



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИ вирусологии МЗ РУз,  
профессор \_\_\_\_\_ МУСАБАЕВ Э.И.

«30» \_\_\_\_\_ 2014 г.

## ПРОТОКОЛ

### Типовых испытаний

противовирусной эффективности

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

Согласно Договора за №14 от 20.05.14 между ООО «New Medical Technologies» (Генеральный директор – Арифбаев Р.С.) и Референс-лабораторией МЗ РУз (Заместитель директора – к.м.н. Алиева Л.Е.) между ООО «New Medical Technologies» и НИИ Вирусологии МЗ РУз (Директор института – д.м.н., профессор Мусабаев Э.И.) проведены типовые испытания инактивирующей эффективности «Установки для инактивации вирусов на медицинском инструментарии» (далее Установка), разработанной и созданной ООО «New Medical Technologies». ПЦР исследования при типовых испытаниях Установка проводились в Референс-лаборатории при НИИ вирусологии врачом-лаборантом Кан Н.Г

#### **Цель проведения исследований:**

Оценить вирусинактивирующую эффективность и целесообразность внедрения в массовое производство и практику здравоохранения «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 заболеваний человека гепатита В (HBV) и гепатита С (HCV), обладающих лимфотропными свойствами.

#### **Введение.**

##### **Характеристика вирусов гепатита В и гепатита С.**

**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.

Следовательно, общим свойством HBV и HCV является их лимфотропизм - способность проникать и реплицироваться в лимфоцитах человека.

### **Метод контроля функциональности Установки 590 nm и Установки 600 nm относительно HBV и HCV.**

Испытаны две установки с монохроматическими излучателями с длиной волны 590 nm и 660 nm (Установка 590 nm и Установка 600 nm). В установках исключено вращение поддона и поддон. Время экспозиции 60 min и 90 min.

Для контроля функциональности Установки 590 nm и Установки 600 nm на жизнеспособность HBV и HCV был применен свойств вирусов поражать 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 4 мл физиологического раствора и перемешивали. Взвесь лимфоцитов хранили в холодильнике при 4<sup>0</sup>С не более 1 суток.

### **Проведение инактивации вирусов HBV и HCV в Установке 590 nm и Установке 600 nm.**

Для проведения инактивации вирусов HBV или HCV отбирали плазму крови больных с высоким содержанием моно-HBV или моно-HCV инфекциями. Для инактивации вирусов использовали стерильные полистироловы 6-ти луночные бактериологические планшеты в количестве 4 шт. (№1, №2, №3, и №4).

В лунки №1В всех 4-х планшетов вносили по 2 мл HBV содержащей плазмы и 2 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

В лунки №3С всех 4-х планшетов вносили по 2 мл HCV содержащей плазмы и 2 мл 0,02% раствора метиленового синего (при разведении получается 0,01% раствор).

Планшет № 1 и планшет №2 подвергали инактивации в Установке с монохроматическим излучателем длиной волны 590 nm (Установка 590 nm). Планшет № 1 экспонировали в течение 60 минут, планшет №2 экспонировали в течение 90 минут.

Планшет № 3 и планшет № 4 подвергали инактивации в Установке с монохроматическим излучателем длиной волны 660 nm (Установка 660 nm). Планшет № 3 экспонировали в течение 60 минут, планшет № 4 экспонировали в течение 90 минут.

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

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

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

Планшет 1 лунка 1В → пробирка 1-1В

Планшет 2 лунка 1В → пробирка 2-1В

Планшет 3 лунка 1В → пробирка 3-1В

Планшет 4 лунка 1В → пробирка 4-1В

Планшет 1 лунка 1С → пробирка 1-1С

Планшет 2 лунка 1С → пробирка 2-1С

Планшет 3 лунка 1С → пробирка 3-1С

Планшет 4 лунка 1С → пробирка 4-1С

Пробирка - контроль В: 2 мл не инактивированной плазмы с HBV.

Пробирка - контроль С: 2 мл не инактивированной плазмы с HCV.

