

«УТВЕРЖДАЮ»

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



2023 г.

ПРОТОКОЛ № 1

Типовых испытаний противовирусной эффективности

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

Цель испытания: оценить вирус инактивирующую эффективность Установок с моно излучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm и с излучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm в комбинированном сочетании с инфракрасным излучателем (с керамическим покрытием) на жизнеспособность и патогенность вируса гепатита В (HBV), обладающего лимфотропным свойством, в плазме крови. Оценить воздействие температуры ИК излучателя в комбинированном применении с излучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm.

Метод контроля функциональности Установок.

Испытана установка подвесная с моно излучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm и установка закрытого типа с излучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm в комбинации с ИК излучателем (излучатели снизу).

Для контроля функциональности Установок 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 с отрицательными результатами тестирования на предмет зараженности HBV, HCV. 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 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, перенесли в одну пробирку, разбавили в 4 мл физиологического раствора и перемешали. Взвесь лимфоцитов получали параллельно с инкубацией плазмы в установках.

Материал для проведения инактивации вирусов в Установке.

Для проведения инактивации вирусов HBV отбирали плазму крови больных с высоким содержанием вирусной нагрузки моно-HBV инфекции. Процедуру инактивации вирусов проводили в стерильных полистироловых планках.

Оценка *in vitro* жизнеспособности и цитопатогенных свойств лимфотропных вирусов HBV, инаktivированных в установке.

Вирус инаktivирующую эффективность Установки с длиной волны 750 nm изучали путем оценки *in vitro* лишения цитопатогенных свойств инаktivированных в установке вирусов HBV относительно лимфоцитов человека под влиянием 0,01% раствора фотоактивированного метиленового синего.

Плaшки после инкубации вынимали из Установок. Содержимое каждой планки переносили в центрифужные пробирки. Далее в каждую пробирку испытания добавляли 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 каждую пробирку добавляли по 10 мл физиологического раствора, содержимое перемешивали. Лимфоциты осаждали путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 30 минут. Лимфоциты осаждаются на дно пробирок. Надосадочная жидкость удаляется. Подобным образом лимфоциты отмываются еще 2-хкратно.

Фиксация вирусов, адсорбированных на наружной поверхности мембраны лимфоцитов.

После 3-х кратного центрифугирования и удаления надосадочной жидкости для фиксирования вирусов, адсорбированных на наружной поверхности мембраны лимфоцитов, во все пробирки добавляли по 10 капель 2% глютаральдегида на 30 секунд. Далее лимфоциты отмывали в физиологическом растворе: в пробирки добавляли 10 мл физиологического раствора, перемешивали и подвергали центрифугированию по вышеуказанной схеме. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспендировали и переносили в чистую пробирку с 10 мл физиологического раствора. Промывку лимфоцитов осуществляли еще раз.

После последнего центрифугирования из пробирок удаляли надосадочную жидкость, осадок лимфоцитов разбавляли 500 мкл физиологического раствора,

перемешивали и переносили в новые, чистые пробирки.

Разрушение лимфоцитов.

Для разрушения лимфоцитов пробирки ставили в морозильную камеру на минус 20⁰С на 16-18 часов. При медленном замораживании происходит разрушение мембран лимфоцитов. После разрушения пробирки с содержимым вынимали из морозильной камеры, оттаивали при комнатной температуре. Далее, для удаления из взвеси мембранных структур разрушенных лимфоцитов пробирки подвергали центрифугированию при 3000 об/мин. в течение 30 минут. На дно пробирки осаждаются мембранные структуры, в надосадочной жидкости остается содержимое цитоплазмы лимфоцитов. Надосадочная жидкость из пробирок переливали в эппендорф 1,5мл и подвергали количественному ПЦР-исследованию на предмет наличия или отсутствия ДНК вируса гепатита В в содержимом цитоплазмы лимфоцитов.

Оценка результатов исследований.

Положительный результат ПЦР исследования – обнаружение ДНК вируса гепатита В 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.

В качестве контроля используется та же положительная плазма, не инактивированная в установке, инкубированная с клетками лимфоцитов здорового донора.

19.10.2022г.

Опыт 1. Установка закрытого типа с излучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm в комбинации с ИК излучателем (установленными снизу). При использовании ИК излучателя температурный режим в камере достигает 56-60⁰С.

