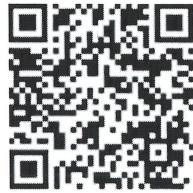




ЕВРАЗИЙСКАЯ ПАТЕНТНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ



ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ

№ 032036

Название изобретения:

**«СПОСОБ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ВИРУСОВ,
ОБЛАДАЮЩИХ ЛИМФОТРОПИЗМОМ»**

Патентовладелец (льцы):

МКРТЧЯН ОВИК ЛЕОНАРДОВИЧ (UZ)

Изобретатель (и):

Гулямов Нариман (UZ)

Заявка №: 201401097

Дата подачи заявки: 21 мая 2013 г.

Дата выдачи патента: 29 марта 2019 г.


Настоящим удостоверяется, что евразийский патент выдан на изобретение с формулой, опубликованной в Бюллетене Евразийского патентного ведомства «Изобретения (евразийские заявки и патенты)» № 3 / 2019 год.

При уплате установленных годовых пошлин патент действует на территории государств - участников Евразийской патентной конвенции - Азербайджанской Республики, Кыргызской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Республики Таджикистан, Российской Федерации, Туркменистана.

ТЛЕВЛЕСОВА Сауле Январбековна
Президент Евразийского патентного ведомства



Евразийское патентное
ведомство (ЕАПВ)



Адрес:
Россия,
109012, Москва,
Малый Черкасский пер., 2

Телефон: (495) 411-6161
Факс: (495) 621-2423

E-mail: info@eapo.org
<http://www.eapo.org>

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **032036**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.03.29

(21) Номер заявки
201401097

(22) Дата подачи заявки
2013.05.21

(51) Int. Cl. *C12Q 1/04* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

**(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ВИРУСОВ, ОБЛАДАЮЩИХ
ЛИМФОТРОПИЗМОМ**

(31) 2012 0233

(32) 2012.06.18

(33) UZ

(43) 2015.04.30

(86) PCT/UZ2013/000001

(87) WO 2013/192636 2013.12.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МКРТЧЯН ОВИК ЛЕОНАРДОВИЧ
(UZ)

(72) Изобретатель:
Гулямов Нариман (UZ)

(74) Представитель:
Русакова Н.В. (KZ)

(56) KALLE SAKSELA et al. Human immunodeficiency virus type 1 mRNA expression in peripheral blood cells predicts disease progression independently of the numbers of CD4+ lymphocytes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, Vol. 91, p. 1104-1108

F. REGGETI et al. CD134 and CXCR4 expression corresponds to feline immunodeficiency virus infection of lymphocytes, macrophages and dendritic cells, Journal of General Virology, 2008, Vol. 89, p. 277-287

(57) Изобретение относится к способу оценки жизнеспособности вирусов HBV, HCV или HIV, обладающих лимфотропными свойствами, в образце плазмы, подвергнутой длительному хранению в заморозке или воздействию противовирусных факторов. Также изобретение относится к способу обнаружения жизнеспособных вирусов HBV, HCV или HIV, обладающих лимфотропными свойствами, в образце плазмы с концентрацией вирусных частиц, не достигающей порога чувствительности методов ИФА или ПЦР. Кроме того, изобретение относится к способу исключения ложноотрицательных результатов, полученных методами ИФА и ПЦР при исследовании образца крови на наличие жизнеспособных вирусов HBV, HCV или HIV, обладающих лимфотропными свойствами. При этом заявленные способы включают исследование образца на наличие РНК или ДНК указанных вирусов путем проведения ПЦР.

B1

032036

032036

B1

Изобретение относится к способам обнаружения вирусов, обладающих лимфотропизмом, в биологических субстратах с низким содержанием вирусных частиц, оценки их жизнеспособности и исключения ложноотрицательных результатов при ИФА и ПЦР-тестировании, и может быть использовано в медицинской промышленности и биотехнологии.

Известен способ обнаружения вируса в биологических субстратах путем его выделения в культуре клеток. Вирусы, выделенные в культуре клеток, идентифицируют с помощью реакции гемадсорбции, гемагглютинации или методом непрямой иммунофлюоресценции. Для эффективного выделения вируса в культуре важно правильно собрать материал и быстро перенести его в лабораторию в подходящей среде. Это обеспечивает сохранение жизнеспособности вирусов и ограничивает размножение бактерий и грибов (Лабораторная диагностика вирусных инфекций, Online: <http://www.center-hc.ru/>). Однако многие вирусы, в частности гепатита В (HBV), гепатита С (HCV) и иммунодефицита человека (HIV), являются антропонозными вирусами - поражают клетки только организма человека и поэтому вызывают заболевание только у человека. Экспериментальные модели этих инфекций не существуют. Также особенно в Республике Узбекистан нет культивируемых клеточных культур, на которых *in vitro* можно было бы адекватно изучить цитопатогенные свойства и жизнеспособность этих вирусов. Кроме того, метод культивирования вируса в культурах клеток не используется для диагностики в связи со сложностью культивирования.

