

ОПТИМИЗАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО МЕТОДА ОЦЕНКИ РЕАКТИВНОСТИ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ ЧЕЛОВЕКА К АНТИГЕНАМ ВИРУСА SARS-CoV-2 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ



О.М. Стрижакова, А.С. Першин, А.А. Казаров, И.В. Лягоскин, Я.А. Бахарева,
А.П. Васильев, Ю.А. Никонова, И.Ю. Егорова, Р.Р. Шукуров, Р.А. Хамитов

АО «ГЕНЕРИУМ», пгт. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, Россия

Резюме. Адекватный и репрезентативный мониторинг популяционного иммунитета к вирусу COVID-19, включая долгосрочное влияние на переболевших и вакцинированных людей, должен включать не только исследование гуморального, но также и Т-клеточного иммунного ответа. При этом важную информацию может дать не только способность клеток активироваться в ответ на специфический антиген, но и определение фенотипа реактивных клеток. Для этого нами разработан метод проточной цитометрии для оценки содержания антиген-реактивных Т-клеток, продуцирующих внутриклеточный IFN γ под воздействием на мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека антигенов вируса SARS-CoV-2, и проведена его валидация. Валидационные испытания методики проводили по следующим характеристикам: чувствительность, специфичность, прецизионность и робастность. Валидационные испытания методики по характеристикам «чувствительность» и «специфичность» проводили, исследуя положительные образцы доноров, переболевших COVID-19, с диагнозом, верифицированным лабораторными методами, и отрицательные образцы, отобранные от доноров с отрицательным анамнезом, не контактировавших с больными COVID-19, с отсутствием антител к антигенам SARS-CoV-2. Из крови доноров выделяли мононуклеарные клетки периферической крови методом центрифугирования в градиенте плотности фикола и стимулировали специфические Т-клетки пептидами, соответствующими основным белковым антигенам коронавируса SARS-CoV-2 — пептиды S-белка и пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a. Учитывали данные на проточном цитометре, выделяя Т-клетки, продуцирующие IFN γ , и проводили статистический анализ полученных результатов. Значения площади, ограниченной ROC-кривой и осью ложноположительных классификаций (AUC) для популяций CD4 и CD8, составило от 0,97 до 1,00. Методика показала приемлемую сходимость и внутрилабораторную прецизионность, поскольку коэффициенты вариации для всех образцов МКПК не превышали 20%. Была подтверждена робастность при использовании МКПК в свежеприготовленном виде и после цикла заморозки/разморозки. По итогам валидации установлены границы определения позитивного и негативного отклика: для CD4-позитивных Т-клеток — 0,029%, для CD8-позитивных Т-клеток — 0,064–0,068%, а также критерии приемлемости для показателей отклика положительного и отрицательного контрольных антигенов. Таким образом подтверждена пригодность методики «Оценка антиген-реактивных Т-клеток, продуцирующих вну-

Адрес для переписки:

Першин Андрей Сергеевич
601125, Россия, Владимирская область, Петушинский район,
пгт. Вольгинский, ул. Владимирская, 14, АО «ГЕНЕРИУМ».
Тел.: 8 (495) 988-47-94. E-mail: aspershin@generium.ru

Contacts:

Andrei S. Pershin
601125, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinsky district,
poselok Volginsky, Vladimirskaia str., 14, JSC "GENERIUM".
Phone: +7 (495) 988-47-94. E-mail: aspershin@generium.ru

Для цитирования:

Стрижакова О.М., Першин А.С., Казаров А.А., Лягоскин И.В.,
Бахарева Я.А., Васильев А.П., Никонова Ю.А., Егорова И.Ю.,
Шукуров Р.Р., Хамитов Р.А. Оптимизация и валидация количественного
метода оценки реактивности Т-клеток памяти человека к антигенам
вируса SARS-CoV-2 с использованием проточной цитометрии //
Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 642–652. doi: 10.15789/2220-
7619-OAV-2084

Citation:

Strizhakova O.M., Pershin A.S., Kazarov A.A., Lyagoskin I.V., Bahareva Ya.A.,
Vasil'ev A.P., Nikonova Yu.A., Egorova I.Yu., Shukurov R.R., Khamitov R.A.
Optimization and validation of flow cytometry method for quantification
of SARS-CoV-2 antigen-reactive human memory T cells // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4,
pp. 642–652. doi: 10.15789/2220-7619-OAV-2084

триклеточный IFN γ под воздействием на мононуклеарные клетки периферической крови человека антигенов вируса SARS-CoV-2, методом проточной цитометрии» для получения достоверных результатов при определении содержания внутриклеточного IFN γ в МКПК. Методику использовали при характеристике стандартных контрольных образцов для внутреннего контроля качества наборов ТиграТест® SARS-CoV-2.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, Т-клеточный иммунитет, пептиды коронавируса, цитометрия, метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS), валидация.

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF FLOW CYTOMETRY METHOD FOR QUANTIFICATION OF SARS-CoV-2 ANTIGEN-REACTIVE HUMAN MEMORY T CELLS

Strizhakova O.M., Pershin A.S., Kazarov A.A., Lyagoskin I.V., Bahareva Ya.A., Vasil'ev A.P., Nikonova Yu.A., Egorova I.Yu., Shukurov R.R., Khamitov R.A.

JSC "GENERIUM", Volginsky, Petushinsky District, Vladimir Region, Russian Federation

Abstract. A proper and representative monitoring of SARS-CoV-2 herd immunity including a long-term health impact on recovered patients and vaccinated individuals is of great importance. For this, a monitoring campaign should assesses both humoral and T-cell immune arms. Upon that, analyzing antigen specific-cell activation and cellular phenotype are informative. We developed a flow cytometry method for detection of intracellular IFN γ -producing antigen-reactive T cells after exposure of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to SARS-CoV-2 virus antigens. The method was validated according to the following characteristics: sensitivity, specificity, precision, and robustness. We used positive samples from donors recovered from COVID-19 and negative samples from donors who had no contact with COVID-19 patients and lacking antibodies to SARS-CoV-2. All samples were tested by laboratory methods. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from donor blood by centrifugation in a Ficoll density gradient. Specific T cells were stimulated with S-protein as well as N, M, ORF3a, and ORF7a protein peptides to count IFN γ -producing T cells by flow cytometer. The data were statistically analyzed. The area limited by ROC-curve and false positive rate (AUC) for CD4 and CD8 cells was from 0.97 to 1.00. Precision was considered acceptable because the coefficient of variation for all PBCM did not exceed 20%. Robustness was confirmed for frozen and freshly prepared PBMC samples. The thresholds levels to recognize immune and non-immune samples were defined for CD4-positive T-cells (0.029%) and CD8-positive T-cells (0.064–0.068%). Also, acceptance criteria for positive and negative controls were defined. Based on the validation, the suitability of the method "Evaluation of antigen-reactive T cells that produce intracellular IFN in response to SARS-CoV-2 virus antigens by flow cytometry" was confirmed. The method allows for reliable data that was used to characterize standard control samples for internal quality control of TigratTest® SARS-CoV-2 kits.

