



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИ вирусологии МЗ РУз,
профессор _____ МУСАБАЕВ Э.И.

«06» _____ 04 _____ 2016 г.

ПРОТОКОЛ

Типовых испытаний

противовирусной эффективности

«Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии»,
разработанной в ООО «New Medical Technologies»

Согласно Договоров за № -----от-----года между ООО «New Medical Technologies» (генеральный директор – Арифбаев Р.С.) и Референс-лабораторией (заведующая – к.м.н. Алиева Л.Е.) НИИ Вирусологии МЗ РУз (директор института – д.м.н., профессор Мусабаев Э.И.) проведены Типовые испытания вирусинактивирующей эффективности «Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии» (далее Установка), разработанной и созданной в ООО «New Medical Technologies». ПЦР исследования при типовых испытаниях Установки проводились в Референс-лаборатории врачом-лаборантом Кан Н.Г

Цель проведения исследований:

Оценить вирусинактивирующую эффективность «Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии» с монохроматическим излучателем с длиной волны в 590 nm и 660 nm (далее Установка 590 nm и Установка 600 nm) на жизнеспособность и патогенность вирусов гепатита В (HBV), обладающих лимфотропными свойствами, в цельной крови и в плазме крови.

Метод контроля функциональности Установки 590 nm и Установки с комбинированным излучением 590 nm +660 nm относительно HBV.

Испытаны две установки с монохроматическими излучателями с длиной волны 590 nm и 660 nm (Установка 590 nm и Установка 660 nm).

Для контроля функциональности Установки 590 nm и Установки 660 nm на жизнеспособность HBV был применен Способ оценки жизнеспособности лимфотропных вирусов проникать и персистировать внутриклеточно в лимфоцитах человека *in vitro*. Способ оценки жизнеспособности лимфотропных вирусов разработан проф. Гулямовым Н.Г.

Получение взвеси лимфоцитов здорового человека.

В испытаниях использовали лимфоциты крови здоровых людей только с отрицательными результатами тестирования на предмет зараженности HBV, HCV и HIV. Для получения взвеси лимфоцитов кровь забирали у здорового человека (донора) утром натощак из локтевой вены в объеме 60-80 мл. Далее кровь по 7-8 мл переносили в центрифужные пробирки, содержащие по 2-3 мл

физиологического раствора с 2-3 каплями гепарина. Смесь в пробирке тщательно перемешивали. Из крови лимфоциты выделяли в градиенте плотности фиколл-верографин по общепринятой методике путем центрифугирования при 1500 об/мин. в течение 20 минут. Далее проводили 3х кратное промывание лимфоцитов в физиологическом растворе с последующим центрифугированием. После последнего центрифугирования из пробирок удаляли надосадочную жидкость. Из всех пробирок осадок, содержащий лимфоциты, переносили в одну пробирку и разбавляли 20 мл физиологического раствора и перемешивали. Взвесь лимфоцитов хранили в холодильнике при 4⁰С не более 1 суток.

Проведение инактивации вирусов HBV в Установке 590 nm и Установке 660 nm.

Для проведения инактивации вирусов HBV отбирали плазму крови больных с высоким содержанием моно-HBV инфекцией. Для инактивации вирусов использовали стерильные полистироловые плашки.

Установка с излучателем длиной волны 590 nm установлен сверху с отражателями по бокам и снизу.

Плашка № 1 .

В лунку плашки №1 вносили по 3 мл HBV содержащую плазму крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). Планшет в течение 30 мин. находился при комнатной температуре (замачивание), затем устанавливался в установку на экспозицию на 30 минут.

Плашка № 2 . В лунку плашки №2 вносили по 3 мл HBV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). Плашка устанавливалась в установку на экспозицию 90 минут.

Плашка № 3 .

В плашку №3 вносили 5 мл HBV содержащей плазмы крови и 5 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). В раствор полностью погружали медицинский инструмент в подвешенном состоянии на скобах. Плашка устанавливалась в установку на экспозицию 90 минут.

Установка с излучателем длиной волны 590 nm (излучатель установлен сбоку и отражателями по периметру и на дверце установки .

Плашка № 4 .

В лунку плашки №4 вносили по 3 мл HBV содержащей плазмы крови и 3

мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). Плашка в течение 30 мин. находилась при комнатной температуре (замачивание), затем устанавливалась на экспозицию 30 минут.