Известен иммунологический способ обнаружения наличия вирусов в биологическом материале - иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на использовании специфических вирусных белков, выделенных из зараженных клеток или полученных методом генной инженерии, путем выявления антитела к нескольким вирусным антигенам (Ильина Е.Н. и др. Хронические вирусные заболевания печени: Методическое пособие для врачей. - М., 2001, с. 7-11).

Однако при некоторых вирусных инфекциях, например HCV, улавливаются только антитела, что существенно ограничивает возможность оценки течения и активности инфекционного процесса. Кроме того, ИФА имеет порог чувствительности, ниже которого методом ИФА невозможно обнаружить наличие вируса.

Наиболее близким к заявленным способам обнаружения лимфотропных вирусов в биологическом материале, оценки жизнеспособности вирусов, обладающих лимфотропизмом, и способа исключения ложноотрицательных результатов при ИФА и ПЦР-исследовании является способ обнаружения РНК или ДНК вирусов путем забора биологического материала и определения в нем наличия РНК или ДНК вирусов путем проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-реакция) (Ильина Е.Н. и др. Хронические вирусные заболевания печени: Методическое пособие для врачей. - М., 2001, с. 7-11). Данный способ относится к прямым методам обнаружения возбудителя в биологическом материале, что позволяет оценить активность вирусного процесса. Положительная ПЦР-реакция свидетельствует о присутствии вируса в печени и с большой долей вероятности в крови. Однако проведение ПЦР-реакции биологического материала (плазмы или белков крови, биоптатов тканей или органов) не всегда позволяет обнаружить инфицированность лимфотропным вирусом, хотя персистенция таких вирусов продолжается и в существенно высоких концентрациях, в лимфоидной ткани (ложноотрицательные результаты ПЦР-реакции), и наоборот, ПЦР-реакция положительная, но персистенция вируса нет. Кроме того, ПЦР-реакция имеет порог чувствительности, ниже которого данным методом наличие вируса обнаружить невозможно.

Задачей предлагаемого изобретения является повышение достоверности определения инфицированности вирусами, обладающих лимфотропизмом, исключение ложноотрицательных реакций при тестировании крови на наличие лимфотропных вирусов при ИФА и ПЦР-исследовании, обнаружение вирусов, обладающих лимфотропизмом, в биологическом материале с концентрацией вирусных частиц ниже порога чувствительности методов ИФА или ПЦР.

Поставленная задача решается способом оценки жизнеспособности вирусов, обладающих лимфотропизмом, включающим забор биологического материала, определение наличие в нем РНК или ДНК вирусов путем проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-реакция), дополнительно из крови здоровых людей получают взвесь лимфоцитов, к которым добавляется равный объем биологического материала, смесь перемешивают, инкубируют при температуре 37°C в течение 6-8 ч, производят отмывание лимфоцитов от плазмы и разрушение лимфоцитов, цитоплазму лимфоцитов подвергают ПЦР-исследованию, обнаружение в цитоплазме лимфоцитов РНК или ДНК вирусов свидетельствует о сохранении жизнеспособности вирусов, отсутствие в цитоплазме лимфоцитов РНК или ДНК вирусов свидетельствует об инактивации вирусов. В качестве биологического материала используют плазму или белки крови, биоптаты ткани или органов, смывы с медицинского инструмента. Данным способом оценивают жизнеспособность вирусов HBV, HCV или HIV.

Поставленная задача решается способом обнаружения вирусов, обладающих лимфотропизмом, в биологическом материале с концентрацией вирусных частиц ниже порога чувствительности методов ИФА или ПЦР, включающим забор биологического материала, при этом из крови здоровых людей получают взвесь лимфоцитов, к которым добавляется равный объем биологического материала, смесь перемешивают, инкубируют при температуре 37°C в течение 6-8 ч, производят отмывание лимфоцитов от

плазмы и разрушение лимфоцитов, цитоплазму лимфоцитов подвергают ПЦР-исследованию, обнаружение в цитоплазме лимфоцитов РНК или ДНК вирусов свидетельствует о наличии вирусов, отсутствие в цитоплазме лимфоцитов РНК или ДНК вирусов свидетельствует об отсутствии вирусов в исследуемом биологическом материале. В качестве биологического материала используют плазму или белки крови. Данным способом определяют наличие вирусов HBV, HCV или HIV.