Key words: SARS-CoV-2, T-cells immunity, COVID-19, coronavirus peptides, flow cytometry, intracellular cytokine staining, validation.

Введение

В начале 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) классифицировала вспышку нового типа коронавируса COVID-19 как пандемию. С тех пор целью многих эпидемиологических и экспериментальных работ было исследование иммунологических аспектов коронавирусной инфекции, что, в свою очередь, способствовало поиску методов ее лечения и профилактики.

Клинические проявления SARS-CoV-2 варьируют от бессимптомной инфекции до тяжелой дыхательной недостаточности. Механизмы, которые определяют особенности течения болезни, остаются до конца невыясненными. Есть основания полагать, что наличие иммунного ответа, в котором задействованы Т-клетки памяти, является ключевым звеном в формировании устойчивого защитного иммунитета в отношении SARS-CoV-2 [2, 5, 7, 9, 17]. Кроме того, специфичный к SARS-CoV-2 Т-клеточный иммунный ответ сохраняется после элиминации нейтрализующих антител в течение по крайней мере 12 месяцев [8, 12]. В связи с этим про-

ведение мониторинга не только гуморального, но и Т-клеточного популяционного иммунитета к вирусу COVID-19 следует считать необходимым элементом эпидемиологического надзора в условиях пандемии.

Существует ряд методов, которые позволяют измерять иммунологические биомаркеры в материале, полученном из венозной крови — ткани, наиболее доступной для иммунологического исследования в клинических испытаниях [7, 16]. Для выявления иммунологических биомаркеров в форме экспрессированных цитокинов хорошо зарекомендовал себя метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS), применяемый к стимулированным мононуклеарным клеткам периферической крови (МКПК) с последующим проточным цитометрическим анализом. Внутриклеточное окрашивание цитокинов, в отличие от альтернативных подходов (ELISpot или ELISA), позволяет обнаруживать специфическое подмножество клеток-респондеров (например, CD4- или CD8-положительные Т-клетки), выявлять ассоциированные маркеры дифференцировки (например, маркеры фенотипа памяти или состояния

активации), проводить функциональные тесты (например, регистрировать продукцию цитокинов, маркеров цитотоксичности и т. д.), детектируя одновременно экспрессию нескольких цитокинов/хемокинов и маркеров пролиферации. Современные многопараметрические инструменты позволяют одновременно измерять экспрессию многих маркеров [5, 9].

Цель нашей работы — разработать и валидировать метод проточной цитометрии для оценки содержания антиген-реактивных Т-клеток, продуцирующих внутриклеточный IFN γ под воздействием на мононуклеарные клетки периферической крови человека антигенов вируса SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Добровольцы, участвующие в исследовании. Образцы крови. Все добровольцы, участвующие в исследовании, заполняли опросный лист с указанием основных характеристик, симптомов заболевания, наличия инфекции SARS-CoV-2, подтвержденной лабораторными тестами, наличия пневмонии, подтвержденной компьютерной томографией, дату иммунизации (если была) и использованный вакцинный препарат. Условно здоровые доноры также отмечали отсутствие продолжительных контактов с больными COVID-19.

Взятие образцов крови осуществлялось 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 взятие 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). 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 ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) (НПП «ПанЭко», Россия) не позднее чем через 1 ч после забора крови. Подсчет клеток проводили с использованием счетчика клеток — NucleoCounter® NC-100. Готовили рабочую суспензию клеток МКПК с концентрацией $5,0 \times 10^6$ кл/мл и вносили в каждую лунку планшета по $5,0 \times 10^5$ МКПК (оптимальное количество) в среде ADCF-Mab® (HyClone, США) в объеме 100 мкл либо замораживали.

Криоконсервация. Клетки осаждали центрифугированием при 400g. Осадок клеток ресуспендировали в среде для криоконсервации клеток (эмбриональная телячья сыворотка (FBS, Capricorn Scientific, Германия) с добавлением 10% диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США)), доводя содержание до $5,0 \times 10^6$ кл/мл. Суспензию вносили по 1,0 мл в промаркированные криопробирки, которые помещали в коробку из пенопласта с крышкой и охлаждали в морозильной камере при температуре не выше минус 70°C. Через 24–72 ч пробирки переносили в криохранилище с жидким азотом и хранили до использования.

Размораживание МКПК. Криопробирку с клетками размораживали на водяной бане при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Содержимое криоампулы переносили в пробирку, содержащую 5,0 мл среды для постановки теста. Центрифугировали 1 мин при 400g и температуре $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$. Осадок клеток ресуспендировали в 1,0 мл среды для постановки теста и определяли их количество и жизнеспособность с помощью счетчика клеток. Готовили рабочую суспензию МКПК для проведения анализа по живым клеткам.

Антигены и контроли. В качестве антигенов для стимуляции специфических Т-клеток использовали пептиды, соответствующие основным белковым антигенам коронавируса SARS-CoV-2: панель антигенов № 1 (AG1, пептиды S-белка) и антигенов № 2 (AG2, пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a). Пептиды, соответствующие основным белковым антигенам коронавируса SARS-CoV-2 для стимуляции специфических Т-клеток, были выбраны на основе публикаций, идентифицировавших репертуар и встречаемость различных эпитопов для TCR у пациентов и конвалесцентов COVID-19. С помощью биоинформатического анализа в основном были исключены эпитопы, способные давать значительную кросс-реактивность с Т-клеточными эпитопами так называемых «простудных» коронавирусов штаммов OC43, NL63, 229E, HKU1. Для выбора оптимального набора пептидов, учитывая распространенность TCR эпитопов и их соответствие генотипам HLA в человеческой популяции, использовали следующие работы и базы данных [14, 17, 21, 24, 25, 26].

Для каждого образца МКПК использовали 8 лунок. Отрицательный и положительный контроль применяли для каждого образца индивидуально. В качестве отрицательного контроля использовали среду ADCF-Mab® (HyClone, США), в качестве положительного контроля — раствор фитогемагглютинаина (ООО НПП «ПанЭко», Россия) с конечной концентрацией в лунке 7 мкг/мл.

Процедура анализа. Планшеты инкубировали при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$, содержании CO_2 $(5,0\pm 0,5)\%$ и влажности 95% в течение 16–24 ч. По окончании инкубации в каждую из лунок вносили по 10 мкл рабочего раствора ингибитора транспорта белков в среде ADCF-Mab[®] (HyClone, США) из расчета 1 мкл ингибитора на 1×10^6 клеток. Инкубировали 4 ч при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере $(5,0\pm 0,5)\%$ CO_2 при влажности 95%.

По окончании инкубации МКПК два раза отмывали фосфатно-солевым буферным раствором, осаждая центрифугированием в течение 5 мин при 500g и температуре $(20\pm 5)^\circ\text{C}$. Вносили раствор реагента Fixable Viability Stain 510 (BD Biosciences, США) в PBS (1 мкл реагента на 1×10^6 клеток). Инкубировали в течение (9 ± 2) мин при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$. Клетки отмывали два раза фосфатно-солевым буферным раствором, осаждая центрифугированием при 500g и температуре $(20\pm 5)^\circ\text{C}$.

