

**ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВАЛИДАЦИЯ «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**

Лягоскин И.В.,

Каргополова П.Е.,

Объедков Д.А.,

Егорова И.Ю.,

Шукуров Р.Р.

Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пгт.
Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125,
Российская Федерация

**INTRA-LABORATORY VALIDATED "TIGRATEST® SARS-CoV-2" TEST
ASSESSING RELEASE OF INTERFERON GAMMA IN VITRO TO
IDENTIFY PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTES SPECIFICALLY
RESPONDING AGAINST SARS-CoV-2 VIRUS ANTIGENS"**

Lyagoskin I.V.

Kargopolova P.E.

Obyedkov D.A.

Egorova I.Yu.

Shukurov R.R.

JSC "GENERIUM", st. Vladimirskaya, 14, pos. Volginsky, Petushinsky district,
Vladimir region, 601125, Russian Federation

Резюме. SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), он же 2019-nCoV (2019-Novel Coronavirus) – вид коронавируса, из рода бетакоронавирусов (Betacoronavirus), обнаруженный в конце 2019 года у больных с пневмонией в Китае. «Коронавирусная инфекция COVID-19» (COrona Virus Disease 2019), - «COVID-19», вызванная коронавирусом 2019 (COVID-19) распространилось по миру очень быстрыми темпами и унесла уже более 5,2 миллионов жизней во всем мире. Ограниченный успех в разработке новых лекарственных средств, а также использование существующих лекарственных препаратов для лечения COVID-19 привел к тому, что долгое время основными мерами профилактики были тестирование и изоляция заболевших, в настоящий момент, ситуацию в лучшую сторону меняет вакцинация.

Проведение мониторинга формирования гуморального и Т-клеточного популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии COVID-19 является необходимым элементом эпидемиологического надзора. Для оценки гуморального иммунитета широко применяют методы на основе ИФА, а для оценки клеточного иммунитета используют различные тест-системы, в том числе и на основе ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot). Анализ ELISPOT — это высокочувствительный и специфичный метод определения количества отдельных Т-клеток, секретирующих цитокин, после стимуляции определенным антигеном. «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 производства АО «ГЕНЕРИУМ», изготовлен на платформе ELISPOT.

В настоящем исследовании описывается процедура лабораторной валидации тест-системы с определением следующих показателей: специфичность пары антител, влияние интерферирующих веществ, чувствительность и специфичность, прецизионность, стабильность образцов крови до извлечения из нее целевых клеток.

Разработанная тест-система показала высокую диагностическую чувствительность и специфичность. Специфичность «ТиграТест® SARS-CoV-2» составила 100%, чувствительность для иммунизированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V) - 91,67%, а чувствительность при оценке переболевших добровольцев 95,45%.

При этом вариабельность результатов как внутри, так и межсерийного сравнения теста не превышала 25%, а хранение крови в условиях (18 – 25) °C в течение 24 часов после отбора крови от пациента и извлечения из нее целевых клеток не оказывало влияние на результаты теста.

Ключевые слова: Валидация, «ТИГРАТЕСТ® SARS-CoV-2», COVID-19, Т-клеточный иммунитет, ELISPOT, диагностическая чувствительность, специфичность, вариабельность

Abstract. SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), also known as 2019-nCoV (2019-Novel Coronavirus) is a strain of coronavirus from the genus Betacoronavirus, discovered in China at the end of 2019 in patients with pneumonia. "Coronavirus infection COVID-19" (COrona VIRus Disease 2019), - "COVID-19" caused by coronavirus 2019 (COVID-19) has spread around the world at a very fast pace, with death toll exceeding more than 5.2 million people worldwide. Limited success in developing new drugs as well as use of existing drugs for the treatment of COVID-19 resulted in situation when the main prevention measures for a long time were based on testing and isolation of sick subjects, which started to reverse due to vaccination. Monitoring the formation of humoral and T-cell population immunity against the SARS-CoV-2 virus during the COVID-19 pandemic is a necessary element for epidemiological surveillance. ELISA-based methods are widely used to assess humoral immunity, and various test systems including ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot) are used to analyze cellular immunity. The ELISPOT assay is a highly sensitive and specific method for

quantifying individual cytokine-secreting T cells after being stimulated with a specific antigen. "TigraTest® SARS-CoV-2" Test assessing release of interferon gamma in vitro to detect peripheral blood T-lymphocytes that specifically respond to the SARS-COV-2 virus antigens manufactured by GENERIUM JSC, is created on the ELISPOT platform. This study describes the procedure for laboratory validation of this test system to analyze the following parameters: specificity of antibody pair, effect of interfering substances, sensitivity and specificity, precision, stability of blood samples till isolation of target cells.

The developed test system showed high diagnostic sensitivity and specificity. The specificity of TigraTest® SARS-CoV-2 was 100%, the sensitivity for subjects immunized with the Gam-COVID-Vac vaccine (Sputnik V) was 91.67%, and the sensitivity in convalescent COVID-19 patients was 95.45%.

At the same time, the data variability both during within and between series comparison did not exceed 25%, whereas 24-hour storage of peripheral blood samples at (18–25) °C after blood collection followed by isolation of target cells did not affect the test results.

Key words: Validation, «TIGRATEST® SARS-CoV-2», COVID-19, T-cell immunity, ELISPOT, diagnostic sensitivity, specificity, variability

1 Введение

2 SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), он же 2019-
3 nCoV (2019-Novel Coronavirus) – вид коронавируса, из рода
4 бетакоронавирусов (Betacoronavirus), обнаруженный в конце 2019 года у
5 больных с пневмонией в Китае.

6 11 февраля 2020 года Всемирная Организация Здравоохранения
7 присвоила официальное название для болезни, которую вызывает SARS-CoV-
8 2 - «Коронавирусная инфекция COVID-19» (COrona VIRus Disease 2019), -
9 «COVID-19» [1]. Заболевание, вызванное SARS-CoV-2 (COVID-19)
10 распространилось по миру очень быстрыми темпами и унесло уже более 5,2
11 миллиона жизней во всем мире [данные [https://origin-](https://origin-coronavirus.jhu.edu/map.html)
12 [coronavirus.jhu.edu/map.html](https://origin-coronavirus.jhu.edu/map.html) на 06.12.2021].

13 Считается, что инкубационный период COVID-19 составляет до 14 дней,
14 в которые возможна передача инфекции. SARS-CoV-2 контагиозен и имеет
15 более высокую степень передачи (R_0 , 1,4–5,5), чем SARS-CoV (R_0 , 2–5) и
16 MERS-CoV (R_0 , <1), хотя уровень смертности для него ниже - 3,4 % по
17 сравнению с 10% для SARS-CoV и 34% для MERS-CoV [2]. При этом
18 большинство не проявляющих симптомов носителей не имеют достаточный
19 уровень нейтрализующих антител [3]. Пандемия COVID-19 ознаменовалась
20 жесткими карантинными мерами – вплоть до закрытия государственных
21 границ. Но наиболее действенным методом для ограничения распространения
22 инфекции, как и для большинства других инфекционных болезней, является
23 вакцинация.