Поставленная задача решается способом исключения ложноотрицательных результатов при ИФА и ПЦР-исследовании, включающим забор крови у пациентов, подозреваемых в зараженности лимфотропными вирусами, при этом забор крови производят в пробирки, содержащие 2,0 мл физиологического раствора и 2-3 капли гепарина, в количестве 6-8 мл, из забранной крови выделяют лимфоциты, которые инкубируют при температуре 37°C в течение 6-8 ч, производят отмывание лимфоцитов от плазмы и разрушение лимфоцитов, цитоплазму лимфоцитов подвергают ПЦР-исследованию, обнаружение в цитоплазме лимфоцитов РНК или ДНК вирусов свидетельствует о наличии вирусов в крови пациентов, отсутствие в цитоплазме лимфоцитов РНК или ДНК вирусов свидетельствует об отсутствии вирусов в крови пациентов. ПЦР-исследованию подвергается содержимое лимфоцитов пациентов.

Известно, что многие вирусы, в частности вирусы гепатита В (HBV), гепатита С (HCV) и иммунодефицита человека (HIV), обладают свойством реплицироваться в мононуклеарных клетках крови, в частности в лимфоцитах и макрофагах. Известно, что при HBV- и HCV-инфекциях одновременно развиваются воспалительные процессы в печени со всеми вытекающими из этого признаками гепатита, а также вторичное иммунодефицитное состояние, выражающееся в различной степени Т-лимфопенией и В-лимфопенией, в диспропорциях регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперов и Т-супрессоров), в снижении иммунорегуляторного индекса (ИРИ), а также в явлениях дисгаммаглобулинемии. Степень и выраженность иммунодефицита при этом не имели закономерной взаимосвязи со степенью выраженности патологического процесса в печени. У больных с хроническими HBV- и HCV-инфекциями по истечении времени интенсивность прогрессирования патологического процесса в ткани печени может быть различной - от слабого до выраженного, но, независимо от этого, происходит стабильное и неуклонное усугубление вторичного иммунодефицита.

Диссоциация степени поражения ткани печени и глубины вторичного иммунодефицита при различных нозологических формах хронических вирусных гепатитов дали основание предположить, что гепатит и вторичный иммунодефицит при HBV- и HCV-инфекциях являются процессами сочетанными, взаимно усугубляющими, но не являются взаимно обуславливающими: то есть HBV и HCV наряду с гепатотропностью обладают и выраженным лимфотропным свойством - непосредственным свойством формировать вторичный иммунодефицит. При этом, различия в клинических проявлениях поражения ткани печени и глубины иммунодефицита при HBV- и HCV-инфекциях обуславливается различиями в степени выраженности гепатотропных и лимфотропных свойств этих вирусов. Именно различия в степени выраженности гепатотропных и лимфотропных свойств вирусов обуславливают различия патогенеза, клинических проявлений и характера эффекта противовирусной терапии при хронических HBV- и HCV-инфекциях в различные сроки давности болезни.

Тожественность лимфотропных свойств HBV и HCV, а также HIV, помимо формирования вторичного иммунодефицита, подтверждается также общностью их эпидемиологических особенностей, механизмов передачи, развитием сопутствующих оппортунистических инфекций (частые ОРЗ, ОКИ) и особенно развитием лимфогрануломатоза в различных тканях организма. Развитие скоплений лимфоидных фолликулов - лимфогрануломатоза в различных органах и тканях организма считается присущим именно для вирусных поражений системы лимфоидных клеток.

Учитывая лимфотропные свойства HBV не трудно предположить, что HBV, независимо от их титра в сыворотке, могут персистировать постоянно и в существенно высоких концентрациях в цитоплазме лимфоидных элементов. Именно это явление используется в данном способе для повышения достоверности и исключения ложноотрицательных результатов при ИФА- и ПЦР-анализе и обнаружении лимфотропных вирусов в биологическом материале с концентрацией вирусных частиц ниже порога чувствительности методов ИФА или ПЦР.

Таким образом, в данных способах жизнеспособности HBV, HCV и HIV нами использованы лимфотропные свойства - способность этих вирусов проникать и персистировать внутриклеточно в лимфоцитах здорового человека при их совместной инкубации в системе *in vitro*.

Способ оценки жизнеспособности вирусов, обладающих лимфотропизмом, в частности HBV, HCV и HIV, необходим после длительного их хранения, для контроля противовирусной эффективности различных дезинфицирующих химических и физических факторов относительно этих вирусов, а также для контроля противовирусного лечения.

Способ оценки жизнеспособности вирусов, обладающих лимфотропизмом, осуществляется следующим образом.

I. Получение взвеси вирусов, обладающих лимфотропизмом.

Для получения взвеси вирусов получают биологический материал (плазму или белки крови, биоптаты ткани или органов, смывы с медицинского инструмента). Полученный биологический материал подвергается количественному ПЦР-исследованию для подтверждения наличия вирусов, обладающих

лимфотропизмом и определения титра вирусов. Вирусосодержащий биологический материал хранится в замороженном состоянии в минусовом холодильнике при температуре ниже -25°C .

