



«УТВЕРЖДАЮ»

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

« 25 » _____ 03 _____ 2016 г.

ПРОТОКОЛ

Типовых испытаний

противовирусной эффективности

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

Согласно Договоров за № -----от-----года между ООО «New Medical Technologies» (генеральный директор – Арифбаев Р.С.) и Референс-лабораторией (заведующая – к.м.н. Алиева Л.Е.) НИИ Вирусологии МЗ РУз (директор института – д.м.н., профессор Мусабаев Э.И.) проведены Типовые испытания вирусинактивирующей 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 вирусинактивирующую 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) и гепатита С (HCV), обладающих лимфотропными свойствами, в плазме крови.

Метод контроля функциональности Установки 590 nm и Установки 660 nm относительно HBV.

Испытаны две установки: с монохроматическим излучателем с длиной волны 590 nm и с комбинированными излучателями 590 nm+660 nm (Установка 590 nm и Установка 590 nm+660 nm).

Для контроля функциональности Установки 590 nm и Установки 590 nm+660 nm на жизнеспособность HBV и HCV 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 в Установке 590 нм и Установке 660 нм.

Для проведения инактивации вирусов HBV отбирали плазму крови больных с высоким содержанием моно-HBV инфекцией. Для инактивации вирусов использовали стерильные полистироловые плашки.

Установка с излучателем с длиной волны 590 нм (излучатель установлен сверху).

Плашка № 1 . В плашку №1 вносили по 5 мл HBV содержащей плазмы крови и 5 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). В плашку погружали медицинский инструмент (пинцет). Экспозиция в установке с излучателями сверху 90 минут.

Плашка № 2 . В плашку №2 вносили по 5 мл HCV содержащей плазмы крови и 5 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). В плашку погружали медицинский инструмент (пинцет). Экспозиция в установке с излучателями сверху 90 минут.

Установка с излучателем с длиной волны 590 нм (излучатели установлены сверху и снизу).

Плашка № 3 . В плашку №3 вносили по 5 мл HBV содержащей плазмы крови и 5 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). В плашку погружали медицинский инструмент (пинцет). Экспозиция в установке с излучателями сверху и снизу 90 минут.

Плашка №4. В плашку №4 вносили по 5 мл HCV содержащей плазмы крови и 5 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). В плашку погружали медицинский инструмент (пинцет). Экспозиция в установке с излучателями сверху и снизу 90 минут.

Установка с излучателем с длиной волны 660 нм (излучатель установлен сбоку и напротив установлены отражатели).

раствор). Плашка в течение 30 мин. находилась при комнатной температуре (замачивание), затем устанавливалась в установку на экспозицию 30 минут.

Плашка № 5 . В лунку плашки №5 вносили по 3 мл HBV содержащей цельной крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). Плашка устанавливалась в установку на экспозицию 90 минут.

Установка с излучателем с длиной волны 590 нм, установленным сбоку и с отражателями напротив.

Плашка № 6 . В лунку плашки №6 вносили по 3 мл HBV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). Плашка в течение 30 мин. находилась при комнатной температуре (замачивание), затем устанавливалась экспозиция 30 минут.

Плашка №7. В лунку плашки №7 вносили по 5 мл HBV содержащей плазмы крови и 5 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). В раствор полностью погружали медицинский инструмент в подвешенном состоянии на скобах. Плашка устанавливалась в установку на экспозицию 90 минут.

Плашка №8. На дно плашки №8 устанавливали сетку. В плашку вносили 5 мл HBV содержащей цельной крови и 5 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). В раствор полностью погружали медицинский инструмент. Плашка устанавливалась в установку на экспозицию 90 минут.

Контроль.

Плашка 9. В лунку плашки №13 вносили по 3 мл HBV содержащей плазмы крови и 3 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор). Плашка находилась при комнатной температуре и в инактивации установке не подвергалась.

Оценка *in vitro* жизнеспособности и цитопатогенных свойств лимфотропных вирусов HBV, инаktivированных в Установке 590 nm и Установке 660 nm.

Вирусинактивирующую эффективность Установки с длиной волны 590 nm и 660 nm изучали путем оценки *in vitro* лишения цитопатогенных свойств инаktivированных в установке вирусов HBV и HCV относительно лимфоцитов человека.