Плашка № 5 . В лунку плашки №5 вносили по 3 мл HBV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). Плашка устанавливалась в установку на экспозицию 90 минут.

Плашка № 6 .

В плашку №6 вносили 5 мл HBV содержащей плазмы крови и 5 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). В раствор полностью погружали медицинский инструмент в подвешенном состоянии на скобах. Плашка устанавливалась в установку на экспозицию 90 минут.

Установка с комбинированными излучателями длиной волны 590 нм и 660 нм сверху и снизу.

Плашка № 7 .

В лунку плашки №7 вносили по 3 мл HBV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). Плашка устанавливалась в установку на экспозицию 90 минут.

Контроль.

Плашка №8. В лунку плашки №8 вносили по 3 мл HBV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). Плашка содержалась при комнатной температуре (экспозиции в установке не подвергалась – контроль).

Оценка *in vitro* жизнеспособности и цитопатогенных свойств лимфотропных вирусов HBV, инактивированных в Установке 590 нм и Установке 660 нм.

Вирусинактивирующую эффективность Установки с длиной волны 590 нм и 660 нм изучали путем оценки *in vitro* лишения цитопатогенных свойств инактивированных в установке вирусов HBV относительно лимфоцитов человека.

Плашки после инкубации вынимали из Установок. Содержимое каждой плашки переносили в центрифужные пробирки.

Далее из холодильника вынимали пробирку с взвесью лимфоцитов здорового человека, содержимое пробирки тщательно перемешивали. В каждые из вышеприведенных 9 пробирок вливали по 1 мл взвеси лимфоцитов. Содержимое пробирок перемешивали и ставили на инкубацию в

термостат при 37⁰С на 6 часов. Каждые 45– 60 минут содержимое пробирок перемешивали.

Отмывание лимфоцитов от плазмы и взвешенных вирусов. По истечении 6 часов все пробирки вынимали из термостата, в пробирки вливали по 8 мл физиологического раствора, содержимое перемешивали. Лимфоциты осаждали путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 20 минут. Лимфоциты осаждаются на дно пробирок. Надосадочная жидкость удаляется, в осадке остаются лимфоциты. Подобным образом лимфоциты отмываются еще 2-хкратно.

Фиксация вирусов, адсорбированных на наружной поверхности мембраны лимфоцитов.

После 2-хкратного центрифугирования и удаления надосадочной жидкости для фиксирования вирусов, адсорбированных на наружной поверхности мембраны лимфоцитов, во все пробирки добавляли по 10 капель 2% глутаральдегида на 90 секунд. Далее лимфоциты отмывали в физиологическом растворе: в пробирки добавляли 8 мл физиологического раствора, перемешивали и подвергали центрифугированию по вышеуказанной схеме. Промывку лимфоцитов осуществляли трижды.

После последнего центрифугирования из пробирок удаляли надосадочную жидкость, осадок лимфоцитов разбавляли 500 мкл физиологического раствора, перемешивали и переносили в эпиндорфы.

Разрушение лимфоцитов. Для разрушения лимфоцитов эпиндорфы ставили в морозильную камеру бытового холодильника на 16-18 часов. При медленном замораживании происходит разрушение мембран лимфоцитов. На следующий день эпиндорфы с содержимым вынимали из морозильной камеры, оттаивали до комнатной температуры. Далее, для удаления из взвеси мембранных структур разрушенных лимфоцитов эпиндорфы подвергали центрифугированию при 6000 об/мин. в течение 30 минут. На дно эпиндорфов осаждаются мембранные структуры, в надосадочной жидкости остается содержимое цитоплазмы лимфоцитов. Надосадочная жидкость из пробирок отсасывали и подвергали количественному ПЦР-исследованию на предмет наличия или отсутствия ДНК либо РНК вирусов в содержимом цитоплазмы лимфоцитов.

Оценка результатов исследований.

Положительный результат ПЦР исследования – обнаружение ДНК или РНК вирусов в содержимом цитоплазмы лимфоцитов является свидетельством проникновения вирусов в цитоплазму лимфоцитов, то есть сохранения жизнеспособности и патогенности вирусов.

Отрицательный результат ПЦР исследования – отсутствие ДНК или РНК вирусов в содержимом цитоплазмы лимфоцитов является свидетельством утраты вирусами способности проникать в цитоплазму

лимфоцитов - утрата жизнеспособности и патогенности, то есть свидетельствует об инактивации вирусов.

