



Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ»

Юридический адрес: 601125, Россия, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, улица Заводская, строение 273
Тел./факс: +7 (49243) 7-25-20
Московский офис: 123112, г. Москва, ул. Тестовская, д. 10, подъезд 2
Тел./факс: +7 (495) 988 47 94
generium@generium.ru / www.generium.ru
ОКПО 89761464, ОГРН 1093316000370
ИНН 3321027747, КПП 332101001

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
АО «ГЕНЕРИУМ»

Д.С. Тальянский

2022 г.

Иск. № 018/4603
от 18.10.2022

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*

«ТиграТест® SARS-CoV-2»

Тест на высвобождение интерферона гамма *in vitro* для определения в крови Т-лимфоцитов, специфически отвечающих на антигены вируса SARS-CoV-2
по ТУ 21.20.23-001-89761464-2020

НАЗНАЧЕНИЕ

«ТиграТест® SARS-CoV-2» Тест на высвобождение интерферона гамма *in vitro* для определения в крови Т-лимфоцитов, специфически отвечающих на антигены вируса SARS-CoV-2, ТУ 21.20.23-001-89761464-2020 (далее по тексту – изделие) предназначен для качественной детекции в крови (далее по тексту – анализируемый образец) методом IGRA ELISPOT (Interferon Gamma Release Assay, Enzyme Linked SPOT analysis) Т-лимфоцитов, специфических к SARS-CoV-2, у людей, перенесших инфекцию COVID-19 или вакцинированных двумя компонентами комбинированной векторной вакцины «Гам-Ковид-Вак» (дата регистрации: 11.08.2020 г.). Активация Т-лимфоцитов определяется через секрецию интерферона гамма (IFN γ).

Функциональное назначение:

– вспомогательное средство выявления *in vitro* адаптивного иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2.

Применение изделия в клинической лабораторной диагностике:

– для использования в качестве вспомогательного средства для выявления людей с адаптивным Т-клеточным иммунным ответом на SARS-CoV-2 после перенесенного заболевания COVID-19;

– для оценки формирования Т-клеточного иммунитета у лиц, иммунизированных двумя компонентами комбинированной векторной вакцины «Гам-Ковид-Вак» (дата регистрации: 11.08.2020 г.).

Отбор проб крови для исследования в «ТиграТест® SARS-CoV-2» осуществляют у лиц, не имеющих признаков заболевания.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Изделие применяется для целей эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями путем оценки наличия у различных групп населения иммунитета, как постинфекционного, так и приобретенного после проведения мероприятий по специфической профилактике коронавирусной инфекции (двумя компонентами комбинированной векторной вакцины «Гам-Ковид-Вак») дата регистрации: 11.08.2020 г.), вызываемой SARS-CoV-2, а также для оценки формирования Т-клеточного иммунитета при проведении прививочных кампаний в отношении вакцинного препарата «Гам-Ковид-Вак».

ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Сотрудники медицинских учреждений и клинико-диагностических лабораторий.

Только для профессионального использования.

Изделие предназначено для ручной постановки иммуноферментного анализа.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Противопоказаний в рамках установленного производителем назначения не имеет.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

1. Состав изделия

Изделие «ТиграТест® SARS-CoV-2» поставляется в следующей комплектации:

№	Наименование	Комплектация на 120 определений
Компоненты		
Набор 1.		1 шт.
	«Положительный контроль» – 100-кратный концентрированный раствор (моноклональное антитело ОКТ-3, среда культуральная безсывороточная «AIM-V Medium»).	1 пробирка (0,2 мл)
	«Конъюгат» – 200-кратный концентрированный раствор (моноклональное антитело к цитокину IFN γ , конъюгированное со щелочной фосфатазой с использованием набора для маркировки антител и протеинов щелочной фосфатазы в растворителе AP Stability)	1 пробирка (0,25 мл)
	«Субстрат» – BCIP: 5-бromo-4-хлоро-3-индол-фосфат, NBT: нитротетразолий синий	1 флакон (36 мл)
	«Культуральный планшет» – стрипованный планшет, в лунках которого сорбированы моноклональные антитела к цитокину IFN γ .	5 шт.
Набор 2, панели пептидных антигенов SARS-CoV-2, флаконы с замороженным раствором пептидов.		1 шт.
	Панель антигенов 1: пептиды S-белка (spike), содержит 25 % ДМСО.	2 пробирки (по 0,4 мл)
	Панель антигенов 2: пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a, содержит 25 % ДМСО	2 пробирки (по 0,4 мл)
Эксплуатационная документация		
	Инструкция по применению изделия	1 шт.

Примечание. Паспорт на серию входит в комплект поставки набора реагентов. Количество экземпляров паспорта каждой серии определено в договоре на поставку продукции.

2. Число анализируемых проб биологического материала

Комплект изделия предназначен для постановки анализа на 120 определений, включая контроли реакции (1 планшет предназначен для 24 определений). Возможно проведение отдельных независимых анализов с использованием необходимого количества стрипов «Культуральный планшет».

3. Принцип метода

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), выделенные из образцов цельной крови пациентов и промытые для удаления любых источников фонового сигнала,

инкубируют с антигенами SARS-CoV-2 для стимуляции имеющихся Т-клеток, специфичных для этих антигенов. Цитокин IFN γ связывается и удерживается рядом с секретирующей его Т-клеткой специфическими анти-IFN γ антителами, находящимися на поверхности мембраны, выстилающей лунку. После активации все клетки удаляются промыванием и для детекции цитокина прибавляются другие анти-IFN γ антитела, конъюгированные со щелочной фосфатазой и узнающие другой эпитоп молекулы IFN γ . После инкубации несвязавшийся конъюгат удаляется промыванием. В каждую лунку вносится раствор хромогенного субстрата, который преобразуется щелочной фосфатазой в окрашенное пятно нерастворимого преципитата в месте реакции. Каждое пятно является отпечатком одной Т-клетки, секретирующей IFN γ , а количество полученных пятен характеризует содержание специфичных для антигенов патогена CD4+ и CD8+ Т-клеток в периферической крови. Результатом анализа является подсчет количества пятен в лунках с контролями и антигенами.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Положительный и отрицательный (питательная среда, не входит в состав набора) контроли используются для оценки функциональности МКПК анализируемых образцов и контроля неспецифической активации Т-клеток при проведении анализа методом ELISPOT на выявление IFN γ , секретируемого Т-клетками, специфически отвечающими на антигены вируса SARS-CoV-2 в анализируемых образцах.

