

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

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.

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

**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.

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

Kazarov A.A.

Lyagoskin I.V.

Bahareva Y.A.

Nikonova Y.A.

Vasil'ev A.P

Egorova I.Yu.

Shukurov R.R.

Khamitov R.A.

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

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

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 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.

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

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 внутриклеточный 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.

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

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

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. AUC level was determined. The predictive value of the method was considered acceptable when AUC was greater than 0.7. Precision was considered acceptable if the coefficient of variation did not exceed 20%. Robustness was confirmed for frozen and freshly prepared PBMC samples.

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 TigraTest® SARS-CoV-2 kits.

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

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

1 **Введение.**

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

8 Клинические проявления SARS-CoV-2 варьируют от бессимптомной
9 инфекции до тяжелой дыхательной недостаточности. Механизмы, которые
10 определяют особенности течения болезни, остаются до конца невыясненными.
11 Есть основания полагать, что наличие иммунного ответа, в котором
12 задействованы Т-клетки памяти, является ключевым звеном в формировании
13 устойчивого защитного иммунитета в отношении SARS-CoV-2 [3,5,7,14,28].
14 Кроме того, специфичный к SARS-CoV-2 Т-клеточный иммунный ответ
15 сохраняется после элиминации нейтрализующих антител в течение по крайней
16 мере 12 месяцев [6,10]. В связи с этим, проведение мониторинга не только
17 гуморального, но и Т-клеточного популяционного иммунитета к вирусу
18 COVID-19 следует считать необходимым элементом эпидемиологического
19 надзора в условиях пандемии.

20 Существует ряд методов, которые позволяют измерять
21 иммунологические биомаркеры в материале, полученном из венозной крови –
22 ткани, наиболее доступной для иммунологического исследования в
23 клинических испытаниях [5,13]. Для выявления иммунологических
24 биомаркеров в форме экспрессированных цитокинов хорошо зарекомендовал
25 себя метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS), применяемый к
26 стимулированным мононуклеарным клеткам периферической крови (МКПК)
27 с последующим проточным цитометрическим анализом. Внутриклеточное
28 окрашивание цитокинов, в отличие от альтернативных подходов (ELISpot или
29 ELISA), позволяет обнаруживать специфическое подмножество клеток-

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

30 респондеров (например, CD4- или CD8-положительные Т-клетки), выявлять
31 ассоциированные маркеры дифференцировки (например маркеры фенотипа
32 памяти или состояния активации), проводить функциональные тесты
33 (например, регистрировать продукцию цитокинов, маркеров цитотоксичности
34 и т.д.), детектируя одновременно экспрессию нескольких
35 цитокинов/хемокинов и маркеров пролиферации. Современные
36 многопараметрические инструменты позволяют одновременно измерять
37 экспрессию многих маркеров [3, 7].

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

43 Материалы и методы.

44 *Добровольцы, участвующие в исследовании. Образцы крови.*

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

52 Образцы крови отбирали венепункцией в условиях процедурного
53 кабинета АО «ГЕНЕРИУМ» в период с апреля по июль 2021 г. в пгт.
54 Вольгинский Владимирской области (Россия). От каждого донора было
55 получено добровольное информированное согласие на отбор образцов крови
56 и включение результатов их анализа в данное исследование. Проведение

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

57 исследования было одобрено локальным независимым этическим комитетом
58 при АО «ГЕНЕРИУМ» (протокол № 01 от 11.11.2020). У переболевших
59 COVID-19 кровь отбирали в интервале от 1 до 10 мес. после исчезновения
60 симптомов заболевания или наличия отрицательного теста ПЦР.

61 *Выделение мононуклеарных клеток периферической крови и приготовление*
62 *рабочих суспензий.*

63 Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли
64 методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$)
65 (НПП "ПанЭко", Россия) не позднее чем через 1 ч после забора крови. Подсчёт
66 клеток, проводили с использованием счетчика клеток – NucleoCounter® NC-
67 100. Готовили рабочую суспензию клеток МКПК с концентрацией $5,0 \times 10^6$
68 кл/мл и вносили в каждую лунку планшета по $5,0 \times 10^5$ МКПК (оптимальное
69 количество) в среде ADCF-Mab® (HyClone, США) в объеме 100 мкл либо
70 замораживали

71 *Криоконсервация.*

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

81 *Размораживание МКПК.*

82 Криопробирку с клетками размораживали на водяной бане при
83 температуре $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$. Содержимое криоампул переносили в пробирку,
84 содержащую 5,0 мл среды для постановки теста. Центрифугировали при 400 g

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

85 мин при температуре (20 ± 5) °С. Осадок клеток ресуспендировали в 1,0 мл
86 среды для постановки теста и определяли их количество и жизнеспособность
87 с помощью счетчика клеток. Готовили рабочую суспензию МКПК для
88 проведения анализа по живым клеткам.