В лунки с МКПК вносили реагенты для иммунофенотипирования — мышиные антитела против человеческого CD3, меченые PerCP-Cy[™] 5.5 (клон UCНТ1); мышиные антитела против человеческого CD4, меченые PE (клон RPA-T4); мышиные антитела против человеческого CD8, меченые BV515 (клон RPA-T8) до финального разведения 1:150 в FACS-буфере с добавлением раствора для блокирования неспецифического связывания с Fc-рецепторами клеток (Fc Block, BD Biosciences, США) в соотношении 1:100. Инкубировали планшет в течение (30 ± 5) мин при температуре $(5\pm 2)^\circ\text{C}$. По окончании инкубации клетки трижды отмывали FACS буфером, осаждая клетки центрифугированием при 500g и температуре $(5\pm 3)^\circ\text{C}$.

Осадок МКПК ресуспендировали в 100 мкл/лунка раствора для фиксации (Fixation Buffer, BD Biosciences, США) и инкубировали в течение (20 ± 2) мин при температуре $(5\pm 2)^\circ\text{C}$. После инкубации дважды отмывали клетки охлажденным FACS-буфером.

Клетки МКПК однократно отмывали рабочим раствором для пермеабиллизации и отмывки (Perm/Wash, BD Biosciences, США) и ресуспендировали в растворе Perm/Wash. Инкубировали в течение (20 ± 2) мин при температуре $(5\pm 2)^\circ\text{C}$. После инкубации клетки осаждали и вносили (кроме неокрашенной пробы и FMO-контроля по IFN γ) реагент для определения IFN γ (мышиные антитела, специфичные к человеческому IFN γ меченые BV421, клон B27) до финального разведения 1:100. Инкубировали в течение (30 ± 5) мин при температуре $(5\pm 2)^\circ\text{C}$. После инкубации дважды отмывали клетки раствором для пермеабиллизации, осаждая центрифугированием при 500g и температуре $(5\pm 2)^\circ\text{C}$. Осадок ресуспендировали в растворе Perm/Wash.

Обработка результатов анализа. Все результаты были получены на проточном цитометре BD FACSCanto II с использованием шаблонов, созданных с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences, версия 6.1.3).

Оптимальные значения интенсивности флуоресценции (MFI) (для каждого из флуорохромов в панели PerCP-Cy[™]5.5; PE; BV515 BV421) были получены методом титрования напряжений с измерением индекса окрашивания (Stain Index) до достижения максимального разделения позитивной и негативной популяций. Целевой диапазон MFI для каждого флуоресцентного канала был установлен с использованием среднего значения $\text{MFI} \pm$ два стандартных отклонения.

Для ежедневной настройки прибора перед сбором обработанных образцов был проведен ряд шагов по стандартизации. Сначала были запущены Cytometer Setup и Tracking beads (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния), и полученные настройки были использованы в эксперименте. Затем напряжения на фотоэлектронном умножителе были отрегулированы так, чтобы они попадали в заданный целевой диапазон MFI.

Для установки компенсации для учета спектрального перекрытия между флуоресцентными каналами использовали набор для оптимизации настроек компенсации флуоресценции для многоцветных проточных цитометрических анализов BD CompBeads Anti-Mouse Ig k/ Negative Control Compensation Particles Set (BD Biosciences).

При выполнении цитометрического анализа использовали следующий порядок гейтирования: из целевой популяции клеток выделяли живые клетки, затем выделяли CD3-положительную популяцию, затем — CD4- и CD8-позитивные клетки, среди которых выделяли Т-клетки, позитивные по маркерам IFN γ (рис. 1, II обложка). Для достоверности получаемых данных в живых клетках регистрировали не менее 20 000 событий.

Результаты

Нами была проведена серия предварительных экспериментов для определения оптимальных реагентов, объемов, времени и других процедурных деталей проточного цитометрического анализа. Затем, используя оптимизированный метод, определяли чувствительность, специфичность, прецизионность и робастность.

Валидационные испытания методики по характеристикам «чувствительность» и «специфичность» проводили, исследуя образцы:

— положительные — МКПК от 18 доноров, переболевших COVID-19, с диагнозом, верифицированным лабораторными методами

(ПЦР, ИФА), и 1 донора, привитого вакциной «Спутник V» (АО «ГЕНЕРИУМ»);

– отрицательные — мононуклеарные клетки периферической крови, отобранные от 9 доноров с отрицательным анамнезом, не контактировавших с больными COVID-19, с отсутствием антител к антигенам SARS-CoV-2 (по результатам ИФА).

При исследовании материала от интактных и переболевших доноров с использованием панелей АГ1 и АГ2 антигенов вируса SARS-CoV-2 определяли процентное содержание продуцентов IFN γ среди CD4- и CD8-позитивных Т-клеток. Далее применяли ROC-анализ [1, 29] и определяли для каждой из двух популяций значения AUC (площади, ограниченной ROC-кривой и осью ложноположительных классификаций). Информативность метода считалась приемлемой при условии, что AUC составляла не менее 0,7.

Результаты оценки приведены в табл. 1–2 и на рис. 2–3.

Для исследования прецизионности методики использовали образцы МКПК от трех доноров — двух переболевших и одного вакцинированного. Прецизионность оценивали на двух уровнях — сходимость и внутрилабораторная прецизионность.

Оценку сходимости выполняли 2 оператора, каждый из которых выполнил по 3 независимых измерения для 3 образцов МКПК от разных доноров, в 2 аналитических циклах (АЦ), с использованием обеих панелей антигенов вируса SARS-CoV-2 (всего 4 АЦ).

Для оценки сходимости отдельно в каждом АЦ вычисляли дисперсию значений процентного содержания продуцентов IFN γ , полученных при повторных измерениях каждого образца МКПК. Значения дисперсии усредняли между АЦ и опе-

Таблица 1. Сводные результаты определения процентного содержания продуцентов IFN γ среди CD4- и CD8-позитивных Т-клеток при исследовании образцов МКПК от иммунных и неиммунных доноров с использованием панелей АГ1 и АГ2 антигенов вируса SARS-CoV-2

Table 1. The percentage of IFN γ producing CD4 and CD8 T cells among immune and non-immune donor-derived PBMC samples incubated with SARS-CoV-2 antigen panels (Ag1 and Ag2)

Популяция Т-клеток T-cell population	CD4 ⁺		CD8 ⁺	
	АГ1 Ag1	АГ2 Ag2	АГ1 Ag1	АГ2 Ag2
Иммунные доноры Immune donors				
Интервал значений Range % (IFN γ +))	0,022–0,108	0,021–0,138	0,072–0,213	0,046–0,374
Среднее значение Average value % (IFN γ +))	0,060	0,061	0,138	0,183
%CV	41,9	50,2	29,3	48,1
Неиммунные доноры Non-immune donors				
Интервал значений Range of % (IFN γ +))	0,011–0,031	0,009–0,028	0,010–0,057	0,017–0,051
Среднее значение Average value % (IFN γ +))	0,019	0,020	0,035	0,030
%CV	35,9	31,0	45,9	35,5

