



ОТЧЕТ

За проведен анализ по договор No /4 от 11.12.2025 г.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВИРУСОЦИДНОТО ДЕЙСТВИЕ НА ПРОДУКТ **Vibiotic®Immuno** срещу **Influenza virus (IV)** и **Coronavirus (HCoV)** в клетъчни култури.

Проби **Vibiotic®Immuno**

Пробите са любезно предоставени за анализ от „ЕКОКОМ ГРУП“ АД под формата на запечатани флакони с непрозрачна течност с тъмно-кафав цвят и характерен мирис.

Пробите се прилагаха в оригиналния си вид (при всяко повторение се използваше нов флакон), без филтруване, разреждане или друга предварителна обработка при анализа за вирусцидна активност и се смесваха *ex tempore* в съотношение 1:1 с вирусна суспензия в началото на всеки експеримент

Клетъчни култури

- MDCK (Madine-Darby caine kidney) епителни клетки от кучешки бъбрек - ATCC (American Type Culture Collection), USA – изследване на ефекта спрямо грипни вируси А.
- Vero Е6 - бъбречни епителни клетки на африканска зелена маймуна (*Chlorocebus sabaues*) (ATCC, CRL-1586) за култивиране на човешки коронавирус OC-43 (HCoV-OC43) (ATCC: VR-1558) (Манасас, Вирджиния, САЩ)

Клетките се култивираха на 37°C в 5% CO₂ инкубатор Thermo Forma 310 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), като монослойна култура в полистиренови матраци Т75 и 96-яккови плаки (Corning® Costar®, USA) в растежна среда DMEM, съдържаща 10 % фетален телешки серум (Gibco), 3.7 mg/ml натриев бикарбонат, 10 µM HEPES буфер (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), 100 E/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B. След размразяването им, клетките в матраците се пасажираха на всеки 72 часа при достигане на 80-90% плътност чрез обработка с разтвор на трипсин-ЕДТА (0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA). Определяше се броят им в камера на Бюркер и се ресуспендираха в свежа растежна хранителна среда.

Експериментите за определяне на вирусоциден ефект се провеждаха в 24-часови клетки с гъстота 2.5×10^5 /ml в 96-ямкови плаки, при минимум 90% конфлуентност на монослой. като визуалното и колориметричното отчитане се извършваше на 72-120-ти час след третиране.

Вируси

- Influenza virus A/Panama/2000/99 (H3N2)
- Influenza virus A/ Puerto Rico/8/34 (H1N1)

любезно предоставени от Институт по вирусология, НЦЗПБ, София

- Human beta coronavirus OC-43 (HCoV-OC43) (ATCC: VR-1558) (Манасас, Вирджиния, САЩ)

Определяне на ефекта върху извънклетъчните вириони – вирусоциден ефект

Проба, съдържаща 1000 CCID₅₀ вирус, и препарат Vibiotic®Immuno беше поставена в контакт в съотношение 1:1 и инкубирана при стайна температура за различни интервали от време (15, 30, и 60 минути). След това пробите се титрираха в 24-часов клетъчен монослой и съдържанието на остатъчен инфекциозен вирус се оценяваше на 72-120 час след инфекцията чрез отчитане на цитопатичен ефект по метода на крайното разреждане и чрез оцветяване с с витално багрило неутрал рот (NR). Плаките се промиваха със 150 µl PBS без Ca²⁺, Mg²⁺ на ямка и се добавяха по 100 µl за всяка ямка от предварително приготвеното NR багрило. Оцветените проби се инкубираха в термостат при 37°C и 5% CO₂ за 3 часа. След този интервал, оцветяващият разтвор се отливаше и отново всяка една от ямките се промиваше с 150µl PBS. Непосредствено преди изливането на солевия разтвор, се приготвяше извличащ разтвор, състоящ се от 1% ледена оцетна киселина (CH₃COOH), 50% етанол (C₂H₅OH) и 49% дестилирана вода (dH₂O) в обем от 100 µl за всяка ямка. Абсорбцията на светлината от пробите се отчиташе при 540 nm на четец за микроплаки (Biotek Organon, West Chester, PA, USA). Резултатите в ΔIgs се определяха в сравнение с вирусни контроли, инкубирани в същите времеви интервали без присъствие на тествания предукт.

