

«УТВЕРЖДАЮ»



Главный врач Центра Государственного
санитарно-эпидемиологического надзора

Минздрава РУз

ШОУМАРОВ С.Б.

« 23 » Января 2009 Г.

ПРОТОКОЛ

Испытаний противовирусной эффективности
«Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском
инструментарии», разработанной в ООО «New Medical Technologies»

Согласно письменного обращения ООО «New Medical Technologies» за №11 от 05.12.2008г. Центром вирусологических исследований Республиканского Центра Госсанэпиднадзора (РЦГСН) МЗ РУз проведены испытания противовирусной эффективности «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» - в дальнейшем «Установки», разработанной и созданной ООО «New Medical Technologies». В проведении исследований эффективности установки участвовали: заведующая Центром вирусологических исследований РЦГСН МЗ РУз, кандидат медицинских наук Джемилева С.Ф., Врач-бактериолог кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Норбоев Н.М.

Цель проведения исследований:

Оценить противовирусную эффективность и целесообразность внедрения для практического применения «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» в учреждениях здравоохранения Республики Узбекистан.

Задачи исследования:

Оценить влияние «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на жизнеспособность и цитопатогенные свойства вирусов заболеваний человека и бактериальных вирусов (бактериофагов).

I серия испытаний.

Оценка влияния «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на активность вирусов заболеваний человека.

Используемое оборудование:

Установка для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии

Ламинарный бокс

Термостат

Используемые инструменты:

Дозаторы автоматические 20-200мкл

Дозаторы автоматические 100-1000мкл

Материалы и реактивы:

Наборы одноразовых пробирок 10-50мл

Стерильные плашки на 96 лунок

Штативы с наконечниками 20-200мкл

Штативы с наконечниками 20-200мкл

Краситель метиленовый синий сухой

Дистиллированная вода

Стерильный физиологический раствор

Питательные среды

Вакцинные штаммы вирусов полиомиелита I, II и III типа

Введение. Характеристика вирусов заболеваний человека, использованных при испытании установки.

Полиовирус представлен тремя серотипами, которые относятся к роду Enterovirus семейства Picornaviridae. Вирион полиовируса представляет собой икосаэдрическую частицу диаметром приблизительно 27 нм. Капсид состоит из 60 субъединиц, каждая из которых содержит 4 белка (VP1-VP4), и окружает геном, представленный одноцепочечной РНК положительной полярности. Капсидные и некапсидные белки вириона формируются путем расщепления крупных полипротеинов-предшественников. Исследования дифракции в рентгеновских лучах позволили установить трехмерную молекулярную структуру вириона полиовируса. Три более крупных белка (VP1-VP3), сходны по строению: полипептидная цепь каждого из них образует плотно лежащие петли и формирует структуру типа «бочонка» из 8 цепей, удерживаемых водородными связями («бета-бочонок»). Между «бочонком» и аминным и карбоксильным концевыми участками белка аминокислотная цепь образует много петель, на которых и локализуются основные антигенные детерминанты, обнаруживаемые на поверхности вириона. Самый малый (внутренний) белок VP4 связан с вирусной РНК, участвуя во встраивании ее в капсид зрелого вириона.

Полиовирусы подобно другим энтеровирусам устойчивы при кислых значениях рН в течение 1-3 часов, имеют плавучую плотность 1,34 г/см³. Так как вирион не имеет оболочки, содержащей липиды, он не повреждается растворителями жиров, такими как этиловый эфир, хлороформ или дезоксихолат натрия.

Полиовирус размножается в цитоплазме инфицированных клеток, инфекционный цикл занимает примерно 6 часов. Зрелый вирус высвобождается из клетки, вызывая ее распад. В лабораторных условиях вирус культивируют в первичных или перевиваемых культурах клеток различных тканей человека и обезьян. Для проведения исследований использовались клеточные культуры Нер-2 (Cincinnati), происходящие из эпидермоидной карциномы человека, привезенные из института Полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН им. М.П. Чумакова (г.Москва).