«**Положительный контроль**» представляет собой 100-кратный концентрированный раствор моноклонального антитела ОКТ-3 в среде «AIM-V Medium»

«**Конъюгат**» представляет собой 200-кратный концентрированный раствор моноклонального антитела к цитокину IFN γ , конъюгированного со щелочной фосфатазой с использованием набора для маркировки антител и протеинов щелочной фосфатазы в растворителе AP Stability.

«**Субстрат**» представляет собой раствор BCIP: 5-бromo-4-хлоро-3- индол-фосфат, NBT: нитротетразолий синий.

«**Культуральный планшет**» представляет собой стрипованный планшет с сорбированными в лунках моноклональными антителами к цитокину IFN γ

«**Панель антигенов 1**» представляет собой раствор пептидов S-белка (spike) вируса SARS-CoV-2, содержит 25 % диметилсульфоксида (ДМСО).

«**Панель антигенов 2**» представляет собой пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a вируса SARS-CoV-2, содержит 25 % диметилсульфоксида (ДМСО).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

1. Предел обнаружения (LOD)

На основании ROC-анализа, проведенного по результатам тестирования 262 образцов МКПК, выделенных из крови условно здоровых добровольцев, переболевших COVID-19 и иммунизированных двумя компонентами вакцины «Гам-Ковид-Вак», предел обнаружения метода составил 11 пятен на 350 000 МКПК.

2. Чувствительность

Чувствительность изделия с использованием панели контрольных образцов составляет 100 % без ложноотрицательных результатов.

3. Специфичность

Специфичность изделия с использованием панели контрольных образцов составляет 100 % без ложноположительных результатов.

4. Аналитическая специфичность по отношению к некоторым сезонным коронавирусам

Специфичность набора реагентов, определенная с использованием образцов крови лиц, переболевших COVID-19 и иммунизированных вакциной «Гам-Ковид-Вак» составила 100 %. Оценку специфичности набора реагентов по отношению к сезонным коронавирусам проводили на 20 образцах крови условно здоровых добровольцев (не содержащих антитела к вирусу SARS-CoV-2), содержащих Т-клетки, специфически отвечающие на антигены сезонных коронавирусов HCoV-NKUI, HCoV-NL63, HCoV-OC43 или HCoV-229E. На основании полученных результатов можно утверждать, что вероятность неспецифического Т-клеточного ответа в ответ на стимуляцию панелью антигенов 1 и 2 составляет менее 1%.

5. Аналитическая специфичность по отношению к рекомбинантным человеческим цитокинам

Лабораторные исследования по оценке специфичности по отношению к рекомбинантным человеческим цитокинам IFN γ , IL2, IL6, TNF α , IFN-1 β показали высокую специфичность по отношению к целевому антигену IFN γ . Не выявлены перекрестные взаимодействия с про- и противовоспалительными цитокинами человека: IL2, IL6, TNF α , IFN-1 β .

6. Воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость анализа была протестирована с использованием 15 образцов в 2 параллельных испытаниях с использованием изделия одной серии. Коэффициент вариации (% CV) не превысил 25 %.

Межсерийная воспроизводимость анализа была протестирована с использованием 15 образцов с использованием 3 серий изделия. Коэффициент вариации (% CV) не превысил 25 %.

7. Интерферирующие вещества

При применении интерферона (ИФН- α , - β) для терапии инфекционных и аутоиммунных заболеваний может наблюдаться интерференция, выражающаяся в подавлении активации Т-клеток специфическими антигенами SARS-CoV-2.

Высокое содержание дексаметазона (до 0,4 мг/мл) в клинических образцах не влияет на результат анализа.

8. Кросс-реактивность

Кросс-реактивность была исследована на 3 образцах МКПК доноров с верифицированным ПЦР вирусными инфекциями (риновирус, парагрипп, Influenza virus A (H3N2)). На основании полученных результатов можно утверждать, что Т-клетки реактивные к данным вирусам не обладают перекрестной реактивностью к антигенам вируса SARS-CoV-2.

9. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность при выявлении IFN γ , секретируемого Т-клетками, специфически отвечающими на антигены вируса SARS-CoV-2, в ходе клинических испытаний составила 93 % (интервал 78,58% – 99,21%, с доверительной вероятностью 95,0%) при анализе 29 образцов.

10. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность при выявлении IFN γ , секретируемого Т-клетками, специфически отвечающими на антигены вируса SARS-CoV-2, в ходе клинико-лабораторных испытаний, составила 96 % (интервал 85,75% - 100%, с доверительной вероятностью 95,0%) при анализе 25 образцов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 2б в соответствии с Приказом МЗ РФ № 4н от 06.06.2012 г. «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий».

При работе с изделием соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» Временных методических

рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) и СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- рассматривать анализируемые образцы как потенциально инфицированные;
- применять изделие строго по назначению, согласно данной инструкции;
- необходимо строго соблюдать асептические условия при работе с кровью и клетками, чтобы избежать контаминации и неспецифической активации Т-клеток;
- не смешивать компоненты из разных серий набора;
- строго соблюдать рекомендованную методику выполнения теста, время инкубации и/или температуру, т.к. они могут повлиять на полученные результаты;
- допускать к работе с набором реагентов только специально обученный персонал, прошедший дополнительное профессиональное обучение правилам безопасной работы с микроорганизмами II-IV групп патогенности;
- метод выделения клеток в лаборатории должен быть апробирован (верифицирован);
- при использовании метода седиментации в градиенте плотности фиколла, кровь должна быть фракционирована в течение не более 24 часов после забора;
- образцы крови необходимо хранить и транспортировать при температуре от 18 до 25°С, нельзя охлаждать и замораживать образцы цельной крови;
- транспортировать кровь рекомендуется в термоизолирующих контейнерах, для минимизации колебания температуры;
- не использовать изделие по истечении срока годности;
- не использовать изделие при нарушении целостности первичной упаковки

Диметилсульфоксид, входящий в состав «Панелей антигенов» обладает раздражающим действием. Избегать попадания компонентов «панелей антигенов» на кожу и слизистые оболочки. В случае попадания промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

Алкалин фосфатаза, входящая в состав «Конъюгата», может вызвать симптомы аллергии или астмы, или затрудненного дыхания. 5-бromo-5-нитро-1,3-диоксан и 2-метил-4-изотиазолин-3 может обладать раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания «Конъюгата» на кожу и слизистые оболочки. В случае попадания промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

«Положительный контроль» и «Конъюгат» содержат стабилизирующие и антимикробные вещества. «Положительный контроль» содержит среду «AIM-V Medium», в которой в качестве противомикробных средств используются стрептомицин сульфат, 50 мкг/мл и гентамицин сульфат, 10 мкг/мл.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

Все реактивы, входящие в состав компонентов изделия в используемых концентрациях, являются нетоксичными. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности набор безопасен и контакт с организмом человека исключен.

