



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИ вирусологии МЗ РУз,
профессор

МУСАБАЕВ Э.И.

20 августа 2015 г.

ПРОТОКОЛ

Типовых испытаний

противовирусной эффективности

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

Согласно Договоров за № 23 от 6 августа 2015 года между ООО «New Medical Technologies» (генеральный директор – Арифбаев Р.С.) и Референс-лабораторией (заместитель директора – к.м.н. Алиева Л.Е.) НИИ Вирусологии МЗ РУз (директор института – д.м.н., профессор Мусабаев Э.И.) проведены Типовые испытания инактивирующей эффективности «Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии» (далее Установа), 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 Установа 590 nm и Установа 600 nm) на жизнеспособность и патогенность вирусов гепатита В (HBV), обладающих лимфотропными свойствами, в цельной крови и в плазме крови.

Введение. Характеристика вирусов гепатита В и гепатита С.

Вирус гепатита В (HBV) является ДНК содержащим вирусом, его репликация происходит преимущественно в гепатоцитах человека. Вирус гепатита В также обладает лимфотропными свойствами - способностью поражать и реплицироваться в лимфоцитах человека.

Метод контроля функциональности Установки 590 nm и Установки 660 nm относительно HBV.

Испытаны две установки с монохроматическими излучателями с длиной волны 590 nm и 660 nm (Установа 590 nm и Установа 660 nm). Время экспозиции 80 min и 90 min.

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.

Метод контроля функциональности Установки 590 nm и Установки 660 nm относительно HBV и HCV.

Испытаны две установки с монохроматическими излучателями с длиной волны 590 nm и 660 nm (Установка 590 nm и Установка 660 nm). Время экспозиции 90 min.

Для контроля функциональности Установки 590 nm и Установки 660 nm на жизнеспособность HBV и HCV 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 и HCV в Установке 590 nm и Установке 600 nm.

Для проведения инактивации вирусов HBV или HCV отбирали цельную кровь и плазму крови больных с высоким содержанием моно-HBV или моно-HCV инфекциями. Для инактивации вирусов использовали стерильные полистироловые 6-ти луночные бактериологические планшеты.

Планшет №1.

В лунку 1.1 вносили 3 мл HBV содержащей цельной крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

В лунку 1.2 вносили 3 мл HBV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

В лунку 1.4 вносили 3 мл HCV содержащей цельной крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

В лунку 1.5 вносили 3 мл HCV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

Планшет №2.

В лунку 2.1 вносили 3 мл HBV содержащей цельной крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

В лунку 2.2 вносили 3 мл HBV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

В лунку 2.4 вносили 3 мл HCV содержащей цельной крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

В лунку 2.5 вносили 3 мл HCV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

Планшет №3 (Контроль с метиленовым синим).

В лунку 3.1 вносили 3 мл HBV содержащей цельной крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

В лунку 3.2 вносили 3 мл HBV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

В лунку 3.4 вносили 3 мл HCV содержащей цельной крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

В лунку 3.5 вносили 3 мл HCV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

Планшет №4 (Контроль).

В лунку 4.1 вносили 3 мл HBV содержащей цельной крови и 3 мл физиологического раствора.

В лунку 4.2 вносили 3 мл HBV содержащей плазмы крови и 3 мл физиологического раствора.

В лунку 4.4 вносили 3 мл HCV содержащей цельной крови и 3 мл физиологического раствора.

В лунку 4.5 вносили 3 мл HCV содержащей плазмы крови и 3 мл физиологического раствора.

Планшет № 1 подвергали инактивации в Установке 590 nm. Время экспозиции 90 минут.

Планшет № 2 подвергали инактивации в Установке 660 nm. Время экспозиции 90 минут.

Планшет №3 (контроль с метиленовым синим) подвергался влиянию метиленового синего, но не подвергался влиянию монохроматического излучения.

Планшет №4 не подвергался влиянию метиленового синего и монохроматического излучения.

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

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

Планшеты после инкубации вынимали из Установок. Содержимое каждой лунки планшет переносили в центрифужные пробирки:

Планшет №1.

Лунка 1.1 → пробирка 1.1 → центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут, надосадов переносили чистую в пробирку 1.1.

Лунка 1.2 → пробирка 1.2

Лунка 1.4 → пробирка 1.4 → центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут, надосадов переносили чистую в пробирку 1.4.

Лунка 1.5 → пробирка 1.5

Планшет №2.

Лунка 2.1 → пробирка 2.1 → центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут, надосадов переносили чистую в пробирку 2.1.

