

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИ вирусологии МЗ РУз,
Профессор Ахсабаев Э.И.



22.04 2022 г.

ПРОТОКОЛ № 1

Типовых испытаний

противовирусной эффективности

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

Цель испытания:

Оценить вирус инактивирующий эффект:

- Устройства с монохроматическими излучателями длиной волны 750 nm (подвесной, открытый тип), (далее Устройство);
- Установки с монохроматическими излучателями с длиной волны 750 nm в комбинированном сочетании с инфракрасным излучателем (с керамическим покрытием), (далее Установка) на жизнеспособность и патогенность вируса гепатита В (HBV), обладающего лимфотропным свойством, в плазме крови. Оценить воздействие температуры ИК излучателя в комбинированном применении с облучением монохроматических излучателей длиной волны 750 nm.

Метод контроля функциональности Установок.

Испытано Устройство подвесное с монохроматическими излучателями длиной волны 750 nm и Установка с монохроматическими излучателями длиной волны 750 nm (снизу) в комбинации с ИК излучателем (сверху).

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 плашках.

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

Вирус инактивирующую эффективность Устройства и Установки изучали путем оценки *in vitro* лишения цитопатогенных свойств инактивированных в установке вирусов HBV относительно лимфоцитов человека под влиянием 0,01% раствора фотоактивированного метиленового синего.

Плашки после инкубации вынимали из Устройства и Установки. Содержимое каждой плашки 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% глутаральдегида 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.

15.01.2022г.

Опыт 1. Установка. 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 НВV+ 3,0 мл 0,02% раствора МС (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. Плашку инкубировали в Установке в течение 90 минут.

Результат. В процессе экспозиции в Установке МС **выпал в осадок.**

После экспозиции в Установке в течение 90 минут наблюдались изменения объема смеси в лунках (объем уменьшился в два раза). На стенках плашек видимая пленка подсохшей плазмы. Материал с плашки собран полностью, включая пленку.

После инкубации смесей в Установке, инкубации с лимфоцитами здорового человека, отмывки лимфоцитов и разрушения их, содержимое цитоплазмы лимфоцитов 1 и 2 лунки 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
1	B1	↑750	4,3E+03
2	B2	↑750	2,4E+03

Опыт 2. Устройство. В 3 и 4 лунки пластиковых плашек налили 3,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+ 3,0 мл 0,02% раствора МС (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. Плашку инкубировали в Устройстве в течение 90 минут.

Результат. В процессе экспозиции в Устройстве МС не выпадает в осадок. После экспозиции в Устройстве в 2х лунках объем смеси остался по 6 мл. То есть объем смесей во всех лунках уменьшений не наблюдался.

После инкубации смесей в Устройстве, инкубации с лимфоцитами здорового человека, отмывки лимфоцитов и разрушения их, содержимое цитоплазмы лимфоцитов 3 и 4 лунки с помощью ПЦР исследовали на предмет обнаружения ДНК HBV. Результаты ПЦР представлены в таблице №2

Табл.№2

№№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
3	B3	↓750	1,3E+03
4	B4	↓750	8,2E+02

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

Табл.№3

№№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
5	B5(К+ с лимфоцитами)	без излучателя	8,7E+02
6	B6(К+ нативная плазма)	без излучателя	более 9,9E+07

02.02.2022г.

Опыт 3. Установка. При использовании ИК излучателя температурный режим в камере достигает 56-60°C.

В 1 и 2 лунки пластиковых плашек налили 3,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+ 3,0 мл 0,02% раствора МС (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. Плашку инкубировали в Установке в течение 90 минут.

Результат. В процессе экспозиции в Установке МС выпал в осадок.

После экспозиции в Установке в течение 90 минут наблюдались изменения объема смеси в лунках (объем уменьшился в два раза). На стенках плашек видима пленка подсохшей плазмы. Материал с плашки собран полностью, включая пленку.

Результат. В процессе экспозиции в Установке МС **выпал в осадок.**

После экспозиции в Установке в течение 90 минут наблюдались изменения объема смеси в лунках (объем уменьшился в два раза). На стенках плашек видимая пленка подсохшей плазмы. Жидкость переливали в пробирки без пленки.

После инкубации смесей в Установке, инкубации с лимфоцитами здорового человека, отмывки лимфоцитов и разрушения их, содержимое цитоплазмы лимфоцитов 1 и 2 лунки с помощью ПЦР исследовали на предмет обнаружения ДНК HBV. Результаты ПЦР представлены в таблице №4

Табл.№4

№.№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
1	B1	↑750	отрицательный
2	B2	↑750	отрицательный

Опыт 4. Устройство. В 3 и 4 лунки пластиковых плашек налили 3,0 мл вирусодержащей плазмы с HBV+ 3,0 мл 0,02% раствора МС (аптечного). Конечная концентрация МС в смеси 0,01%. Плашку инкубировали в Устройстве в течение 90 минут.

Результат. В процессе экспозиции в Устройстве МС **не выпадает в осадок.**

После экспозиции в Устройстве в 2х лунках объем смеси остался по 6 мл. То есть объем смесей во всех лунках уменьшений не наблюдался.

После инкубации смесей в Устройстве, инкубации с лимфоцитами здорового человека, отмывки лимфоцитов и разрушения их, содержимое цитоплазмы лимфоцитов 3 и 4 лунки 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
3	B3	↓750	5,2E+02
4	B4	↓750	2,0E+02

В качестве контроля испытания в 5 лунку пластиковой плашки наливали 3,0 мл вирусодержащей плазмы с HBV + 1,0 мл взвеси лимфоцитов. Результаты ПЦР представлены в таблице №6

Табл.№6

№.№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
5	B5(K+)	без излучателя	3,4E+07

Заключение.

При изучении возможности изменения объема жидкости облучаемого образца в лунках после экспозиции с использованием **Устройства** в течение 90 минут, **не наблюдалось**. В процессе экспозиции **МС не выпал в осадок**.

При изучении возможности изменения объема жидкости облучаемого образца в лунках после экспозиции с использованием **Установки** в течение 90 минут выявлено, что после экспозиции **объем жидкости в лунках уменьшается в два раза, МС выпадает в осадок**.
Результаты ПЦР представлены в таблице №7

Табл№7

№.№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
1	B1	↑750	отрицательный
2	B2	↑750	отрицательный
3	B3	↓750	5,2E+02
4	B4	↓750	2,0E+02
5	B5 (K+)	без излучателя	3,4E+07

После инкубации образца плазмы в Установке с лимфоцитами здорового человека, отмывки лимфоцитов и разрушения их, содержимое цитоплазмы лимфоцитов из 1 и 2 лунки 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 плазмы K+ (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.