В качестве эталонных штаммов были использованы музейные штаммы вируса полиомиелита I, II и III типа, культивированные в Национальном Институте Биологических Стандартов и Контроля, Великобритания (NIBSC, WHO International Laboratory for Biological Standards) Code No: 95/602, которые также привезены из института Полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН им. М.П. Чумакова (г.Москва).

Принцип оценки влияния «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на вирусы заболеваний человека заключался в следующем:

1. На дно всех лунок 96-ти луночных пластиковых планшетов наносили питательную среду и засеивали культуры клеток Нер-2 (Cincinnati). Для размножения клеток планшеты инкубировали в термостате с температурой 37°C. Для исследований использовали односуточные культуры клеток. Состояние (целостность и жизнеспособность) клеток оценивали под светооптическим микроскопом.
2. В лунки другого чистого планшета заливали по 50 мкл раствора метиленового синего различной концентрации. Часть лунок оставляли не залитыми раствором метиленовой сини. Далее в лунки планшета как с раствором метиленового синего, так в чистые лунки, заливали по 50 мкл взвеси эталонных штаммов вируса полиомиелита. Планшет вносили в «Установку для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на различное время экспозиции. После экспозиции в установке планшеты вынимали.
3. После экспозиции планшета в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» соблюдая точность в нумерации содержимое лунок переносили в лунки планшета с засеянными культурами клеток Нер-2 (Cincinnati) и ставили на инкубацию в термостат при температуре 37°C. Учет результатов производили под светооптическим микроскопом через 1 и 2 сутки после инкубации.

По наличию или ЦПЭ (цитопатогенного эффекта) в культуре клеток определялось эффективность обеззараживания вируса в следующих измерениях и величинах:

- а) 0 - баллов – отсутствие лизиса, сохранение целостности и жизнеспособности всех клеток на дне лунки. Данный результат является свидетельством отсутствия или полной инактивации вирусов;
- б) 1+ - лизис и разрушение до 25% клеток – сохранение слабой степени цитопатогенной активности вирусов;
- в) 2+ - лизис и разрушение до 50% клеток – сохранение умеренной степени цитопатогенной активности вирусов;
- г) 3+ - лизис и разрушение до 75% клеток – сохранение значимой степени цитопатогенной активности вирусов;

д) 4+ - лизис и разрушение до 100% клеток – полное сохранение цитопатогенной активности вирусов.

Результаты проведенных исследований эффективности «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на полиовирусах. (Первый опытный образец установки).

Опыт первый. Использованные концентрации метиленового синего: 0,001%, 0,0005% и 0,0001% растворы. Время экспозиции в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» – 30 минут.

		Концентрация раствора метиленового синего (%)						Контроль вируса		Контроль клеток				
		0,001		0,0005		0,0001								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Вирусы полиомиелита	I тип	A	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0		
		B	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0		
	II тип	C	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0		
		D	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0		
	III тип	E	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0		
		F	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0		
		G												
		H												

Условные обозначения: 4+ - лизис и разрушение до 100% клеток – полное сохранение цитопатогенной активности (ЦПА) вирусов; 0 – отсутствие ЦПЭ вирусов; К/к – контроль клеток (интактные клетки Нер-2 (Cincinnati) без воздействия вирусов); К/в – контроль вируса (интактные вирусы без воздействия на установку).

Результаты первого опыта.

- 1) Столбцы 9 и 10. Интактные клетки Нер-2 (Cincinnati) без воздействия вирусов после 1 и 2 суточной инкубации в термостате не подверглись лизису, сохранили свою нормальную структуру и жизнеспособность - 0.
- 2) Столбцы 7 и 8. После инкубации с интактными полиовирусами I, II и III типов 100% клеток Нер-2 (Cincinnati) подверглись лизису - 4+.
- 3) Столбцы 1-6. После инкубации с полиовирусами I, II и III типов, подвергшихся влиянию 0,001%, 0,0005% и 0,0001% растворами метиленового синего в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» в течении 30 минут, 100% клеток Нер-2 (Cincinnati) подверглись лизису. То есть, вирусы сохранили свои цитопатогенные свойства и инактивация вирусов не наступила - 4+.