24 Определение наличия Т-клеточного иммунного ответа к вирусу SARS-
25 CoV-2 актуально для определения общего количества людей, перенесших
26 данное заболевание, в том числе без ярко выраженных симптомов, а также для
27 оценки эффективности вакцинации. При этом, среди методов оценки Т-
28 клеточного иммунного ответа наиболее перспективным является тест
29 ELISPOT на секрецию интерферона гамма [4,5].

Анализ ELISPOT — это метод определения количества отдельных Т-клеток, секретирующих цитокин, после стимуляции определенным антигеном или пептидом, проявляющихся в виде пятен на нитроцеллюлозной мембране [6,7,8]. Как правило, количество пятен увеличивается пропорционально силе иммунного ответа. Важным преимуществом метода ELISPOT является то, что он является прямым измерением иммунного ответа, опосредованного клетками Th1.

В ELISPOT пятна образуются с помощью колориметрической реакции, в которой растворимый субстрат расщепляется, оставляя нерастворимый осадок на месте реакции. Это пятно представляет собой след исходной клетки, продуцирующей цитокин. Количество пятен является прямым измерением частоты цитокин-продуцирующих Т-клеток. Конечная точка анализа (спот — точка, пятно) представляет собой результат серии комплекса явлений, которые можно разбить на три этапа: (а) условия культивирования клеток, приводящие к продукции IFN γ ; (б) ферментно-опосредованная система обнаружения захвата антителами; и (в) подсчет клеток [6].

В настоящем исследовании описывается процедура лабораторной валидации тест-системы «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 с определением следующих показателей: специфичность пары антител, влияние интерферирующих веществ, чувствительность и специфичность, прецизионность, стабильность образцов крови до извлечения из нее целевых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Добровольцы. Образцы крови

Все добровольцы, участвующие в исследовании, заполняли опросный лист с указанием основных характеристик, симптомов заболевания, наличия или отсутствия подтверждения лабораторными методами инфекции,

вызванной SARS-CoV-2, наличия или отсутствия подтверждения диагноза пневмонии компьютерной томографией или дату иммунизации и использованный вакцинный препарат. Условно здоровые доноры также указывали наличие или отсутствие близких, или продолжительных контактов с больными COVID-19. Образцы крови отбирали венепункцией в условиях процедурного кабинета АО «ГЕНЕРИУМ» в период с апреля по июль 2021 г. в пгт. Вольгинский Владимирской области (Россия). От каждого донора было получено добровольное информированное согласие на отбор образцов крови и включение результатов их анализа в данное исследование. Проведение исследования было одобрено локальным независимым этическим комитетом при АО «ГЕНЕРИУМ» (протокол № 01 от 11.11.2020). Всего были взяты образцы крови у 98 добровольцев (42 интактных (не болевшие и не контактировавшие с инфицированными COVID-19, 12 иммунизированных «Гам-Ковид-Вак» добровольцев и 44 переболевших COVID-19) добровольцев. Доноров распределяли по группам. Отбор крови у иммунизированных вакциной «Гам-Ковид-Вак» (Спутник V) происходил в интервале 3–6 нед. после двукратной вакцинации. У переболевших COVID-19 кровь отбирали в интервале от 1 до 10 мес. после исчезновения симптомов заболевания или наличия отрицательного теста ПЦР.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови и
приготовление рабочих суспензий

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла (ρ 1,077 г/см³) (НПП "ПанЭко", Россия) не позднее чем через 1 ч после забора крови. При исследовании стабильности образцов крови выделение МКПК проводили через 12, 24, 48 и 72 часа после забора крови. Подсчёт клеток, проводили с использованием счетчика клеток – NucleoCounter® System (Chemometec, Дания).

Для приготовления рабочей суспензии МКПК кл/мл использовали следующие формулы:

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

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

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

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

V – объём среды AIM-V® + AlbuMAX®, мкл.

В каждую лунку планшета вносили от $3,0 \times 10^5$ до $4,0 \times 10^5$ МКПК (оптимальное количество – $3,5 \times 10^5$) в среде AIM-V® + AlbuMAX® (GIBCO™ (Инвитроген, США) в объеме 100 мкл.

Для анализа ELISPOT использовали только свежевыделенные МКПК.

Антигены

В качестве антигенов для стимуляции специфических Т-клеток в ТиграТест® SARS-CoV-2 использовали пептиды, соответствующие основным белковым антигенам коронавируса SARS-CoV-2: S-белок (шип) (Панель антигена 1 – ПА1), нуклеокапсидный белок (N), мембранный белок (M) и 2 вспомогательных белка ORF3a и ORF7a (Панель антигенов 2 – ПА2).

IFN- γ ELISPOT.

МКПК каждого добровольца инкубировали в течение 16–24 ч с пептидными антигенами (концентрация каждого пептида в пуле составляла 2 мкг/мл) обеих панелей антигенов. Индивидуальный тест для каждого донора состоял из 4 лунок: - отрицательный контроль, без стимуляции МКПК; - стимуляция пептидами S-белка (ПА1); - стимуляция пептидами белков N, M, ORF3a и ORF7a (ПА2); - положительный контроль (стимуляция всех

жизнеспособных и функционально активных Т-клеток с помощью антитела к CD3, клон ОКТ-3).

После инкубации и отмывки пятна проявляли с помощью антитела к IFN γ , конъюгированного со щелочной фосфатазой (производство АО «ГЕНЕРИУМ», клон 1G9 (Конъюгат)) и хромогенного субстрата BCIP/NBT (5-бromo-4-хлоро-3-индолил-фосфат/нитросиний тетразолия хлорид, Sigma-Aldrich, США).

Подсчет пятен производили как визуально под стереомикроскопом, так и с помощью специализированного ELISPOT ридера AID Classic ELR08 (AID GmbH, Германия). Величину Т-клеточного ответа выражали как количество подсчитанных пятен в лунках с ПА1 или ПА2 за вычетом количества пятен в отрицательном контроле (без стимуляции антигенами).

Критерием пригодности теста были результаты положительного (K+) и отрицательного (K-) контролей. В положительном контроле должно было быть не менее 100 пятен, в отрицательном контроле — не более 14 пятен. Наличие более 14 пятен могло свидетельствовать об остром воспалительном процессе или о случайном загрязнении образца клеток эндотоксинами. В таком случае донору предлагали повторно сдать кровь через 1–2 недели. У категории переболевших в лунках с панелями антигенов 1 и 2 или в лунке с панелью антигенов 2 должны выявляться четко различимые локальные пятна. У категории вакцинированных должны выявляться четко различимые локальные пятна в лунках с панелью антигенов 1. Коэффициент вариации (RSD%) не должен превышать 25% [9].