Таблица 2. Результаты ROC-анализа (оценка информативности метода, подбор порогового значения для оптимизации чувствительности и специфичности)

Table 2. ROC analysis (i.e., evaluation of assay's threshold to optimize both sensitivity and specificity)

Т-клетки T-cells type	Панель антигенов Antigens panel	AUC (95% ДИ) AUC (95% CI)	Пороговое значение Threshold	Чувствительность % Sensitivity	Специфичность % Specificity
CD4 ⁺	АГ1 Ag1	0,97 (0,91–1,00)	0,029	88,9	88,9
	АГ2 Ag2	0,97 (0,91–1,00)	0,029	94,4	100,0
CD8 ⁺	АГ1 Ag1	1,00 (1,00–1,00)	0,064	100,0	100,0
	АГ2 Ag2	0,99 (0,97–1,00)	0,068	94,4	100,0

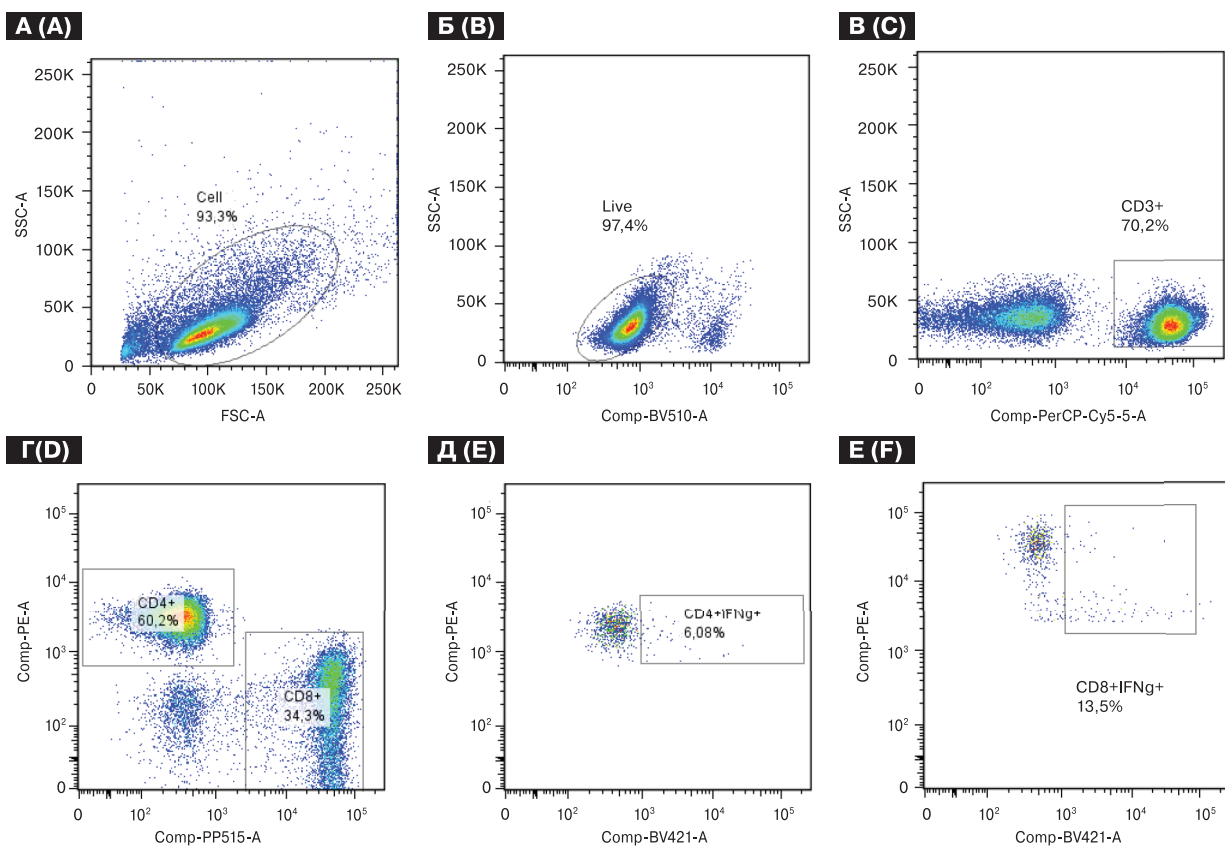


Рисунок 1. Порядок выделения целевых популяций Т-клеток МПКП

Figure 1. Flow cytometry gating strategy for PBMCs T cells

Примечание. А — выделение клеточной популяции; Б — выделение популяций живые/мертвые; В — выделение популяции CD3; Г — выделение популяции CD4- и CD8-позитивных клеток; Д — выделение популяции CD4-IFN γ -позитивных клеток; Е — выделение популяции CD8-IFN γ -позитивных клеток.

Note. A — cells; B — live/dead; C — CD3 positive; D — CD4⁺ and CD8⁺; E — CD4-IFN γ -positive; F — CD8-IFN γ -positive.

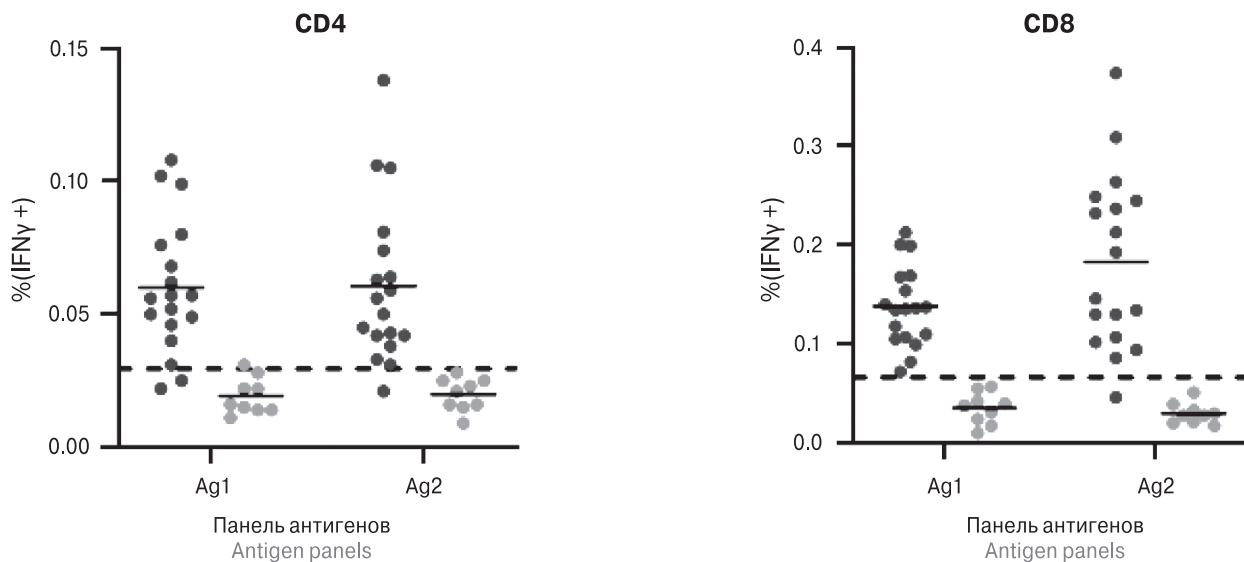


Рисунок 2. Результаты определения процентного содержания продуцентов IFN γ среди CD4-позитивных (слева) и CD8-позитивных (справа) Т-клеток при исследовании образцов МКПК от иммунных (темные маркеры) и неиммунных (светлые маркеры) доноров с использованием панелей АГ1 и АГ2 антигенов вируса SARS-CoV-2