Антигены и контроли.

90 В качестве антигенов для стимуляции специфических Т-клеток
91 использовали пептиды, соответствующие основным белковым антигенам
92 коронавируса SARS-CoV-2: панель антигенов №1 (АГ1, пептиды S-белка) и
93 антигенов №2 (АГ2, пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a). Пептиды,
94 соответствующие основным белковым антигенам коронавируса SARS-CoV-2
95 для стимуляции специфических Т-клеток, были выбраны на основе
96 публикаций, идентифицировавших репертуар и встречаемость различных
97 эпитопов для TCR у пациентов и конвалесцентов COVID-19. С помощью
98 биоинформатического анализа были в основном исключены эпитопы,
99 могущие давать значительную кросс-реактивность с Т-клеточными эпитопами
100 так называемых простудных коронавирусов штаммов OC43, NL63, 229E,
101 HKU1. Для выбора оптимального набора пептидов, учитывая
102 распространенность TCR эпитопов и их соответствие генотипам HLA в
103 человеческой популяции использовали следующие работы и базы данных: [2;
104 14;18;21;22;23].

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

Процедура анализа.

111 Планшеты инкубировали при температуре (37 ± 1) °С, содержание CO₂
112 $(5,0 \pm 0,5)\%$ и влажности 95% в течение 16-24 часов. По окончании инкубации
113 в каждую из лунок вносили по 10 мкл рабочего раствора ингибитора

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

114 транспорта белков в среде ADCF-Mab[®] (HyClone, США) из расчета 1 мкл
115 ингибитора на 1×10^6 клеток. Инкубировали 4 часа при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$
116 в атмосфере $(5,0 \pm 0,5)\%$ CO₂, влажности 95%.

117 По окончании инкубации МКПК два раза отмывали фосфатно-солевым
118 буферным раствором, осаждая центрифугированием в течение 5 минут при
119 500 g и температуре $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$. Вносили раствор реагента Fixable Viability
120 Stain 510 (BD Biosciences, США) в PBS (1 мкл реагента на 1×10^6 клеток).
121 Инкубировали в течение (9 ± 2) мин при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Клетки
122 отмывали два раза фосфатно-солевым буферным раствором, осаждая
123 центрифугированием при 500 g и температуре $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$.

124 В лунки с МКПК вносили реагенты для иммунофенотипирования -
125 мышинные антитела против человеческого CD3 меченые PerCP-Cy[™] 5.5 (клон
126 UCNT1); мышинные антитела против человеческого CD4 меченые PE (клон
127 RPA-T4); мышинные антитела против человеческого CD8 меченые BV515
128 (клон RPA-T8) до финального разведения 1:150 в FACS буфере с добавлением
129 раствора для блокирования неспецифического связывания с Fc-рецепторами
130 клеток (Fc Block, BD Biosciences, США) в соотношении 1:100. Инкубировали
131 планшет в течение (30 ± 5) мин при температуре $(5 \pm 2) ^\circ\text{C}$. По окончанию
132 инкубации клетки трижды отмывали FACS буфером, осаждая клетки
133 центрифугированием при 500 g и температуре $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

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

138 Клетки МКПК однократно отмывали рабочим раствором для
139 пермеабелизации и отмывки (Perm/Wash, BD Biosciences, США) и
140 ресуспендировали в растворе Perm/Wash. Инкубировали в течение (20 ± 2) мин
141 при температуре $(5 \pm 2) ^\circ\text{C}$. После инкубации клетки осаждали и вносили
142 (кроме неокрашенной пробы и FMO контроля по IFN- γ) реагент для

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

143 определения IFN- γ (мышинные антитела, специфичные к человеческому IFN- γ
144 меченые BV421, клон B27) до финального разведения 1:100. Инкубировали в
145 течение (30 ± 5) мин при температуре (5 ± 2) °C. После инкубации дважды
146 отмывали клетки раствором для пермеабилзации, осаждая
147 центрифугированием при 500 g и температуре (5 ± 2) °C. Осадок
148 ресуспендировали в растворе Perm/Wash.

149 *Обработка результатов анализа.*

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

153 Оптимальные значения интенсивности флуоресценции (MFI) (для
154 каждого из флуорохромов в панели PerCP-CyTM5.5; PE; BV515 BV421), были
155 получены методом титрования напряжений с измерением индекса
156 окрашивания (Stain Index) до достижения максимального разделения
157 позитивной и негативной популяций. Целевой диапазон MFI для каждого
158 флуоресцентного канала был установлен с использованием среднего значения
159 MFI \pm два стандартных отклонения.