При попадании данных растворов на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды. При наступлении вреда при вдыхании и приеме внутрь, возникновении аллергических реакций обратиться за неотложной помощью.

При работе с изделием использовать средства индивидуальной защиты (халат, шапочку или косынку, кожаные тапочки, одноразовые перчатки).

Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочее место дезинфицировать в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 и МУ 287-113

«Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Обеззараживание и/или обезвреживание и утилизацию всех анализируемых образцов, компонентов и отходов набора реагентов, несущих потенциальную биологическую опасность, производить в соответствии с разделом «Утилизация изделия» настоящей инструкции по применению.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Оборудование и материалы, необходимые для работы, но не представленные в наборе

Для работы с изделием необходимо следующее оборудование:

- бокс биологической безопасности класса II;
- инвертированный оптический микроскоп;
- автоматический счетчик клеток;
- микроскоп, оснащенный фотокамерой (разрешение камеры 5,0 Мп), с программным обеспечением, совместимым с операционными системами Windows 7, Windows 8 и Windows 10;
- планшетный промыватель (при наличии);
- инкубатор с влажной камерой, в которой поддерживается температура $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ и содержится $(5 \pm 0,5) \%$ углекислого газа;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- автоматические одноканальные дозаторы пипеточные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 1 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов, погрешность измерения которых должна быть не более 3%;
- автоматический многоканальный дозатор пипеточный с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкостей от 20 до 200 мкл, аттестованный по значению средней дозы и сходимости результатов, погрешность измерения которого должна быть не более 3%;
- камера Горяева для подсчета клеток;
- насос-дозатор пипеточный автоматический для серологических пипеток, позволяющий отбирать объемы жидкостей от 1 до 10 мл;
- центрифуга с бакет–ротором и вкладышами для пробирок вместимостью 15 мл;
- холодильник, поддерживающий температуру в рабочей камере от плюс 2 до плюс 8 $^\circ\text{C}$, в морозильной камере до минус 18 $^\circ\text{C}$.

Для работы с изделием необходимы следующие материалы и реагенты:

- пробирки типа Vacutainer для забора крови с натрия–гепарином, лития–гепарином или с цитратом натрия или аналогичные;
- емкость с крышкой и дезинфицирующим раствором для сбора медицинских отходов;
- таймер/часы;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные;
- стерильные центрифужные пробирки вместимостью 15 мл;
- лабораторная посуда;
- пробирки типа Eppendorf с защелкивающимися крышками объемом 1,5–2,0 мл;
- мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм;
- шприцы одноразовые емкостью 60 мл;
- камеры для автоматического подсчета клеток соответствующие модели счетчика;
- жидкость Тюрка (реагент для подсчета лейкоцитов);

- одноразовые наконечники с фильтрами для автоматических дозаторов пипеточных, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 1 до 1000 мкл;
- стерильные серологические пипетки вместимостью 5 мл и 10 мл;
- фиколл с плотностью 1,077 г/см³ (рег. удостоверение РЗН 2021/15059, рН 5,5 - 7,5, осмолярность 280±20 мосмоль/кг);
- стерильный фосфатно–солевой буферный раствор (ФСБ), рН 7,2-7,4;
- среда «AIM-V Medium» (рег. удостоверение №РЗН 2021/15095);
- реагенты для автоматического подсчета клеток, соответствующие модели счетчика;
- вода, очищенная по ФС.2.2.0020.18;
- 70% раствор этилового спирта.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Идентификацию и прослеживаемость анализируемых образцов (пробы от пациентов) проводить в соответствии с принятой системой менеджмента качества лаборатории.

1. Подготовка анализируемых образцов к анализу

Необходимо обеспечить правильность процедуры извлечения и подсчета мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). *Не использовать для сбора крови пробирки с антикоагулянтом ЭДТА!* Как правило, достаточное для проведения исследования количество МКПК от условно здорового пациента, может быть получено из образца венозной крови при соблюдении следующих правил:

–Дети в возрасте 10 лет и старше и взрослые: одна пробирка на 8 мл или две пробирки по 4 мл.

–Дети в возрасте от 2 до 9 лет: одна пробирка на 4 мл

–Дети в возрасте до 2 лет: одна пробирка на 2 мл.

Образцы крови забирают у пациентов в пробирки для забора крови (Vacutainer), где в качестве антикоагулянта используют натрия-гепарин, лития-гепарин или натрия цитрат, согласно рекомендациям производителя.

Образцы крови до выделения МКПК хранят при температуре от плюс 18 до плюс 25 °С не более 24 ч. *Не охлаждать ниже плюс 18 °С и не замораживать.* Для достижения лучших результатов образцы крови следует центрифугировать не позднее 8 ч после забора крови.

Важно! Все манипуляции с кровью и клетками (за исключением центрифугирования) проводить в асептических условиях в боксе биологической безопасности с использованием стерильных пробирок и наконечников с фильтрами для автоматических пипеток.

Выделение МКПК проводят в градиенте плотности фикола.

В центрифужные пробирки вместимостью 15 мл помещают 3 мл раствора фикола для выделения МКПК и выдерживают их при температуре от плюс 18 до плюс 25°С не менее 10 мин.

Кровь для выделения МКПК перед центрифугированием необходимо развести в 2 раза стерильным фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ). Для этого в стерильную пробирку вместимостью 15 мл помещают 4 мл стерильного ФСБ и 4 мл крови. Перемешивают осторожным переворачиванием закрытой крышкой пробирки 1-3 раза.

В стерильную центрифужную пробирку вместимостью 15 мл, содержащую 3 мл раствора фикола, осторожно накладывают 8 мл разведенной крови. Центрифугируют при 1000 g (2200 об/мин) при температуре от 15 до 25 °С в течение 20 – 25 мин.

Разделение клеток крови после центрифугирования

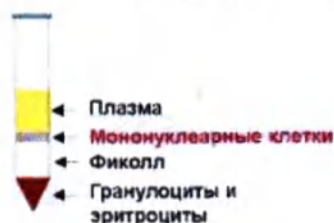


Рисунок 1 - Разделение клеток крови после центрифугирования в градиенте плотности фиколла

Стерильной пипеткой отбирают белый мутный слой МКПК (интерфазное кольцо) и переносят в стерильные конические центрифужные пробирки вместимостью 15 мл. Доводят объем суспензии стерильным ФСБ до 10 мл.

Центрифугируют при 600 g в течение 7 – 10 мин.