В исследовании были использованы следующие серии теста:

Таблица 1. Экспериментальные серии «ТиграТест® SARS-CoV-2» (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия)

Оценка специфичности антител по отношению к про- и противовоспалительным цитокинам

Для оценки специфичности антител, сорбированных на мембране, иммобилизованной в лунках планшета и выявляющих интерферон-гамма (IFN γ), использовали следующие антигены: IL-2 (Thermo Fisher Scientific Inc, кат. PHC0023), IL-6 (206-IL-010, R&D Systems, США), IFN-1 β (Лекарственный препарат Инфибета® (IFN-1 β) (АО «ГЕНЕРИУМ», серия ВАО4120), TNF α (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, кат. ргФНО-альфа).

Лиюфилизат каждого из антигенов растворяли в необходимом количестве среды AIM V® + AlbuMAX® до достижения концентрации 10 мкг/мл, и хорошо перемешивали. Приготовленные рабочие растворы антигенов по 100 мкл в трех повторностях вносили в лунки планшета и проводили испытание согласно инструкции по применению теста. Постановка теста не предусматривала внесение в лунки МКПК.

Оценка влияния интерферирующих веществ

Изучение влияния интерферирующих веществ проводили с использованием образцов крови от 8 доноров, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» или переболевших COVID-19.

Шесть пробирок крови по 8-9 мл от каждого добровольца разделяли на две группы: по 4 донора использовали для изучения влияния дексаметазона (раствор для инъекций 4 мг/мл, серия A65691, KRKA, Словения) и интерферона-бета-1b (лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения Инфибета® (Infibeta®), АО «ГЕНЕРИУМ») на специфичность теста.

В первые три пробирки доноров первой группы добавляли раствор дексаметазона из расчета 0,0033 мг/мл, в другие три пробирки – фосфатно-буферный раствор (рН 7,2) в объеме, соответствующем объемной дозе дексаметазона.

В первые три пробирки доноров второй группы добавляли раствор интерферона-бета-1b из расчета 0,04 мкг/мл, в другие три пробирки –

171 фосфатно-буферный раствор в объеме, соответствующем объемной дозе
172 интерферона-бета-1b.

173 Образцы тщательно перемешивали и инкубировали в течение 1 часа при
174 комнатной температуре. Далее проводили выделение МКПК, подсчет клеток
175 и приготовление рабочих суспензий согласно инструкции к тесту. Если %RSD
176 между результатами теста с использованием МКПК без добавления и МКПК
177 с добавлением интерферента не превышал 25%, то считали то интерферент не
178 оказывает влияние на специфичность теста.

179 Оценка чувствительности и специфичности

180 Анализ результатов тестирования образцов МКПК, полученных от
181 добровольцев с достоверно установленным статусом, проводили используя
182 формулы указанные в разделе Статистический анализ. Диагностическая
183 специфичность теста была оценена на МКПК от 42 интактных (не болевших и
184 не контактировавших с инфицированными COVID-19). Диагностическая
185 чувствительность теста в отношении иммунизированных «Гам-КОВИД-Вак»
186 лиц была оценена на МКПК от 12 добровольцев, прошедших вакцинацию.
187 Диагностическая чувствительность теста в отношении переболевших COVID-
188 19 лиц была оценена на МКПК от 44 добровольцев с верифицированным
189 лабораторными методами (ПЦР, ИФА) диагнозом.

190 Оценка стабильности образцов крови

191 Для испытания использовали образцы, полученные от добровольцев,
192 иммунизированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V). Кровь
193 отбирали в пробирки для забора крови (BD Vacutainer®, США), где в качестве
194 антикоагулянта использовался натрий гепарин. Образцы крови до выделения
195 МКПК хранили при температуре от 18 до 25 °C в течение 72 часов. Выделение
196 МКПК и анализ высвобождения IFN γ проводили сразу после отбора крови (не
197 позднее 1 часа), а затем через 12, 24, 48 и 72 ч.

198 Оценка прецизионности

Прецизионность характеризовали коэффициентом вариации. Оценивали следующие параметры:

1) *Вариабельность внутри одного планшета в течение одного аналитического цикла (АЦ).* Изучение параметра проводили с использованием МКПК, выделенных из крови добровольца, переболевшего с верифицированным диагнозом COVID-19, подтверждённым ПЦР и наличием специфических антител к антигенам SARS-CoV-2.

Клетки вносили в лунки планшета в хаотичном порядке, следуя правилу тетраплета для одной повторности (К-, ПА1, ПА2, К+). Учет результатов проводили при соблюдении критериев пригодности теста, а также вычисления коэффициента вариации для лунок с панелями антигенов 1 и 2 внутри одного планшета в течении одного аналитического цикла в одном и том же образце.

2) *Вариабельность между операторами внутри одного лота (партии) теста.*

Изучение параметра проводили с использованием МКПК, выделенных из крови добровольцев, переболевших с верифицированным диагнозом COVID-19, подтверждённым ПЦР или наличием специфических антител и добровольцев, иммунизированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V). Всего в исследовании использовали МКПК от 8 доноров. Оценку проводили с применением одной серии теста «ТиграТест® SARS-CoV-2» и участием двух операторов. Учет результатов проводили при соблюдении критериев пригодности теста, а также вычисления коэффициента вариации для лунок с панелями антигенов 1 и 2 в одних и тех же образцах внутри одного аналитического цикла между операторами.

3) *Вариабельность между лотами (партиями) теста.*

При оценке параметра использовали 8 доноров, со статусом и критериями оценки описанных в пункте (2) *Вариабельность между операторами внутри одного лота (партии) теста.* Исследование проводилось в одной лаборатории с использованием трёх серий теста «ТиграТест® SARS-CoV-2»

(№120, №220/320 и №111-20/220) и участием одного оператора. Учет результатов проводили при соблюдении критериев пригодности теста, а также вычисления коэффициента вариации для лунок с панелями антигенов 1 и 2 в одних и тех же образцах между лотами (партиями) теста для переболевших и вакцинированных добровольцев.

