



«Утверждаю»
Директор НИИ Вирусологии МЗ РУз
Мусабаев Э.И.
2010 г.

ПРОТОКОЛ

Испытаний противовирусной эффективности «Установки для инактивации РНК, ДНК вирусов на медицинском инструментарии», разработанной в ООО «New Medical Technologies»

Согласно договора от 28 апреля 2010 г. между ООО «New Medical Technologies» и лабораторией природно-очаговых особо опасных вирусных инфекций (ЛПООВОИ) НИИ Вирусологии МЗ РУз проведены испытания противовирусной эффективности «Установки для инактивации РНК, ДНК вирусов на медицинском инструментарии», разработанной в ООО «New Medical Technologies».

Цель проведения исследований:

Оценить противовирусную эффективность и целесообразность внедрения в массовое производство «Установки для инактивации РНК, ДНК вирусов на медицинском инструментарии» для широкого практического использования в учреждениях здравоохранения Республики Узбекистан.

Задачи исследования:

Оценить влияние «Установки для инактивации РНК, ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на жизнеспособность вируса Крымской - Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ).

Оборудование:

- Установка для инактивации РНК, ДНК вирусов на медицинском инструментарии;
- Шкаф биобезопасности (ШББ);
- Термостат;
- Центрифуги;
- Вортекс;
- Фотоаппарат;
- Микроскопы фирмы «Лейка»;
- Ламинарные боксы;
- Карусель для ПЦР капилляров;
- Аппарат Лайт-циклер.

Инструменты:

- Дозаторы автоматические 100-1000 мкл
- Дозаторы электронные для пипеток;
- Шприцы туберкулиновые.

Материалы и реактивы

- Флаконы (Т-50, Т-75) для выращивания чистой культуры клеток;
- Наборы одноразовых пробирок 15-50 мл;
- Стерильные планшеты на 6 лунок;
- Стерильные одноразовые пипетки 1мл, 5мл, 10мл, 25 мл.
- Штативы с наконечниками 100-1000 мкл;
- Перчатки одноразовые;
- Краситель метиленовый синий 0,01 %;
- Среда Лейбовича (L-15X1);
- Трипсин;
- Антибиотики, антимикотики;
- Фетальная бычья сыворотка (ФБС);
- Стерильный физ. раствор;
- Сахарный бульон для посева на стерильность исследуемого материала;
- Наборы одноразовых пробирок 1,5 мл (для постановки ПЦР);
- Наборы для выделения РНК вирусов;
- Чистая культура клеток Vero (клон Е-6) – клетки почек зелёных мартышек;
- Культуральный вирус ККГЛ ;
- 2-3 дневные новорожденные беспородные белые мыши (НБМ).
- 10% мозговая суспензия вируса ККГЛ .

Введение. Характеристика вируса ККГЛ.

Вирус ККГЛ относится к семейству Буньявириде, роду Найровирус. Вирион сферической формы, размер его достигает 90-100 нм, имеет (минус)1 нитевую 3-х фрагментированную цепочку РНК.

Перед постановкой опытов на культуре клеток и НБМ весь применяемый в опытах материал (среды, раствор метиленовой сини, культуральная вируссодержащая жидкость, мозговая вируссодержащая суспензия) подвергался проверке на стерильность в виде посева на 1% сахарный бульон.

Описание опыта 1. Принцип оценки влияния «Установки для инактивации РНК, ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на вирус ККГЛ заключался в следующем.

1. На дно лунок 6 - луночной пластиковой планшеты разлили смесь питательной среды Лейбовича (L-15 X 1) с культурой клеток Vero и поместили в термостат (температура 37⁰ С) для роста монослоя клеток. Для исследований использовали 3-х дневную культуру клеток. Состояние (целостность, жизнеспособность клеток) оценивали под светооптическим микроскопом.
2. В лунку другой стерильной 6-луночной планшеты залили 0,5 мл раствора 0,01% метиленового синего и в неё же залили 0,5 мл ККГЛ-вируссодержащей культуральной жидкости (наличие в ней вируса

ККГЛ предварительно подтвердили выявлением генома вируса методом ПЦР в реальном времени), т.е. получили смесь в равных количествах метиленовой сини и вирусосодержащей культуральной жидкости (50:50).

3. Затем планшету помещали в «Установку для инактивации РНК, ДНК вирусов на медицинском инструментарии» с длиной волны 590 нм на экспозицию 45 мин. При этом крышка с планшеты была удалена. После экспозиции в установке планшету накрывали крышкой и переносили в ШББ.
4. Из 6-луночной планшеты с монослоем культуры клеток Vero(клон E-6) удаляли всю среду роста, затем в 2 лунки перенесли по 100 мкл смеси 0,01% метиленовой сини с вирусосодержащей культуральной жидкостью, прошедшей инактивацию в испытуемой «установке» (опытные лунки).
5. В 2 лунки перенесли по 100 мкл смеси 0,01% метиленовой сини с вирусосодержащей культуральной жидкостью (50:50) не прошедшей экспозицию в испытуемой установке (контрольные лунки).
6. В 2 лунки перенесли по 100 мкл смеси (50:50) вируса со средой роста (контроль вируса без метиленового синего).
7. В 2 лунки перенесли по 100 мкл смеси (50:50) 0,01% метиленовой сини без вируса со средой роста (лунки для контроля токсичности метиленового синего на клетки).
8. В 2 лунки залили 100 мкл чистой среды роста (контроль клеток).
9. Планшету оставили на 1 час при комнатной температуре для контакта вируса с клетками, затем все лунки трижды промыли чистой средой роста.