II. Получение взвеси лимфоцитов здорового человека:

а) здоровые люди - добровольцы методом ИФА тестируются на предмет зараженности вирусами, обладающими лимфотропизмом. В испытаниях используются лимфоциты только здоровых людей с отрицательными результатами тестирования на предмет зараженности исследуемых вирусов;

б) для получения достаточного количества взвеси лимфоцитов кровь забирается у здорового человека (добровольца) утром натощак из локтевой вены в количестве 20-30 мл. Далее кровь по 7-8 мл переносится в центрифужные пробирки, содержащие 2 мл физиологического раствора с 3 каплями гепарина (препарат "Гепарин" содержит 5000 МЕ/мл, 3 капли содержат 750 МЕ/мл гепарина). Смесь в пробирке тщательно перемешивается;

в) выделение лимфоцитов из цельной гепаринизированной крови проводят путем разделения в растворе фиколл-верографина с градиентом плотности $d=1,077$ г/мл по методу Ф.Ю. Гариб с соавт. (UZ DP 2426). Для этого в чистую центрифужную пробирку наливают 2 мл раствора фиколл-верографина, на ее поверхность осторожно наслаивается гепаринизированная кровь и пробирка центрифугируется при 1500 об/мин в течение 20 мин. В процессе центрифугирования все форменные элементы крови, кроме лимфоцитов, проникают через толщу градиента фиколл-верографина и находятся под ним. Плазма крови остается над градиентом. В толще градиент фиколл-верографин образует своеобразное мутное кольцо, состоящее из чистой взвеси лимфоцитов. Это кольцо с лимфоцитами осторожно отсасывается с помощью пипетки и переносится в чистую центрифужную пробирку;

г) далее проводится 2-3-кратное промывание лимфоцитов в 10,0 мл физиологического раствора с последующим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 20 мин;

д) после последнего центрифугирования удаляется надосадочная жидкость. Осадок, содержащий лимфоциты, разбавляется 600 мкл физиологического раствора и перемешивается. Взвесь лимфоцитов можно хранить не более 1 суток при температуре 4°C .

III. Оценка *in vitro* способности вирусов, обладающих лимфотропизмом, проникать и персистировать внутриклеточно в лимфоцитах человека.

1) Забранный биологический материал, содержащий вирусы, обладающие лимфотропизмом, вынимается из минусового холодильника, оттаивается при комнатной температуре.

2) в чистую пробирку с помощью автоматической пипетки переносится равный объем (по 300 мкл) вирусосодержащего биологического материала и взвеси лимфоцитов, содержимое перемешивается и ставится на инкубацию (инкубация вирусов с лимфоцитами *in vitro*) в термостат при температуре 37°C на 6-8 ч. Содержимое пробирки перемешивается путем встряхивания каждые 1,5-2 ч.

3) Отмывание лимфоцитов. Далее пробирка вынимается из термостата. В нее добавляется 6-8 мл физиологического раствора, перемешивается и центрифугируется при 1500 об/мин в течение 20 мин. Происходит осаждение лимфоцитов на дно пробирок. Надосадочная жидкость (смесь плазмы с физиологическим раствором) удаляется полностью. Далее таким же образом производится 2-3-кратное промывание в физиологическом растворе и осаждение лимфоцитов. После последнего центрифугирования и удаления надосадочной жидкости взвесь лимфоцитов (осадок) разбавляется 300 мкл физиологического раствора и переносится в эпиндорф.

4) После этого для разрушения лимфоцитов пробирка ставится в морозильную камеру бытового холодильника на ночь. При медленном замораживании происходит разрушение мембран лимфоцитов.

5) Удаление мембранных структур разрушенных лимфоцитов. На следующий день эпиндорфы вынимаются из морозильника и оттаиваются при комнатной температуре. Далее, для удаления из взвеси мембранных структур разрушенных лимфоцитов пробирки подвергаются центрифугированию при 3000 об/мин в течение 30 мин. На дно пробирки осаждаются мембранные структуры, в надосадочной жидкости остается содержимое цитоплазмы лимфоцитов.

6) Надосадочная жидкость из пробирки отсасывается и подвергается количественному ПЦР-исследованию на предмет выявления в содержимом цитоплазмы лимфоцитов ДНК либо РНК вирусов, которые содержались ранее в плазме крови от больных.

IV. Оценка результатов.

1. Положительный результат ПЦР-исследования на наличие РНК или ДНК вирусов в содержимом цитоплазмы лимфоцитов свидетельствует о сохранении жизнеспособности вирусов, то есть об их способности проникать и персистировать в лимфоцитах человека *in vitro*.

2. Отрицательный результат ПЦР-исследования на наличие РНК или ДНК вирусов в содержимом цитоплазмы лимфоцитов свидетельствует об утрате жизнеспособности (инактивации) вирусов, то есть об утрате их способности проникать и персистировать в лимфоцитах человека *in vitro*.

Заявленные способы подтверждаются следующими примерами.

Пример 1. Способ оценки жизнеспособности вирусов, обладающих лимфотропизмом, в плазме крови.