Далее из холодильника вынимали пробирку с взвесью лимфоцитов здорового человека, содержимое пробирки тщательно перемешивали. В каждые из вышеприведенных 10 пробирок вливали по 300 мкл взвеси лимфоцитов. Содержимое пробирок перемешивали и ставили на инкубацию в термостат при 37<sup>0</sup>С на 8 часов. Каждые 1 – 1,5 часа содержимое пробирок перемешивали.

**Отмывание лимфоцитов от плазмы и взвешенных вирусов.** По истечении 8 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 2-хратно.

#### **Фиксация вирусов, адсорбированных на наружной поверхности мембраны лимфоцитов.**

После 2-хкратного центрифугирования и удаления надосадочной жидкости для фиксирования вирусов, адсорбированных на наружной поверхности мембраны лимфоцитов, во все пробирки добавляли по 1 мл 2% глутаральдегида на 60 секунд. Далее лимфоциты отмывали в физиологическом растворе: в пробирки добавляли 6-8 мл физиологического раствора, перемешивали и подвергали центрифугированию по вышеуказанной схеме. Промывку лимфоцитов осуществляли дважды.

После последнего центрифугирования из пробирок удаляли надосадочную жидкость, осадок лимфоцитов разбавляли 400 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 обеих 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 - отсутствие жизнеспособности и патогенности, то есть свидетельствует об инактивации вирусов.

**Результаты испытаний Установки 590 nm** (Длина волны монохроматического излучателя 590 nm ) и **Установки 660 nm** (Длина волны монохроматического излучателя 660 nm) для инактивации вирусов на медицинском инструментарии. Время экспозиции 60 минут и 90 минут.

Таблица 1

№ опыта	Тип вируса	Контроль (инкубация ЛФ с не инактивированными вирусами).	Результаты количественного ПЦР исследования содержимого лимфоцитов (кол-во вирусных частиц)	
			Время Инкубации в Установке 60 минут	Время Инкубации в Установке 90 минут
<b>Установка 590 nm</b> (Длина волны монохроматического излучателя 590 nm )				
1-1В	HBV		<500	
2-1В	HBV			0 (отрицательно)
1-1С	HCV		0 (отрицательно)	
2-1С	HCV			0 (отрицательно)
<b>Установка 660 nm</b> (Длина волны монохроматического излучателя 660 nm)				
3-1В	HBV		< 500	
4-1В	HBV			0 (отрицательно)
3-1С	HCV		0 (отрицательно)	
4-1С	HCV			0 (отрицательно)
Контр. В		1,0x10 <sup>3</sup>		
Контр. С		1,0x10 <sup>4</sup>		

После инактивации в **Установке 590 nm** (Длина волны монохроматического излучателя 590 nm ) в течение 90 минут сывороток с высоким содержанием HBV и HCV с последующей инкубацией с взвесью лимфоцитов 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.

После инактивации в **Установке 660 nm** (Длина волны монохроматического излучателя 590 nm ) в течение 90 минут сывороток с высоким содержанием HBV и HCV с последующей инкубацией с взвесью лимфоцитов 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 инаktivации 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 **Типовых испытаний** в Референс- лаборатории результатов испытаний **Установки 590 nm** (Длина волны монохроматического излучателя 590 nm) и **Установки 660 nm** (Длина волны монохроматического излучателя 660 nm) заключаем:


1. **Установка 590 nm** (Длина волны монохроматического излучателя 590 nm) и **Установка 660 nm** (Длина волны монохроматического излучателя 660 nm), разработанная ООО «New Medical Technologies», **стабильно обеспечивают инаktivацию HBV и HCV при экспозиции в течение 90 минут.** Эффект инаktivации в Установке выражается в полном лишении HBV и HCV жизнеспособности и в утрате цитопатогенности – способности проникать и заражать лимфоциты человека.

2. Массовое производство и внедрение **Установка 590 nm** (Длина волны монохроматического излучателя 590 nm) и **Установка 660 nm** (Длина волны монохроматического излучателя 660 nm) для широкого практического использования в лечебных учреждениях будет способствовать существенному снижению частоты заражения пациентов HBV и HCV 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.