Вывод 1: Экспозиция полиовирусов в рабочей камере «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» с 0,001%, 0,0005% и 0,0001% растворов метиленовой сини в течение 30 минут не способствовала инактивации вирусов.

Опыт второй. Использованные концентрации метиленового синего: 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005% и 0,001% растворы. Время экспозиции в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» – 90 минут.

		Концентрация раствора метиленового синего (%)										К/в	К/к	
		0,1		0,05		0,01		0,005		0,001				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11
Вирусы полиомиелита	I тип	A	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	4+	4+	0
		B	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	4+	4+	0
	II тип	C	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	4+	4+	0
		D	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	4+	4+	0
	III тип	E	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	4+	4+	0
		F	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	4+	4+	0
		G												
		H												

Условные обозначения: 4+ - лизис и разрушение до 100% клеток – полное сохранение цитопатогенной активности (ЦПА) вирусов; 0 – отсутствие ЦПЭ вирусов; К/к – контроль клеток (интактные клетки Нер-2 (Cincinnati) без воздействия вирусов); К/в – контроль вируса (интактные вирусы без воздействия на установке).

Результаты второго опыта.

- 1) Столбец 12. Интактные клетки Нер-2 (Cincinnati) без воздействия вирусов после 1 и 2 суточной инкубации в термостате не подверглись лизису, сохранили свою нормальную структуру и жизнеспособность - 0.
- 2) Столбец 11. После инкубации с интактными полиовирусами I, II и III типов 100% клеток Нер-2 (Cincinnati) подверглись лизису - 4+.
- 3) Столбцы 7,8,9,10. После инкубации с полиовирусами I, II и III типов, подвергшихся влиянию 0,005%, 0,001% растворами метиленового синего в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» в течении 90 минут, 100% клеток Нер-2 (Cincinnati) подверглись лизису - 4+. То есть, вирусы сохранили свои цитопатогенные свойства и инактивация вирусов не наступила.

4. Столбцы 1-6. После инкубации с полиовирусами I, II и III типов, подвергшихся влиянию 0,1%, 0,05%, 0,01% растворами метиленового синего в «Установке для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» в течении 90 минут, лизис клеток Нер-2 (Cincinnati) не был отмечен – 0. То есть, вирусы полностью утратили свои цитопатогенные свойства и наступила инаktivация вирусов.

Вывод 2. а) Экспозиция в рабочей камере «Установки для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» полиовирусов I, II и III типов с применением 0,005%, 0,001% растворов метиленового синего в течение контрольных 90 минут не способствовало инаktivации вирусов;

б) Экспозиция в рабочей камере «Установки для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» полиовирусов I, II и III типов с применением 0,1%, 0,05%, 0,01% растворов метиленового синего в течение 90 минут способствовала полной инаktivации вирусов.

Опыт третий. Третий опыт проведен с целью подтверждения результатов второго опыта. Использованные концентрации метиленового синего: 0,1%, 0,05% и 0,01%, растворы. Время экспозиции в «Установке для инаktivации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» – 90 минут.

		Концентрация раствора метиленового синего в %						Контроль вируса		Контроль клеток				
		0,1		0,05		0,01								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Вирусы полиомиелита	I тип	A	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
		B	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
	II тип	C	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
		D	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
	III тип	E	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
		F	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
		G												
		H												

Условные обозначения: 4+ - лизис и разрушение до 100% клеток – полное сохранение цитопатогенной активности (ЦПА) вирусов; 0 – отсутствие ЦПЭ вирусов; К/к – контроль клеток (интактные клетки Нер-2 (Cincinnati) без воздействия вирусов); К/в – контроль вируса (интактные вирусы без воздействия на установку).

Результаты третьего опыта.