У больного, получившего противовирусное лечение гепатита С, из локтевой вены произвели забор крови. Из цельной крови отделили плазму, которую подвергли количественному ПЦР-исследованию для

подтверждения наличия HCV и определения титра вирусов. ПЦР-реакция отрицательная. Исследуемую плазму хранят в замороженном состоянии в минусовом холодильнике при температуре ниже -25°C .

В это время у здоровых людей - добровольцев производят забор крови утром натощак из локтевой вены в количестве 20-30 мл. Часть плазмы подвергается ПЦР-исследованию на предмет зараженности вирусами, обладающими лимфотропизмом. В испытаниях используются лимфоциты только здоровых людей с отрицательными результатами тестирования на предмет зараженности исследуемых вирусов. Далее кровь по 7-8 мл переносят в центрифужные пробирки, содержащие 2 мл физиологического раствора с 3 каплями гепарина (препарат "Гепарин" содержит 5000 МЕ/мл, 3 капли содержат 750 МЕ/мл гепарина). Смесь в пробирке тщательно перемешивают. Производят выделение лимфоцитов из цельной гепаринизированной крови путем разделения в растворе фиколл-верографина с градиентом плотности $d=1,077$ г/мл по методу Ф.Ю. Гариб с соавт. Для этого в чистую центрифужную пробирку наливают 2 мл раствора фиколл-верографина, на ее поверхность осторожно наслаивают гепаринизированную кровь и пробирку подвергают центрифугированию при 1500 об/мин в течение 20 мин. В процессе центрифугирования все форменные элементы крови, кроме лимфоцитов, проникают через толщу градиента фиколл-верографина и находятся под ним. Плазма крови остается над градиентом. В толще градиента фиколл-верографин образуется своеобразное мутное кольцо, состоящее из чистой взвеси лимфоцитов. Это кольцо с лимфоцитами осторожно отсасывают с помощью пипетки и переносят в чистую центрифужную пробирку. Далее проводят 2-3-кратное промывание лимфоцитов в 10,0 мл физиологического раствора с последующим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 20 мин. После последнего центрифугирования удаляют надосадочную жидкость. Осадок, содержащий лимфоциты, разбавляют 600 мкл физиологического раствора и перемешивают. Взвесь лимфоцитов можно хранить не более 1 суток при температуре 4°C .

Исследуемую плазму вынимают из минусового холодильника, оттаивают при комнатной температуре. В чистую пробирку с помощью автоматической пипетки переносят равный объем (по 300 мкл) плазмы и взвеси лимфоцитов, содержимое перемешивают и ставят на инкубацию в термостат при температуре 37°C на 6-8 ч. Содержимое пробирки перемешивают путем встряхивания каждые 1,5-2 ч.

Далее пробирку вынимают из термостата. В нее добавляют 6-8 мл физиологического раствора, перемешивают и центрифугируют при 1500 об/мин в течение 20 мин. Происходит осаждение лимфоцитов на дно пробирки. Надосадочную жидкость (смесь плазмы с физиологическим раствором) удаляют полностью. Далее таким же образом производят 2-3-кратное промывание в физиологическом растворе и осаждение лимфоцитов. После последнего центрифугирования и удаления надосадочной жидкости взвесь лимфоцитов (осадок) разбавляют 300 мкл физиологического раствора и переносят в эпиндорф. После этого производят разрушение мембран лимфоцитов путем помещения эпиндорфа в морозильную камеру бытового холодильника на ночь. На следующий день пробирки вынимают из морозильника и оттаивают при комнатной температуре. Далее, для удаления из взвеси мембранных структур разрушенных лимфоцитов пробирку подвергают центрифугированию при 3000 об/мин в течение 30 мин. На дно пробирки осаждаются мембранные структуры, в надосадочной жидкости остается содержимое цитоплазмы лимфоцитов. Надосадочную жидкость из пробирки отсасывают и подвергают количественному ПЦР-исследованию на предмет выявления в содержимом цитоплазмы лимфоцитов HCV вируса. ПЦР-реакция HCV положительная, что свидетельствует о сохранении жизнеспособности вируса HCV и необходимости дальнейшего противовирусного лечения.

Пример 2.

У больного, получившего противовирусное лечение гепатита В, произвели пункцию печени и забор биоптата печени. Биоптат печени гомогенизировали в 1,5 мл физиологического раствора, перенесли в центрифужную пробирку, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 мин, надосадочную жидкость отсосали в чистую пробирку. Часть надосадочной жидкости подвергли количественному ПЦР-исследованию для подтверждения наличия HBV и определения титра вирусов. ПЦР-реакция HBV положительная. Исследуемый биоптат хранят в замороженном состоянии в минусовом холодильнике при температуре ниже -25°C .

Получение взвеси лимфоцитов здорового человека произвели, как описано в примере 1.