Статистический анализ

При оценке параметров валидации рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Статистическая обработка результатов, выполнялась при помощи пакета MS Excel 2019, с использованием следующих формул [10]:

$$\text{Среднее арифметическое (mean)} \quad \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

$$\text{Стандартное (среднеквадратическое) отклонение} \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$\text{Коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение)} \quad RSD = \frac{S}{\bar{X}_{cp}} \times 100\%$$

Диагностическая чувствительность =

$$\frac{\text{Истинно положительные}}{\text{Истинно положительные} + \text{ложно отрицательные (не выявленные тестом)}} \times 100\%$$

$$\text{Диагностическая специфичность} = \frac{\text{Истинно отрицательные}}{\text{Истинно отрицательные} + \text{ложно положительные}} \times 100\%$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оценка специфичности по отношению к про- и противовоспалительным цитокинам

При оценке Т-клеточного ответа важным показателем специфичности является способность тест-системы выявлять специфичные клетки, отвечающие секрецией IFN γ на стимуляцию МКПК антигенами SARS-CoV-2. Подобранная пара антител к IFN γ должна специфично и с высокой чувствительностью выявлять именно искомый цитокин. Экспериментально доказано, что антитела, иммобилизованные на мембранах в лунках культурального планшета «ТиграТест® SARS-CoV-2», взаимодействуют

только с IFN γ и не имеют перекрестной реакции с другими цитокинами (IL-2, IL-6, IFN-1 β , TNF α), продуцируемые Т-клетками (графические данные представлены на Рис.1).

Рисунок 1. Оценка специфичности пары антител, используемых в «ТиграТест® SARS-CoV-2».

Оценка влияния интерферирующих веществ

В данном исследовании оценивалось влияние потенциально интерферирующих веществ на специфичность «ТиграТест® SARS-CoV-2». К интерферирующим веществам относятся как эндогенные, так и экзогенные вещества, которые в норме или при различных патологиях могут присутствовать в крови пациента и, следовательно, повлиять на результаты исследования [11]. Потенциальное влияние интерферирующих веществ на результаты «ТиграТест® SARS-CoV-2» должно сводиться к минимуму ввиду процесса отмывки фракции МКПК при подготовке клеток перед внесением в лунки. Однако, чтобы исключить вероятность влияния интерферента были проведены исследования с применением Дексаметазона и интерферона-бета-1b. При этом, оба препарата вносились в образцы заведомо с избытком, с концентрацией, которая в организме человека не встречается.

Отобранные пробы МКПК, как с добавлением потенциального интерферента, так и без него, подвергались анализу с целью прямого сравнения конкретных проб. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты постановок венозной (периферической) крови от категорий доноров, вакцинированных против новой короновирусной инфекции вакцинным препаратом «Гам-КОВИД-Вак» и переболевших COVID-19 с добавлением и без добавления дексаметазона и интерферона бета-1b для оценки влияния интерферирующих веществ

Содержание дексаметазона в количестве 0,0033 мг/мл в клинических образцах не влияло на эффективность теста. Коэффициенты вариации результатов проведенных испытаний в лунках с антигенами панелей 1 или 2,

содержащих МКПК, выделенные из образцов крови с внесенным дексаметазоном, и пятен в лунках с антигенами панелей 1 или 2, содержащих МКПК, выделенные из образцов крови без дексаметазона, не превысили 25 %. Содержание интерферона бета-1b в количестве 0,04 мкг/мл в клинических образцах оказывало влияние на эффективность теста в зависимости от донора. Коэффициенты вариации результатов проведенных испытаний в лунках с антигенами панелей 1 или 2, содержащих МКПК, выделенные из образцов крови с внесенным интерфероном бета-1b, и пятен в лунках с антигенами панелей 1 или 2, содержащих МКПК, выделенные из образцов крови без интерферона бета-1b для трех из четырех доноров, превысили 25 %.

Оценка чувствительности и специфичности

Проведенные исследования показали, что в лунках с негативным контролем (К-) у пациентов любой из испытуемых категорий, количество пятен не превышало 14, в среднем наблюдалось 3 пятна. В лунках с позитивным контролем (К+) количество пятен всегда превышало 100.

На панели МКПК от условно здоровых лиц (n=42) специфичность «ТиграТест® SARS-CoV-2» составила 100%, не было выявлено ни одного ложноположительного результата.

У добровольцев, иммунизированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в 91,67% случаев подтверждался статус, среднее количество пятен (n=12) в лунке с панелью антигенов 1 составило 50, а с панелью антигенов 2 – 8 пятен.

У добровольцев, переболевших с верифицированным диагнозом COVID-19, подтверждённым ПЦР или наличием специфических антител, в 95,45% случаев также подтверждался статус. У шести добровольцев пятна (12 пятен, за вычетом пятен в отрицательном контроле) регистрировались только в лунке с панелью антигенов 2. Количество пятен в лунке с панелью антигенов 1 не превышало 10 (за вычетом пятен в отрицательном контроле).

В одном случае у добровольца с верифицированным диагнозом COVID-19, регистрировалось количество пятен, превышающее 12 (за вычетом пятен в отрицательном контроле), только в лунке с панелью антигенов 1.

В другом случае, у добровольца с верифицированным диагнозом COVID-19, регистрировалось количество пятен менее 10 (за вычетом пятен в отрицательном контроле), только в лунке с панелью антигенов 1, а в лунке с панелью антигенов 2 – 12 пятен и результат оценивался как сомнительный.

В сорока двух случаях у добровольцев с верифицированным диагнозом COVID-19 регистрировалось количество пятен более 12 (за вычетом пятен в отрицательном контроле) в лунках с обоими панелями антигенов. Для этой категории добровольцев среднее количество пятен в лунке с панелью антигенов 1 составило 39, а в лунке с панелью антигенов 2 – 72 пятна.

Стабильность биологических образцов

Важным показателем любой тест-системы является получение достоверных результатов при оценке образцов, подвергшихся влиянию внешних условий, особенно это касается температуры хранения. Анализ данных показал, что образцы крови стабильны в течение 24 часов при комнатной температуре 18-25 °С. При этом с течением времени наблюдается увеличение количества неспецифической секреции IFN γ в контрольной лунке (К-) в виде диффузных с не очерченными границами пятен. Если в интервале 0-24 ч наблюдается варьирование количества пятен в лунках в пределах $\pm 10\%$, то уже спустя 48 часов количество четко очерченных пятен в лунках с панелями антигенов 1 и 2 снижается на 90 %, а через 72 ч в соответствующих лунках пятна не обнаруживаются. Графические результаты представлены на рисунке 2.

Рисунок 2 Пример результатов оценки уровня выброса IFN γ у пациента, иммунизированного вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V) после стимуляции МКПК панелью антигенов 1 в различных временных точках при хранении крови в пробирках *BD Vacutainer®*.

Прецизионность

Вариабельность внутри одного планшета в течение одного аналитического цикла (АЦ).

Коэффициент вариации результатов измерения количества пятен внутри одного планшета в течении одного аналитического цикла в одном и том же образце с использованием «ТиграТест® SARS-CoV-2» в лунках с панелями антигенов 1 и 2 не превышал 25%.

Вариабельность между операторами внутри одного лота (партии) теста.

Результаты оценки вариабельности между операторами представлены в таблице 3.