В 1 и 2 лунки пластиковых плашек налили 3,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+. Образец №1 облучали ИК излучателем в течении 60 минут. В образец №2 добавили 3,0 мл 0,02% раствора МС (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. Оба образца инкубировали в Установке с излучателем длиной волны 750 nm в течение 90 минут.

Результат. В процессе экспозиции в установке с ИК плазма свернулась.

Опыт приостановлен из-за отсутствия образца сравнения под воздействием ИК излучения

Опыт 2. Установка закрытого типа с излучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm в комбинации с ИК излучателем

(установленными снизу). При использовании ИК излучателя температурный режим в камере достигает 50°C.

В 1 и 2 лунки пластиковых плашек налили 3,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+. Образец №1 облучали ИК излучателем в течении 15 минут. В оба образца добавили по 3,0 мл 0,02% раствора МС (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. Далее образцы инкубировали в Установке с излучателем длиной волны 750 nm в течение 90 минут.

Результат. После экспозиции в Установке в течение 90 минут наблюдались изменения объема смеси в лунках (объем уменьшился).

После инкубации смесей в Установке, инкубации с лимфоцитами здорового человека, отмывки лимфоцитов и разрушения их, содержимое цитоплазмы лимфоцитов с помощью ПЦР исследовали на предмет обнаружения ДНК HBV. Результаты ПЦР представлены в таблице №1

Табл№1

№№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
3	B1	↓750	2,8E+02
4	B2	↓750	2,2E+02

В качестве контроля испытания в 3 лунку пластиковой плашки наливали 3,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV + 1,0 мл взвеси лимфоцитов. 4 образец нативная плазма содержащая вирус гепатита В, контроль плазмы. Результаты исследования в табл №2

Табл№2

№№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
5	B3(К+ с лимфоцитами)	без излучателя	1,9E+02
6	B4(К+ нативная плазма)	без излучателя	более 9,9E+07

15.02.2023г.

Опыт 3. В опыте использовались 3 установки:

- 1 Установка закрытого типа с излучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm в комбинации с ИК излучателем (установленными снизу). При использовании ИК излучателя температурный режим в камере достигает 40°C;
- 2 Установка открытого типа с излучением монохроматических излучателей длиной волны 660 nm, излучение сверху;
- 3 Установка подвесная с моно излучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm (установленными сверху).

В 1 и 2 лунки пластиковых плашек налили 3,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+ прогрели при температуре 40°C в течении 30 мин. Добавили 3,0 мл 0,02% раствора метиленового синего (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. Плашку инкубировали в Установке №1 в течение 90 минут.

В лунку 3 и 4 пластиковых плашек налили 3,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+ добавили 3,0 мл 0,02% раствора метиленового синего (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. Плашку инкубировали в Установке №2 и №3 в течение 90 минут.

Результат.

После экспозиции в Установке №1 в течение 90 минут наблюдались изменения объема смеси в лунках (объем уменьшился).

В процессе экспозиции в Установках №2 и №3 в течение 90 минут объем смесей во всех лунках уменьшений не претерпел.

После инкубации смесей в Установке, инкубации с лимфоцитами здорового человека, 5 кратной отмывки лимфоцитов и разрушения их, содержимое цитоплазмы лимфоцитов с помощью ПЦР исследовали на предмет обнаружения ДНК HBV. Результаты ПЦР представлены в таблице №3

Табл №3

№.№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
1	B1	↑750	42
2	B2	↑750	51
3	B3	↓660	5,9E+02
4	B4	↓750	1,5E+02

В качестве контроля испытания в лунку 5 пластиковой плашки наливали 3,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV + 1,0 мл взвеси лимфоцитов. 6 образец нативной плазмы содержащей вирус гепатита В, контроль плазмы. Результаты исследования в табл №4

Табл №4

№.№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
5	B5(К+ с лимфоцитами)	без излучателя	1,4E+02
6	B6(К+ нативная плазма)	без излучателя	более 9,9E+07

22.02.2023г

Опыт 4. В опыте использовались 3 установки:

- 1 Установка закрытого типа с излучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm в комбинации с ИК излучателем (установленными снизу). При использовании ИК излучателя температурный режим в камере достигает 40°C;
- 2 Установка закрытого типа с излучением монохроматических излучателей длиной волны 590 nm, излучение сверху и снизу;
- 3 Установка подвесная с моно излучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm (установленными сверху).