Статистическа обработка на данните.

Експериментите бяха проведени в две и три повторения за статистическа достоверност на резултатите. Данните са обработени с помощта на софтуер Gen5® и Excel® Microsoft, а графичното им представяне с Graph Pad Prism 9.0®

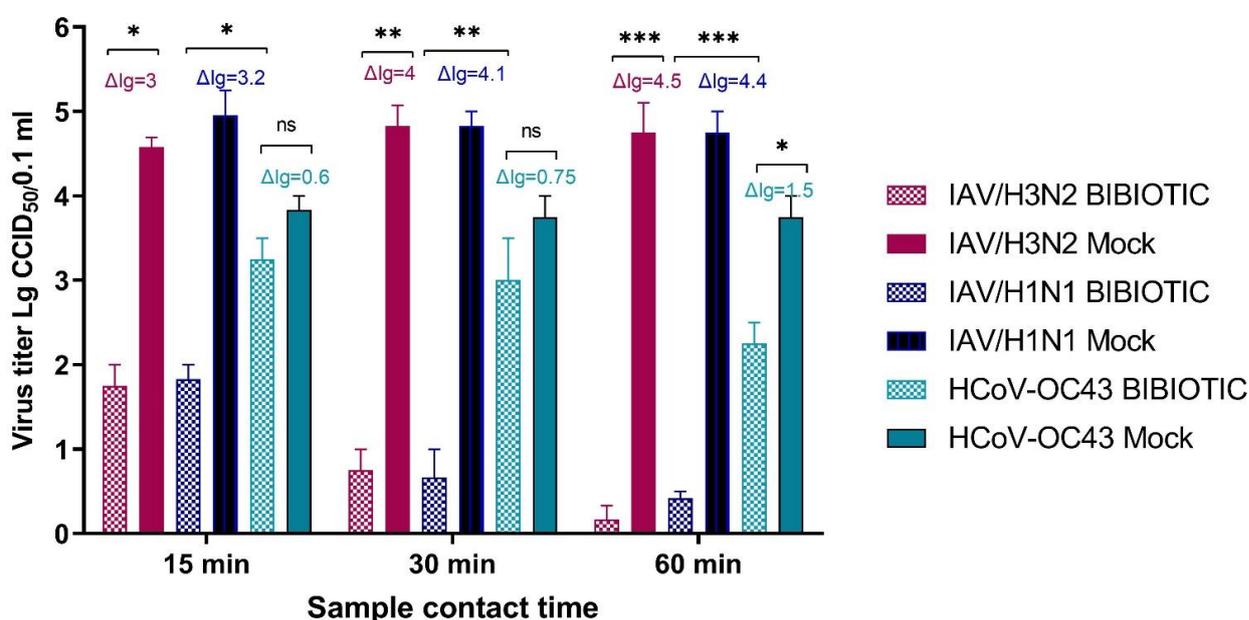
Резултати

1. Определяне на ефекта върху извънклетъчните вириони – вирусоциден ефект

Таблица 1: Вирусцидно действие на при експериментална инфекция със 1000 CCID₅₀/ml*

