clin. Microbiol.* 2000. V. 38. № 12. P. 4523–4526.
8. *Ryzhikov A.B., Ryabchikova E.I., Sergeev A.N., Tkacheva N.V.* Spread of Venezuelan equine encephalitis virus in mice olfactory tract // *Arch. Virol.* 1995. V. 140. N 12. P. 2243–2254.

I.E. Agranovskii, A.N. Sergeev, O.V. Pyankov, V.A. Petrishchenko, A.P. Agafonov, G.M. Ignatiev, A.I. Borodulin, A.S. Safatov. **The use of new personal sampler for detection of alive viruses in aerosol state.**

The results of the study of new personal sampler are presented. The viruses with different stability in the environment were used for testing: influenza, measles, mumps, vaccinia, and SARS. It was shown that during sampling 80% of biological activity of influenza virus (labile virus) and only about 10% of vaccinia virus activity (robust virus) was lost. Viruses in the sampler lost up to 1.5 logarithms of biological activity during sampling for 4 hours at room temperature. The perspectives of using the new personal sampler for detection of alive viruses in aerosol state were shown.