Во все опытные и контрольные лунки залили по 3 мл поддерживающей среды. Затем планшету поместили в термостат при температуре 37⁰ С. За состоянием клеток наблюдали под светооптическим микроскопом в течение 10 дней.

Клетки были сфотографированы на 10-й день наблюдения. После чего клетки были сняты с планшеты механическим способом для дальнейшей идентификации.

Описание опыта 2. Принцип оценки влияния «Установки для инактивации РНК, ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на вирус ККГЛ заключался в следующем.

Были проведены исследования на новорожденных белых мышах (НБМ) 2-3-х дневного возраста.

1. В лунку стерильной 6-луночной планшеты залили 0,5 мл раствора 0,01% метиленового синего и 0,5 мл 10% вирусосодержащей мозговой суспензии (наличие в ней вируса ККГЛ предварительно подтвердили в реакции ПЦР в реальном времени выявлением генома вируса), т.е. получили смесь в равных количествах метиленовой сини и вирусосодержащей мозговой суспензии (50: 50).

2. Смесь вируса и 0,01% метиленового синего в равных количествах (50:50) помещали в «Установку для инактивации РНК, ДНК вирусов на медицинском инструментарии» с длиной волны 590 нм на экспозицию 45 мин. После экспозиции провели заражение НБМ.
3. Опытную группу НБМ (5 сосунков) заразили подкожно по 0,02 мл инактивированной в «установке» смесью вирусосодержащей мозговой суспензии и 0,01% метиленового синего (50: 50).
4. Контрольную группу животных (5сосунков-НБМ) заразили смесью (50:50) 10% вирусосодержащей мозговой суспензии и 0,01% метиленовой сини не прошедшей инактивацию на испытываемой «установке», по 0,02 мл подкожно.

Наблюдение за зараженными НБМ проводили в течение 9 дней. На 8-й и 9-й дни наблюдения из мозга НБМ контрольной и опытной групп были приготовлены 10% мозговые суспензии.

Идентификацию мозговой суспензии на наличие в ней вируса ККГЛ проводили методом ПЦР в реальном времени.

Результаты проведённых исследований противовирусной эффективности «Установки для инактивации РНК, ДНК вирусов на медицинском инструментарии», разработанной в ООО «New Medical Technologies»

1. При наблюдении (опыт №1) за культурой клеток Vero(клон Е-6), в опытных, а также в контрольных лунках, зараженных смесью метиленовой сини с вирусом не прошедшей инактивацию в «установке» и в лунках для контроля токсичности метиленового синего на клетки на 1-2 день наблюдения отмечали цитопатогенное действие (ЦПД) на клетки на уровне «++; +++» по четырёх крестовой системе. Тогда как клетки, зараженные вирусом без метиленового синего и контроль чистых (не заражённых) клеток оставались без изменения до 10 дня наблюдения.
2. а) После подкожного заражения НБМ смесью 10% вирусосодержащей мозговой суспензии и 0,01% метиленовой сини **не прошедшей инактивацию** на испытываемой «установке» в мозговых суспензиях контрольной группы животных методом ПЦР **был выявлен геном вируса ККГЛ**, что свидетельствует о жизнеспособности вируса.
б) После подкожного заражения НБМ смесью 10% вирусосодержащей мозговой суспензии и 0,01% метиленовой сини, **прошедшей инактивацию** на испытываемой «установке», в мозговых суспензиях опытной группы животных **геном вируса ККГЛ выявлен не был**, что свидетельствует о потере жизнеспособности вируса после инактивации в «установке».

Заключение

1. После подкожного заражения НБМ смесью 10% вирусосодержащей мозговой суспензии и 0,01% метиленовой сини, не прошедшей инактивацию на испытываемой «установке», в мозговых суспензиях контрольной группы животных методом ПЦР **был выявлен геном вируса ККГЛ**, что свидетельствует о жизнеспособности вируса.
2. После подкожного заражения НБМ смесью 10% вирусосодержащей мозговой суспензии и 0,01% метиленовой сини, прошедшей инактивацию на испытываемой «установке», в мозговых суспензиях опытной группы животных **геном вируса ККГЛ выявлен не был**, что свидетельствует о потере жизнеспособности вируса после инактивации в «Установки для инактивации РНК, ДНК вирусов на медицинском инструментарии», разработанной в ООО «New Medical Technologies».
3. Опыты с воздействием вируса ККГЛ на клеточную культуру Vero(клон Е-6) провести не удалось в связи с непосредственным токсическим действием метиленовой сини на культуру клеток.

Заведующая ЛПОООВИ
НИИ Вирусологии МЗ РУз,
доктор медицинских наук



Матназарова Г.С.

Врач- вирусолог



Брянцева Е.В.

Врач-вирусолог



Хузияхметова И.Ю.