- 1). Столбцы 9 и 10. Интактные клетки Нер-2 (Cincinnati) без воздействия вирусов после 1 и 2 суточной инкубации в термостате не подверглись лизису, сохранили свою нормальную структуру и жизнеспособность - 0.
- 2) Столбцы 7 и 8. После инкубации с интактными полиовирусами I, II и III типов 100% клеток Нер-2 (Cincinnati) подверглись лизису - 4+.
4. Столбцы 1-6. После инкубации с полиовирусами I, II и III типов, подвергшихся влиянию 0,1%, 0,05%, 0,01% растворами метиленового синего в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» в течении 90 минут, лизис клеток Нер-2 (Cincinnati) не был отмечен – 0. То есть, вирусы полностью утратили свои цитопатогенные свойства и наступила инактивация вирусов.

Вывод 3. Экспозиция в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» полиовирусов I, II и III типов с применением 0,1%, 0,05%, 0,01% растворов метиленового синего в течение 90 минут способствовала полной инактивации вирусов.

Внесение изменений в параметры «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» (первого опытного образца).

Исходя из того, что опытный образец «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» обеспечивал стабильный противовирусный эффект при длительном – в течение 90 минут воздействии его на вирусы, разработчиками по согласованию с вирусологами мощность излучения монохроматического излучателя «установки» был повышен в 1,8 раза (второй опытный образец установки).

Результаты проведенных исследований эффективности «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на полиовирусах. (Второй опытный образец установки).

Опыт четвертый. Четвертый опыт проведен с целью оценки противовирусного эффекта второго образца «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии». Использованные концентрации метиленового синего: 0,1%, 0,05% и 0,01%, растворы. Время экспозиции в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» – 90 минут.

Результаты четвертого опыта.

- 1). Столбцы 9 и 10. Интактные клетки Нер-2 (Cincinnati) без воздействия вирусов после 1 и 2 суточной инкубации в термостате не подверглись лизису, сохранили свою нормальную структуру и жизнеспособность - 0.
- 2) Столбцы 7 и 8. После инкубации с интактными полиовирусами I, II и III типов 100% клеток Нер-2 (Cincinnati) подверглись лизису - 4+.
4. Столбцы 1-6. После инкубации с полиовирусами I, II и III типов, подвергшихся влиянию 0,1%, 0,05%, 0,01% растворами метиленового синего

во втором образце «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» в течении 90 минут, лизис клеток Нер-2 (Cincinnati) не был отмечен – 0. То есть, вирусы полностью утратили свои цитопатогенные свойства и наступила инактивация вирусов.

		Концентрация раствора метиленового синего в %						Контроль вируса		Контроль клеток				
		0,1		0,05		0,01								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11
Вирусы полиомиелита	I тип	A	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
		B	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
	II тип	C	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
		D	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
	III тип	E	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
		F	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
			G											
			H											

Условные обозначения: 4+ - лизис и разрушение до 100% клеток – полное сохранение цитопатогенной активности (ЦПА) вирусов; 0 – отсутствие ЦПА вирусов; К/к – контроль клеток (интактные клетки Нер-2 (Cincinnati) без воздействия вирусов); К/в – контроль вируса (интактные вирусы без воздействия на установку).

Вывод 4. а) Экспозиция в рабочей камере «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» полиовирусов I, II и III типов с применением 0,1%, 0,05%, 0,01% растворов метиленового синего в течение 90 минут способствовала полной инактивации вирусов.

Принято решение об уменьшении времени

Опыт пятый. Пятый опыт проведен с целью подтверждения противовирусного эффекта второго образца «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» при уменьшенном времени экспозиции. Использованные концентрации метиленового синего: 0,1%, 0,05% и 0,01%, растворы. Время экспозиции в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» – 45 минут.

		Концентрация раствора метиленового синего в %						Контроль вируса		Контроль клеток				
		0,1		0,05		0,01								
				1	2	3	4	5	6	7	8			9
Вирусы полиомиелита	I тип	A	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
		B	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
	II тип	C	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
		D	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
	III тип	E	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
		F	0	0	0	0	0	0	4+	4+	0	0		
			G											
			H											

Условные обозначения: 4+ - лизис и разрушение до 100% клеток – полное сохранение цитопатогенной активности (ЦПА) вирусов; 0 – отсутствие ЦПЭ вирусов; К/к – контроль клеток (интактные клетки Нер-2 (Cincinnati) без воздействия вирусов); К/в – контроль вируса (интактные вирусы без воздействия на установку).