Таблица 3. Статистическая обработка данных при оценке вариабельности между операторами внутри одного планшета и одного лота (партии) «ТиграТест® SARS-CoV-2» для переболевших COVID-19 и добровольцев, иммунизированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V)

Коэффициенты вариации между лотами (партиями) теста для переболевших в лунках с панелями антигенов №1 и №2 в одном и том же образце не превышали 25 %.

Вариабельность между лотами (партиями) теста.

Таблица 4. Статистическая обработка данных при оценке вариабельности между сериями «ТиграТест® SARS-CoV-2» одним оператором для переболевших COVID-19 и добровольцев, иммунизированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V).

Коэффициенты вариации между лотами (партиями) теста для переболевших и вакцинированных в лунках с панелями антигенов 1 и 2 в одном и том же образце не превышали 25 %.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ELISPOT — это высокочувствительный, относительно простой в выполнении и воспроизводимый метод идентификации и количественного

определения даже очень редких антиген-специфических Т-клеток [12-14], отвечающих за формирование клеточного иммунитета, в том числе и при COVID-19. При этом до настоящего времени все еще остаются нерешенными вопросы относительно длительности Т-клеточного иммунитета и его выраженности после перенесенного COVID-19 или иммунизации вакцинными препаратами.

На показатели специфичности и чувствительности теста, являющимися важнейшими аналитическими характеристиками методики, отражающими ее возможности в получении объективных и достоверных результатов, существенное влияние может оказывать качество и стабильность биологических образцов.

В литературе встречается достаточно данных, свидетельствующих о стабильности образцов крови при хранении в пробирках с гепарином лития для проведения биохимических исследований [15], кроме того, показано, что транспортировка образцов крови в течение ночи не наносит существенного ущерба субпопуляциям Т-клеток и они сохраняют свой фенотип и пролиферативную способность [16]. Нашими исследованиями также подтверждена стабильность образцов крови, отобранных в пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта натриевую соль гепарина, в течение 24 ч после отбора при хранении в условиях комнатной температуры. Увеличение сроков хранения образцов приводило к снижению чувствительности теста, что выражалось уменьшением количества четко ограниченных пятен и вероятно было связано как с лизисом, так и с апоптозом в клеточной популяции [17].

При изучении влияния дексаметазона и интерферона (бета-) установлено, что применение для терапии некоторых инфекционных (гепатиты В и С, папилломатоз) и аутоиммунных заболеваний (рассеянный склероз) интерферонов может оказывать влияние на последующую активацию Т-клеток при постановке теста. При этом показано, что дексаметазон не

обладает свойствами интерферентов и не оказывает влияние на специфичность теста.

Специфичность подобранной пары антител в данном тесте, а также процедура отмывки МКПК минимизирует учет неспецифического выброса цитокинов Т-лимфоцитами, что позволяет повышать диагностические характеристики «ТиграТест® SARS-CoV-2».

При испытании внутри- и межсерийной прецизионности показано, что результаты удовлетворяли критериям приемлемости - $RSD \leq 25\%$.

Проведенная валидация «ТиграТест® SARS-CoV-2» для выявления Т-клеточного ответа к вирусу SARS-CoV-2 показала соответствие ее параметров принятым критериям приемлемости по чувствительности и специфичности (более 90%), в том числе специфичность по отношению к другим целевым анализам (100%), прецизионности (не более 25%) и влиянию интерферирующих веществ на специфичность теста. Дополнительно установлена стабильность биологических образцов в течение 24 часов после их забора, позволяющая получать воспроизводимые и достоверные результаты исследований.

Полученные в рамках валидационных испытаний данные свидетельствуют об аналитической надежности сконструированного АО «ГЕНЕРИУМ» теста на основе ELISPOT и позволяют его использовать в целях эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями человека путем оценки наличия у различных групп населения иммунитета, как постинфекционного, так и приобретенного после проведения мероприятий по специфической профилактике короновиральной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, а также для оценки формирования Т-клеточного иммунитета при проведении прививочных кампаний в отношении вакцинных препаратов, для которых опубликованы данные о способности формирования Т-клеточного ответа.

В исследованиях были использованы только свежевыделенные МКПК, однако существуют достаточное количество исследований, свидетельствующих о возможности криоконсервации клеток [2,4,5,12,13]. Так, М. Matijevic et al, советуют при разморозке клеток промывать клетки средой, содержащей ДНКазы (например, Benzonase®), которые позволят минимизировать неспецифическую активацию размороженных клеток.

Дальнейшие исследования направлены на оптимизацию условий криоконсервирования клеток, позволяющих сохранять функциональные свойства клеток, проведение клинических испытаний на большем количестве пациентов, установлении длительности сохранения, выраженного Т-клеточного иммунитета после переболевания и иммунизации, а также оценку применимости «ТиграТест® SARS-CoV-2» для мониторинга эффективности специфических профилактических мероприятий, осуществляемых вакцинными препаратами, содержащими в качестве антигенов не только спайк (S)-белок SARS-CoV-2.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность научному сотруднику Отдела Молекулярной Биологии и Биохимии Департамента Генно-Инженерных Биологических Препаратов Зариповой Д.Т., а также Директору Департамента управления проектами, к.х.н, Сауткиной Е.Н.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Оценка специфичности пары антител, используемых в «ТиграТест® SARS-CoV-2».

Figure 1. Evaluated specificity of the antibody pair used in "TigraTest® SARS-CoV-2".