Лунка 2.2 → пробирка 2.2

Лунка 2.4 → пробирка 2.4 → центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут, надосадов переносили чистую в пробирку 2.4.

Лунка 2.5 → пробирка 2.5

Планшет №3 (Контроль с метиленовым синим).

Лунка 3.1 → пробирка 3.1 → центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут, надосадов переносили чистую в пробирку 3.1.

Лунка 3.2 → пробирка 3.2

Лунка 3.4 → пробирка 3.4 → центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут, надосадов переносили чистую в пробирку 3.4.

Лунка 3.5 → пробирка 3.5

Планшет №4 (Контроль).

Лунка 4.1 → пробирка 4.1 → центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут, надосадов переносили чистую в пробирку 4.1.

Лунка 4.2 → пробирка 4.2

Лунка 4.4 → пробирка 4.4 → центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут, надосадов переносили чистую в пробирку 2.4.

Лунка 4.5 → пробирка 4.5

Далее из холодильника вынимали пробирку с взвесью лимфоцитов здорового человека, содержимое пробирки тщательно перемешивали. В каждые из вышеприведенных 16 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-кратного 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 обеих 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 590 nm и Установки 660 nm для инактивации вирусов на медицинском инструментарии.
Время экспозиции 90 минут.**

№ опыта	Объект и тип вируса	Результаты количественного ПЦР исследования содержимого лимфоцитов
Планшет 1. Установка 590 nm		
1.1	HBV (кровь)	Отрицательно
1.2	HBV (плазма)	Отрицательно
1.4	HCV (кровь)	Отрицательно
1.5	HCV (плазма)	Отрицательно
Планшет 2. Установка 660 nm		
2.1	HBV (кровь)	Отрицательно
2.2	HBV (плазма)	Отрицательно
2.4	HCV (кровь)	Отрицательно
2.5	HCV (плазма)	Отрицательно
Планшет 3 (Контроль с метиленовым синим)		
3.1	HBV (кровь)	Положительно
3.2	HBV (плазма)	Положительно
3.4	HCV (кровь)	Положительно
3.5	HCV (плазма)	Положительно
Планшет 4 (Контроль)		
4.1	HBV (кровь)	Положительно
4.2	HBV (плазма)	Положительно
4.4	HCV (кровь)	Положительно
4.5	HCV (плазма)	Положительно

После инактивации в Установке с длиной волны монохроматического излучателя 590 nm в течение 90 минут цельной крови и плазмы с высоким содержанием HBV и HCV в содержимом лимфоцитов РНК и ДНК вирусов не обнаруживались, что указывало на инактивацию вирусов с утратой жизнеспособности и патогенности. Установка проявила стабильный

инактивирующий эффект.

После инактивации в Установке с длиной волны монохроматического излучателя 660 nm в течение 90 минут цельной крови и плазмы с высоким содержанием HBV и HCV в содержимом лимфоцитов РНК и ДНК вирусов не обнаруживались, что указывало на инактивацию вирусов с утратой жизнеспособности и патогенности. Установка проявила стабильный инактивирующий эффект.

В то же время после инкубации контрольных образцов тех же вирусосодержащих сывороток, не подвергнутых инактивации в установке ПЦР-исследованием в содержимом лимфоцитов обнаруживались ДНК и РНК вирусов. Это указывало, что исследованные вирусы HBV и HCV были жизнеспособными и обладали выраженной патогенностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных Типовых испытаний в Референс-лаборатории результатов испытаний Установки 590 nm и Установки 660 nm заключаем:

1. Установка 590 nm и Установка 660 nm, разработанные ООО «New Medical Technologies», стабильно обеспечивают инактивацию HBV и HCV в зараженной цельной крови и плазме при экспозиции в течение 90 минут. Эффект инактивации в Установке выражается в полном лишении HBV и HCV жизнеспособности и утрате цитопатогенности – способности проникать и заражать лимфоциты человека.

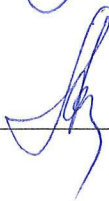
2. Массовое производство и внедрение Установки 590 nm и Установки 660 nm для широкого практического использования в лечебных учреждениях будет способствовать существенному снижению частоты заражения пациентов HBV и HCV при медицинских манипуляциях, что имеет высокое эпидемиологическое значение.

Заместитель директора
Референс-лаборатории НИИ вирусологии,
кандидат медицинских наук



АЛИЕВА Л. Е.

Врач-лаборант
Референс-лаборатории



КАН Н. Г.