МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения
Республики Беларусь
_____ Б.Н. Андросюк
_____ 2023 г.

Инструкция по применению

РЕАГЕНТ ДЛЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ: ЧАСТИЦЫ ЛЕНТИВИРУСНЫЕ ПСЕВДОТИПИРОВАННЫЕ S-БЕЛКОМ ВИРУСА SARS-COV-2 «ЧЛВ – S-SARS-COV-2»

ТУ BY 100558032.429-проект

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора
Республиканского унитарного предприятия «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»
_____ М.И. Злотникова
«18» 09 2023 г.

СОГЛАСОВАНО
Директор Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»
_____ В.А. Горбунов
«23» 05 2023 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач учреждения здравоохранения «Минская областная клиническая больница»
_____ А.А. Линкевич
«04» 05 2023 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач учреждения здравоохранения «Минский клинический консультативно-диагностический центр»
_____ Ю.И. Белянкина
«10» 08 2023 г.

Минск 2023

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

Реагент для иммунологических исследований: частицы лентивирусные, псевдотипированные S-белком вируса SARS-CoV-2 «ЧЛВ – S-SARS-CoV-2» (далее по тексту – реагент), предназначен для определения нейтрализующей активности антител к SARS-CoV-2 в лабораторных условиях 2 уровня биозащиты (BSL2) в клинических образцах пациентов (плазма крови, сыворотка крови) после вакцинирования и/или перенесённого заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2 с использованием культурального метода на культуре клеток HEK293-ACE2.

Принцип действия реагента основан на специфическом взаимодействии частиц лентивирусных псевдотипированных S-белком вируса SARS-CoV-2 и нейтрализующих антител, содержащихся в сыворотке или плазме крови. Нейтрализующие антитела препятствуют связыванию частиц с ACE2 рецептором, расположенным на поверхности клеток HEK293-ACE2 и блокируют проникновение лентивирусных частиц в клетки.

Для измерения нейтрализующих антител с помощью функционального анализа образцы сыворотки коинкубируются с псевдовирусными частицами (ПЧ), после чего измеряется способность этих частиц инфицировать клетки-мишени in vitro. Титр нейтрализующих антител в сыворотке отрицательно коррелирует с уровнем ПЧ - опосредованной инфекцией.

Проникновение частиц детектируется с использованием люминисцентного микроскопа/цитофлюориметра (детекция светящихся клеток) и/или с использованием люминометра (хемилюминисценция), т.к. лентивирусная частица содержит два репортёрных гена (ген, кодирующий зелёный флюоресцирующий белок и ген люциферазы).

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент предназначен для определения нейтрализующей активности антител к SARS-CoV-2 в лабораторных условиях 2 уровня биозащиты (BSL2) в клинических образцах пациентов (плазма крови, сыворотка крови) после вакцинирования и/или перенесённого заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2 с использованием культурального метода на культуре клеток HEK293-ACE2. Набор реагентов рассчитан на проведение 100 исследований, включая контроли.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

2 СОСТАВ

Комплект реагента содержит следующие компоненты:

- Частицы лентивирусные с титром 10^5единиц трансдукции в 1 мл культуральной среды — 1 фл.
- Инструкция по применению — 1 шт.

3 СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 Меры предосторожности

Все работы проводятся в изолированных помещениях (боксах), предназначенных для работы с культурами клеток. Обязательным является наличие системы приточной и вытяжной вентиляции с HEPA-фильтрацией. При работе обязательно использование сменных медицинских халатов, сменной обуви, защитных масок и перчаток. Запрещается выходить из рабочих помещений в специальной одежде.

Исследование клинического материала (сыворотка, плазма крови), который потенциально может содержать возбудителей бактериальных и вирусных инфекций проводят с соблюдением «Требований безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки».

Работа проводится только в одноразовых перчатках, используются одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) обеззараживается 3-5% раствором перекиси водорода в специальных контейнерах, после чего разрешается слив в общую канализационную сеть.

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

При утилизации пластиковой посуды, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

Рабочую поверхность ламинарного шкафа по окончанию работ обрабатывают спиртосодержащими дезинфицирующими растворами и облучают бактерицидными лампами в течение 1–2 часов.

Применять реагент необходимо строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не использовать реагент по истечении срока годности.

4 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

4.1 Культура клеток HEK293-ACE2, коллекция культур клеток человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

4.2 Плашки 96-луночные для культур клеток с крышкой, стерильные (любой марки).

4.3 Среда ДМЕМ с высоким содержанием глюкозы для культур клеток, стерильная, Gibco, содержащая 2мМ L-глутамина, 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

4.4 Полибрен, SigmaAldrich, или другой марки.

4.5 Ламинарный шкаф 2В класса защиты, Kojair KR-125 Safety или другой марки.

4.6 Инкубатор углекислотный, любой марки.

4.7 Люминометр (любой марки).

4.8 Набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», «Socorex» либо любой другой марки).

4.9 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.

4.10 Инвертированный флуоресцентный микроскоп, Nicon NC-2000 или аналогичный.

4.11 Плашки 96-луночные непрозрачные, полистирол, с крышкой, стерильные, для измерения хемилюминисценции (любой марки).

4.12 Холодильник на 2 – 8 ^{0}C, морозильник на минус 20°C (любой марки).

4.13 Центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 8 тыс. об/мин (любой марки).

4.14 Центрифуга-вортекс (любой марки).

4.15 Пакеты для сбора и утилизации медицинских отходов.

4.16 Набор для определения люциферазной активности, Firefly luciferase assay kit 2.0, или аналог.

5 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Для исследования используется биологический материал – сыворотка, плазма крови.

Биологический материал доставляют в лабораторию, инактивируют в течение 30 мин при 56 °C, аликвотируют и хранят при +4°C (если планируется использовать в течение 1 недели), или на - 80 °C до использования.

5.1. Подготовка культуры клеток

Клетки культивируют в среде ДМЕМ, содержащей 2мМ L-глутамина, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотики пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл), в атмосфере 5% CO2 при температуре 37°C. Пересев клеток осуществляется общепринятым методом. Для диссоциации клеток используется 0,25% раствор трипсина и 0,02% раствор Версена в соотношениях 1:3 или ФСБР (фосфатно-солевой буферный раствор) с добавлением 0,5 мМ Na_2EDTA. Клетки пересевают дважды в неделю по достижению монослоя на 3-4 сутки.

За день до проведения исследований клетки HEK293-ACE2 рассевают по 12 500 клеток в каждую лунку 96 луночной культуральной плашки, с расчётом 10 лунок на каждый образец (3 разведения с титровкой 1: 3 по 2 лунки на каждое разведение) и дополнительно 2 лунки для отрицательного контроля и 2 лунки для положительного контроля.

5.2. Подготовка растворов, биологических образцов и псевдотипированных вирусных частиц (*расчет приведён на исследование 2 образцов*)

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

5.2.1 Готовят раствор полибрена (0,4 мг/мл) для этого к 20 мкл (2 мг/мл) раствора полибрена добавляют 80 мкл полной среды ДМЕМ (п.4.3. материалы). Используется *свежеприготовленным.*

5.2.2 В день проведения исследований сыворотку/плазму размораживают если требуется, помещая пробирку при комнатной температуре. В ламинаре готовят 3х разведения каждого образца, для этого в лунки 96 планшета для разведения образцов вносят полную среду ДМЕМ (п.4.3. материалы) в следующем объёме: 1-я лунка 144 мкл, 2-я лунка 100 мкл, 3 лунка 100 мкл. В первую лунку вносят 6 мкл сыворотки, тщательно пипетируют (это разведение 1:25), 50 мкл содержимого первой лунки переносят во вторую лунку, тщательно пипетируют (это разведение 1:75), 50 мкл содержимого второй лунки переносят в третью лунку, тщательно пипетируют (это разведение 1:225).

5.2.3 Подготовка частиц лентивирусных псевдотипированных S-белком вируса SARS-CoV-2. Пробирку, содержащую реагент извлекают из жидкого азота *непосредственно перед использованием* и помещают в водяную баню при 37°С на 1-2 мин. Затем 100 мкл лентивирусных частиц вносят в 900 мкл полной среды ДМЕМ (п. 4.3 материалы).

5.3. Постановка анализа (реакция нейтрализации)

В ламинарном боксе в отдельные лунки 96 луночного планшета вносят по 50 мкл каждого разведения плазмы/сыворотки (дубли) и прибавляют по 50 мкл частиц лентивирусных (п.5.2.3). Лунки №1-3 разведения образца (1:25; 1:75; 1:225), лунки №4-6 дубли разведений, для каждого образца. Дополнительно готовят: лунки № 7, 8 для положительного контроля (контроль вируса, КВ): для этого к 50 мкл ДМЕМ (п.4.3. материалы) прибавляют 50 мкл частиц лентивирусных (приготовленных в соответствие с п.5.2.3); лунки № 9, 10 для отрицательного контроля (контроль клеток, КК): в лунки помещают по 100 мкл среды ДМЕМ (п.4.3. материалы). Планшет с подготовленными образцами инкубируют 1 час в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37°С.

5.4. Нанесение на клетки

Плашку с клетками помещают в ламинарный бокс и аккуратно наслаивают на клетки по 100 мкл образцов, приготовленных в соответствии с п.5.3. В каждую лунку добавляют по 4 мкл полибрена, приготовленного как описано в п.5.2.1. и аккуратно ресуспендируют.

Инкубируют плашку с нанесёнными образцами в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37°С в течение 48 часов до снятия результатов.

5.5. Учёт результатов

5.5.1 Учёт результатов с использованием микроскопирования и/или проточного цитофлуориметра.

Клетки просматривают под флуоресцентным микроскопом и отбирают лунки, где количество позитивных клеток по ZsGreen составляет от 1% до 10%. Клетки из отобранных и контрольных лунок снимают с использованием трипсина, центрифугируют, растворяют в PBS с 1% BSA и подсчитывают на проточном цитометре количество флюоресцирующих клеток. Для оценки NT_{50} строится график, отражающий снижение титра псевдовируса в зависимости от разведения сыворотки. Нейтрализующая активность антител (NT_{50}) определяется как активность сыворотки в определенном разведении, способная снизить максимальный титр псевдовируса на 50%.

5.5.2 Учет результатов с использованием люминометра

Исследования проводят с использованием набора для определения люциферазной активности Firefly luciferase assay kit 2.0 (Biotium, или аналог) в соответствии с инструкцией производителя. Нейтрализующая активность антител (NT50) определяется также, как в пункте 5.5.1., по учёту относительных единиц хелюминесценции (RLU, Relative Light Units), снижение которых коррелирует с увеличением титра нейтрализующих антител.

6 ФОРМА ВЫПУСКА

Реагент для иммунологических исследований: частицы лентивирусные, псевдотипированные S-белком вируса SARS-CoV-2 «ЧЛВ – S-SARS-COV-2» выпускается в виде упакованного набора. Реагент рассчитан на проведение 100 исследований, включая контроли.

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

7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Транспортировка реагента должна производиться при температуре от –20±2^{0}С в течение суток.

Хранение набора реагентов должно производиться при температуре –150±2^{0}С на протяжении всего срока годности.

Разработчики:
от РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

Заведующий лабораторией иммунологии
и клеточной биотехнологии, д-р. биол. наук _____ Е.Г. Фомина

Ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии
и клеточной биотехнологии, канд. биол. наук _____ Е.Е. Григорьева

Стажёр младшего научного сотрудника лаборатории
иммунологиии клеточной биотехнологии _____ В.В. Антоненко

от РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий

Заведующий лабораторией биотехнологии
кроветворных клеток, канд. хим. наук _____ Н.В. Петёвка

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии
кроветворных клеток, канд. биол. наук _____ И.К. Фомин

Младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии
кроветворных клеток _____ О.Ю. Пилютина

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