Figure 2. The percentage of IFN γ producing CD4 (left) and CD8 (right) T-cells among immune (dark dots) and non-immune (light dots) donor-derived PBMC samples incubated with SARS-CoV-2 antigen panels (Ag1 and Ag2)

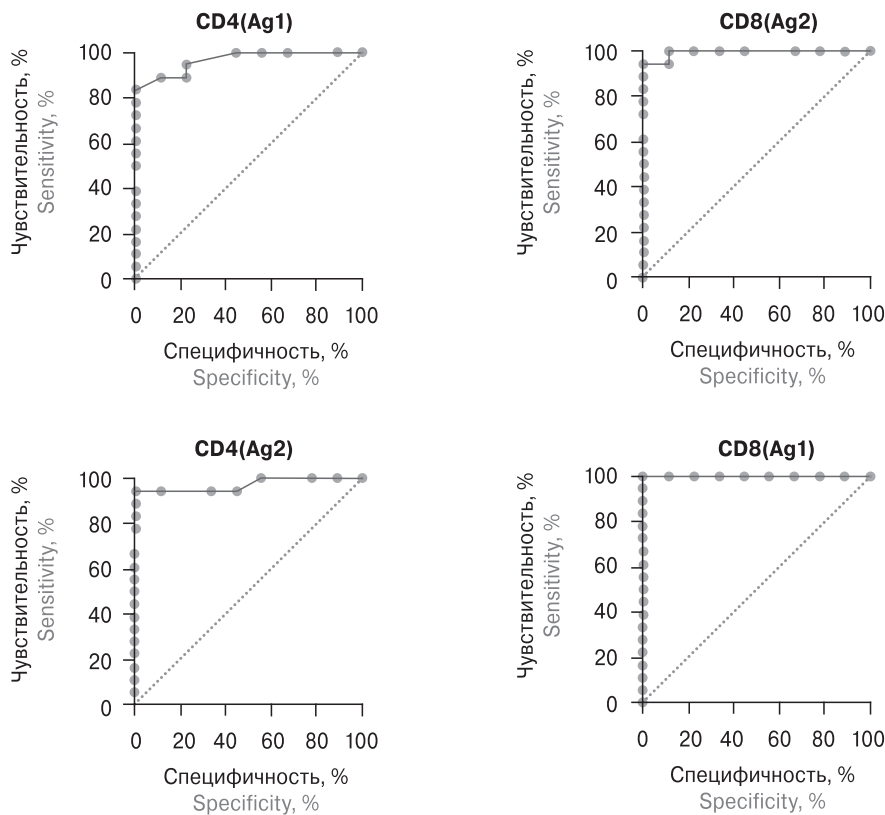


Рисунок 3. ROC-кривые, полученные при исследовании процентного содержание продуцентов IFN γ среди CD4- и CD8-позитивных Т-клеток у иммунных и неиммунных доноров с использованием панелей АГ1 и АГ2 антигенов вируса SARS-CoV-2

Figure 3. ROC analysis for percentage of IFN γ -producing CD4 and CD8 T-cells among immune and non-immune donor-derived PBMC samples incubated with SARS-CoV-2 antigen panels (Ag1 and Ag2)

Таблица 3. Результаты оценки сходимости и внутрилабораторной прецизионности

Table 3. Repeatability and intermediate precision assessment

Популяция Т-клеток T-cell population	CD4 ⁺		CD8 ⁺	
	АГ1 Ag1	АГ2 Ag2	АГ1 Ag1	АГ2 Ag2
CV сходимости %CV of repeatability	16,5–18,8	11,7–17,5	3,8–6,9	4,7–13,8
CV внутрилабораторной прецизионности %CV of intermediate precision	14,2–19,3	11,4–19,0	6,5–15,3	8,9–13,3

раторами (полученное значение далее в тексте обозначается как $V_{сх}$) и вычисляли коэффициент вариации сходимости ($\%CV_{сх}$) как отношение квадратного корня усредненной дисперсии к среднему значению процентного содержания продуцентов IFN γ для каждого образца МКПК (далее в тексте обозначается как M).

Таблица 4. Результаты оценки криостабильности МКПК как показателя робастности методики

Table 4. Comparison of frozen and freshly prepared PBMCs samples

Донор МКПК PBMCs donor	Статус образца МКПК PBMCs sample	Результат Result	Превышение порогового значения (0,064%) Threshold exceeded (0,064%)
1	Свежеприготовленный Freshly prepared	0,200	Да Yes
	Замороженный Frozen	0,233	Да Yes
2	Свежеприготовленный Freshly prepared	0,168	Да Yes
	Замороженный Frozen	0,173	Да Yes
3	Свежеприготовленный Freshly prepared	0,199	Да Yes
	Замороженный Frozen	0,147	Да Yes

Для оценки внутрилабораторной прецизионности в каждом АЦ вычисляли значения процентного содержания продуцентов IFN γ , усредненные по повторным измерениям каждого образца МКПК. Далее вычисляли стандартное отклонение между усредненными результатами каждого АЦ (далее в тексте обозначается как $V_{мц}$). Коэффициент вариации внутрилабораторной прецизионности ($CV_{вв}$) вычисляли по формуле [3]:

$$\%CV_{вв} = \frac{\sqrt{V_{мц} + \left(1 - \frac{1}{N}\right) V_{сх}}}{M},$$

где N — количество измерений образца в пределах АЦ, остальные условные обозначения см. в тексте.

Полученные значения приведены в табл. 3.

Для оценки криостабильности образцы МКПК от 3 доноров анализировали в свежеприготовленном виде и после однократного цикла заморозки/разморозки. Анализ проводили только в формате CD8/АГ1. Полученные результаты приведены в табл. 4.