160 Для ежедневной настройки прибора перед сбором обработанных
161 образцов был проведен ряд шагов по стандартизации. Сначала были запущены
162 Cytometer Setup и Tracking beads (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния), и
163 настройки были применены к эксперименту. Затем напряжения на
164 фотоэлектронном умножителе были отрегулированы так, чтобы они попадали
165 в заданный целевой диапазон MFI.

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

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

171 При выполнении цитометрического анализа использовали следующий
172 порядок гейтирования – из целевой популяции клеток выделяли живые клетки,
173 затем выделяли CD3-положительную популяцию, затем CD4- и CD8-
174 позитивные клетки, среди которых выделяли Т-клетки, позитивные по
175 маркерам IFN- γ . Для достоверности получаемых данных в живых клетках
176 регистрировали не менее 20000 событий.

177

178 **Рисунок 1. Порядок выделения целевых популяций Т-клеток МПКП:**

179 **А – выделение клеточной популяции;**

180 **Б – выделение популяций живые/мертвые;**

181 **В – выделение популяции CD3;**

182 **Г – выделение популяции CD4- и CD8-позитивных клеток;**

183 **Д – выделение популяции CD4-IFN- γ -позитивных клеток;**

184 **Е – выделение популяции CD8-IFN- γ –позитивных клеток.**

185 **Figure 1. Flow cytometry gating strategy for PBMC T cells:**

186 **A – cells;**

187 **B – live/dead;**

188 **V – CD3 positive;**

189 **Г – CD4+ и CD8+;**

190 **Д – CD4-IFN- γ -positive;**

191 **Е – CD8-IFN- γ -positive.**

192 **Результаты исследований.**

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

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

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

- 200 – положительные - МКПК от 18 доноров, переболевших COVID-19, с
201 диагнозом, верифицированным лабораторными методами (ПЦР, ИФА),
202 и 1 донора, привитого вакциной «Спутник V» (АО «ГЕНЕРИУМ»);
203 – отрицательные - мононуклеарные клетки периферической крови,
204 отобранные от 9 доноров с отрицательным анамнезом, не
205 контактировавших с больными COVID-19, с отсутствием антител к
206 антигенам SARS-CoV-2 (по результатам ИФА).

207 При исследовании материала от интактных и переболевших доноров с
208 использованием панелей АГ1 и АГ2 антигенов вируса SARS-CoV-2,
209 определяли процентное содержание продуцентов IFN γ среди CD4 и CD8-
210 позитивных Т-клеток. Далее применяли ROC-анализ [26; 27] и определяли для
211 каждой из двух популяций значения AUC (площади, ограниченной ROC-
212 кривой и осью ложноположительных классификаций). Информативность
213 метода считалась приемлемой при условии, что AUC составляла не менее 0,7.

214 Результаты оценки приведены в таблицах 1-2 и на рисунках 2-3.

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

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

222

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

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

226 **Table 2. ROC analysis results (i.e., evaluation of assay threshold to optimize**
227 **sensitivity and specificity).**

228

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

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

237

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

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

245 Для исследования прецизионности методики использовали образцы
246 МКПК от трех доноров - двух переболевших и одного вакцинированного.
247 Прецизионность оценивали на двух уровнях - сходимость и
248 внутрилабораторная прецизионность.

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

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

253 Для оценки сходимости отдельно в каждом АЦ вычисляли дисперсию
254 значений процентного содержания продуцентов IFN- γ , полученных при
255 повторных измерениях каждого образца МКПК. Значения дисперсии
256 усредняли между АЦ и операторами (полученное значение далее в тексте
257 обозначается как $V_{сх}$) и вычисляли коэффициент вариации сходимости
258 ($\%CV_{сх}$) как отношение квадратного корня усреднённой дисперсии к
259 среднему значению процентного содержания продуцентов IFN- γ для каждого
260 образца МКПК (далее в тексте обозначается как M).

261 Для оценки внутрилабораторной прецизионности в каждом АЦ
262 вычисляли значения процентного содержания продуцентов IFN- γ ,
263 усреднённые по повторным измерениям каждого образца МКПК. Далее
264 вычисляли стандартное отклонение между усреднёнными результатами
265 каждого АЦ (далее в тексте обозначается как $V_{мц}$). Коэффициент вариации
266 внутрилабораторной прецизионности ($CV_{вв}$) вычисляли по формуле [29]:

$$267 \quad \%CV_{вв} = \frac{\sqrt{V_{мц} + \left(1 - \frac{1}{N}\right) V_{сх}}}{M}$$

268 где N – количество измерений образца в пределах АЦ, остальные условные
269 обозначения см. в тексте.

270 Полученные значения приведены в таблице 3.