Затем удаляют супернатант, ресуспендируют и объединяют осадок МКПК одного донора в 1 мл стерильного ФСБ. Доводят объем стерильным ФСБ до 10 мл и снова центрифугируют при 400 g в течение 7 – 10 мин. Процедуру повторяют еще 1 раз.

Сливают супернатант и ресуспендируют осадок в 0,5 мл среды «AIM-V Medium» – исходная суспензия МКПК.

2. Подсчет клеток и разведение

Для анализа одного образца крови необходимо в каждую лунку внести от 3.0×10^5 до 4.0×10^5 МКПК (оптимальное количество – 3.5×10^5). Использование недостаточного или избыточного количества МКПК может привести к неправильной интерпретации результатов.

Для анализа необходимо приготовить 0,5 мл (500 мкл) рабочей суспензии МКПК в среде «AIM-V Medium» с концентрацией $3,5 \times 10^6$ кл/мл, что соответствует $3,5 \times 10^5$ кл/100 мкл.

Перед отбором клеточной суспензии для анализа, разведения или подсчета клеток клеточную суспензию следует осторожно перемешать. В противном случае клетки могут осесть на дно пробирки, что приведет к неправильному подсчету клеток. Подсчет клеток проводят ручным способом с использованием камеры Горяева или автоматическим с использованием специализированного оборудования в соответствии с инструкциями производителей. Для приготовления рабочей суспензии МКПК с концентрацией $3,5 \times 10^6$ кл/мл, что соответствует $3,5 \times 10^5$ кл/100 мкл, используют следующие формулы:

$$k = \frac{C, \text{ кл/мл}}{3,5 \times 10(6)} \quad (1)$$

$$Z = \frac{500}{k} \quad (2)$$

$$V = 500 - Z \quad (3)$$

где: k – коэффициент разведения исходной суспензии МКПК;

C, кл/мл – концентрация МКПК в исходной суспензии;

$3,5 \times 10^6$ – целевая концентрация МКПК в рабочей суспензии, млн.

Z – объем исходной суспензии МКПК, которую необходимо отобрать из пробирки, мкл;

V – объем среды «AIM-V Medium», мкл.

Необходимо смешать в пробирке подходящей вместимости расчетные объемы (Z) исходной суспензии МКПК и V среды «AIM-V Medium» для приготовления рабочей суспензии МКПК, в мкл.

Например, получено значение содержания лейкоцитов $X = 7,0 \times 10^3/\text{мм}^3$, что равно $7,0 \times 10^6$ кл/мл. Для приготовления 500 мкл конечной клеточной суспензии с концентрацией $3,5 \times 10^6$ клеток/мл вычисляют коэффициент разведения, объем приготовленной клеточной суспензии и объем среды «AIM-V Medium», мкл.

$$k = \frac{7 \cdot 10(6)}{3,5 \times 10(6)} = 2 \quad (1)$$

$$Z = \frac{500}{2} = 250 \quad (2)$$

$$V = 500 \text{ мкл} - 250 \text{ мкл} = 250 \text{ мкл} \quad (3)$$

Соответственно, необходимо отобрать 250 мкл исходной суспензии МКПК и прибавить 250 мкл среды «AIM-V Medium».

Полученный при расчетах объем исходной клеточной суспензии можно округлить до десятков.

Если концентрация МКПК в исходной суспензии ниже $3,0 \times 10^6$ клеток/мл, суспензию центрифугируют, осадок МКПК ресуспендируют в меньшем объеме среды, объем рабочей суспензии МКПК не должен быть менее 400 мкл, поскольку необходимо заполнить этой суспензией 4 лунки, по 100 мкл на одну лунку. Оптимальное число МКПК в каждой лунке должно составлять 350 000.

Примечание: клеточная суспензия с концентрацией от 3×10^6 кл/мл до 4×10^6 кл/мл может быть внесена в лунки без дополнительных манипуляций.

Если концентрация МКПК в исходной суспензии - от $2,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ кл/мл, то следует применить коэффициент перерасчета, как описано в разделе «Интерпретация результатов».

Образцы МКПК хранению не подлежат и используются для постановки теста в день их выделения из крови.

ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ИЗДЕЛИЯ

Все манипуляции с реагентами и анализируемыми образцами проводят в асептических условиях в боксе биологической безопасности во избежание бактериальной контаминации. Среда, буферные растворы и реагенты перед использованием предварительно выдерживают при комнатной температуре (от 15 °C до 25 °C) в течение не менее 20 мин.

Стрипы с иммобилизованными на них мембранах используются однократно. Рамки, подложки и крышки после проведения теста сохраняют для повторного использования.

Процедуру промывки стрипов планшета проводят либо ручным способом, либо при помощи планшетных промывателей (при наличии).

1. Разведение концентрированных пептидных пулов (панелей антигенов 1 и 2), приготовление рабочих растворов панелей антигенов

Размораживают по одной пробирке с концентрированным раствором панелей антигенов 1 и/или 2, полностью переносят содержимое одного флакона в 15 мл пробирку, содержащую 3,5 мл среды «AIM-V Medium», и хорошо перемешивают. Приготовленный рабочий раствор пептидов готов к использованию. Рабочий раствор панели антигенов 1 или 2, приготовленный из одной пробирки, входящей в комплект, предназначен для 60 тестов.

Поскольку весь объем приготовленных растворов не будет использован для проведения анализа одновременно, каждый из полученных рабочих растворов необходимо разделить на аликвоты. Объем аликвоты зависит от количества анализов, которые ставятся одновременно. Рекомендуемые объемы рабочего раствора каждой панели антигенов приведены ниже.

- По 0,12 мл в 30 микропробирках – на 2 анализа каждая.
- По 0,25 мл в 15 микропробирках – на 4 анализа каждая.
- По 0,36 мл в 10 микропробирках* – на 6 анализов каждая.
- По 0,75 мл в 5 микропробирках – на 12 анализов каждая.

Объемы растворов пептидов (концентрированные и рабочие) предусматривают запас на возможные потери при аликвотировании и проведении анализов в размере от 15 до 25 %.

Все аликвоты до проведения анализа необходимо поместить для заморозки и хранения при температуре не выше минус 18 °С. Повторное замораживание не допускается.

Таким образом, готовые к использованию рабочие растворы панелей антигенов 1 и 2 могут быть подвергнуты только одному циклу замораживания-оттаивания. Дополнительных циклов замораживания-оттаивания проводить не рекомендуется.

Хранение: аликвоты панелей антигенов хранят в течение 3 месяцев при температуре не выше минус 18 °С.