В качестве дополнения был выполнен расчет критериев приемлемости для показателей отклика положительного и отрицательного контрольных антигенов, используемых в анализе (см. табл. 5). Для этого значения отклика, полученные в опытах по оценке чувствительности и специфичности (см. выше), были

Таблица 5. Расчет критериев приемлемости для показателей отклика положительного и отрицательного контрольных антигенов

Table 5. Evaluation of acceptance criteria for positive and negative controls' response

	Отрицательный контроль Negative control	Положительный контроль Positive control
Размах отклика Response range	0,010–0,065	0,759–6,02
То же после логарифмирования Log-response range	от –2,000 до –1,367	от –0,120 до 0,780
Усредненный логарифмированный отклик Averaged log-response	–1,659	0,351
Стандартное отклонение Standart deviation	0,216	0,246
Вычисленное значение критерия приемлемости Acceptance criterion	$\leq 0,059$	$\geq 0,725$

логарифмированы по основанию 10. Для них были вычислены среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD). Значения критериев приемлемости как предельные значения отклика (L), обеспечивающие ожидаемую частоту сбоев не выше 5%, были вычислены по формулам:

- для отрицательного контроля: $L(-) \leq 10^{M+2SD}$;
- для положительного контроля: $L(+) \geq 10^{M-2SD}$.

Обсуждение

Сбалансированный иммунный ответ связан с более легким течением заболевания, при этом важную в иммунитете COVID-19 роль играют CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки. У лиц с нарушенной регуляцией антиген-специфического ответа, например, в возрасте более 65 лет, имеющих связанный со старением дефицит наивных Т-клеток, чаще наблюдается плохой исход [18]. При анализе Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 необходимо дифференцировать ответ перекрестно-реактивных к эндемичным коронавирусам человека (HCoV) Т-клеток. Активация Т-клеток антигенами SARS-CoV-2, в зависимости от исследования, наблюдалась у 35–90% здоровых людей, чья иммунная система не встречалась с данным патогеном [7, 14, 19, 20, 25, 29]. При этом находящиеся в дыхательных путях перекрестно-реактивные Т-клетки важны для защиты от аэрозольной трансмиссии SARS-CoV-2 [11]. Кроме того, количество перекрестно-реактивных Т-клеток коррелирует с исходом инфекции после воздействия SARS-CoV-2 [13]. Т-клетки, отвечающие на SARS-CoV-2 у наивных пациентов, можно отличить от клеток после инфекции COVID-19 по профилю секреции цитокинов после стимуляции пулом пептидов SARS-CoV-2 [27]. Цитометрические анализы экспрессии цитокинов, маркеров активации или пролиферации, демонстрируют высокую чувствительность, позволяя определять истинный статус образцов [22].

Проточная цитометрия еще не достигла такой же степени стандартизации, как другие лабораторные методы. В условиях поисковых исследований не всегда проводится строгая проверка эффективности анализа. Это создает проблему при определении уровня детализации, точки отсечения, приемлемой точности и других критериев достоверности метода. В нашей работе мы описываем общий подход для оценки реактивности Т-клеток памяти человека к антигенам вируса SARS-CoV-2 с использованием проточной цитометрии.

В рамках выполненной работы нами проведено экспериментальное подтверждение пригодности метода для получения достоверных

результатов. В ходе валидационных испытаний методики по характеристикам «чувствительность» и «специфичность», для CD4 и CD8 популяций Т-клеток и обеих панелей антигенов получены значения AUC выше 0,95, что подтверждает высокую информативность метода. Пороговые значения сигнала (процентного содержания продуцентов IFN γ), обеспечивающие оптимальную чувствительность и специфичность (около 90% и выше), составили для CD4-позитивных Т-клеток 0,029%, для CD8-позитивных Т-клеток 0,064–0,068%.

Критерии приемлемости при оценке внутрилабораторной прецизионности и сходимости были нами установлены на основе перечня основополагающих специализированных работ [4, 10, 23, 28]. Сходимость и внутрилабораторная прецизионность считались приемлемыми, если %CV_{сх} и %CV_{вв} по всем образцам МКПК не превышали 20%. Оптимальную сходимость и внутрилабораторную прецизионность показал формат метода CD8/AG1 и CD8/AG2, предполагающий определение процентного содержания продуцентов IFN γ среди CD8-позитивных Т-клеток с использованием панели антигенов AG1 и AG2. Этот формат решено использовать в дальнейшем как основной при проведении рутинных анализов.

В качестве показателя робастности методики нами была выбрана стадия заморозки/разморозки образца МКПК, которая может влиять на состояние клеток и их способность продуцировать IFN γ в присутствии антигена. В ходе экспериментов робастность подтвердили, установив, что для всех образцов МКПК в свежеприготовленном виде и после цикла заморозки/разморозки результат определения значений процентного содержания CD8-позитивных Т-клеток по маркерам IFN γ был выше порогового значения, определенного при оценке чувствительности и специфичности (0,064%). Таким образом, в ходе исследований была доказана возможность использования в данном методе как свежесыводенных, так и замороженных МКПК.

Спонтанное высвобождение IFN γ в анализах было описано в литературе и было связано с образцами РВМС от доноров с повышенными уровнями предшествующей иммунной активации как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток [15]. Чтобы отличить пептид-специфические ответы в образцах РВМС от высокого неспецифического фона, мы установили подтверждающую точку отсечения для отрицательного контроля. Эта точка отсечения будет использоваться для определения специфичности пептидного ответа (если и пептидная стимуляция и отсутствие пептидной стимуляции привели к ответам). У лиц с нарушенной регуляцией антиген-

специфического ответа, например, имеющих связанный со старением дефицит наивных Т-клеток [14], возможна низкая степень активации иммунокомпетентных клеток в ответ на патоген. Чтобы подтвердить отсутствие нарушений регуляции антиген-специфического ответа мы установили подтверждающую точку отсечения для положительного контроля (не менее 0,725).

На основании описанных результатов валидации метод был признан пригодным для оценки реактивности Т-клеток памяти человека к антигенам вируса SARS-CoV-2 с использованием проточной цитометрии.

Выводы

По итогам валидации, подтверждена пригодность методики «Оценка антиген-реактивных Т-клеток, продуцирующих внутриклеточный IFN γ при воздействии на мононуклеарные клетки периферической крови человека антигенов вируса SARS-CoV-2, методом проточной цитометрии» для получения достоверных результатов при определении содержания внутриклеточного IFN γ в МКПК. Методику использовали при характеристике стандартных контрольных образцов для внутреннего контроля качества наборов ТиграТест® SARS-CoV-2.