271 **Таблица 3. Результаты оценки сходимости и внутрилабораторной**
272 **прецизионности.**

273 **Table 3. Repeatability and intermediate precision assessment**

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

274 Для оценки криостабильности образцы МКПК от 3-х доноров
275 анализировали в свежеприготовленном виде и после однократного цикла
276 заморозки/разморозки. Анализ проводили только в формате CD8/АГ1.
277 Полученные результаты приведены в таблице 4.

278

279 **Таблица 4. Результаты оценки криостабильности МКПК как показателя**
280 **робастности методики.**

281 **Table 4. Comparison of frozen and freshly prepared PBMCs samples.**

282

283 В качестве дополнения, был выполнен расчёт критериев приемлемости
284 для показателей отклика положительного и отрицательного контрольных
285 антигенов, используемых в анализе (см. таблицу 5). Для этого значения
286 отклика, полученные в опытах по оценке чувствительности и специфичности
287 (см. выше) были логарифмированы по основанию 10. Для них были
288 вычислены среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD).
289 Значения критериев приемлемости, как предельные значения отклика (L),
290 обеспечивающие ожидаемую частоту сбоев не выше 5%, были вычислены по
291 формулам:

292 Для отрицательного контроля – $L(-) \leq 10^{M+2SD}$

293 Для положительного контроля – $L(+) \geq 10^{M-2SD}$

294

295 **Таблица 5. Расчёт критериев приемлемости для показателей отклика**
296 **положительного и отрицательного контрольных антигенов.**

297 **Table 5. Evaluation of acceptance criteria for positive and negative control**
298 **response.**

299

300 **Обсуждение**

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

301 Сбалансированный иммунный ответ связан с более легким течением
302 заболевания, при этом важную в иммунитете COVID-19 роль играют CD4+ и
303 CD8+ Т-клетки. У лиц с нарушенной регуляцией антиген-специфического
304 ответа, например, в возрасте более 65 лет, имеющих связанный со старением
305 дефицит наивных Т-клеток, чаще наблюдается плохой исход [15]. При анализе
306 Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 необходимо дифференцировать ответ
307 перекрестно-реактивных к эндемичным коронавирусам человека (HCoV)
308 Т-клеток. Активация Т-клеток антигенами SARS-CoV-2, в зависимости от
309 исследования, наблюдалась у 35–90% здоровых людей, чья иммунная система
310 не встречалась с данным патогеном [2, 5,16,17,22,26]. При этом, находящиеся
311 в дыхательных путях перекрестно-реактивные Т-клетки важны для защиты от
312 аэрозольной трансмиссии SARS-CoV-2 [9]. Кроме того, количество
313 перекрестно-реактивных Т-клеток коррелирует с исходом инфекции после
314 воздействия SARS-CoV-2 [11]. Т-клетки отвечающие на SARS-CoV-2 у
315 наивных пациентов можно отличить от клеток после инфекции COVID-19 по
316 профилю секреции цитокинов после стимуляции пулом пептидов SARS-CoV-
317 2 [24]. Цитометрические анализы экспрессии цитокинов, маркеров активации
318 или пролиферации, демонстрируют высокую чувствительность, позволяя
319 определять истинный статус образцов [19].

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

328 В рамках выполненной работы нами проведено экспериментальное
329 подтверждение пригодности метода для получения достоверных результатов.

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

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

338 Критерии приемлемости, при оценке внутрилабораторной
339 прецизионности и сходимости, были нами установлены на основе перечня
340 основополагающих специализированных работ [1,8,20,25]. Сходимость и
341 внутрилабораторная прецизионность считались приемлемыми, если %CV_{сх} и
342 %CV_{вв} по всем образцам МКПК не превышали 20%. Оптимальную
343 сходимость и внутрилабораторную прецизионность показал формат метода
344 CD8/АГ1 и CD8/АГ2, предполагающий определение процентного содержания
345 продуцентов IFN γ среди CD8-позитивных Т-клеток с использованием панели
346 антигенов АГ1 и АГ2. Этот формат решено использовать в дальнейшем как
347 основной при проведении рутинных анализов.

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

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

358 Спонтанное высвобождение IFN- γ в анализах было описано в литературе
359 и было связано с образцами РВМС от доноров с повышенными уровнями
360 предшествующей иммунной активации как CD4+, так и CD8+ Т-клеток [12].
361 Чтобы отличить пептид-специфические ответы в образцах РВМС от высокого
362 неспецифического фона, мы установили подтверждающую точку отсечения,
363 для отрицательного контроля. Эта точка отсечения будет использоваться для
364 определения специфичности пептидного ответа (если и пептидная стимуляция
365 и отсутствие пептидной стимуляции привели к ответам). У лиц с нарушенной
366 регуляцией антиген-специфического ответа, например, имеющих связанный
367 со старением дефицит наивных Т-клеток [2] возможна низкая степень
368 активации иммунокомпетентных клеток в ответ на патоген. Чтобы
369 подтвердить отсутствие нарушений регуляции антиген-специфического
370 ответа мы установили подтверждающую точку отсечения для положительного
371 контроля (не менее 0,725).

