



«УТВЕРЖДАЮ»

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

« 09 октября 2015 г.

ПРОТОКОЛ

Типовых испытаний

противовирусной эффективности

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

Согласно Договоров за № 31 от 15 октября 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 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 вирусиактивирующую 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), гепатита С (HCV) и ВИЧ (HIV), обладающих лимфотропными свойствами, в цельной крови и в плазме крови.

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 (Установка 590 nm и Установка 660 nm). Время экспозиции 90 min.

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

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

Планшеты № 1 .

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

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

В лунку 1.3 планшета вносили по 3 мл HCV содержащей цельной крови и по 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

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

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

В лунку 1.6 планшета вносили по 3 мл HIV содержащей плазмы крови и по 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

Планшеты № 2.

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

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

В лунку 1.3 планшета вносили по 3 мл HCV содержащей цельной крови и по 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

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

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

В лунку 1.6 планшета вносили по 3 мл HIV содержащей плазмы крови и по 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

Планшет № 3 (Контроль).

В лунку 1.1 вносили 3 мл HBV содержащей цельной крови и 3 мл физиологического раствора.

В лунку 1.2 вносили 3 мл HBV содержащей плазмы и 3 мл физиологического раствора.

В лунку 1.3 вносили 3 мл HCV содержащей цельной крови и 3 мл физиологического раствора.

В лунку 1.4 вносили 3 мл HCV содержащей плазмы и 3 мл физиологического раствора.

В лунку 1.5 вносили 3 мл HIV содержащей цельной крови и 3 мл физиологического раствора.

В лунку 1.6 вносили 3 мл HIV содержащей плазмы и 3 мл физиологического раствора.

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

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

Планшет № 5 (Контроль) не подвергали инаktivации и содержали при комнатной температуре.

Оценка in vitro жизнеспособности и цитопатогенных свойств лимфотропных вирусов HBV, HCV и HIV, инаktivированных 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, HCV и HIV относительно лимфоцитов человека.

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

Далее из холодильника вынимали пробирку с взвесью лимфоцитов здорового человека, содержимое пробирки тщательно перемешивали. В каждые из вышеприведенных 18 пробирок вливали по 1 мл взвеси лимфоцитов. Содержимое пробирок перемешивали и ставили на инкубацию в термостат при 37°C 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 590 nm и Установки 660 nm

№ опыта	Объект и тип вируса	Результаты количественного ПЦР исследования содержимого лимфоцитов
Время экспозиции		90 минут
Установка 590 nm		
		Планшет № 1
1.1	HBV (кровь)	Отрицательно
1.2	HBV (плазма)	Отрицательно
1.3	HCV (кровь)	Отрицательно
1.4	HCV (плазма)	Отрицательно
1.5	HIV (кровь)	Отрицательно
1.6	HIV (плазма)	Отрицательно
Установка 660 nm		
		Планшет № 2
1.1	HBV (кровь)	Отрицательно
1.2	HBV (плазма)	Отрицательно
1.3	HCV (кровь)	Отрицательно
1.4	HCV (плазма)	Отрицательно
1.5	HIV (кровь)	Отрицательно
1.6	HIV (плазма)	Отрицательно
Планшет № 5 (Контроль)		
1.1	HBV (кровь)	Положительно
1.2	HBV (плазма)	Положительно
1.3	HCV (кровь)	Положительно
1.4	HCV (плазма)	Положительно
1.5	HIV (кровь)	Положительно
1.6	HIV (плазма)	Положительно

После инактивации в Установках с длиной волны монохроматического излучателя 590 nm и 660 nm в течение 90 минут в содержимом цитоплазмы лимфоцитов, инкубированных с инактивированной в Установке вирусосодержащей цельной кровью и плазмой, ДНК HBV, РНК HCV или РНК HIV обнаружено не было, что свидетельствует об утрате жизнеспособности (цитопатогенности) вирусами HBV, HCV или HIV.

В содержимом цитоплазмы лимфоцитов, инкубированных с вирусосодержащей цельной кровью и плазмой (контроль), были обнаружены ДНК HBV, РНК HCV или РНК HIV, что свидетельствует о содержании в цельной крови и плазме жизнеспособных вирусов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных Типовых испытаний в Референс-лаборатории результатов испытаний Установки 590 nm и Установки 660 nm, разработанных ООО «New Medical Technologies», заключаем:

Установки с длиной волны монохроматического излучателя 590 nm и 660 nm обеспечивают стабильную и надёжную инактивацию HBV, HCV или HIV в зараженной цельной крови и в плазме при экспозиции в течение 90 минут.

Заведующая
Референс-лабораторией НИИ вирусологии,
кандидат медицинских наук



АЛИЕВА Л. Е.

Врач-лаборант
Референс-лаборатории



КАН Н. Г.