Результаты пятого опыта.

- 1). Столбцы 9 и 10. Интактные клетки Нер-2 (Cincinnati) без воздействия вирусов после 1 и 2 суточной инкубации в термостате не подверглись лизису, сохранили свою нормальную структуру и жизнеспособность - 0.
- 2) Столбцы 7 и 8. После инкубации с интактными полиовирусами I, II и III типов 100% клеток Нер-2 (Cincinnati) подверглись лизису - 4+.
4. Столбцы 1-6. После инкубации с полиовирусами I, II и III типов, подвергшихся влиянию 0,1%, 0,05%, 0,01% растворами метиленового синего во втором образце «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» в течении 45 минут, лизис клеток Нер-2 (Cincinnati) не был отмечен – 0. То есть, вирусы полностью утратили свои цитопатогенные свойства и наступила инактивация вирусов.

Вывод 5. а) Экспозиция в рабочей камере «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» полиовирусов I, II и III типов с применением 0,1%, 0,05%, 0,01% растворов метиленового синего в течение 45 минут способствовало полной инактивации вирусов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам I серии испытаний по оценке влияния «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на активность вирусов заболеваний человека.

«Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» (второй опытный образец установки) разработанный ООО «New Medical Technologies» стабильно обеспечивает полную инактивацию полиовирусов всех I, II и III типов. После экспозиции *в рабочей камере «Установки»* с применением растворов метиленового синего вирусы полностью инактивируются - лишаются цитопатогенности, инвазивности и репликативной активности. Наиболее оптимальными концентрациями для инактивации вирусов заболеваний человека в установке являются 0,05% и 0,01% растворы метиленового синего. Оптимальным временем экспозиции в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» для полной инактивации вирусов заболеваний человека являются 45 минут.

II серия испытаний.

Оценка влияния «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на активность бактериальных вирусов (бактериофагов).

Оборудование:

Установка (второй образец) для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии
Микробиологический бокс
Термостат

Инструменты:

Дозаторы автоматические 20-200мкл
Дозаторы автоматические 100-1000мкл

Материалы и реактивы:

Стерильные плашки на 96 лунок
Штативы с наконечниками 20-200мкл
Штативы с наконечниками 20-200мкл
Стерильные чашки Петри
Краситель метиленовый синий сухой
Стерильный физиологический раствор
Питательные среды
Бактериофаг S.typhi
Бактериофаг S.typhimurium
Бактериофаг Sh. Flexneri 1^a

Характеристика вирусов бактерий (бактериофагов).

Бактериофаги или вирусы бактерий широко распространены в природе. Каждый вид бактерий имеет свой специфический бактериофаг: бактериофаги способны поражать, подвергать лизису и размножаться только в специфических для них бактериальных клетках. В условиях присутствия жизнеспособных специфических бактериофагов бактерии данного вида лизируются и в питательных средах их рост не отмечается. При испытаниях «Установки (второй образец) для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» использованы фаги *S.typhi*, *S.typhimurium* ES №45 и *Sh. Flexneri* 1^A, полученные из лаборатории фагодиагностики НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний МЗ РУз.

Эти фаги были получены и культивированы 10 лет назад, систематически применяются для диагностики бактериальных кишечных инфекций.

Перечисленные фаги в титрах 10^7 способны полностью уничтожить (подвергнуть лизису) соответствующие бактериальные клетки в культурах на питательных средах.