Список литературы/References

- ГОСТ Р 5302.3-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. [State Standard P 5302.3-2008. Clinical laboratory technologies. Requirements for quality of clinical laboratory tests. Part 3. Assessment of laboratory tests clinical significance (In Russ.)]
- 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 // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2021. Т. 21, № 3. С. 178–192. [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 TigratTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit. BИOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BИOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment, 2021, vol. 21, no. 3, pp. 178–192. (In Russ.)] doi: 10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192
- РМГ 61-2010. Рекомендации по межгосударственной стандартизации. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. Москва, 2013. [State system for ensuring the uniformity of measurements. Accuracy, trueness and precision measures of the procedures for quantitative chemical analysis. Methods of evaluation. Moscow, 2013. (In Russ.)]
- Barnett D., Louzao R., Gambell P., De J., Oldaker T., Hanson C.A., ICSH/ICCS Working Group. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS — part IV — postanalytic considerations. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2013, vol. 84, pp. 309–314. doi: 10.1002/cyto.b.21107
- Bert N.L., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., Chng M., Lin M., Tan N., Linster M., Chia W.N., Chen M.I.-C., Wang L.-F., Ooi E.E., Kalimuddin S., Tambyah P.A., Low J.G.-H., Tan Y.-J., Bertoletti A. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*, 2020, vol. 584, pp. 457–462. doi: 10.1038/s41586-020-2550-z
- Beveridge N.E.R., Price D.A., Casazza J.P., Pathan A.A., Sander C.R., Asher T.E., Ambrozak D.R., Precopio M.L., Scheinberg P., Alder N.C., Roederer M., Koup R.A., Douek D.C., Hill A.V., McShane H. Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific CD4⁺ memory T lymphocyte populations. *Eur. J. Immunol.*, 2007, vol. 37, pp. 3089–3100. doi: 10.1002/eji.200737504
- Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B., Fauchere F., Baysal E., Mangold M., Henze L., Lauster R., Mall M.A., Beyer K., Röhm J., Voigt S., Schmitz J., Miltenyi S., Demuth I., Müller M.A., Hocke A., Witzenthalm M., Suttrop N., Kern F., Reimer U., Wenschuh H., Drosten C., Corman V.M., Giesecke-Thiel C., Sander L.E., Thiel A. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*, 2020, vol. 587, pp. 270–274. doi: 10.1038/s41586-020-2598-9
- Britten C.M., Janetzki S., Butterfield L.H., Ferrari G., Gouttefangeas C., Huber C., Kalos M., Levitsky H.I., Maecker H.T., Melief C.J.M., O'Donnell-Tormey J., Odunsi K., Old L.J., Ottenhoff T.H.M., Ottensmeier C., Pawelec G., Roederer M., Roep B.O., Romero P., Van der Burg S.H., Walter S., Hoos A., Davis M.M. T cell assays and MIATA: the essential minimum for maximum impact. *Immunity*, 2012, vol. 37, no. 1, pp. 1–2. doi: 10.1016/j.immuni.2012.07.010
- Chen J., Liu X., Zhang X., Lin Y., Liu D., Xun J., Wang Z., Gu L., Li Q., Yin D., Yang J., Lu H. Decline in neutralising antibody responses, but sustained T cell immunity, in COVID-19 patients at 7 months post-infection. *Clin. Transl. Immunol.*, 2021, vol. 10, no. 7: e1319. doi: 10.1002/cti2.1319
- Darrach P.A., Patel D.T., De Luca P.M., Lindsay R.W.B., Davey D.F., Flynn B.J., Hoff S.T., Andersen P., Reed S.G., Morris S.L., Roederer M., Seder R.A. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat. Med.*, 2007, vol. 13, no. 7, pp. 843–850. doi: 10.1038/nm1592
- Davis B.H., Dasgupta A., Kussick S., Han J.Y., Estrellado A., Group I.I.W. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS — part II — preanalytical issues. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2013, vol. 84, no. 5, pp. 286–290. doi: 10.1002/cyto.b.21105
- Diniz M.O., Mitsi E., Swadling L., Rylance J., Johnson M., Goldblatt D., Ferreira D., Maini M.K. Airway-resident T cells from unexposed individuals cross-recognize SARS-CoV-2. *Nat. Immunol.*, 2022, vol. 23, no. 9, pp. 1324–1329. doi: 10.1038/s41590-022-01292-1