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

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

РИСУНКИ

Рисунок 1. Порядок выделения целевых популяций Т-клеток МПКП:

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.

Figure 1. Flow cytometry gating strategy for PBMCs T cells:

A- cells;

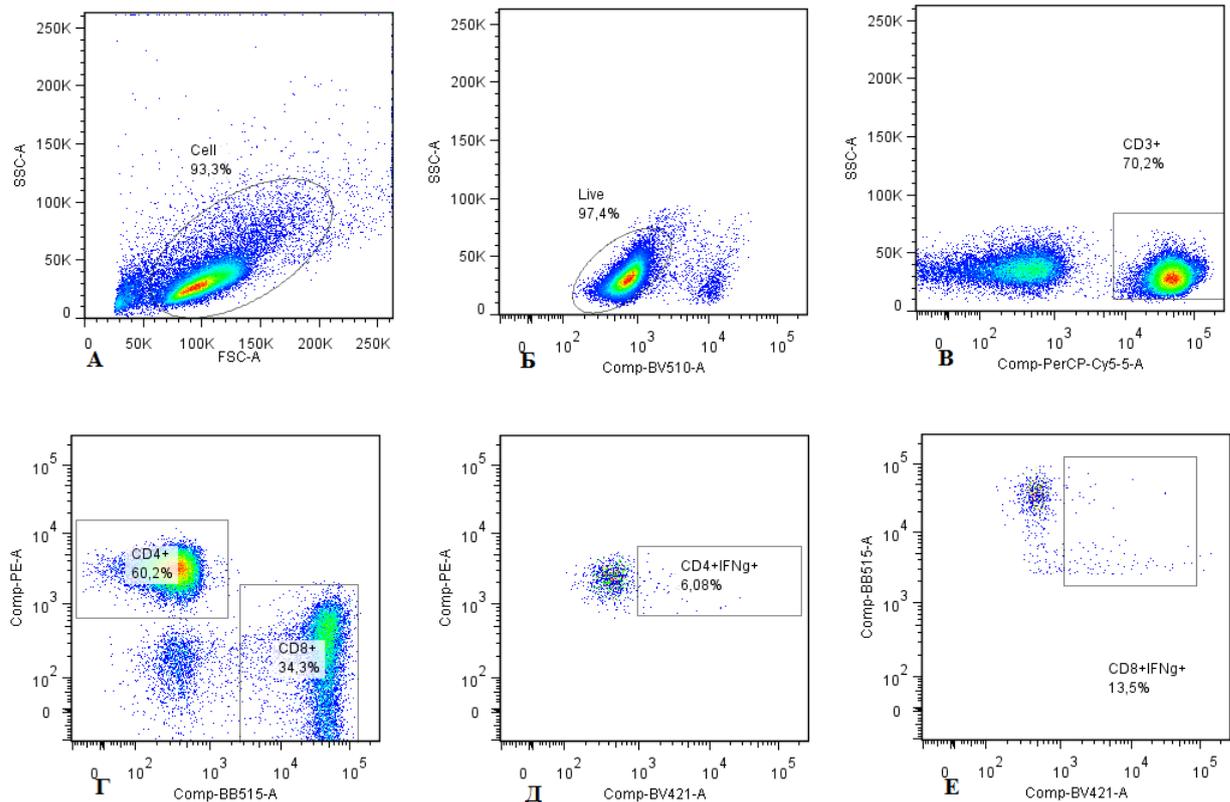
Б –live/dead;

В –CD3 positive;

Г –CD4+ и CD8+;

Д –CD4-IFN- γ -positive;

