

«УТВЕРЖДАЮ»



Директор НИИ вирусологии МЗ РУз,
Академик Мусабаев Э.И.

Э.И. Мусабаев

2024 г.

ПРОТОКОЛ № 9

Типовых испытаний

противовирусной эффективности

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

Оценить вирус инактивирующую эффективность Установок с излучением монохроматического излучателя длиной волны 750 nm на жизнеспособность и патогенность вируса гепатита В (HBV), обладающего лимфотропными свойствами.

Метод контроля функциональности Установки с излучением 750 nm

Испытана установка с излучением монохроматического излучателя длиной волны 750 nm (установленного сверху и снизу).

Для контроля функциональности Установки 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 по 7-8 мл в пробирки с ЭДТА, в объеме 60-80 мл. В каждую пробирку добавляли по 2 мл физиологического раствора затем 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 в Установке.

Для проведения инактивации вирусов HBV отбирали плазму крови больных с высоким содержанием вируса HBV. Инактивацию вирусов в установке проводили на стерильных полистироловых плашках.

Оценка *in vitro* жизнеспособности и цитопатогенных свойств лимфотропных вирусов HBV, инаktivированных в установке с излучением 750 nm.

Вирус инаktivирующую эффективность Установки с длиной волны 750 nm изучали путем оценки *in vitro* лишения цитопатогенных свойств инаktivированных в установке вирусов HBV относительно лимфоцитов человека под влиянием 0,01% и 0,005% раствора Бетадина.

Плашки после инкубации вынимали из Установок. Содержимое каждой плашки переносили в центрифужные пробирки. Далее из холодильника вынимали пробирку с взвесью лимфоцитов здорового человека, содержимое пробирки тщательно перемешивали. 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-хкратного центрифугирования и удаления надосадочной жидкости для фиксирования вирусов, адсорбированных на наружной поверхности мембраны лимфоцитов, во все пробирки добавляли по 10 капель 2% глutarальдегида на 30 секунд. Далее лимфоциты отмывали в физиологическом растворе: в пробирки добавляли 10 мл физиологического раствора, перемешивали и подвергали центрифугированию по вышеуказанной схеме. Промывку лимфоцитов осуществляли еще дважды.

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. На следующий день пробирки с

содержимым вынимали из морозильной камеры, оттаивали при комнатной температуре. Далее, для удаления из взвеси мембранных структур разрушенных лимфоцитов эпиндорфы подвергали центрифугированию при 3000 об/мин. в течение 30 минут. На дно эпиндорфов осаждаются мембранные структуры, в надосадочной жидкости остается содержимое цитоплазмы лимфоцитов. Надосадочная жидкость из пробирок переливали в эпиндорф 1,5мл 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.

29.08.2024г.

Установка с излучателями 750 nm, тип излучения сверху (установка закрытого типа).

В 2 лунки пластиковых плашек налили 4,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV+ и 4,0 мл 0,02% и 0,01% раствора Бетадина (аптечного). Конечная концентрация Бетадина в смеси 0,01% и 0,005%. Плашки инкубировали в Установке в течение 90 минут.

Результат.

Результаты ПЦР ДНК HBV после инактивации в Установке с монохроматическим излучателем длиной волны 750 nm представлены в таблице №1

Таблица №1

№№	Наименование образца	Тип излучателя, nm	Результаты ПЦР, МЕ ВГВ/мл
1	B1	750	2,4E+02
2	B2	750	отрицательный
3	B3	Без излучателя	1,5E+02
4	B6	Без излучателя	25
5	B7	Без излучателя	5,3E+02

В качестве контроля испытания в 3 лунки пластиковой плашки наливали 4,0 мл вирусосодержащей плазмы с HBV. Образец B3 и B6 это образцы нативной плазмы с раствором Бетадина, конечная концентрация 0,01% и 0,005%. Образец B7 (контроль плазмы) - нативная плазма, содержащая вирус гепатита В, с взвесью лимфоцитов здорового человека.

Заключение.

В процессе экспозиции в Установке с излучателями длиной волны 750 nm сверху с раствором Бетадина в конечном разведении 0,01% дал положительный результат на ПЦР и отрицательный результат ПЦР в образце с конечным разведением Бетадина 0,005%.

Положительный результат в контрольных образцах говорит о сохранении жизнеспособности вируса гепатита В.

Для точного определения иннактивирующей концентрации Бетадина необходимо провести дополнительные исследования.

Зав.референс лаборатории,
доктор мед. наук

Врач-вирусолог

Джураев Р. Х.

Кан Н. Г.