13. Guo L., Wang G., Wang Y., Zhang Q., Ren L., Gu X., Huang T., Zhong J., Wang Y., Wang X., Huang L., Xu L., Wang C., Chen L., Xiao X., Peng Y., Knight J.C., Dong T., Cao B., Wang J. SARS-CoV-2-specific antibody and T-cell responses 1 year after infection in people recovered from COVID-19: a longitudinal cohort study. *Lancet*, 2022, vol. 3, no. 5, pp. 348–356. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00036-2
14. Kundu, R., Narean, J.S., Wang, L. Fenn J., Pillay T., Fernandez N.D., Conibear E., Koycheva A., Davies M., Tolosa-Wright M., Hakki S., Varro R., McDermott E., Hammett S., Cutajar J., Thwaites R.S., Parker E., Rosadas C., McClure M., Tedder R., Taylor G.P., Dunning J., Lalvani A. Cross-reactive memory T cells associate with protection against SARS-CoV-2 infection in COVID-19 contacts. *Nat. Commun.*, 2022, vol. 13, no. 1: 80. doi: 10.1038/s41467-021-27674-x
15. Liu A.Y., De Rosa S.C., Guthrie B.L., Choi R.Y., Kerubo-Bosire R., Richardson B.A., Kiarie J., Farquhar C., Lohman-Payne B. High background in ELISpot assays is associated with elevated levels of immune activation in HIV-1-seronegative individuals in Nairobi. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2018, vol. 6, no. 3, pp. 392–401. doi: 10.1002/iid3.231
16. Maecker H.T., Rinfret A., D'Souza P., Darden J., Roig E., Landry C., Hayes P., Birungi J., Anzala O., Garcia M., Harari A., Frank I., Baydo R., Baker M., Holbrook J., Ottinger J., Lamoreaux L., Epling C.L., Sinclair E., Suni M.A., Punt K., Calarota S., El-Bahi S., Alter G., Maila H., Kuta E., Cox J., Gray C., Altfeld M., Nougarede N., Boyer J., Tussey L., Tobery T., Bredt B., Roederer M., Koup R., Maino V.C., Weinhold K., Pantaleo G., Gilmour J., Horton H., Sekaly R.P. Standardization of cytokine flow cytometry assays. *BMC Immunol.*, 2005, vol. 6: 13. doi: 10.1186/1471-2172-6-13
17. Mateus J., Grifoni A., Tarke A., Sidney J., Ramirez S.I., Dan J.M., Burger Z.C., Rawlings S.A., Smith D.M., Phillips E., Mallal S., Lammers M., Rubiro P., Quiambao L., Sutherland A., Yu E.D., da Silva Antunes R., Greenbaum J., Frazier A., Markmann A.J., Premkumar L., de Silva A., Peters B., Crotty S., Sette A., Weiskopf D. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science*, 2020, vol. 370, no. 6512, pp. 89–94. doi: 10.1126/science.abd3871
18. Moderbacher C.R., Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jardi R.S., Marrama D., Aravinda de Silva M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 2020, vol. 181, no. 7, pp. 1489–1501.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015
19. Nelde A., Bilich T., Heitmann J.S., Maringer Y., Salih H.R., Roerden M., Lübke M., Bauer J., Rieth J., Wacker M., Peter A., Hörber S., Traenkle B., Kaiser P.D., Rothbauer U., Becker M., Junker D., Krause G., Strengert M., Schneiderhan-Marra N., Templin M.F., Joos T.O., Kowalewski D.J., Stos-Zweifel V., Fehr M., Rabsteyn A., Mirakaj V., Karbach J., Jäger E., Graf M., Gruber L.C., Rachfalski D., Preuß B., Hagelstein I., Märklin M., Bakchoul T., Gouttefangeas C., Kohlbacher O., Klein R., Stevanović S., Rammensee H.G., Walz J.S. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat. Immunol.*, 2021, vol. 22, no. 1, pp. 74–85. doi: 10.1038/s41590-020-00808-x
20. Nolan S., Vignat M., Klinger M., Dines J.N., Kaplan I.M., Svejnova E., Craft T., Boland K., Pesesky M., Gittelman R.M., Snyder T.M., Gooley C.J., Semprini S., Cerchione C., Mazza M., Delmonte O.M., Dobbs K., Carreño-Tarragona G., Barrio S., Sambri V., Robins H.S. A large-scale database of T-cell receptor beta (TCR β) sequences and binding associations from natural and synthetic exposure to SARS-CoV-2. *Research Square*, 2020. Version 1. doi: 10.21203/rs.3.rs-51964/v1
21. Ogbe A., Kronsteiner B., Skelly D.T., Pace M., Brown A., Adland E., Adair K., Akhter H.D., Ali M., Ali S.E., Angyal A., Ansari M.A., Arancibia-Carcamo C.V., Brown H., Chinnakannan S., Conlon C., de Lara C., de Silva T., Dold C., Dong T., Donnison T., Eyre D., Flaxman A., Fletcher H., Gardner J., Grist J.T., Hackstein C.P., Jaruthamsophon K., Jeffery K., Lambe T., Lee L., Li W., Lim N., Matthews P.C., Mentzer A.J., Moore S.C., Naisbitt D.J., Ogese M., Ogg G., Openshaw P., Pirmohamed M., Pollard A.J., Ramamurthy N., Rongkard P., Rowland-Jones S., Sampson O., Sreaton G., Sette A., Stafford L., Thompson C., Thomson P.J., Thwaites R., Vieira V., Weiskopf D., Zacharopoulou P.; Oxford Immunology Network Covid-19 Response T Cell Consortium; Oxford Protective T Cell Immunology for COVID-19 (OPTIC) Clinical Team; Turtle L., Klenerman P., Goulder P., Frater J., Barnes E., Dunachie S. T cell assays differentiate clinical and subclinical SARS-CoV-2 infections from cross-reactive antiviral responses. *Nat. Commun.*, 2021, vol. 12, no. 1: 2055. doi: 10.1038/s41467-021-21856-3
22. O'Hara D.M., Xu Y., Liang Z., Reddy M.P., Wu D.Y., Litwin V. Recommendations for the validation of flow cytometric testing during drug development: II assays. *J. Immunol. Methods*, 2011, vol. 363, no. 2, pp. 120–134. doi: 10.1016/j.jim.2010.09.036
23. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., Dejnirattisai W., Rostron T., Supasa P., Liu C., Lopez-Camacho C., Slon-Campos J., Zhao Y., Stuart D., Paeson G., Grimes J., Antson F., Bayfield O.W., Hawkins D.E., Ker D.S., Turtle L., Subramaniam K., Thomson P., Zhang P., Dold C., Ratcliff J., Simmonds P., de Silva T., Sopp P., Wellington D., Rajapaksa U., Chen Y.L., Salio M., Napolitani G., Paes W., Borrow P., Kessler B., Fry J.W., Schwabe N.F., Semple M.G., Baillie K.J., Moore S., Openshaw P.J., Ansari A., Dunachie S., Barnes E., Frater J., Kerr G., Goulder P., Lockett T., Levin R., Cornall R.J., Conlon C., Klenerman P., McMichael A., Sreaton G., Mongkolsapaya J., Knight J.C., Ogg G., Dong T. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol.*, 2020, vol. 21, no. 11, pp. 1336–1345. doi: 10.1038/s41590-020-0782-6
24. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E., Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J-I., Sönnnerborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S., Buggert M. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 1, pp. 158–168. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017
25. Shomuradova A.S., Vagida M.S., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Kiryukhin D., Titov A., Peshkova I.O., Khmelevskaya A., Dianov D.V., Malasheva M., Shmelev A., Serdyuk Y., Bagaev D.V., Pivnyuk A., Shcherbinin D.S., Maleeva A.V., Shakirova N.T., Pilunov A., Malko D.B., Khamaganova E.G., Biderman B., Ivanov A.V., Shugay M., Efimov G.A. SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T cell receptors. *Immunity*, 2020, vol. 53, no. 6, pp. 1245–1257. doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.004
26. Tan C.C.S., Owen C.J., Tham C.Y.L., Bertoletti A., van Dorp L., Balloux F. Pre-existing T cell-mediated cross-reactivity to SARS-CoV-2 cannot solely be explained by prior exposure to endemic human coronaviruses. *Infect. Genet. Evol.*, 2021, vol. 95: 105075. doi: 10.1016/j.meegid.2021.105075

27. Tanqri S., Vall H., Kaplan D., Hoffman B., Purvis N., Porwit A., Hunsberger B., Shankey T.V., Group I.I.W. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS — part III — analytical issues. *Cytometry B. Clin. Cytom.*, 2013, vol. 84, no. 5, pp. 291–308. doi: 10.1002/cyto.b.21106
28. Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., van den Akker J.P.C., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Haagmans B.L., de Swart R.L., Sette A., de Vries R.D. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 48: eabd2071. doi: 10.1126/sciimmunol.abd2071
29. Zweig M.H., Campbell G. Receiver-operating characteristics (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.*, 1993, vol. 39, no. 4, pp. 561–577. doi: 10.1093/clinchem/39.4.561

Авторы:

Стрижакова О.М., к.в.н., научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Першин А.С., к.в.н., научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Казаров А.А., старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Лягоскин И.В., к.б.н., руководитель отдела аналитических методов департамента фармацевтического анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Бахарева Я.А., химик лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Васильев А.П., младший научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Никонова Ю.А., научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Егорова И.Ю., руководитель группы диагностических тест-систем Отдела молекулярной диагностики Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Шукуров Р.Р., к.б.н., директор департамента фармацевтического анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Хамитов Р.А., д.м.н., профессор, вице-президент по исследованиям и разработкам АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия.

Authors:

Strizhakova O.M., PhD (Veterinary), Researcher, Laboratory of Biological Methods, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;

Pershin A.S., PhD (Veterinary), Researcher, Laboratory of Biological Methods, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;

Kazarov A.A., Senior Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;

Lyagoskin I.V., PhD (Biology), Head of the Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;

Bahareva Ya.A., Chemist, Laboratory of Biological Methods, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;

Vasil'ev A.P., Junior Researcher, Laboratory of Biological Methods, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;

Nikonova Yu.A., Researcher, Laboratory of Biological Methods, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;

Egorova I.Yu., Head of the Group of Diagnostic Test Systems, Division of Molecular Diagnostics, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;

Shukurov R.R., PhD (Biology), Director of the Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

Khamitov R.A., DSc (Medicine), Professor, Vice President of Research and Development, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.12.2022
Отправлена на доработку 19.03.2023
Принята к печати 21.06.2023

Received 07.12.2022
Revision received 19.03.2023
Accepted 21.06.2023