2. Приготовление положительного контроля

Рабочий раствор положительного контроля (1х) для постановки теста готовят непосредственно перед анализом. Для этого необходимый для проведения анализа объем концентрированного положительного контроля (100х) разводят в 100 раз средой «AIM-V Medium» и хорошо перемешивают. Объем концентрированного положительного контроля (100х), требуемого для приготовления рабочего раствора, зависит от количества планируемых тестов.

Расчет объема рабочего раствора (1х):

1) необходимый для анализа объем рабочего раствора положительного контроля (1х) рассчитывают следующим образом:

$$V_{1x} = N \times 50 \times 1,2,$$

где: V_{1x} – объем рабочего раствора положительного контроля необходимого для проведения анализа, в мкл;

N – количество лунок, планируемое для анализа.

2) объем 100х положительного контроля, необходимого для приготовления рабочего раствора положительного контроля, рассчитывают следующим образом:

$$V_{100x} = V_{1x} / 100,$$

где: V_{1x} – объем рабочего раствора положительного контроля, готового для применения и необходимого для проведения анализа, в мкл;

V_{100x} – объем 100х положительного контроля, который необходимо развести в 100 раз, чтобы выполнить анализ, в мкл.

3) объем среды «AIM-V Medium», необходимой для приготовления рабочего раствора (1х) положительного контроля, рассчитывают следующим образом:

$$V_{\text{среды}} = V_{1x} - V_{100x},$$

где: $V_{\text{среды}}$ – объем среды «AIM-V Medium», необходимой для приготовления рабочего раствора (1х) положительного контроля, в мкл,

Необходимо смешать в пробирке подходящей вместимости расчетные объемы среды «AIM-V Medium» ($V_{\text{среды}}$, мкл) и 100х положительного контроля (V_{100x} , мкл), входящего в состав набора, для приготовления рабочего раствора (1х) положительного контроля, готового к применению.

Рабочий раствор положительного контроля (1х) до начала использования выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре.

Хранение: разведенный рабочий раствор хранению не подлежит, вскрытая пробирка хранится при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С 6 месяцев с момента ее вскрытия.

3. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Рабочий раствор конъюгата (1х) готовят непосредственно перед использованием из концентрированного раствора конъюгата (200х), входящего в состав набора. Необходимый объем концентрированного (200х) раствора разводят в 200 раз в ФСБ комнатной температуры.

Необходимый объем концентрированного конъюгата (200х) для приготовления рабочего раствора конъюгата (1х) зависит от количества планируемых тестов.

Расчет объема рабочего раствора (1х):

1) Необходимый для анализа объем рабочего раствора конъюгата (1х), готового к применению, рассчитывают следующим образом:

$$V_{1x} = N \times 50 \times 1,2,$$

где: V_{1x} – объем рабочего раствора конъюгата (1х) необходимого для проведения анализа, в мкл.

N – количество лунок, планируемое для анализа.

2) необходимый объем концентрированного (200х) раствора конъюгата, входящего в состав набора, который требуется развести в 200 раз для приготовления рабочего раствора конъюгата (1х), рассчитывают следующим образом:

$$V_{200x} = V_{1x} / 200,$$

где: V_{200x} – объем концентрированного (200х) раствора конъюгата, который необходимо развести в 200 раз, чтобы выполнить анализ, в мкл.

V_{1x} – объем рабочего раствора конъюгата (1х), необходимый для выполнения анализа, в мкл.

3) объем ФСБ, необходимый для приготовления рабочего раствора конъюгата (1х), необходимого для выполнения анализа, рассчитывают по формуле:

$$V_{\text{ФСБ}} = V_{1x} - V_{200x},$$

где: $V_{\text{ФСБ}}$ – объем ФСБ, необходимый для приготовления рабочего раствора конъюгата (1х), в мкл.

Необходимо смешать в пробирке подходящей вместимости расчетные объемы ФСБ ($V_{\text{ФСБ}}$) и концентрированного (200х) раствора конъюгата (V_{200x}), входящего в состав набора.

Хранение: разведенный рабочий раствор хранению не подлежит, вскрытая пробирка хранится при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 6 месяцев с момента ее вскрытия.

4. Приготовление субстрата

Субстрат готов к применению. За 30 мин до начала использования его выдерживают при комнатной температуре. Перед использованием рекомендуется предварительная фильтрация через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Хранение: вскрытый флакон хранится в течение 6 месяцев с момента его вскрытия при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в плотно закрытом флаконе.

5. Подготовка планшетов

Во избежание контаминации перед проведением анализа (не менее чем за 30 минут до внесения анализируемых образцов) следует обработать необходимое количество упаковок с планшетами, рамок и крышек для планшетов (в случае их повторного использования) 70 % раствором этилового спирта и выдержать их в боксе биологической безопасности с включенным ламинарным потоком и ультрафиолетовым (УФ) светом не менее 20 минут. После этого выключить УФ-свет, вскрыть упаковки с планшетами, вынуть планшеты или стрипы из планшетов, не вынимая их из бокса биологической безопасности, и установить стрипы в предварительно обработанные УФ-светом рамки и крышки, в случае их повторного использования. Неиспользованные стрипы в плотно закрытом пакете с вложенным в него влагопоглотителем хранят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 42 суток.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться в строгом соответствии с данной инструкцией по применению.

1. Порядок промывки стрипов

Перед проведением анализа, установленные в планшет стрипы, выдерживают при температуре от плюс 15 до плюс 25 °С не менее 5 мин. Примерно за 10 минут до внесения рабочей суспензии МКПК промывают стрипы 200 мкл стерильного ФСБ на лунку. Удаляют буфер стряхиванием. Повторно вносят в лунки по 200 мкл стерильного ФСБ. Инкубируют при температуре от плюс 15 до плюс 25 °С в течение 10 - 15 мин. По окончании инкубации удаляют буфер стряхиванием.

Дважды промывают стрипы 200 мкл стерильного ФСБ на лунку. Удаляют буфер стряхиванием.

Внимание. После промывки планшет готов к использованию. Не допускается высыхание лунок перед внесением реагентов. Если между последней промывкой ФСБ и внесением образцов должно пройти более 1 минуты, оставьте в лунках ФСБ и удалите его непосредственно перед внесением образцов.

2. Внесение образцов в планшет и инкубация МКПК с антигенами

В «ТиграТест® SARS-CoV-2» на каждый анализируемый образец МКПК используют 4 лунки. Отрицательный и положительный контроль следует применять для каждого образца индивидуально. Рекомендуется вносить образцы в порядке, указанном на рисунке 2.

Для анализа одного образца в каждую лунку планшета вносят по 3.5×10^5 МКПК (допускается внесение от 3.0×10^5 до 4.0×10^5 МКПК в 100 мкл на лунку). Использование недостаточного или избыточного количества клеток может привести к искажению интерпретации результатов.