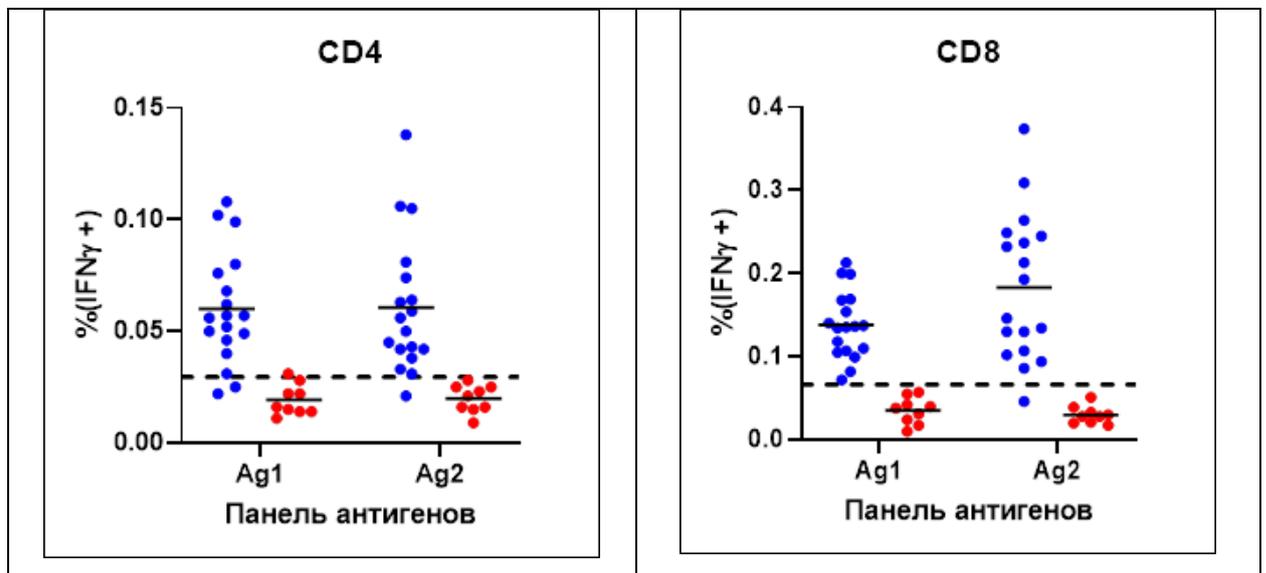
Е –CD8-IFN- γ -positive.



T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

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 (синие маркеры) и неиммунных (красные маркеры) доноров с использованием панелей АГ1 и АГ2 антигенов вируса SARS-CoV-2.

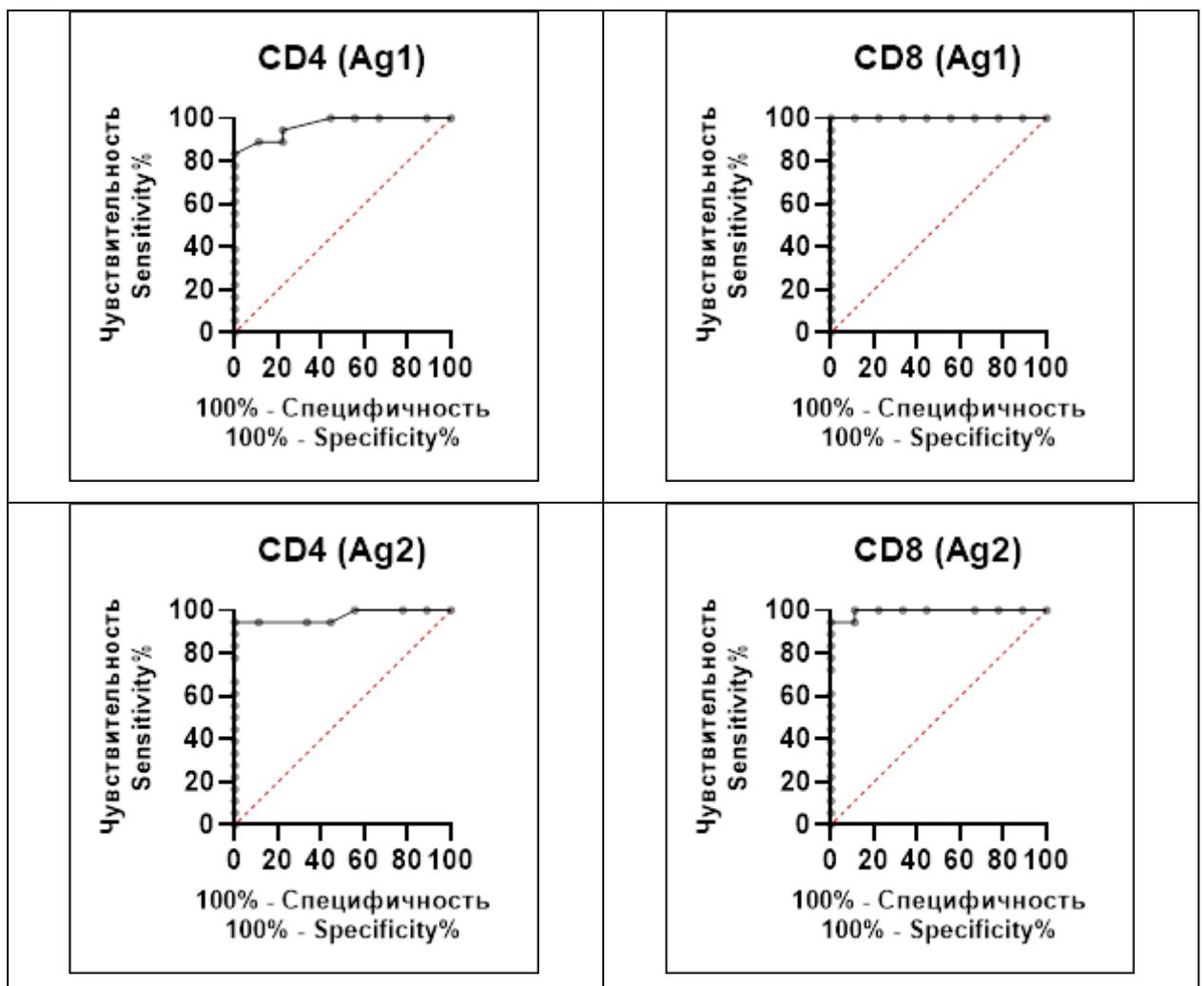
Figure 2. The percentage of IFN- γ producing CD4 (left) and CD8 (right) T-cells among immune (blue dots) and non-immune (red dots) donor-derived PBMC samples incubated with SARS-CoV-2 antigen panels (Ag1 and Ag2).