Принцип оценки влияния «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на бактериальные вирусы (бактериофаги) человека заключался в следующем:

1. В лунки 96-тилуночного чистого планшета заливали по 100 мкл раствора метиленового синего различной концентрации. Часть лунок оставляли не залитыми раствором метиленовой сини. Далее в лунки различных рядов планшета как с раствором метиленового синего, так в чистые лунки, заливали по 100 мкл взвеси фагов *S.typhi*, *S.typhimurium* ES №45 и *Sh. Flexneri* 1^A в титрах 10^7 в мкл. Планшет помещали в рабочую камеру «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на различное время экспозиции. После экспозиции в установке планшеты вынимали.
2. В различные чашки Петри со стерильной питательной средой осуществляли посев *S.typhi*, *S.typhimurium* и *Sh. Flexneri* 1^A по общепринятой в микробиологии методике. Чашки с посевами бактерий инкубировали в термостате при 37⁰С в течение 2-х часов.
3. После экспозиции планшетов в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» соблюдая точность в нумерации содержимое лунок наносили на поверхность двухчасовых *S.typhi*, *S.typhimurium* и *Sh. Flexneri* 1^A культур в чашках Петри. ставили на инкубацию в термостат при температуре 37⁰С. Учет результатов производили под стереоскопическим микроскопом через 1 и 2 сутки после инкубации.

Об эффективности инактивации фагов после их экспозиции в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» судили по наличию или отсутствию роста бактерий (лизирующего эффекта) на участках нанесения фагов на культуры бактерий в чашках Петри. Результаты оценивали следующим способом:

- а) + + + + – наличие роста бактерий на участке нанесения фагов. Данный результат является свидетельством отсутствия или полной инактивации бактериофагов;
- б) - - - - – полное отсутствие роста бактерий на участке нанесения фагов. Данный результат является свидетельством сохранения жизнеспособности и активности бактериофагов.

Опыт шестой. Опыт шестой проведен с целью оценки инактивирующего эффекта «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на бактериальные вирусы - бактериофаги. Использованные концентрации метиленового синего: 0,1%, 0,05% и 0,01%, растворы. Время экспозиции в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» – 90 минут.

		Экспозиция фагов в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии»						Контроль фагов		Контроль бактерий				
		Конц-я раствора метил. синего в %												
		0,1		0,05		0,01								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Бактериофаги	S. typhi	A	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
		B	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
	S. t. murium	C	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
		D	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
	Sh. Flexn. 1 ^A	E	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
		F	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
		G												
		H												

Условные обозначения: Контроль бактерий – рост бактерий без воздействия фагов; контроль фагов – рост бактерий при воздействии бактериофагов, не подверженных предварительному воздействию в установке; +++++ - интенсивный рост бактериальных клеток - отсутствие или полная инактивация фагов из этих лунок; ---- полное отсутствие роста бактерий – сохранение активности бактериофагов из этих лунок.

Результаты шестого опыта.

- 1) Столбцы 9 и 10. Контроль бактерий - рост без воздействия фагов. Все бактерии после 1 и 2 суточной инкубации в термостате сохранили свойства к интенсивному размножению и росту, сохранили свою нормальную структуру и жизнеспособность - +++++.
- 2) Столбцы 7 и 8. Контроль фагов – рост бактерий при воздействии бактериофагов, не подверженных предварительному воздействию в установке. Прекращение роста и лизис бактерий, бактериофаги проявили активность в высокой степени - ---- .

4. Столбцы 1-6. После инкубации с бактериофагами, подвергшимися влиянию 0,1%, 0,05%, 0,01% растворами метиленового синего в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» в течении 90 минут. Интенсивный рост и сохранение структуры бактерий –++++. То есть, в результате полной инактивации бактериофаги из этих лунок планшета не проявили активность относительно соответствующих видов бактерий.

Вывод 6. После экспозиции в рабочей камере «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» с применением 0,1%, 0,05%, 0,01% растворов метиленового синего в течение 90 минут бактериофаги *S.typhi*, *S.typhimurium* и *Sh. Flexneri 1* полностью инактивировались и лишились свойств поражать и лизировать соответствующие им бактериальные клетки.

Опыт седьмой. Опыт седьмой проведен с целью оценки инактивирующего эффекта «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на бактериальные вирусы – бактериофаги при уменьшенной времени экспозиции. Использованные концентрации метиленового синего: 0,1%, 0,05% и 0,01%, растворы. Время экспозиции в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» – 45 минут.