Исследуемую надосадочную жидкость из гомогената биоптата печени вынимают из минусового холодильника, оттаивают при комнатной температуре. В чистую пробирку с помощью автоматической пипетки переносят равный объем (по 300 мкл) надосадочной жидкости из гомогената биоптата печени и взвеси лимфоцитов, содержимое перемешивают и ставят на инкубацию в термостат при температуре 37°C на 6-8 ч. Содержимое пробирки перемешивают путем встряхивания каждые 1,5-2 ч.

Далее пробирку вынимают из термостата. В нее добавляют 6-8 мл физиологического раствора, перемешивают и центрифугируют при 1500 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость (смесь плазмы с физиологическим раствором) удаляют полностью. Далее таким же образом производят 2-3-кратное промывание в физиологическом растворе и осаждение лимфоцитов. После последнего центрифугирования и удаления надосадочной жидкости взвесь лимфоцитов (осадок) разбавляют 300 мкл физиологического раствора. После этого производят разрушение мембран лимфоцитов путем помещения пробирки в морозильную камеру бытового холодильника на ночь. На следующий день пробирки выни-

мают из морозильника и оттаивают при комнатной температуре. Далее, для удаления из взвеси мембранных структур разрушенных лимфоцитов пробирки подвергают центрифугированию при 3000 об/мин в течение 30 мин. На дно пробирки осаждаются мембранные структуры, в надосадочной жидкости остается содержимое цитоплазмы лимфоцитов. Надосадочную жидкость из пробирки отсасывают и подвергают количественному ПЦР-исследованию на предмет выявления в содержимом цитоплазмы лимфоцитов HBV вируса. ПЦР-реакция HBV отрицательная, что свидетельствует об утрате жизнеспособности (инактивации) вируса.

Пример 3. Обнаружение вирусов, обладающих лимфотропизмом, в биологическом материале с концентрацией вирусных частиц ниже порога чувствительности методов ИФА или ПЦР.

В донорском пункте станции переливания крови для определения возможности заражения донорской крови вирусами, обладающих лимфотропизмом, взяли 6-8 мл крови, из которой отделили плазму. Часть плазмы подвергли количественному ПЦР-исследованию для подтверждения наличия HBV, HCV и HIV вирусов и определения титра вирусов. ПЦР-реакция HBV, HCV и HIV вирусов отрицательная. Исследуемую плазму хранят в замороженном состоянии в минусовом холодильнике при температуре ниже -25°C .

Получение взвеси лимфоцитов здорового человека произвели, как описано в примере 1.

Исследуемую плазму вынимают из минусового холодильника, оттаивают при комнатной температуре. В чистую пробирку с помощью автоматической пипетки переносят равный объем (по 300 мкл) плазмы и взвеси лимфоцитов, содержимое перемешивают и ставят на инкубацию в термостат при температуре 37°C на 6-8 ч. Содержимое пробирки перемешивают путем встряхивания каждые 1,5-2 ч.

Далее пробирку вынимают из термостата. В нее добавляют 6-8 мл физиологического раствора, перемешивают и центрифугируют при 1500 об/мин в течение 20 мин. Происходит осаждение лимфоцитов на дно пробирки. Надосадочную жидкость (смесь плазмы с физиологическим раствором) удаляют полностью. Далее таким же образом производят 2-3-кратное промывание в физиологическом растворе и осаждение лимфоцитов. После последнего центрифугирования и удаления надосадочной жидкости взвесь лимфоцитов (осадок) разбавляют 300 мкл физиологического раствора. После этого производят разрушение мембран лимфоцитов путем помещения пробирки в морозильную камеру бытового холодильника на ночь. На следующий день пробирки вынимают из морозильника и оттаивают при комнатной температуре. Далее, для удаления из взвеси мембранных структур разрушенных лимфоцитов пробирки подвергают центрифугированию при 3000 об/мин в течение 30 мин. На дно пробирки осаждаются мембранные структуры, в надосадочной жидкости остается содержимое цитоплазмы лимфоцитов. Надосадочную жидкость из пробирки отсасывают и подвергают количественному ПЦР-исследованию на предмет выявления в содержимом цитоплазмы лимфоцитов HBV, HCV и HIV вирусов. ПЦР-реакция HIV положительная, что свидетельствует о наличии вируса HCV в донорской крови и не пригодность ее для переливаний.

Пример 4. Исключение ложноотрицательных результатов при ИФА и ПЦР-исследовании.

У донора крови из локтевой вены произвели забор 6-8 мл крови утром натощак. Цельную кровь перенесли в чистую пробирку, подвергли отстаиванию и получили сыворотку, часть которой подвергли количественному ПЦР-исследованию для подтверждения наличия HBV, HCV и HIV вирусов и определения титра этих вирусов. ПЦР-реакция отрицательная. Остальную сыворотку крови перенесли в пробирку.

