

«УТВЕРЖДАЮ»

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



«02» 2013 г.

ПРОТОКОЛ

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

Согласно Договоров между ООО «New Medical Technologies» (Генеральный директор – Арифбаев Р.С.) и Референс-лабораторией МЗ РУз (Заместитель директора – к.м.н. Алиева Л.Е.) б/н от 04.07.2012 г, б/н от 04.09.2012 г, между ООО «New Medical Technologies» и НИИ Вирусологии МЗ РУз (Директор института – д.м.н., профессор Мусабаев Э.И.) за №1 от 20.11.2012 г, за №4 от 07.12.2012 г, за №5 от 11.12.2012 г, Договора за №2 от 01.02.2013 г и за №03-8 от 25.02.2013 г. проведены испытания инактивирующей эффективности «Установки для инактивации РНК и ДНК содержащих вирусов на медицинском инструментарии» (Далее Установа), разработанной и созданной ООО «New Medical Technologies». Все испытания Установки проводились в Референс-лаборатории при НИИ вирусологии врачом-лаборантом Кан Н.Г

Цель проведения исследований:

Оценить инактивирующую эффективность и целесообразность внедрения в массовое производство и практику здравоохранения «Установки для инактивации РНК и ДНК вирусов на медицинском инструментарии» с монохроматическим излучателем с длиной волны в 590 нм (далее Установа) на жизнеспособность и патогенность вирусов заболеваний человека гепатита В (HBV), гепатита С (HCV) и ВИЧ (HIV), обладающих лимфотропными свойствами.

Введение.

Характеристика вирусов гепатита В, гепатита С и ВИЧ.

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.

Вирус гепатита С (HCV) является РНК содержащим вирусом, обладающим свойством поражать и реплицироваться как в гепатоцитах, так и в лимфоцитах человека.

Вирус иммунодефицита человека (HIV) относится к оболочечным

ретровирусам и является РНК-содержащим вирусом. Основными клетками-мишенями для поражения и репликации являются CD4 лимфоцит.

Следовательно, общим свойством HBV, HCV и HIV является их лимфотропизм - способность проникать и реплицироваться в лимфоидных клетках.

Метод контроля функциональности «Установки для инактивации РНК и ДНК содержащих вирусов на медицинском инструментарии» относительно HBV, HCV и HIV.

Для контроля функциональности Установки на жизнеспособность HBV, HCV и HIV был применен способ оценки свойств вирусов поражать и персистировать внутриклеточно в лимфоцитах человека *in vitro*. Способ разработан проф. Гулямовым Н.Г.

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 утром натощак из локтевой вены в количестве 60-80 мл. Далее кровь по 7-8 мл переносили в центрифужные пробирки, содержащие 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. в мин. Далее проводили 2х-3х кратное промывание лимфоцитов в физиологическом растворе с последующим центрифугированием. После последнего центрифугирования удаляли надосадочную жидкость. Осадок, содержащий лимфоциты, разбавляли 600 мкл физиологического раствора и перемешивали.

Проведение инактивации и оценка способности вирусов HBV, HCV или HIV проникать в лимфоциты человека *in vitro*.

Для проведения исследований отбирали плазму крови больных с высоким содержанием моно- HBV, HCV или HIV инфекций. Вируссодержащую плазму разделяли по объему на две равные части (1-я и 2-я часть) каждая на 2 пробирки (пробирка №1 и пробирка №2).

1-я часть вируссодержащей плазмы переносили в лунку стерильного шестилуночного пластикового планшета, туда же добавляли в равном объеме 0,02% раствор метиленового синего (при двукратном разведении 0,02% раствора метиленового синего получается 0,01% раствор). Планшет устанавливали в камеру Установки для инактивации, открывали крышку планшета и включали монохроматический излучатель. Экспозиция длилась 45 минут. После экспозиции закрывали крышку планшета, планшет вынимали из камеры установки. Содержимое лунки планшета (смесь 1-ой части

инактивированной вируссодержащей плазмы с метиленовым синим) переносили в пробирку 1 со взвесью лимфоцитов (пробирка №1 – опытная). 2-ю часть вируссодержащей плазмы (не подвергшейся инаktivации) переносили в пробирку со 2-ой частью взвеси лимфоцитов (пробирка №2 – контроль). Содержимое обеих пробирок тщательно перемешивали и ставили в термостат при 37°C на 6-8 часов (Инкубация вирусов с лимфоцитами). Каждые 1,5-2 часа пробирки встряхивали и перемешивали содержимое.