T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

Рисунок 3. ROC-кривые, полученные при исследовании процентного содержания 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).



ТАБЛИЦЫ

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

Table 1. The percentage of IFN-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 \div 0.108	0.021 \div 0.138	0.072 \div 0.213	0.046 \div 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 \div 0.031	0.009 \div 0.028	0.010 \div 0.057	0.017 \div 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%

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

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% д.и.) 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

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

Таблица 3. Результаты оценки сходимости и внутрилабораторной прецизионности.**Table 3. Repeatability and intermediate precision assessment.**

Популяция Т-клеток T-cell population	CD4+		CD8+	
Панель антигенов Antigen panel	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
Популяция Т-клеток T-cell population	CD4+		CD8+	
Панель антигенов Antigen panel	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
Популяция Т-клеток T-cell population	CD4+		CD8+	
Панель антигенов Antigen panel	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

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

Таблица 4. Результаты оценки криостабильности МКПК как показателя робастности методики.

Table 4. Comparison of frozen and freshly prepared PBMCs samples.

<i>Донор МКПК PBMCs donor</i>	<i>Статус образца МКПК PBMCs sample</i>	<i>Р е з у л ь т а т R e s u lt</i>	<i>Превышает пороговое значение (0,064%)? Does it exceed the threshold? (0,064%)?</i>
<i>1</i>	Свежеприготовленный Freshly prepared	0, 2 0 0	Да Yes
	Замороженный Frozen	0, 2 3 3	Да Yes
<i>2</i>	Свежеприготовленный Freshly prepared	0, 1 6 8	Да Yes
	Замороженный Frozen	0, 1 7 3	Да Yes
<i>3</i>	Свежеприготовленный Freshly prepared	0, 1 9 9	Да Yes
	Замороженный Frozen	0, 1 4 7	Да Yes
<i>Донор МКПК PBMC donor</i>	<i>Статус образца МКПК PBMC sample</i>	<i>Результат Result</i>	<i>Превышает пороговое значение (0,064%)? Does it exceed a threshold? (0.064%)?</i>
<i>1</i>	Свежеприготовленный	0,200	Да Yes

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	Freshly prepared		
	Замороженный Frozen	0,233	Да Yes
2	Свежеприготовленны й Freshly prepared	0,168	Да Yes
	Замороженный Frozen	0,173	Да Yes
3	Свежеприготовленны й Freshly prepared	0,199	Да Yes
	Замороженный Frozen	0,147	Да Yes

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

Таблица 5. Расчёт 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	-2.000 ÷ -1.367	-0.120 ÷ 0.780
Усреднённый логарифмированный отклик Averaged log-response	-1.659	0.351
Стандартное отклонение Standart deviation	0.216	0.246
Вычисленное значение критерия приемлемости Acceptance criterion	Не более 0.059 ≤ 0.059	Не менее 0.725 ≥ 0.725

	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	-2.000 ÷ -1.367	-0.120 ÷ 0.780
Усреднённый логарифмированный отклик Averaged log-response	-1.659	0.351
Стандартное отклонение Standard deviation	0.216	0.246
Вычисленное значение критерия приемлемости Acceptance criterion	Не более 0.059 ≤ 0.059	Не менее 0.725 ≥ 0.725

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ**Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку**

Першин А.С. – научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», к.в.н.

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

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

Correspondence address: Pershin Andrey Sergeevitch, 601125, Russia, pos. Volginsky, st. Vladimirskaya, 14, JSC "GENERIUM". Tel.: +7 495 988 47 94.

E-mail: aspershin@generium.ru

Блок 2. Информация об авторах

Стрижакова О.М. – научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», к.в.н.