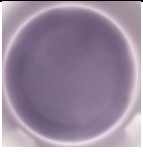
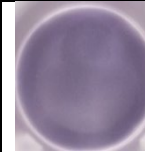
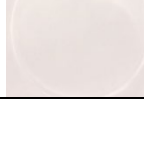
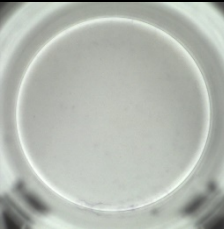
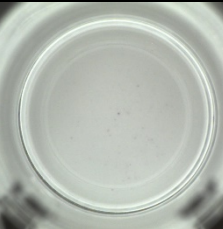
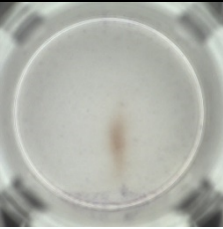
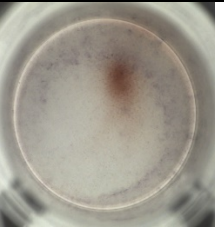
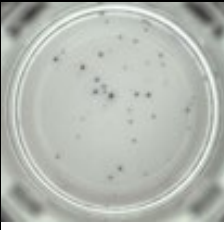
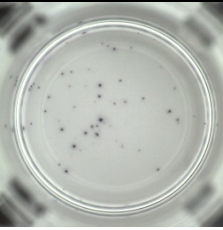
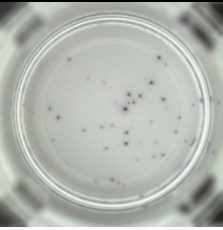
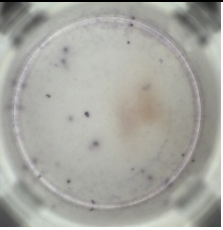
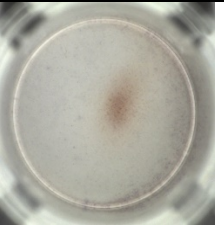
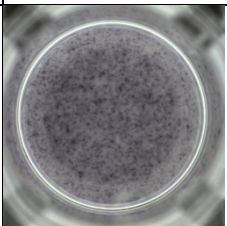
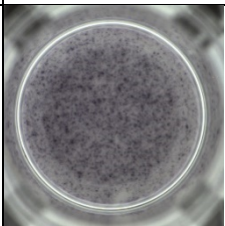
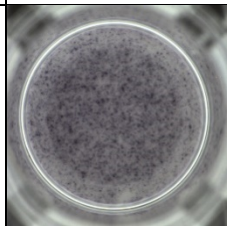
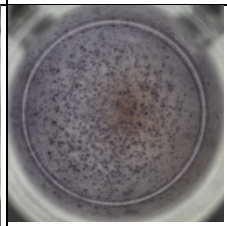
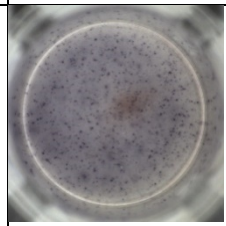
Антиген (Antigen)	Повторность №... Reruns No. ...		
	1	2	3
IFN γ			
IL-2			
IL-6			
IFN-1 β			
TNF α			

Рисунок 2 Пример результатов оценки уровня выброса IFN γ у пациента, иммунизированного вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V) после стимуляции МКПК панелью антигенов 1 в различных временных точках при хранении крови в пробирках *BD Vacutainer®*.

Figure 2 Representative results assessing the IFN γ level released in the patient immunized with the Gam-COVID-Vac vaccine (Sputnik V) after PBMC stimulation with antigen panel No. 1 at different time points during blood storage in BD Vacutainer® tubes.

Точка а Point	Исходная точка (1ч) Starting point (1h)	12 ч 12h	24 ч 24h	48 ч 48h	72 ч 72h
Кол- во пятен Numb er of spots	0	0	0	0	0
К-					
Кол- во пятен Numb er of spots	23	23	22	3	0
ПА1 Antig en panel No. 1					
Кол- во пятен	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100

Numb er of spots					
K+					

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Экспериментальные серии «ТиграТест® SARS-CoV-2» (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия)

Table 1. Experimental batches of "TigraTest® SARS-CoV-2" (JSC "GENERIUM", Russia)

Серия теста Kit batches	120	220/320	111-20
Планшет Plate	EXAH00120	EXAH00220	111-20
ОКТ-3 ОКТ-3	EXAC00120	EXAC00320	XAC00220
Конъюгат Conjugate	EXAF00120	EXAF00320	XAF00220
Субстрат Substrate	EXAA00120	EXAA00320	XAA00220
Панель антигенов №1 Antigen panel No. 1	XAK00220	XAK00220	XAK00220
Панель антигенов №2 Antigen panel No. 2	XAM00220	XAM00220	XAM00220

Таблица 2. Результаты постановок венозной (периферической) крови от категорий доноров, вакцинированных против новой коронавирусной инфекции вакцинным препаратом «Гам-КОВИД-Вак» и переболевших COVID-19 с добавлением и без добавления дексаметазона и интерферона бета-1б для оценки влияния интерферирующих веществ

Table 2. Results of venous (peripheral) blood production based on volunteer categories immunized with vaccine preparation "Gam-COVID-Vak" against a new coronavirus infection and COVID-19 convalescent subjects with and without the addition of dexamethasone and interferon beta-1b to assess the effect of interfering substances

№ п/п No.	Шифр образца / Sample code	Реагент \компонент Reagent \component	Повторы / Runs			Среднее значение / Mean	Кол- во пятен в ПА1 и ПА2 за вычетом К- / Number of spots in PA1 and PA2 minus K-	Результат / Result	%RSD между образцом с ИФ и без добавления ИФ /% RSD between sample with and without interference	
			1	2	3				Панель 1 / Antigen panel 1	Панель 2 / Antigen panel 2
1	021-Б без дексамета зона No dexameth asone	К-	0	0	0	0	88	Полож ительн ый Positive	3	24
		Панель №1 Panel 1	76	11 3	76	88				
		Панель №2 Panel 2	15	14	9	13	13			
		К+	52 0	53 3	51 4	522				
	021-Б с добавлен ием дексамета зона	К-	1	1	1	1	92	Полож ительн ый Positive		
		Панель №1	84	10 1	95	93				
		Панель №2	9	9	12	10	9			

	With dexameth asone 0,0033 мг/мл	K+	51 2	54 3	53 4	530				
2	016-Б без дексамета зона	K-	0	0	0	0	2	Сомни тельны й dubious	0	8
		Панель №1	5	2	0	2				
		Панель №2	13	10	9	11	11			
		K+	55 2	53 1	53 9	541				
	016-Б с добавлен ием дексамета зона 0,0033 мг/мл	K-	0	2	1	1	2	Сомни тельны й dubious		
		Панель №1	2	5	3	3				
		Панель №2	14	12	13	13	12			
		K+	55 1	54 6	54 5	547				
3	017-Б без дексамета зона	K-	0	0	0	0	5	Сомни тельны й dubious	20	4
		Панель №1	5	2	9	5				
		Панель №2	13	10	9	11	11			
		K+	55 2	53 1	53 9	541				
	017-Б с добавлен ием дексамета зона 0,0033 мг/мл	K-	0	1	0	0	4	Отрица тельны й Negativ e		
		Панель №1	4	5	4	4				
		Панель №2	8	13	10	10	10			
		K+	47 5	54 8	49 9	507				
4	018-В без дексамета зона	K-	13	13	13	13	7	Полож ительн ый	20	6
		Панель №1	21	32	7	20				
		Панель №2	79	48	57	61	48			
		K+	50 1	54 2	47 9	507				
	018-В с добавлен ием	K-	4	2	13	6	10	Полож ительн ый		
		Панель №1	31	7	9	16				

