

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИ вирусологии МЗ РУз,
академик Мусабоев Э.И.



2024 г.

ПРОТОКОЛ № 8

Типовых испытаний противовирусной эффективности «Установки для инаktivации вирусов на медицинском инструментарии», разработанной в ООО «New Medical Technologies»

Цель испытания: оценить вирус инаktivирующую эффективность Установок с эксимерной лампой (длина волны излучения от 108 до 351 нм) на жизнеспособность и патогенность вируса гепатита В (HBV), обладающего лимфотропным свойством, в плазме крови.

Эксимерные лампы являются источниками квазимонохроматического света и работают в широком диапазоне длин волн в ультрафиолетовой (UV) и вакуумной ультрафиолетовой (VUV) областях спектра.

Метод контроля функциональности Установок.

Испытана установка с эксимерной лампой закрытого типа с излучением квазимонохроматического света длиной волны 108-351 nm. излучатели установлены снизу и 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 инаktivации вирусов в Установке.

Для проведения инаktivации вирусов HBV отбирали плазму крови больных с высоким содержанием вирусной нагрузки моно-HBV инфекции. Процедуру инаktivации вирусов проводили в стерильных полистироловых плашках.

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

Вирус инаktivирующую эффективность Установки с эксимерной лампой (длина волны излучения от 108 до 351 нм) изучали путем оценки *in vitro* лишения цитопатогенных свойств инаktivированных в установке вирусов HBV относительно лимфоцитов человека под влиянием 0,01% раствора фотоактивированного метиленового синего.

Плашки после инкубации вынимали из Установок. 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 20°C 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.

29.08.2024г.

Опыт 1. Установка закрытого типа с эксимерной лампой с излучением квазимонохроматического света длиной волны 108-351 nm. излучатели установлены снизу и сверху. В 2 лунки пластиковых плашек (образец №4 и №5) налили по 4,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+. Добавили по 4,0 мл раствора Бетадина, конечная концентрация Бетадина в образцах 0,01% и 0,005%. Образцы инкубировали в Установке с эксимерной лампой в течение 90 минут. Излучение образцов происходило сверху и снизу.

Образец №3 и №6 - нативная плазма с Бетадином, конечная концентрация которого 0,01% и 0,005%, инкубировали при комнатной температуре, без воздействия эксимерной лампы. Образцы считаются контрольными.

В качестве контроля плазмы использовали образец №7, нативная плазма, не подвергавшаяся излучению, без Бетадина, инкубировалась с лимфоцитами.

Результат. В процессе экспозиции в установке с эксимерной лампой цвет смеси не изменился.

После разрушения взвеси лимфоцитов опытных и контрольных образцов, содержимое цитоплазмы было исследовано на предмет содержания ДНК ВГВ с помощью ПЦР. Результаты ПЦР представлены в таблице №1

Таблица №1

№№	Наименование образца	Тип излучателя, нм	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
1	B3	без излучателя	1,5E+02
2	B4	Экцимерная лампа	отрицательный
3	B5	Экцимерная лампа	25
4	B6	без излучателя	25
5	B7	без излучателя	2,3E+02

Заключение.

При экспозиции образцов в установке закрытого типа с эксимерной лампой с излучением квазимонохроматического света длиной волны 108-351 nm изменения объема и цвета смеси в лунках не замечено.

После инкубации смесей в установке закрытого типа с эксимерной лампой с излучением квазимонохроматического света с лимфоцитами здорового человека, отмывки лимфоцитов и разрушения их, содержимое цитоплазмы лимфоцитов при ПЦР исследовании на предмет обнаружения ДНК HBV дали отрицательный результат, образец №4, Бетадин в конечном разведении 0,01%, что указывает на инактивацию вируса, потерю его жизнеспособности и способности проникать в цитоплазму лимфоцитов.

В то время как в контрольных образцах №3, №4 (плазма с высоким содержанием вирусных частиц с Бетадином, в конечном разведении 0,01% и 0,005%) и №7 (плазма с высоким содержанием вирусных частиц инкубированная с клетками лимфоцитов здорового донора), без инактивации в установке, 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.