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

Далее из холодильника вынимали пробирку с взвесью лимфоцитов

здорового человека, содержимое пробирки тщательно перемешивали. В каждые из вышеприведенных 9 пробирок вливали по 1 мл взвеси лимфоцитов. Содержимое пробирок перемешивали и ставили на инкубацию в термостат при 37⁰С 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-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 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 с длиной волны мнوخроматического излучателя 590 nm и 660 nm

№ плашки	Объект и тип вируса	Замачивание	Время экспозиции в установке	Результаты количественного ПЦР на наличие жизнеспособных вирусов
Установка с излучателем с длиной волны 590 nm установлен сверху.				
Плашка № 1	HBV (плазма)	30 мин	30 мин	Отрицательно
Плашка № 2	HBV (плазма)	нет	90 мин	Отрицательно
Плашка № 3	HBV (плазма)	нет	90 мин	Отрицательно
Установка с комбинированным излучателем с длиной волны 590 nm и 660 nm (излучатель установлен сверху).				
Плашка № 4	HBV (плазма)	30 мин	30 мин	Отрицательно
Плашка № 5	HBV (плазма)	нет	90 мин	Отрицательно
Установка с излучателем с длиной волны 590 nm, установленным сбоку и напротив установлены отражатели.				
Плашка № 6	HBV (плазма)	30 мин	30 мин	Отрицательно
Плашка № 7	HBV (плазма)	нет	90 мин	Отрицательно
Плашка № 8	HBV (плазма)	нет	90 мин	Отрицательно
Контроль.				
Плашка №9	HBV (плазма)	-	-	Положительно

Плашка №1. После замачивания вирусосодержащей плазмы в 0,01% растворе метиленовой сини в течение 30 мин и инактивации в Установке 30 минут в вирусосодержащей плазме жизнеспособные HBV не обнаружено.

Плашка №2. После экспозиции в установке (с медицинским инструментом, подвешенным на скобах), при экспозиции 90 мин в вирусосодержащей плазме жизнеспособные HBV не обнаружены.

Плашка №3. После экспозиции в установке (с медицинским инструментом, расположенном на сетке), при экспозиции 90 мин в вирусосодержащей плазме жизнеспособные HBV не обнаружены.

Плашка №4. После замачивания в метиленовой сини в течение 30 минут и экспозиции 30 минут в установке в вирусосодержащей плазме жизнеспособные вирусы не обнаружены.

Плашка №5. После экспозиции в установке в течение 90 минут в вирусосодержащей плазме жизнеспособные HBV не обнаружены.

Плашка №6. После замачивания 30 минут в метиленовой сини и экспозиции 30 минут в установке в вирусодержащей плазме жизнеспособные HBV не обнаружены.

Плашка №7. После экспозиции в течение 90 минут в установке смеси вирусодержащей плазмы и метиленовой сини с медицинским инструментом на скобах, в вирусодержащей плазме жизнеспособные HBV не обнаружены.

Плашка №8. После экспозиции в течение 90 минут в установке смеси вирусодержащей плазмы и метиленовой сини с медицинским инструментом на сетке, в вирусодержащей плазме жизнеспособные HBV не обнаружены.

Плашка №9. В смеси HBV содержащей плазмы, не подверженной инактивации в установке, обнаружены жизнеспособные HBV.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов Типовых испытаний, проведенных Референс-лаборатории НИИ Вирусологии Установки с излучением 590 nm и Установки с комбинированным излучением излучением 590 nm +660 nm, разработанных ООО «New Medical Technologies», заключаем:

Установка для инактивации вирусов на медицинском инструментарии с излучателем длиной волны в 590 nm и с комбинированным излучателем 590 nm +660 nm обеспечивает стабильную инактивацию HBV и HCV в зараженной плазме и в зараженной плазме с медицинскими инструментами при экспозиции в Установке в течение 90 минут, при предварительном замачивании на 30 минут с последующей экспозицией в Установке в течение 30 минут.

Заведующая
Референс-лабораторией НИИ вирусологии,
кандидат медицинских наук


АЛИЕВА Л. Е.

Врач-лаборант
Референс-лаборатории


КАН Н. Г.