Одной аликвоты объемом 0,75 мл каждого замороженного готового раствора панели антигенов достаточно для 12 лунок (12 пациентов). Если приготовлены более мелкие аликвоты и количество доноров меньше 12, то перед началом анализа размораживают соответствующее количество аликвот готового раствора панели антигенов и выдерживают их при температуре $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 10 – 15 мин.

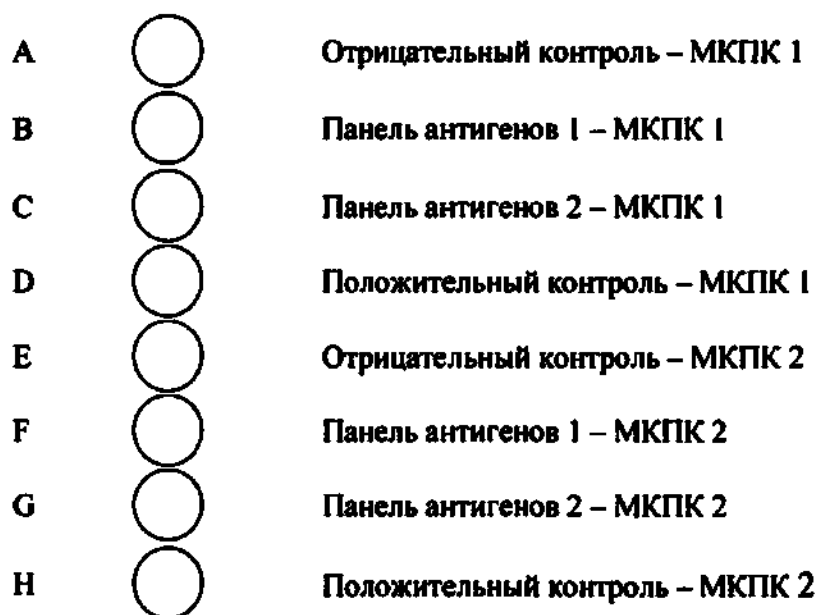


Рисунок 2. Схема постановки анализа для двух анализируемых образцов МКПК.

Для каждого тестируемого пациента вносят в отдельные лунки с помощью отдельных наконечников следующие реагенты:

- отрицательный контроль (50 мкл среды «AIM-V Medium»),
- рабочий раствор панели антигенов 1 (50 мкл),
- рабочий раствор панели антигенов 2 (50 мкл),
- рабочий раствор положительного контроля (50 мкл).

Внесение образцов производят в соответствии с рисунком 2.

Внимание. При внесении реагентов не касаться мембраны наконечником пипетки, т.к. это может привести к повреждению мембраны и искажению результатов.

В каждую из четырех лунок, меняя наконечники, вносят по 100 мкл рабочей суспензии МКПК, приготовленной согласно пункту «Подготовка образцов МКПК». Перед внесением рабочую суспензию МКПК осторожно перемешивают однократным пипетированием.

После внесения МКПК и компонентов реакции для равномерного покрытия дна каждой лунки смесью осторожно постучать по планшету сбоку. Не допускается интенсивное встряхивание планшета, чтобы избежать перемешивания реагентов из разных лунок.

Планшет помещают в инкубатор с влажной камерой на 16 – 24 часа. Условия инкубации – температура $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(5 \pm 0,5)\%$ CO_2 , влажность 95 %.

Внимание. Перемещение планшета во время инкубации не допускается. Несоблюдение рекомендованного времени инкубации может привести к получению недостоверных результатов.

3. Внесение рабочего раствора конъюгата (1х) и проявление пятен

Извлекают планшет из инкубатора. Удаляют клеточную среду в специальный сборник, оснащенный дезинфицирующим средством, стряхиванием.

Промывают лунки 5 раз по 200 мкл ФСБ.

Внимание! Во время процедуры промывки не допускать высыхания лунок.

Вносят по 50 мкл рабочего раствора конъюгата в каждую лунку, не касаясь мембраны, и инкубируют при температуре от плюс 15 до плюс 25 $^\circ\text{C}$ в течение 40 – 60 мин, планшет во время инкубации должен быть закрыт крышкой.

Удаляют рабочий раствор конъюгата стряхиванием.

Промывают лунки 4 раза по 200 мкл раствором ФСБ.

Вносят в лунки по 50 мкл субстрата, не касаясь мембраны, и инкубируют планшет в защищенном от света месте при температуре от плюс 15 до плюс 25 $^\circ\text{C}$ не менее 7 – 10 минут до появления отчетливых пятен в лунке с положительным контролем, но до возникновения выраженного фоновое окрашивания в лунке с отрицательным контролем.

Удаляют раствор субстрата стряхиванием. Для остановки реакции лунки стрипов промывают 5 раз по 200 мкл очищенной водой. Планшет высушивают в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение не менее 1 ч, удалив разборное дно планшета, или не менее 2-3 ч при температуре от плюс 15 до плюс 25 $^\circ\text{C}$ при приоткрытых крышках.

Подсчитывают и документируют количество отчетливо видимых темно-синих пятен на мембране каждой лунки.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты анализа «ТиграТест® SARS-CoV-2» получают путем вычитания количества пятен в лунке с отрицательным контролем из количества пятен в лунках с антигенами SARS-CoV-2 по каждому анализируемому образцу в отдельности.

Недопустимо принятие потребителем по результатам тестирования решений медицинского характера без предварительной консультации с медицинским работником.

Критерии

Результаты анализа подлежат интерпретации только при соблюдении следующих критериев:

В лунках отрицательного контроля пятна, как правило, должны отсутствовать. В отрицательном контроле допускается до 14 пятен, включительно. Отрицательный контроль, в котором наблюдается более 14 пятен, должен рассматриваться как «сомнительный или неопределенный». Подобный результат трудно интерпретировать. Необходимо повторить исследование.

В лунке положительного контроля должно быть не менее 100 пятен, допускается наличие практически слитых пятен (слишком много для подсчета). В редких случаях Т-клетки пациентов не отвечают адекватно на стимуляцию ОКТ-3. Если количество пятен в лунке с положительным контролем менее 100, то результат рассматривается как «сомнительный или неопределенный» и анализ повторяют.

Примечание: если в лунки планшета было внесено от $2,5 \times 10^5$ до $2,9 \times 10^5$ кл/мл МКПК, то следует применить поправочный коэффициент 1,4. Для этого число пятен в каждой лунке надо умножить на 1,4, а затем приступить к оценке результатов теста, как описано выше.