Выделение лимфоцитов из цельной крови произвели аналогично способу, описанному в примере 1. После выделения лимфоцитов произвели их разрушение путем помещения пробирки в морозильную камеру бытового холодильника на ночь. На следующий день пробирку вынимают из морозильника и оттаивают при комнатной температуре. Далее, для удаления из взвеси мембранных структур разрушенных лимфоцитов пробирки подвергают центрифугированию при 3000 об/мин в течение 30 мин. На дно пробирки осаждаются мембранные структуры, в надосадочной жидкости остается содержимое цитоплазмы лимфоцитов. Надосадочную жидкость из пробирки отсасывают и подвергают количественному ПЦР-исследованию на предмет выявления в содержимом цитоплазмы лимфоцитов HBV, HCV и HIV вирусов. ПЦР-реакция HBV положительная, что свидетельствует о наличии вируса HBV у донора.

При общепринятом методе ПЦР-тестирования сыворотки крови доноров средние показатели частоты выявления наличия вирусов, в частности вируса HBV и HCV, по республике составляет 2,7% случаев. По данным эпидемиологического анализа в республике Узбекистан из вновь выявленных случаев заражения вирусом гепатита В (HBV) и вирусом гепатита С (HCV) в 2,2-5,6% случаях факторами передачи инфекции служит переливание зараженной крови или ее компонентов. В поисках причины заражения реципиентов HBV и в целях устранения этого были использованы лимфотропные свойства вируса.

Методом ПЦР проведено сравнительное изучение частоты выявления маркеров HBV в сыворотке и в содержимом лимфоцитов крови у 309 доноров.

Результаты позволили установить, что при ПЦР-исследовании сыворотки крови 309 доноров HBV был обнаружен в 6 случаях, что составило 1,94% от общего числа доноров. При исследовании данным способом (исследование содержимого лимфоцитов тех же доноров) HBV был обнаружен в 17 случаях, что составило 7,44% от общего числа доноров. То есть общепринятый метод тестирования сыворотки

крови доноров методом ПЦР на предмет зараженности ВГВ в 5,50% случаев показал ложноотрицательный результат, что является причиной заражения реципиентов вирусным гепатитом В в результате переливания зараженной крови или ее компонентов.

Внедрение в практическую деятельность донорских пунктов ПЦР-метода определения вирусов в лимфоцитах крови доноров позволит существенно снизить частоту либо исключить заражение людей такими вирусами, как HBV, HCV и HIV, при переливаниях крови или ее компонентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ оценки жизнеспособности вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV) или вируса иммунодефицита человека (HIV), обладающих лимфотропными свойствами, в образце плазмы, подвергнутой длительному хранению в заморозке или воздействию антивирусных факторов, включающий исследование указанного образца на наличие РНК или ДНК указанных вирусов путем проведения ПЦР, отличающийся тем, что к исследуемому образцу плазмы добавляют равный объем взвеси лимфоцитов из крови здорового человека, смесь перемешивают, инкубируют при температуре 37°C в течение 6-8 ч, отмывают лимфоциты, выделяют их посредством центрифугирования и разрушают их путем медленного замораживания, после чего посредством центрифугирования удаляют мембраны разрушенных лимфоцитов из смеси, отделяют супернатант с цитоплазмой лимфоцитов и посредством ПЦР определяют в нем наличие или отсутствие РНК или ДНК вируса HBV, HCV или HIV, причем обнаружение вирусной РНК или ДНК в цитоплазме лимфоцитов свидетельствует о сохранении указанным вирусом жизнеспособности в исследуемом образце плазмы, а отсутствие вирусной РНК или ДНК в цитоплазме лимфоцитов свидетельствует об инактивации указанного вируса или утрате им жизнеспособности в исследуемом образце плазмы.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что для получения взвеси лимфоцитов добавляют 6-8 мл крови здорового человека к 2 мл физиологического раствора с 2-3 каплями гепарина, смесь перемешивают, затем на 2 мл раствора фиколл-верографина наслаивают гепаринизированную кровь, выделяют лимфоциты путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 20 мин, промывают лимфоциты 2-3 раза физиологическим раствором и повторно центрифугируют в тех же условиях, супернатант удаляют, а осадок, содержащий взвесь лимфоцитов, разбавляют физиологическим раствором.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что для отмывания лимфоцитов добавляют к смеси физиологический раствор, перемешивают, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 20 мин, супернатант удаляют, повторяют процедуру отмывания 2-3 раза, после чего полученный осадок, содержащий взвесь лимфоцитов, разбавляют физиологическим раствором.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что для удаления мембран разрушенных лимфоцитов смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин.