После инкубации пробирки №1 и №2 вынимали из термостата. В каждую пробирку добавляли по 6-8 мл физиологического раствора, перемешивали и центрифугировали при 1500 об./ мин. в течение 15 минут. Лимфоциты осаждались на дно пробирок. Надосадочную жидкость удаляли полностью. Далее таким же образом производили 2х кратное промывание в физиологическом растворе и осаждение лимфоцитов. После 3-кратного центрифугирования и удаления надосадочной жидкости для фиксации вирусов, адсорбированных на наружной поверхности мембраны лимфоцитов, в обе пробирки добавляли 2-3 капли 2,4% глютаральдегида на 20-30 секунд. В пробирки добавляли 6-8 мл физиологического раствора, перемешивали и подвергали центрифугированию по вышеуказанной схеме. Промывку лимфоцитов осуществляли двукратно.

После последнего центрифугирования из пробирок удаляли надосадочную жидкость, осадок лимфоцитов разбавляли равным объемом (300 мкл) физиологического раствора.

После этого для разрушения лимфоцитов обе пробирки ставили в морозильную камеру бытового холодильника на 16-18 часов (при температуре-?). При медленном замораживании происходит разрушение мембран лимфоцитов. На следующий день пробирки с содержимым забирали из морозильной камеры, которые оттаивали до комнатной температуры. Далее, для удаления из взвеси мембранных структур разрушенных лимфоцитов пробирки подвергали центрифугированию при 3000 об/мин. в течение 60 минут. На дно пробирки осаждаются мембранные структуры, в надосадочной жидкости остается содержимое цитоплазмы лимфоцитов. Надосадочная жидкость из обеих пробирок отсасывается и подвергается 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, 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, жизнеспособности и патогенности, то есть свидетельствует об инактивации вирусов.

Результаты испытаний «Установки для инактивации ДНК и РНК содержащих вирусов на медицинском инструментарии».

Результаты проведенных испытаний Установки приведены в таблице 1.

Таблица 1

Дата проведения испытаний Установки	№ опыта	Тип вируса	Результаты ПЦР исследования содержимого лимфоцитов	
			Контроль (инкубация ЛФ с не инаktivированными вирусами).	Опыт (инкубация ЛФ с инаktivированными в Установке вирусами).
06.09.2012	1.	HCV	Положительный	Отрицательный
	2.	HCV	Положительный	Отрицательный
28.11.2012	1.	HBV	Положительный	Отрицательный
04.12.2012	1.	HCV	Положительный	Отрицательный
	2.	HCV	Положительный	Отрицательный
	3.	HCV	Положительный	Отрицательный
27.12.2012	1.	HBV	Положительный	Отрицательный
	2.	HBV	Положительный	Отрицательный
23.01.2013	1.	HBV	Положительный	Отрицательный
	2.	HBV	Положительный	Отрицательный
28.01.2013	1.	HBV	Положительный	Отрицательный
	2.	HBV	Положительный	Отрицательный
06.02.2013	1.	HBV	Положительный	Отрицательный
	2.	HBV	Положительный	Отрицательный
	3.	HBV	Положительный	Отрицательный
12.02.2013	1.	HBV	Положительный	Отрицательный
	2.	HBV	Положительный	Отрицательный
15.02.2013	1.	HBV	Положительный	Отрицательный
	2.	HBV	Положительный	Отрицательный
	3.	HBV	Положительный	Отрицательный
	4.	HBV	Положительный	Отрицательный
28.02.2013	1.	HBV	Положительный	Отрицательный
	2.	HBV	Положительный	Отрицательный
	3.	HBV	Положительный	Отрицательный
12.03.2014	1.	HBV	Положительный	Отрицательный
	2.	HBV	Положительный	Отрицательный
	3.	HBV	Положительный	Отрицательный
	4.	HBV	Положительный	Отрицательный

После инактивации в Установке сывороток с высоким содержанием HBV и HCV с последующей инкубацией с взвесью лимфоцитов (Опыт) здорового человека ПЦР-исследованием ДНК или РНК вирусов в содержимом

лимфоцитов 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, с взвесью лимфоцитов здорового человека ПЦР-исследованием в содержимом лимфоцитов обнаруживались ДНК или РНК вирусов. Это указывало, что исследованные вирусы HBV и HCV были жизнеспособными и обладали выраженной патогенностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных в 2009-2011 и 2012-2013 гг. в Референс-лаборатории результатов испытаний «Установки для инактивации ДНК и РНК содержащих вирусов на медицинском инструментарии» заключаем:

1. «Установка для инактивации РНК и ДНК содержащих вирусов на медицинском инструментарии», разработанная ООО «New Medical Technologies», стабильно обеспечивает инактивацию HBV, HCV и HIV. Эффект инактивации в Установке выражается в полном лишении HBV, HCV и HIV жизнеспособности и в утрате патогенности – способности проникать и заражать лимфоциты человека.

2. Массовое производство и внедрение «Установки для инактивации РНК и ДНК содержащих вирусов на медицинском инструментарии» для широкого практического использования в лечебных учреждениях будет способствовать существенному снижению частоты заражения пациентов HBV, HCV и HIV 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.