В 1 и 2 лунки пластиковых плашек налили 4,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+ прогрели при температуре 40°C в течении 60 мин. Добавили 4,0 мл 0,02% раствора метиленового синего (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. После добавления раствора МС плашку инкубировали при комнатной температуре в течении 15 мин, затем поместили в установку №1, инкубировали в течение 90 минут.

В лунку 3 пластиковых плашек налили 4,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+ добавили 4,0 мл 0,02% раствора метиленового синего (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. Плашку инкубировали в Установке №2 в течение 60 минут.

В лунку 4 пластиковых плашек налили 4,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+ добавили 4,0 мл 0,02% раствора метиленового синего (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. Плашку инкубировали в

Установке №3 в течение 90 минут.

Дополнительный образец №5. В лунку 5 пластиковых плашек налили 4,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+ добавили 4,0 мл 0,02% раствора метиленового синего (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. Плашку прогрели в СВЧ 10 секунд.

Результат. В процессе экспозиции в Установке №1 изменился цвет жидкости образца №1. Наблюдались изменения объема смеси в лунках (объем уменьшился)

После экспозиции в Установке №2 и №3 объем смесей во всех лунках уменьшений не претерпел.

После инкубации смесей в Установке, инкубации с лимфоцитами здорового человека, бти кратной отмывки лимфоцитов и разрушения их, содержимое цитоплазмы лимфоцитов с помощью ПЦР исследовали на предмет обнаружения ДНК HBV. Результаты ПЦР представлены в таблице №5

Табл №5

№.№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
1	B1	↑750	ДНК ВГВ не обнаружено
2	B2	↑750	ДНК ВГВ не обнаружено
3	B3	↑↓ 590	ДНК ВГВ не обнаружено
4	B4	↓750	ДНК ВГВ не обнаружено

Дополнительный образец №5. Наблюдается не значительное изменение цвета раствора, осадок в виде белых хлопьев (предположительно белок свернувшийся под воздействием СВЧ). После инкубации с лимфоцитами здорового человека, отмывки лимфоцитов и разрушения их, содержимое цитоплазмы лимфоцитов с помощью ПЦР исследовали на предмет обнаружения ДНК HBV. Результаты ПЦР представлены в таблице №7

Табл №6

№.№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
5	B5	без излучателя	1E+03

В качестве контроля испытания в 6 лунку пластиковой плашки наливали 3,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV + 1,0 мл взвеси лимфоцитов. 7 образец нативной плазмы содержащей вирус гепатита В, контроль плазмы. Результаты ПЦР представлены в таблице №7

Табл №7

№.№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
6	B6(K+ с лимфоцитами)	без излучателя	1E+03
7	B7(K+ нативная плазма)	без излучателя	1E+07

Заключение.

При изучении возможности изменения объема смеси в лунках после экспозиции в **Установке подвесной с излучателями длиной волны 750 nm** (↓установленными с верху) в течение 90 минут выявлено, что после экспозиции в **объем смесей** в лунках уменьшений не претерпело. В процессе экспозиции **МС невыпадает в осадок**.

При изучении возможности изменения объема смеси в лунках после экспозиции в **Установке с излучателями длиной волны 750 nm снизу, в комбинации с ИК** (↑установленными снизу) в течение 90 минут выявлено, что после экспозиции **объем смесей** в лунках уменьшается в два раза, **МС выпадает в осадок**.

После инкубации смесей в Установке с излучателями длиной волны 750 nm, в комбинации с ИК (↑установленными снизу) с лимфоцитами здорового человека, отмывки лимфоцитов и разрушения их, содержимое цитоплазмы лимфоцитов при ПЦР исследовании на предмет обнаружения ДНК HBV дали отрицательный результат, что указывает на инактивацию вируса, потерю его жизнеспособности и способности проникать в цитоплазму лимфоцитов.

В то время как в контрольном образце К+ (плазма с высоким содержанием вирусных частиц инкубированная с клетками лимфоцитов здорового донора), без инактивации в установках, результат ПЦР был положительный, что свидетельствуют о сохранении жизнеспособности вирусов и их способности проникать в клетки лимфоцитов.

Зав.референс лаборатории,
доктор мед. наук

Врач-вирусолог



Джураев Р. Х.

Кан Н. Г.