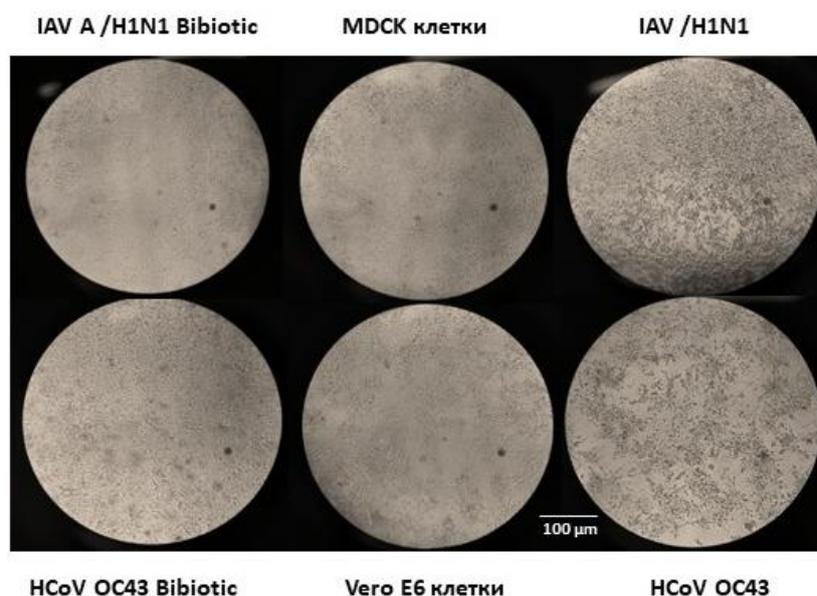
Проба/ Вирус	Концентрация	ΔLg		
		15 min	30 min	60 min
Bibiotic/ IAV H3N2	50%	3.0	4.0	4.5
Bibiotic / IAV H1N1	50%	3.2	4.1	4.4
Bibiotic /HCoV OC43	50%	0.6	0.75	1.5
Ethanol (референт) IAV/H3N2 IAV/H1N1 HCoV	70%	5.0 / 5.0/ 4.0	5.0 / 5.0/ 4.0	5.0 / 5.0/ 4.0

*Средни стойности от два независими експеримента.



Statistical analysis: Error bars: SD – standard deviations, Two-way ANOVA (Bibiotic vs Mock)

Фигура 1: Вирусцидно действие на Bibiotic®Immuno спрямо A/Panama/00/99 (H3N2), A/PR/8/34 (H1N1) и HCoV OC43 при интервал на контакт 15, 30 и 60 минути.



Фиг. 1 Микроскопска визуализация на вирусоцидният ефект на Bibiotic®Immuno спрямо грипния вирус А/Н1N1 в клетъчна линия MDCK и и HCoV OC-43 в клетки Vero E6 при 60 мин интервал на контакт (Инвертен светлинен микроскоп Olympus CK40, увеличение X10).

Заклучения:

1. Проучването на вирусоцидното действие показва подчертан ефект на Bibiotic®Immuno върху извънклетъчните частици на грипния вирус А/Panama/00/99 (H3N2) при интервал на контакт на вирионите с пробата от 15 до 60 мин ($\Delta\log=3.0 /15/ \text{min}$; $\Delta\log=4.0 /30/ \text{min}$; $\Delta\log=4.5 /60 \text{ min/}$).

2. Проучването на вирусоцидното действие показва силно изразен ефект на Bibiotic®Immuno върху извънклетъчните частици на грипния вирус А/PR/8/34 (H1N1) при интервал на контакт на вирионите с пробата от 15 до 60 мин ($\Delta\log=3.2 /15/ \text{min}$; $\Delta\log=4.1/30/ \text{min}$; $\Delta\log=4.4 /60 \text{ min/}$).

3. Проучването на вирусоцидното действие показва умерен ефект на Bibiotic®Immuno върху извънклетъчните частици на човешки коронавирус HCoV OC43 при интервал на контакт на вирионите с пробата от 15 до 60 мин ($\Delta\log=0.6 /15/ \text{min}$; $\Delta\log=0.75 /30/ \text{min}$; $\Delta\log=1.5 /60 \text{ min/}$).

Изследването е проведено при BSL2 ниво на безопасност в Лаборатория „Експериментална химиотерапия на грип“ към Департамент „Вирусология“, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, Българска академия на науките

Изготвил отчета:

Доцент д-р Лора Симеонова

/Ръководител Лаборатория „Експериментална химиотерапия на грип“/

гр. София,

16.02.2026 г.