21290

СОГЛАСОВАНО

Заместитель Министра здравоохранения Республики Беларусь

_____ Андросюк

«___» _____ г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

_____ В. А. Горбунов

«___» _____2020 г.

НАБОР ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ИЗ РАСФАСОВАННЫХ ВОД И ЭКСТРАКТОВ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

(ТУ РБ 100558032.119 – 2005, изм. «3»)

Инструкция по применению

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора

УП "Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении"

_____ Гринько

«___» _____ 2020 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора для концентрирования вирусов из расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для концентрирования вирусов (ECHO, Коксаки А и В, вирусов полиомиелита, гепатита А и Е, ротавирусов, аденовирусов, вирусов Норволк) из расфасованных вод (вода питьевая, расфасованная в емкости: бутыли, контейнеры, пакеты) и экстрактов пищевых продуктов путем адсорбции вирусных частиц на твердом носителе (адсорбенте), десорбции (элюции) с использованием элюирующего раствора и дополнительного концентрирования с помощью полиэтиленгликоля.

Набор рассчитан на 20 определений.

2 СОСТАВ НАБОРА

Номер реагента	Наименование, внешний вид	Количество
№ 1	Адсорбент (порошок белого цвета)	20 фл. (1,5 г х 20)
№ 2	Элюент (прозрачный раствор коричневого цвета)	2 фл. (4,0 мл х 2)
№ 3	(ПЭГ+ NaCl) (порошок белого цвета)	20 фл. (0,39 г х 20)
Инструкция по применению		1 шт.

3 СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 Необходимые материалы и оборудование.

- Скоростная центрифуга на 10 000 g
- Низкоскоростная центрифуга 3 000 об/мин
- Шуттель-аппарат
- Лабораторная посуда (пипетки, флаконы)

3. 2 Отбор проб.

3.2.1 Пробы расфасованных вод отбираются в заводской упаковке. Необходимый объем исследуемой пробы должен составлять: 3 литра (2 бутылки) при расфасовке по 1,5 литра, 4 литра (2 бутылки) при расфасовке по 2 литра и 5 литров (1 емкость) при расфасовке в большие объемы.

3.2.2 Необходимый объем для исследования экстрактов пищевых продуктов должен составлять 100-500 мл.

3.2. 3 Параметры проверки пригодности реагентов.

Внешний вид и количество реагентов должны соответствовать п. 2.

3. 3 Концентрирование вирусов из исследуемого объема проб

3.3.1 Порядок приготовления реагентов.

- Реагенты № 1 (адсорбент) и №3 (ПЭГ+ NaCl) готовы к употреблению.
- Приготовление раствора элюента из концентрата. Содержимое флакона № 2 переносят во флакон объемом 50,0 мл и добавляют 36 мл стерильной дистиллированной воды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Срок стабильности после вскрытия. Приготовленный раствор элюента хранят в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8^0С не более 5 суток, при температуре от минус 16 до минус 20^0С – в течение 12 месяцев.

3.3.2 Концентрирование вирусов из исследуемых проб расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов основано на методе адсорбции/элюции, который позволяет сконцентрировать вирусный материал примерно в 160 раз для экстрактов пищевых продуктов и в 500 раз для расфасованных вод.

3.3.3 Общее время проведения стадии концентрирования вирусов из проб составляет примерно 4,0-4,5 часа.

3.3.4 Во избежание излишнего вспенивания перед внесением адсорбента в газированные воды, их необходимо предварительно открыть на 40-60 мин в стерильном боксе для дегазации.

Во вскрытые в стерильных условиях бутылки или другие емкости вносят адсорбент в количестве 1,5 г **(содержимое одного флакона №1)** на объем 1,5-2 л и 3 г **(содержимое двух флаконов №1)** на объем 5 литров.

3.3.5 На объем 100-500 мл экстракта пищевого продукта вносят 1,5 грамма адсорбента **(содержимое одного флакона №1)**.

3.3.6 Емкости закрывают и помещают на шуттель-аппарат для встряхивания в течение 2 ч, после чего их отстаивают в течение 1 ч для осаждения адсорбента. Надосадок осторожно сливают, а адсорбент с небольшим количеством жидкости переносят в стерильный флакон с помощью пипетки с отпиленным концом. Флакон центрифугируют при 1500-2000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования верхнюю фазу осторожно отбирают с помощью пипетки и удаляют.

3.3.7 Для осуществления элюирования адсорбированных вирусов во флакон с адсорбентом (п.3.3.6) добавляют 3 мл приготовленного раствора элюента. Вирус элюируют путем встряхивания флакона на шуттель-аппарате в течение 20 мин, после чего флакон центрифугируют при 1500-2000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования верхнюю фазу (элюат) осторожно отбирают в стерильный флакон.

3.3.8 Для осветления и удаления бактериальной флоры собранный элюат обрабатывают хлороформом в соотношении 1:2 (объем пробы/объем хлороформа). Полученную смесь встряхивают в течение 10 мин на шуттель-аппарате, а затем центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования верхнюю фазу (элюат) осторожно, не задевая нижнюю фазу, отбирают с помощью пипетки в стерильный флакон.

3.3.9 Полученный в результате проведенных стадий пробоподготовки (концентрирования вирусов) элюат, предположительно содержащий вирусный материал, разделяют на аликвоты для удобства использования. Одну часть (примерно 1,0 мл) в дальнейшем используют для исследования на культурах клеток, методом иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР), вторую часть (примерно 2,0 мл) используют для дополнительного концентрирования.

3.4 Дополнительное концентрирование с помощью полиэтиленгликоля.

3.4.1 Общее время проведения стадии дополнительного концентрирования вирусов из проб составляет примерно 12,5-14,5 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.4.2 Для дополнительного концентрирования полученного элюата (п.3.3.8) примерно в 4-5 раз проводят его концентрирование с помощью полиэтиленгликоля с хлористым натрием (ПЭГ + NaCl).

3.4.3 Дополнительное концентрирование осуществляют в центрифужных пробирках. Элюат переносят в центрифужную пробирку и добавляют содержимое флакона № 3 (ПЭГ+NaCl) до конечных концентраций 10% и 0,5 М, соответственно. Смесь тщательно перемешивают до растворения ингредиентов, затем выдерживают в течение 10-12 ч в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8^0С. Образовавшуюся суспензию центрифугируют при 10 000g в течение 1ч либо при 6 000 g в течение 2 ч. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в 0,5 мл стерильной дистиллированной воды для его последующего исследования методом ИФА и ПЦР.

3.4.4 Полученный элюат (п. 3.3.8 или п. 3.4.3) можно хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8^0С - не более 3 суток, при температуре от минус 16 до минус 20°С - не более 6 месяцев. Аликвоты элюата, предназначенные для вирусологических исследований, не следует размораживать более 2 раз.

3.5 Использованный адсорбент заливают раствором перекиси водорода с массовой долей 6% для обеззараживания на 12 ч.

4 СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ.

Срок годности набора 12 месяцев с даты изготовления.

Набор хранят при температуре от плюс 2^0С до плюс 8^0С.

Транспортирование осуществляют любыми видами крытого транспорта (воздушный, железнодорожный, автомобильный) при температуре от плюс 2 до плюс 8^0С. Допускается транспортирование при более высокой температуре (до плюс 20^0С) в течение не более 5 суток.

Заведующий лабораторией инфекций с природным резервуаром д.м.н., проф.
_____Т. В. Амвросьева
Ведущий научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром, к.б.н.
_____Н. В.Поклонская
Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____О. Н. Казинец
Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____З. Ф. Богуш
«13» 02 2020г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru