

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Е.Н. Кроткова
18.12.2023 г.
Регистрационный № 054-0623



**МЕТОД НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ВИРУСА SARS-COV-2 НА
КУЛЬТУРЕ ПЕРМИССИВНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
COVID-19**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

кандидат медицинских наук, доцент А.Г. Красько, О.В. Климович, С.Ф.
Семёнов., Л.П. Родионова, О.С. Залевская, Я.В. Лютина

Минск, 2023

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Е.Н. Кроткова

18.12.2023

Регистрационный № 054-0623

**МЕТОД НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ВИРУСА SARS-COV-2 НА
КУЛЬТУРЕ ПЕРМИССИВНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
COVID-19**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

кандидат медицинских наук, доцент А.Г. Красько, О.В. Климович, С.Ф.
Семёнов., Л.П. Родионова, О.С. Залевская, Я.В. Лютина

Минск, 2023

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод нейтрализации вируса SARS-CoV-2 на культуре перmissive клеток, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику COVID-19, оценку напряжённости иммунного ответа при коронавирусной инфекции.

Инструкция предназначена для врачей-лаборантов, учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с коронавирусной инфекцией.

1 Показания к применению метода COVID-19 (U07.1)

2 Противопоказания к применению метода

Отсутствие условий для работы с возбудителями 3 группы риска.

3 Перечень необходимых изделий медицинской техники, изделий медицинского назначения, реактивов и др.

- бокс биологической безопасности 3 класса;
- CO₂ – инкубатор с температурой (37±0,5) °C;
- термостат (37±0,5) °C;
- морозильник с температурой минус (20±2) °C;
- холодильник (5±3) °C;
- дозатор 8-канальный автоматический объёмом 30-300 мкл;
- дозатор одноканальный автоматический объёмом 20-200 мкл;
- микроцентрифуга лабораторная;
- инвертированный микроскоп;

- 96-луночные планшеты для культивирования клеток, стерильные плоскодонные;
- 96-луночные планшеты для культивирования клеток, стерильные круглодонные;
- наконечники универсальные одноразовые стерильные для дозатора автоматического, объемом 2-200 мкл;
- пипетки градуированные стерильные объемом 5,0 и 10,0 мл;
- пипетки Пастера;
- пробирки пластиковые, 10,15 мл;
- флаконы для культивирования клеток, 75 см²;
- пробирки объемом 1,5 мл;
- ванночки-резервуары для многоканальных дозаторов объёмом 30-60 мл;
- тест-штамм коронавируса SARS-CoV-2;
- культура клеток линии Vero E6 в концентрации около 100 000 клеток в мл;
- неиммунная сыворотка крови;
- питательная среда ДМЕМ для культур клеток с Л-глутамином;
- фетальная бычья сыворотка, жидкая;
- трипсин ЭДТА 0,25%;
- раствор Версена;
- раствор Хенкса;
- гентамицина сульфат (40 мг/мл);
- спирт этиловый ректификат 70%.

4 Технология осуществления метода

4.1 Посев клеток линии Vero E6 на флаконы для культивирования клеток

Для постановки реакции нейтрализации необходимо засеять культурой клеток Vero E6 два флакона площадью 75 см² (посевная доза на флакон 2,7 миллиона клеток). Клетки Vero E6 выращивают 24 часа при температуре (37±1) °C. Наличие полного конфлюэнтного монослоя клеток оценивается с помощью инвертированного микроскопа при увеличении 40х.

4.2 Титрование вируса SARS-CoV-2

Клетки Vero E6 снимают с поверхности флакона смесью растворов трипсина и Версена в соотношении (1:1). Для определения инфекционного титра штамма вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero E6 10 мл клеточной суспензии рассеивают на 96-луночные культуральные планшеты в концентрации 20-30 тысяч клеток на лунку. В качестве ростовой среды используют питательную среду DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и раствора гентамицина сульфата в концентрации 100 мкг/мл. Клетки культивируют в CO₂-инкубаторе при 37°C в атмосфере 90% влажности и подачей 5% CO₂ 24 часа.

Готовят 10-кратные разведения вируса на среде DMEM с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки (поддерживающая среда). Для этого в семь пробирок объёмом 1,5 мл вносят по 900 мкл поддерживающей среды. В 1-ю пробирку вносят 100 мкл суспензии вируса и тщательно перемешивают (разведение 10⁻¹), во вторую пробирку вносят 100 мкл вирусосодержащей жидкости из 1-й пробирки (разведение 10⁻²), аналогично для последующих разведений до 10⁻⁷.

Планшеты с суточным монослоем клеток отмывают раствором Хенкса и вносят разведения вируса в объеме 100 мкл в лунку, используя 8 лунок на разведение (Таблица 1). Планшеты инкубируют при температуре 37°C в течение 1,5 часов для адсорбции вируса, затем содержимое лунок удаляют и вносят в каждую лунку по 100 мкл поддерживающей среды. Клеточным контролем (КК) служит культура клеток Vero E6.

Таблица 1 - Схема титрования вируса

Обозначения рядов	Разведения вируса							Контроль				
	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	КК	КК	КК	КК	КК
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Планшеты инкубируют в течение 5 суток в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. Ежедневно под микроскопом контролируют состояние монослоя клеток на наличие цитопатического действия (ЦПД). Окончательный учет титрования проводят на 5-е сутки. Учёт результатов выполняют визуально путём микроскопического исследования клеточного монослоя на наличие характерного ЦПД на 5-е сутки после заражения (округление и открепление клеток от монослоя). Титр вируса SARS-CoV-2 определяют по конечной точке проявления ЦПД в культуре клеток Vero E6 и рассчитывают по методике Кербера:

$$T=1,5+N/8,$$

где N — общее количество лунок с проявлением ЦПД в опыте.

Титр вируса (Т) выражается в lg ТЦД₅₀/мл.

4.3 Получение сывороток крови

Венозную кровь отбирают из локтевой вены в количестве 5-6 мл в стерильную пробирку без антикоагулянта.

Получение сывороток из крови проводят одним из двух методов:

1) Собранную кровь помещают на 15 мин в термостат при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ для более быстрого свертывания. Пипеткой Пастера отделяют сгусток крови от стенок пробирки. Пробирки с кровью оставляют на 1 час при комнатной температуре для отделения сыворотки от сгустка крови. Затем пробирки центрифугируют в течение 10 минут при 2000 об/мин.

2) Собранную кровь помещают на 15 мин в термостат при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ для более быстрого свертывания. Пипеткой Пастера отделяют сгусток крови от стенок пробирки. Пробирки с кровью оставляют на ночь при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ для отделения сыворотки от сгустка крови. Затем пробирки центрифугируют в течение 10 минут при 2000 об/мин.

После центрифугирования полученные сыворотки крови отбирают в стерильные пробирки. Далее сыворотки прогревают в течение 30 мин при температуре 56°C в водяной бане для инактивации системы комплемента и стабилизации глобулиновых фракций.

4.4 Определение вируснейтрализующей активности сывороток крови

Вируснейтрализующую активность определяют в реакции нейтрализации штамма коронавируса SARS-CoV-2 с сыворотками крови в культуре клеток Vero E6 по цитопатическому действию (ЦПД).

Готовят разведения сывороток в круглодонном 96-луночном планшете (Таблица 2). В лунки ряда А многоканальным дозатором

вносят по 165 мкл питательной среды ДМЕМ, содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки; в лунки рядов В-Н вносят по 110 мкл питательной среды ДМЕМ, содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки. Далее одноканальным дозатором в лунки ряда А вносят по 55 мкл исследуемых сывороток, отрицательного контроля (нормальная сыворотка, не содержащая вируснейтрализующие антитела) – ОК, положительного контроля (сыворотка пациента с COVID-19, заведомо содержащая вируснейтрализующие антитела) – ПК, и питательной среды ДМЕМ для контроля рабочего разведения вируса (PPV). Каждый образец вносится в одну лунку, наконечник меняется каждый раз при внесении новой сыворотки. Далее сыворотки смешивают многоканальным дозатором в лунках и титруют, перенося из ряда в ряд по 110 мкл до разведения 1:512 перемешивая не менее 5 раз. По достижении ряда Н и окончания перемешивания, последние 110 мкл разведения сыворотки удаляют (выбрасывают вместе с наконечниками). Таким образом, объём разведений сыворотки во всех рядах остаётся одинаковым – 110 мкл.

Таблица 2 - Схема приготовления разведений сывороток

Планшет 1	Название материала		Сыворотки и контрольные образцы											
	Разведение сыворотки	№ сыворотки	1	2	3	4	5	6	7	8	ОК	ПК	PPV	
Объём внесения среды ДМЕМ		Обозначения рядов												
165 мкл	1:4	А	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
110 мкл	1:8	В	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
110 мкл	1:16	С	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
110 мкл	1:32	Д	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
110 мкл	1:64	Е	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
110 мкл	1:128	Ф	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
110 мкл	1:256	Г	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
110 мкл	1:512	Н	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Далее готовят рабочее разведение коронавируса SARS-CoV-2. Рабочая доза штамма коронавируса должна содержать около 100 ТЦД₅₀ в объёме 0,05 мл. Рабочее разведение штамма коронавируса рассчитывают по следующей формуле:

$$D=10^T/20,$$

где Т – титр вируса, выраженный в lg ТЦД₅₀/мл.

Значение D показывает, во сколько раз необходимо развести суспензию штамма вируса SARS-CoV-2 для получения рабочего разведения. Суспензия коронавируса SARS-CoV-2 разводится до рабочего разведения питательной средой ДМЕМ, содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки.

Для постановки реакции нейтрализации 8 сывороток на двух плоскодонных 96-луночных планшетах с клетками Vero E6 необходимо приготовить 15 мл рабочего разведения штамма коронавируса.

Рабочее разведение вируса переливают в ванночку для многоканальных дозаторов и раскапывают его во все лунки круглодонного 96-луночного планшета по 110 мкл (1:1). Планшеты со смесью сыворотки и вируса инкубируют при 37°C в CO₂-инкубаторе не менее 1 ч. После инкубации в плоскодонные планшеты с клетками Vero E6 вносят смеси сывороток и контрольных образцов с вирусом (Таблица 3). Для этого осторожно удаляют среду из лунок и многоканальным дозатором (по 8 наконечников) переносят по 100 мкл смеси разведений сывороток с вирусом в две лунки соседних колонок. Наконечники меняют после внесения разведений каждого образца. В столбцы 11 и 12 вносят по 100 мкл среды ДМЕМ, содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки, для контроля клеток.

**Таблица 3 - Схема внесения разведений сывороток с вирусом в лунки
96-луночного плоскодонного планшета с клетками.**

Планшет 1		Название материала	Сыворотки											
штамм SARS-CoV-2	Разведение	№ сыворотки	1		2		3		4		5		6	
		Обозначения рядов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1:8	A												
	1:16	B												
	1:32	C												
	1:64	D												
	1:128	E												
	1:256	F												
	1:512	G												
	1:1024	H												
Планшет 2		Название материала	Сыворотки											
штамм SARS-CoV-2	Разведение	№ сыворотки	7		8		ОК		ПК		РРВ		КК	
		Обозначения рядов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1:8	A												
	1:16	B												
	1:32	C												
	1:64	D												
	1:128	E												
	1:256	F												
	1:512	G												
	1:1024	H												

После этого панели инкубируют в CO₂ – инкубаторе при температуре (37±1)°C в течение 5 суток.

На пятые сутки клетки Vero E6 в лунках планшетов просматривают в инвертированном микроскопе (увеличение 40х-100х) на наличие цитопатогенного действия.

Критерии достоверности полученных результатов:

- во всех лунках с разведениями отрицательного контроля (ОК) должны быть признаки ЦПД;
- в лунках с положительным контролем (ПК) ЦПД должно отсутствовать по крайней мере в разведении 1:8;

- в лунках с контролем культуры (КК) ЦПД должно отсутствовать;
- монослой клеток в лунках, содержащих рабочее разведение вируса (РРВ), должен иметь признаки специфической дегенерации, т.е. ЦПД.

Учет результатов

- разведения сывороток, в лунках которых клеточный монослой остаётся без признаков ЦПД, оцениваются как вируснейтрализующие;
- в тех лунках, в которых разведение сыворотки не способно нейтрализовать вирус, наблюдается ЦПД с округлением клеток и отслоением от подложки.

Последнее разведение сыворотки, способное нейтрализовать рабочее разведение вируса, учитывается как нейтрализующий титр в реакции нейтрализации.

4.5 Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения

При точном выполнении этапов исследования, изложенных в настоящей инструкции ошибки и осложнения исключены.