5. Способ обнаружения жизнеспособных вирусов HBV, HCV или HIV, обладающих лимфотропными свойствами, в образце плазмы с концентрацией вирусных частиц, не достигающей порога чувствительности методов ИФА или ПЦР, включающий исследование указанного образца на наличие РНК или ДНК указанных вирусов путем проведения ПЦР, отличающийся тем, что к исследуемому образцу плазмы добавляют равный объем взвеси лимфоцитов из крови здорового человека, смесь перемешивают, инкубируют при температуре 37°C в течение 6-8 ч, отмывают лимфоциты, выделяют их посредством центрифугирования и разрушают их путем медленного замораживания, после чего посредством центрифугирования удаляют мембраны разрушенных лимфоцитов из смеси, отделяют супернатант с цитоплазмой лимфоцитов и посредством ПЦР определяют в нем наличие или отсутствие РНК или ДНК вируса HBV, HCV или HIV, причем обнаружение ранее не детектируемой вирусной РНК или ДНК в цитоплазме лимфоцитов свидетельствует о наличии указанного жизнеспособного вируса в исследуемом образце плазмы, а отсутствие вирусной РНК или ДНК в цитоплазме лимфоцитов свидетельствует об отсутствии указанных жизнеспособных вирусов в исследуемом образце плазмы.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что для получения взвеси лимфоцитов добавляют 6-8 мл крови здорового человека к 2 мл физиологического раствора с 2-3 каплями гепарина, смесь перемешивают, затем на 2 мл раствора фиколл-верографина наслаивают гепаринизированную кровь, выделяют лимфоциты путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 20 мин, промывают лимфоциты 2-3 раза физиологическим раствором и повторно центрифугируют в тех же условиях, супернатант удаляют, а осадок, содержащий взвесь лимфоцитов, разбавляют физиологическим раствором.

7. Способ по п.5, отличающийся тем, что для отмывания лимфоцитов добавляют к смеси физиологический раствор, перемешивают, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 20 мин, супернатант удаляют, повторяют процедуру отмывания 2-3 раза, после чего полученный осадок, содержащий взвесь лимфоцитов, разбавляют физиологическим раствором.

8. Способ по п.5, отличающийся тем, что для удаления мембран разрушенных лимфоцитов смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин.

9. Способ исключения ложноотрицательных результатов, полученных методами ИФА и ПЦР при исследовании образца крови на наличие жизнеспособных вирусов HBV, HCV или HIV, обладающих

лимфотропными свойствами, включающий исследование указанного образца на наличие РНК или ДНК указанных вирусов путем проведения ПЦР, отличающийся тем, что к 2 мл физиологического раствора с 2-3 каплями гепарина добавляют 6-8 мл исследуемого образца крови, смесь перемешивают, затем на 2 мл раствора фиколл-верографина наслаивают гепаринизированную кровь, выделяют лимфоциты путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 20 мин, промывают лимфоциты 2-3 раза физиологическим раствором и повторно центрифугируют в тех же условиях, супернатант удаляют, а осадок, содержащий взвесь лимфоцитов, разбавляют физиологическим раствором, затем полученные лимфоциты разрушают путем медленного замораживания, после чего посредством центрифугирования удаляют мембраны разрушенных лимфоцитов из смеси, отделяют супернатант с цитоплазмой лимфоцитов и посредством ПЦР определяют в нем наличие или отсутствие РНК или ДНК вируса HBV, HCV или HIV, причем обнаружение вирусной РНК или ДНК в цитоплазме лимфоцитов свидетельствует о наличии указанного жизнеспособного вируса в исследуемом образце крови, а отсутствие вирусной РНК или ДНК в цитоплазме лимфоцитов свидетельствует об отсутствии указанных жизнеспособных вирусов в исследуемом образце крови.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что для отмывания лимфоцитов добавляют к смеси физиологический раствор, перемешивают, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 20 мин, супернатант удаляют, повторяют процедуру отмывания 2-3 раза, после чего полученный осадок, содержащий взвесь лимфоцитов, разбавляют физиологическим раствором.

11. Способ по п.9, отличающийся тем, что для удаления мембран разрушенных лимфоцитов смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин.



Re: PCT National Phase Patent Application in USA - PCT/UZ2013/000001 - **США**

Заявка № 14/397,680 от 29.10.2014 года

Applicant: MKRTCHYAN O.L. (UZ)

Title: METHOD FOR EVALUATION OF VIABILITY OF VIRUSES WITH LYMPHOTROPISM PROPERTIES

Согласно запросу Ведомства США (далее **USPTO**) от 06.05.2016 г. указанная заявка претерпела изменения для устранения замечания об отсутствии единства изобретения, а именно:

пункты 1-6 (*Способ оценки жизнеспособности вирусов со свойствами лимфотропизма*) остались на рассмотрении в рамках данной заявки;

пункты 7-11 (*Способ обнаружения вирусов со свойствами лимфотропизма в биологическом материале*) и

пункты 12-16 (*Способ исключения ложноотрицательных результатов при ИФА и ПЦР-исследовании*) были выделены в качестве самостоятельных заявок.