Важно! Количество пятен на каждой панели антигенов не может значительно превышать количество пятен в положительном контроле (в 2 и более раз). Такой результат (например, в случае, когда интенсивность окрашивания на панелях антигенов заметно выше интенсивности окрашивания в положительном контроле) может быть следствием контаминации лунок с панелями антигенов положительным контролем или неравномерного распыления МКПК по лункам. В этом случае также необходимо повторить исследование.

«ТиграТест® SARS-CoV-2» - отрицательный результат

Результат теста следует рассматривать как отрицательный, если количество пятен, как в лунке с панелью антигенов 1, так и в лунке с панелью антигенов 2, за вычетом пятен в отрицательном контроле, не превышает 10.

«ТиграТест® SARS-CoV-2» - отрицательный результат» показывает, что образец, вероятно, не содержит Т-клеток, специфически сенсibilизированных в отношении определенных антигенов коронавируса SARS-CoV-2.

«ТиграТест® SARS-CoV-2» - положительный результат

Результат теста следует рассматривать как положительный, если количество пятен в лунке с панелью антигенов 1 или в лунке с панелью антигенов 2, за вычетом пятен в отрицательном контроле, превышает 12.

«ТиграТест® SARS-CoV-2» - положительный результат» свидетельствует о том, что образец содержит Т-клетки, специфически сенсibilизированные к определенным антигенам коронавируса SARS-CoV-2.

Положительный результат в лунках с антигенами панелей 1 и 2 или в лунках с панелью антигенов 2 может потенциально свидетельствовать о перенесенной инфекции SARS-CoV-2, не обязательно симптоматической, и о сформировавшемся Т-клеточном постинфекционном иммунитете к вирусу SARS-CoV-2.

Положительный результат, полученный на панели антигенов 1, при отрицательном результате на панели антигенов 2, может свидетельствовать о сформировавшемся Т-клеточном иммунитете после иммунизации двумя компонентами вакцины «Гам-Ковид-Вак».

«ТиграТест® SARS-CoV-2» - сомнительный или неопределенный результат

Результат теста следует рассматривать как сомнительный или неопределенный, если количество пятен в лунке с панелью антигенов 1 и в лунке с панелью антигенов 2, за вычетом пятен в отрицательном контроле, составляет 11-12. Сомнительным также считается результат, если хотя бы в одной из лунок с панелью антигенов (1 или 2) детектируется 11-12 пятен, в то время как в другой - количество пятен не превышает 10.

В таком случае рекомендуется провести повторное исследование не ранее, чем через 72 часа.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения входного контроля качества изделия и периодического внутрилабораторного контроля качества исследований лаборатория может использовать образцы МКПК от лиц, с установленным в анамнезе фактом перенесенного заболевания COVID-19 или иммунизации против SARS-CoV-2 двумя компонентами вакцины «Гам-Ковид-Вак». Срок с момента перенесения заболевания и вакцинации не должен превышать 6 месяцев. Используемые для контроля качества образцы должны быть охарактеризованы с помощью референсной методики (проточная цитометрия или анализ на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования следующего поколения (NGS) для обнаружения и идентификации последовательностей гена реаранжированного Т-клеточного рецептора бета (TCR β) из геномной ДНК человека (гДНК)).

По запросу пользователей изготовитель изделия может предоставлять стандартные контрольные образцы. Стандартные контрольные образцы представляют собой криоконсервированные (90% фетальной бычьей сыворотки крови, 10% ДМСО) моноклеарные клетки периферической крови, хранящиеся в жидком азоте (минус 196°C).

При выявлении в ходе проведения входного контроля качества изделия и периодического внутрилабораторного контроля качества исследований снижения аналитических характеристик изделия (получение для 50% исследованных проб результатов, не соответствующих данным анамнеза о перенесенном заболевании или вакцинации) или неадекватной работы контролей реакции (не соответствие установленным критериям) информируют производителя.

ПРИЧИНЫ СНИЖЕНИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ IGRA ELISPOT

Использование компонентов с истекшим сроком годности.

Использование компонентов из наборов реагентов разных серий производства АО «ГЕНЕРИУМ» или смешивание их в процессе приготовления растворов.

Использование компонентов из наборов реагентов других производителей наборов реагентов.

Несоблюдение условий и сроков хранения вскрытых компонентов.

Использование для приготовления растворов грязной посуды.

Несоблюдение условий забора крови и хранения анализируемых образцов, которое может привести к разрушению анализируемого соединения или появлению в анализируемом образце веществ, искажающих результат анализа.

Несоблюдение объемов вносимых растворов и концентрации МКПК.

Неправильное дозирование растворов.

Изменение концентрации раствора за счет испарения жидкости из открытого флакона с компонентом. Во избежание этого необходимо закрывать флакон с компонентом крышкой сразу после отбора из него раствора.

Использование оборудования, не прошедшего регламентированного периодического технического обслуживания и/или эксплуатирующегося не в соответствии с инструкцией по применению на данное оборудование.

Неправильное использование устройства для промывки планшетов, приводящее к бактериальному или грибковому загрязнению. Во избежание этого необходимо промывать устройство для промывки планшетов водой очищенной не менее одного раза в день и дезинфицировать его не менее одного раза в неделю.

Высыхание лунок «Культурального планшета» между отдельными операциями.

Использование одних и тех же емкостей для приготовления или хранения разных компонентов и рабочих растворов.

Использование для работы с компонентами, анализируемыми образцами и контролями реакции грязных наконечников.

Внесение анализируемых образцов одним наконечником.

Использование для дезинфекции посуды, оборудования, материалов и рабочих поверхностей неразрешенных и/или оказывающих влияния на результат анализа дезсредств. Рекомендуется использовать, например, дезсредства, содержащие спирты, четвертичные аммониевые соединения, амины и их комбинации. Нельзя использовать хлорамин и другие хлорсодержащие средства, а также перекись водорода.

Ограничения теста

Т-клетки, специфически реагирующие на антигены коронавируса SARS-CoV-2, могут быть не выявлены при некоторых иммуносупрессиях, длительном применении интерферона (ИФН- α , - β) при лечении таких заболеваний, как рассеянный склероз, гепатит В или С, папилломатоз.

Ложноотрицательный результат может возникнуть, если анализируемый образец содержит количество Т-клеток, специфически отвечающих на антигены SARS-CoV-2 индукцией IFN- γ , ниже предела обнаружения методики. Отрицательный результат также вероятен, если с момента переболевания COVID-19 или вакцинации против COVID-19 прошло свыше 6 месяцев, поскольку тест выявляет эффекторные Т-клетки, а не более долгоживущие Т-клетки памяти.