		Экспозиция фагов в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» Конц-я раствора метил. синего в %						Контроль фагов		Контроль бактерий				
		0,1		0,05		0,01								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11
Бактериофаги	<i>S.typhi</i>	A	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
		B	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
	<i>S.t.murium</i>	C	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
		D	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
	<i>Sh. Flexn.1^A</i>	E	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
		F	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++		
	G													
	H													

Условные обозначения: Контроль бактерий – рост бактерий без воздействия фагов; контроль фагов – рост бактерий при воздействии бактериофагов, не подверженных предварительному воздействию в установке; +++++ - интенсивный рост бактериальных клеток - отсутствие или полная инактивация фагов из этих лунок; ---- полное отсутствие роста бактерий – сохранение активности бактериофагов из этих лунок.

Результаты седьмого опыта.

1). Столбцы 9 и 10. Контроль бактерий - рост без воздействия фагов. Все бактерии после 1 и 2 суточной инкубации в термостате сохранили свойства к интенсивному размножению и росту, сохранили свою нормальную структуру и жизнеспособность - ++++.

2) Столбцы 7 и 8. Контроль фагов – рост бактерий при воздействии бактериофагов, не подверженных предварительному воздействию в установке. Прекращение роста и лизис бактерий, бактериофаги проявили активность в высокой степени - ---- .

4. Столбцы 1-6. После инкубации с бактериофагами, подвергшимися влиянию 0,1%, 0,05%, 0,01% растворами метиленового синего в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» в течении 45 минут. Интенсивный рост и сохранение структуры бактерий – ++++. То есть, в результате полной инактивации бактериофаги из этих лунок планшета не проявили активность относительно соответствующих видов бактерий.

Вывод 7. После экспозиции в рабочей камере «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» воздействия с применением 0,1%, 0,05%, 0,01% растворов метиленового синего в течение 45 минут бактериофаги S.typhi, S.typhimurium и Sh. Flexneri I^A полностью инактивировались и лишились свойств поражать и лизировать соответствующие им бактериальные клетки.

При контрольных повторях опытов шесть и семь полученные результаты подтверждались и были стабильными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам II серии испытаний по оценке влияния «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» на активность бактериальных вирусов (бактериофагов

«Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» разработанный ООО «New Medical Technologies» стабильно обеспечивает полную инактивацию бактериальных вирусов – бактериофагов. После экспозиции в установке с раствором метиленового синего бактериофаги полностью инактивируются - лишаются способности поражать и лизировать бактериальные клетки. Наиболее оптимальными концентрациями для инактивации бактериофагов в установке являются 0,05% и 0,01% растворы метиленового синего. Оптимальным временем экспозиции для полной инактивации бактериофагов в «Установке для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» являются – 45 минут.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

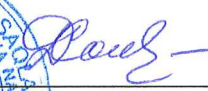
По результатам испытаний противовирусной эффективности «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии», разработанной в ООО «New Medical Technologies», проведенных в Центре вирусологических исследований и бактериологической лаборатории Республиканского Центра Госсанэпиднадзора МЗ РУз в период от 15.12.2008г. до 20.01.2009г.

«Установка для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии», разработанный ООО «New Medical Technologies» стабильно обеспечивает полную инактивацию вирусов заболеваний человека (полиовирусов) и бактериальных вирусов (бактериофагов). После экспозиции в Установке вирусы полностью инактивируются - лишаются цитопатогенности, инвазивности и репликативной активности. Наиболее оптимальными концентрациями для инактивации вирусов заболеваний человека в установке являются 0,05% и 0,01% растворы метиленового синего. Оптимальным временем экспозиции для полной инактивации вирусов заболеваний человека в Установке является – 45 минут.

Внедрение в практическое применение в медицинских учреждениях Республики Узбекистан «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии», разработанной ООО «New Medical Technologies» будет способствовать предупреждению заражения людей вирусными инфекциями при медицинских манипуляциях.

Заведующая Центром вирусологических исследований РЦГСН МЗ РУз,
кандидат медицинских наук



 Джемилева С.Ф.

Врач-бактериолог,
кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник

 Норбоев Н.М.