	дексамета зона 0,0033 мг/мл	Панель №2	71	39	42	51	45					
		К+	54 1	57 1	54 6	553						
5	019-Б без интерфер она бета- 16 No interferon- beta-1b	К-	1	0	0	0	7	Полож ительн ый	44	42		
		Панель №1	4	8	10	7						
		Панель №2	64	79	73	72	72					
		К+	52 4	531	53 9	531						
	019-Б с добавлен ием интерфер она бета- 16 0,04 мкг/мл With interferon- beta-1b	К-	11	1	6	6		Полож ительн ый				
		Панель №1	8	8	13	10						
		Панель №2	44	43	47	45	39					
		К+	60 0	600	36 0	520						
6	030-Б без интерфер она бета- 16	К-	12	11	12	12	1	Полож ительн ый	111	36		
		Панель №1	16	10	12	13						
		Панель №2	13 8	115	11 1	121	109					
		К+	60 0	600	60 0	600						
	030-Б с добавлен ием интерфер она бета- 16 0,04 мкг/мл	К-	5	4	4	4	9	Полож ительн ый				
		Панель №1	11	16	11	13						
		Панель №2	65	57	86	69	65					
		К+	60 0	600	60 0	600						
7	013-Б без интерфер она бета- 16	К-	2	0	0	1	18	Полож ительн ый	1	17		
		Панель №1	21	25	12	19						
		Панель №2	8	10	9	9	8					

		К+	52 9	540	53 6	535				
	013-Б с добавлен ием интерфер она бета- 16 0,04 МКГ/МЛ	К-	1	2	3	2	19	Полож ительн ый		
		Панель №1	26	20	17	21				
		Панель №2	11	14	13	13	11			
К+	55 2	567	55 3	557						
8	006-Б без интерфер она бета- 16	К-	12	13	12	12	1	Отрица тельны й	130	77
		Панель №1	10	14	16	13				
		Панель №2	1	1	1	1	-11			
		К+	55 5	511	54 1	536				
	006-Б с добавлен ием интерфер она бета- 16 0,04 МКГ/МЛ	К-	7	11	8	9	25	Полож ительн ый		
		Панель №1	30	28	43	34				
		Панель №2	5	5	6	5	-4			
		К+	60 0	600	40 0	533				

Примечание: ИФ – интерферент

Comments: IF – interfering agent

Таблица 3. Статистическая обработка данных при оценке вариабельности между операторами внутри одного планшета и одного лота (партии) «ТиграТест® SARS-CoV-2» для переболевших COVID-19 и добровольцев, иммунизированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V)

Table 3. Data statistical processing while assessing variability between in-plate single lot (batch) TigraTest® SARS-CoV-2 data for COVID-19 patients and donors immunized with the Gam-COVID-Vac vaccine (Sputnik V)

Доброволец (volunteer)	Лунка (well)	Оператор (Operator)		Среднее (Mean)	Стандартное отклонение (S)	Коэффициент вариации (%RSD)
		№1	№2			
1	Панель антигенов 1 Antigen panel 1	36	26	31	7,1	23
	Панель антигенов 2	34	25	29,5	6,4	22
2	Панель антигенов 1	10	12	11	1,4	13
	Панель антигенов 2	37	46	41,5	6,4	15
3	Панель антигенов 1	10	9	9,5	0,7	7
	Панель антигенов 2	18	17	17,5	0,7	4
4	Панель антигенов 1	14	15	14,5	0,7	5
	Панель антигенов 2	13	14	13,5	0,7	5
5	Панель антигенов 1	36	44	40	5,7	14
	Панель антигенов 2	5	4	4,5	0,7	16
6	Панель антигенов 1	38	30	34	5,7	17
	Панель антигенов 2	5	0	2,5	3,5	141*
7	Панель антигенов 1	22	19	20,5	2,1	10
	Панель антигенов 2	14	15	14,5	0,7	5

8	Панель антигенов 1	40	36	38	2,8	7
	Панель антигенов 2	6	7	6,5	0,7	11

*Примечание: добровольцы 1-4 – переболевшие COVID-19; добровольцы 5-8 – вакцинированные; * - показатель исключен при статистической обработке данных.*

*Note: Donors 1-4 – COVID-19 patients; donors 5-8 – vaccinated; * - parameter excluded from statistical analysis.*

Таблица 4. Статистическая обработка данных при оценке вариабельности между сериями «ТиграТест® SARS-CoV-2» одним оператором для переболевших COVID-19 и добровольцев, иммунизированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V).

Table 4. Data statistical processing while assessing the inter-batch variability for «TigraTest® SARS-CoV-2» by a single operator for COVID-19 patients and donors immunized with the Gam-COVID-Vac vaccine (Sputnik V).

Доброволец (volunteer)	Лунка (well)	Серия «ТиграТест® SARS-CoV-2» Batches of "TigraTest® SARS-CoV-2"			Среднее (Mean)	Стандартное отклонение (S)	Коэффициент вариации (%RSD)
		120	220/320	111- 20			
1	Панель антигенов 1	26	26	28	26,7	1,2	4
	Панель антигенов 2	25	34	30	29,7	4,5	15
2	Панель антигенов 1	12	10	8	10,0	2,0	20
	Панель антигенов 2	46	32	41	39,7	7,1	18
3	Панель антигенов 1	9	14	12	11,7	2,5	22
	Панель антигенов 2	17	17	20	18,0	1,7	10
4	Панель антигенов 1	15	12	12	13,0	1,7	13
	Панель антигенов 2	14	15	18	15,7	2,1	13
5	Панель антигенов 1	44	33	39	38,7	5,5	14

	Панель антигенов 2	4	3	4	3,7	0,6	16
6	Панель антигенов 1	30	31	24	28,3	3,8	13
	Панель антигенов 2	0	0	0	0,0	0,0	0
7	Панель антигенов 1	19	17	18	18,0	1,0	6
	Панель антигенов 2	15	20	19	18,0	2,6	15
8	Панель антигенов 1	38	34	31	34,3	3,5	10
	Панель антигенов 2	7	5	6	6,0	1,0	17

Примечание: Добровольцы 1-4 – переболевшие COVID-19; Добровольцы 5-8 – вакцинированные.

Note: Donors 1-4- COVID-19 patients; donors 5-8- vaccinated.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВАЛИДАЦИЯ «ТИГРТЕСТ® SARS-CoV-2»
ТЕСТ НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ИНТЕРФЕРОНА ГАММА *IN VITRO* ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ В КРОВИ Т-ЛИМФОЦИТОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИ
ОТВЕЧАЮЩИХ НА АНТИГЕНЫ ВИРУСА SARS-CoV-2

INTRA-LABORATORY VALIDATED "TIGRATEST® SARS-CoV-2" TEST
ASSESSING RELEASE OF INTERFERON GAMMA IN VITRO TO IDENTIFY
PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTES SPECIFICALLY RESPONDING
AGAINST SARS-CoV-2 VIRUS ANTIGENS"

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Лягоскин И.В. – Начальник Отдела Аналитических методов
Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», к.б.н.

Lyagoskin I.V. - Head of the Analytical Methods Division of the Department
of the Pharmaceutical Analysis, JSC GENERIUM, Ph.D.

Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пгт.
Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125,
Российская Федерация

JSC "GENERIUM", st. Vladimirskaya, 14, pos. Volginsky, Petushinsky district,
Vladimir region, 601125, Russian Federation

Correspondence address: Lyagoskin Ivan Vladimirovich, 601125, Russia, pos.
Volginsky, st. Vladimirskaya, 14, JSC "GENERIUM". Tel.: +7 495 988 47 94.

E-mail: lyagoskin@ibcgenerium.ru

Блок 2. Информация об авторах

Лягоскин И.В. – Начальник Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», к.б.н.

Lyagoskin I.V. - Head of the Analytical Methods Division of the Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC GENERIUM, Ph.D.

Каргополова П.Е. – химик-аналитик лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ»

Kargopolova P.E. - analytical chemist of the Laboratory of biological methods, the Analytical Methods Division of the Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM"

Объедков Д.А. – научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ»

Obyedkov D.A. – Researcher of the Laboratory of Biological Methods, the Analytical Methods Division of the Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM"

Егорова И.Ю. – Руководитель группы диагностических тест-систем Отдела молекулярной диагностики Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», д.в.н., доцент.

Egorova I.Yu. - Head of the group of diagnostic test systems of the Division of Molecular Diagnostics of the Department of Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", D.vet. Sc., Associate Professor.

Шукуров Р.Р. – Директор Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», к.б.н.

Shukurov R.R. - Director of the Department of Pharmaceutical Analysis, JSC
"GENERIUM", Ph.D.

Блок 3. Метаданные статьи

Сокращенное название статьи:

ВАЛИДАЦИЯ «ТИГРТЕСТ® SARS-CoV-2»

VALIDATION "TIGRATEST® SARS-CoV-2"

Ключевые слова: Валидация, «ТИГРТЕСТ® SARS-CoV-2», COVID-19, Т-клеточный иммунитет, ELISPOT, диагностическая чувствительность, специфичность, вариабельность

Key words: Validation, «TIGRATEST® SARS-CoV-2», COVID-19, T-cell immunity, ELISPOT, diagnostic sensitivity, specificity, variability

16 страниц, 2 рисунка, 4 таблицы

Оригинальная статья

28.12.2021

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или
1	Inayat Ur Rahman, Niaz Ali, Farhana Ijaz, Aftab Afzal & Elsayed Fathi Abd_Allah // COVID-19 - Important considerations for developing and using a vaccine	-	https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1781507
2	Zayed R.A., Omran D. and Zayed AA. COVID-19 clinical and laboratory diagnosis overview // Journal of the Egyptian Public Health Association volume 96, Article number: 25 (2021).		https://jepha.springeropen.com/articles/10.1186/s42506-021-00087-w?utm_source=xmol&utm_medium=affiliate&utm_content=meta&utm_campaign=DDCN_1_GL01_metadata
3	Jae-Hoon Ko, Eun-Jeong Joo, Su-Jin Park et al. Neutralizing Antibody Production in Asymptomatic and Mild COVID-19 Patients, in Comparison with Pneumonic COVID-19 Patients // J Clin Med. 2020 Jul; 9(7): 2268.		DOI: 10.3390/jcm9072268
4	Потеряев Д.А., Хамитов Р.А., Ефимов Г.А., Шустер А.М. Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противоэпидемических мероприятий	Poteryaev D.A., Khamitov R.A., Efimov G.A., Shuster A.M. Prospects for Using the ELISPOT Technological Platform as Part of Anti-Epidemic Measures Against the New Coronavirus Infection COVID-	https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158

	против новой коронавирусной инфекции COVID-19. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2020;20(3):146-158. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158	19. BИOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2020;20(3):146-158. (In Russ.) https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158	
5	Потеряев Д. А., Аббасова С. Г., Игнатьева П. Е., Стрижакова О. М., Колесник С. В, Хамитов Р.А. Оценка Т- клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2	Poteryaev D.A., Abbasova S.G., Ignatyeva P.E., Strizhakova O.M., Kolesnik S.V., Khamitov R.A. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit. BИOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2021;21(3):178-192. (In Russ.) https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192	https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192
6	Smith J. G., Liu X., Kaufhold R. M., Clair J., and Caulfield M. J. Development and Validation of a Gamma Interferon ELISPOT Assay for Quantitation of Cellular Immune Responses to Varicella-Zoster Virus	-	DOI: 10.1128/CDLI.8.5.871–879.2001
7	Asai,T.,W.J. Storkus, and T.L. Whiteside. 2000. Evaluation of the modified ELISPOT assay for gamma interferon		DOI: 10.1128/CDLI.7.2.145-154.2000

	production in cancer patients receiving antitumor vaccines. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7:145–154.		
8	Power, C.A., C.L. Grand, N. Ismail, N.C. Peters, D.P. Yurkowski, and P.A. Bretscher. 1999. A valid ELISPOT assay for enumeration of ex vivo, antigen specific, IFN- γ -producing cells. J. Immunol. Methods 227:99–107.		DOI: 10.1016/s0022-1759(99)00074-5
9	Janetzki S, Cox J.H., Oden N., and Ferrari G.. Standardization and Validation Issues of the ELISPOT Assay // Methods in Molecular Biology, vol. 302: Handbook of ELISPOT: Methods and Protocol Methods Mol Biol. 2005;302:51-86.		DOI: 10.1385/1-59259-903-6:051.
10	Matijevic M. and Urban R.G. Use of Interferon- γ ELISPOT in Monitoring Immune Responses in Humans // Methods Mol Biol. 2005; 302:237-52.		DOI: 10.1385/1-59259-903-6:237.
11	Lalvani A., Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice // Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010 Apr;28(4):245-52.	-	DOI: 10.1016/j.eimc.2009.05.012. Epub 2009 Sep 24.
12	Henriksen L.O., Faber N. R., Moller M. F., Nexø E. and Hansen A.B. Stability of 35 biochemical and immunological routine tests after 10 hours storage and		doi.org/10.3109/00365513.2014.928940

	transport of human whole blood at 21°C // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Volume 74, 2014 - Issue 7.		
13	Posevitz-Fejfar A., Posevitz V., Gross C.C, Bhatia U, Kurth F., Schütte V., Bar-Or A., Meuth S.G., Wiendl H. Effects of Blood Transportation on Human Peripheral Mononuclear Cell Yield, Phenotype and Function: Implications for Immune Cell Biobanking		doi.org/10.1371/journal.pone.0115920
14	Keith H., Wong K., Sandlin R D., Carey T. R., Miller K.L., Shank A.T., Oklu R., Maheswaran Sh., Haber D.A., Irimia D., Stott Sh.L. and Toner M. The Role of Physical Stabilization in Whole Blood Preservation // Scientific Reports, volume 6, Article number: 21023 (2016).	-	https://europepmc.org/article/MED/28720788