Результаты испытаний Установки с длиной волны монохроматического излучателя 590 nm и 660 nm

№ плашки	Объект и тип вируса	Замачивание	Время экспозиции в установке	Результаты количественного ПЦР исследования содержимого лимфоцитов
Установка 590 nm (излучатель сверху)				
Плашка № 1	HBV (плазма)	30 мин	30 мин	Отрицательно
Плашка № 2	HBV (плазма)	нет	90 мин	Отрицательно
Плашка № 3	HBV (плазма)	нет	90 мин	Отрицательно
Установка 590 nm (излучатель сбоку)				
Плашка № 4	HBV (плазма)	30 мин	30 мин	Отрицательно
Плашка № 5	HBV (плазма)	нет	90 мин	Отрицательно
Плашка № 6	HBV (плазма)	нет	90 мин	Отрицательно
Установка со смешанными излучателями 590 nm и 660 nm (сверху)				
Плашка № 7	HBV (плазма)	нет	90 мин	Отрицательно
Контроль				
Плашка № 8	HBV (плазма)			Положительно: $1,8 \times 10^2$ вир. частиц

Плашка №1. После замачивания вирусосодержащей плазмы в 0,01% растворе метиленовой сини в течение 30 мин и инактивации в Установке с длиной волны монохроматического излучателя 590 nm (излучатель сверху) при экспозиции 30 минут в вирусосодержащей плазме жизнеспособных вирусов не обнаружено.

Плашка №2. После экспозиции в установке с длиной волны монохроматического излучателя 590 nm (излучатель сверху) при экспозиции 90 мин в вирусосодержащей плазме жизнеспособные вирусы не обнаружены.

Плашка №3. После экспозиции в установке с длиной волны монохроматического излучателя 590 nm (излучатель сверху) в течение 90 мин медицинского инструмента, подвешенного на скобах и погруженного полностью в смесь вирусосодержащей плазмы и 0,01% раствора метиленовой сини (без замачивания) жизнеспособные вирусы не обнаружены.

Плашка №4. После замачивания вирусосодержащей плазмы в 0,01% растворе метиленовой сини в течение 30 мин и инактивации в Установке с длиной волны монохроматического излучателя 590 nm (излучатель сбоку с отражателями) при экспозиции в течение 30 минут в вирусосодержащей плазме жизнеспособных вирусов не обнаружено.

Плашка №5. После экспозиции в установке с длиной волны монохроматического излучателя 590 nm (излучатель сбоку) с отражателями при

экспозиции в течение 90 мин смеси вирусосодержащей плазмы с 0,01% раствором метиленовой сини (без замачивания) жизнеспособные вирусы не обнаружены.

Плашка №6. После экспозиции в установке с длиной волны монохроматического излучателя 590 nm (излучатель сбоку) при экспозиции в течение 90 мин медицинского инструмента, подвешенного на прутьях и погруженного полностью в смесь вирусосодержащей плазмы и 0,01% раствора метиленовой сини (без замачивания) жизнеспособные вирусы не обнаружены.

Плашка №7. После экспозиции в течение 90 мин в установке со смешанным излучателем 590 нм и 660 нм (излучатели сверху) смеси вирусосодержащей плазмы с 0,01% раствором метиленовой сини (без замачивания) жизнеспособные вирусы не обнаружены.

Плашка №8. Контроль. В смеси вирусосодержащей плазмы с 0,01% раствором метиленовой сини (без экспозиции в установке) обнаружено $1,8 \times 10^2$ жизнеспособных вирусных частиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов Типовых испытаний, проведенных Референс-лаборатории НИИ Вирусологии Установки с излучением 590 nm и Установки с комбинированным излучением 590 nm +660 nm, разработанных ООО «New Medical Technologies», заключаем:

Установка для инактивации вирусов на медицинском инструментарии с излучателем длиной волны в 590 nm и с комбинированным излучателем 590 nm +660 nm обеспечивает стабильную инактивацию HBV в зараженной плазме и в зараженной плазме с медицинскими инструментами при экспозиции в Установке в течение 90 минут, при предварительном замачивании на 30 минут с последующей экспозицией в Установке в течение 30 минут.

Заведующая
Референс-лабораторией НИИ вирусологии,
кандидат медицинских наук


АЛИЕВА Л. Е.

Врач-лаборант
Референс-лаборатории


КАН Н. Г.