Вероятность получения ложноположительного результата может быть, если пациент болеет или недавно перенес заболевание, вызванное другими коронавирусами, не относящимися к SARS-CoV-2: HCoV-NKU1, HCoV-NL63, HCoV-OC43 или HCoV-229E.

Вышеперечисленные ограничения учитывают при оценке результатов путем тщательного сбора данных анамнеза и не допущения к исследованию лиц с клиническими признаками инфекционных заболеваний.

УТИЛИЗАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

В процессе использования и утилизации изделия с истекшим сроком годности токсичные отходы не образуются, образующиеся отходы утилизируются как отходы класса Б.

Обращение (сбор, временное хранение, обеззараживание и/или обезвреживание и транспортирование) отходов, образующихся в процессе использования и утилизации наборов реагентов с истекшим сроком годности, проводить согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Для обеззараживания и/или обезвреживания отходов в соответствии с МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» использовать зарегистрированные в РФ дезсредства и оборудование в соответствии с инструкциями по их применению.

Отходы утилизировать через организации, имеющие лицензию на этот вид деятельности.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Срок годности набора реагентов «ТиграТест® SARS-CoV-2» - 18 месяцев (стабильность подтверждена на срок 9 мес.). Исследование стабильности набора реагентов в реальном времени продолжается.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Компоненты Набора 1 должны храниться и транспортироваться в защищенном от света месте, в условиях «холодовой цепи» при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Не замораживать.

Компоненты Набора 2 должны храниться и транспортироваться в защищенном от света месте, в условиях «холодовой цепи» при температуре от минус 80 °С до минус 18 °С.

Рабочие растворы пептидов, приготовленные из Набора 2, хранят при температуре не выше минус 18 °С в течение 3 месяцев.

Разведенные рабочие растворы положительного контроля и конъюгата хранению не подлежат.

Вскрытые пробирки положительного контроля, конъюгата, флакона с субстратом хранят в плотно закупоренном состоянии при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 6 месяцев после их вскрытия.

Неиспользованные стрипы в плотно закрывающихся пакетах с вложенным в него влагопоглотителем хранят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 6 месяцев после их вскрытия.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых наборов реагентов требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество набора реагентов гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки набора реагентов, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил применения, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо факторов непреодолимой силы.

Производитель обязуется за свой счет заменить набор реагентов, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления набора реагентов производителем.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, обращаться в АО «ГЕНЕРИУМ» 601125, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Заводская, стр. 273, e-mail: QAMD@generium.ru. Рекламации принимаются в письменном виде на бумажном носителе (или в виде скан-копии, направленной на электронную почту организации), заверенном подписью уполномоченного лица и печатью организации.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению изделия, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

АО «ГЕНЕРИУМ» по адресу: 601125, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Заводская, стр. 273.

<https://www.generium.ru>

Тел.: +7 (49243)72-5-20, 72-5-14.

Символы, применяемые для маркировки набора реагентов

Символ	Наименование символа	Символ	Наименование символа
Вторичная упаковка. Пачка			

	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Не использовать при повреждении упаковки		Не допускать воздействие солнечного света
Транспортная упаковка.			
	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Хрупкое, обращаться осторожно
	Беречь от влаги		Верх

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

1. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
2. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. Минздравом России 30.12.1998 N МУ-287-113).
3. Приказ Минздрава России №4н от 06.06.2012 г. «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий».
4. ГОСТ Р 52905-2007 (ISO 15190:2003) Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Требования безопасности.
5. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), Версия 11 от 07.05.2021.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Потеряев ДА, Хамитов РА, Ефимов ГА, Шустер АМ. Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противоэпидемических мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19. БИОпрепараты Профилактика, диагностика, лечение. 2020; 20(3):146–58.
2. Channappanavar R, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. Immunol Res. 2014; 59(1-3):118–28. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8534-z>
3. Zuo J, Dowell AC, Pearce H, Verma K, Long HM, Begum J, et al. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. Nat Immunol. 2021; 22(5):620–6. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00902-8>
4. Wyllie D, Jones HE, Mulchandani R, Trickey A, Taylor-Phillips S, Brooks T, et al. SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19: a prospective cohort study in keyworkers. medRxiv. 2020.11.02.20222778. <https://doi.org/10.1101/2020.11.02.20222778>
5. Mallone R, Mannering S, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Cilio CM, Wong FS, et al. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. Clin Exp Immunol. 2011; 163(1): 33–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04272.x>
6. Shomuradova AS, Vagida MS, Sheetikov SA, Zornikova KV, Kiryukhin D, Titov A, et al. SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T cell receptors. Immunity. 2020; 53(6):1245–57.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.004>

7. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020;584(7821):457–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
8. Mateus J, Grifoni A, Tarke A, Sidney J, Ramirez SI, Dan JM, et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science*. 2020; 370(6512):89–94. <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>
9. Reynolds CJ, Swadling L, Gibbons JM, Pade C, Jensen MP, Diniz MO, et al. Discordant neutralizing antibody and T cell responses in asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infection. *Sci Immunol*. 2020; 5(54):eabf3698. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf3698>
10. Nolan S, Vignali M, Klinger M, Dines JN, Kaplan IM, Svejnoha E, Craft T, Boland K, Pesesky M, Gittelman RM. A large-scale database of T-cell receptor beta (TCR β) sequences and binding associations from natural and synthetic exposure to SARS-CoV-2. 2020. Preprint. *Res Sq*. 2020;rs.3.rs-51964. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-51964/v1>
11. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatullin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020; 396(10255): 887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
12. Todryk SM, Pathan AA, Keating S, Porter DW, Berthoud T, Thompson F, Klenerman P, Hill AV. The relationship between human effector and memory T cells measured by ex vivo and cultured ELISPOT following recent and distal priming. *Immunology*. 2009;128(1):83–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03073.x>
13. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, Grifoni A, Ramirez SI, Haupt S, Frazier A, Nakao C, Rayaprolu V, Rawlings SA, Peters B, Krammer F, Simon V, Saphire EO, Smith DM, Weiskopf D, Sette A, Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021; 371(6529):cabf4063. <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
14. Bauer T, Jilg W. Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. *Vaccine*. 2006; 24(5):572–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.058>
15. Ferretti AP, Kula T, Wang Y, Nguyen DMV, Weinheimer A, Dunlap GS, et al. Unbiased screens show CD8⁺ T cells of COVID-19 patients recognize shared epitopes in SARS-CoV-2 that largely reside outside the spike protein. *Immunity*. 2020; 53(5):1095–107.e3. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.006>

Версия _____

20 пс000