Strizhakova O.M. – Researcher of the Laboratory of Biological Methods, the Analytical Methods Division of the Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Ph.D.

Казаров А.А. – старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ»

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

Kazarov A.A. – Senior Researcher of the Laboratory of Immunochemistry, the Analytical Methods Division of the Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM"

Лягоскин И.В. – Руководитель 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.

Бахарева Я.А. – химик лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ»

Bahareva Y.A. - chemist of the Laboratory of biological methods, the Analytical Methods Division of the Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM"

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

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

Васильев А.П. – младший научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», к.в.н.

Vasil'ev A.P.– Junior researcher of the Laboratory of Biological Methods, the Analytical Methods Division of the Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Ph.D.

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.

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

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

Хамитов Р.А. Вице-президент по исследованиям и разработкам АО «ГЕНЕРИУМ», д.м.н., профессор.

Khamitov R.A. Vice President of Research and Development JSC GENERIUM, Dr. Sci. (Med.), Professor.

Блок 3. Метаданные статьи

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

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

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

РЕАКТИВНОСТЬ Т-КЛЕТОК К SARS-COV-2

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

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

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

Оригинальные статьи

Количество страниц текста – 19, количество таблиц – 5, количество рисунков – 3.

РЕАКТИВНОСТЬ Т-КЛЕТОК К SARS-COV-2

10.15789/2220-7619-OAV-2084

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

Дата поступления. 07.12.2022

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 DOI
1.	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. <i>Cytometry B Clin Cytom.</i> 2013. vol.84, pp. 309-314.	-	DOI: 10.1002/cyto.b.21107
2.	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. MI-C., Wang L-F., Ooi E.E., Kalimuddin S., Tambyah P.A., Low J.G-H., Tan Y-J., Bertoletti A. SARS-CoV-2-	-	DOI: 10.1038/s41586-020-2550-z

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. Nature. 2020. vol. 584, pp. 457-462.		
3.	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,1 and Helen McShane1. 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
4.	Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B.,	-	DOI: 10.1038/s41586-020-2598-9

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	Fauchere F., Baysal E., Mangold M., Henze L., Lauster R., Mall M.A., Beyer K., Röhmel J., Voigt S., Schmitz J., Miltenyi S., Demuth I., Müller M.A., Hocke A., Witzenrath M., Suttorp 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.		
5.	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	-	DOI: 10.1016/j.immuni.2012.07.010

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	S.H., Walter S., Hoos A., Davis M.M. T cell assays and MIATA: the essential minimum for maximum impact. Immunity. 2012 vol. 37. pp. 1–2.		
6.	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 Tcell immunity, in COVID-19 patients at 7 months post-infection. Clin. Transl. Immunology. 2021. vol. 10. pp. 1-9.	-	DOI:/10.1002/cti2.1319
7.	Darrah 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	-	DOI: 10.1038/nm1592

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	against <i>Leishmania major</i> . <i>Nat. Med.</i> 2007. vol. 13. pp. 843–850.		
8.	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. <i>Cytometry Part B (Clinical Cytometry)</i> 2013. pp. 286–290.	-	DOI: 10.1002/cyto.b.21105
9.	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. <i>Nat. Immunol.</i> 2022. vol. 23. pp. 1324–1329.	-	DOI: 10.1038/s41590-022-01292-1
10.	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,	-	DOI:10.1016/S2666-5247(22)00036-2

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	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. The Lancet. vol. 3, no 5. 2022. pp. 348-356.		
11.	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	-	DOI:10.1038/s41467-021-27674-x

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	COVID-19 contacts. Nat. Commun. 2022. vol. 13., no. 80.		
12.	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. pp.392–401.	-	DOI: 10.1002/iid3.231.
13.	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.,	-	DOI: 10.1186/1471-2172-6-13.

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	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.		
14.	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	-	DOI: 10.1126/science.abd387 1

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	unexposed humans. <i>Science</i> . 2020. vol. 370. pp. 89-94.		
15.	Moderbacher C.R., Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., , Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi 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. <i>Cell</i> (2020) 181(7):1489–501.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015	-	DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.015
16.	Nelde A., Bilich T., Heitmann J.S., Maringer Y., Salih HR, Roerden M., Lübke M., Bauer J., Rieth J., Wacker M., Peter A., Hörber S., Traenkle B., Kaiser	-	DOI: 10.1038/s41590-020-00808-x.

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	<p>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. pp. 74–85.</p>		
17.	<p>Nolan S., Vignal, M., Klinger M., Dines J. N., Kaplan I. M., Svejnoha E., Craft T., Boland K., Pesesky M., Gittelman R.M., Snyder T.M., Gooley C.J., Semprini S.,</p>	-	DOI: 10.21203/rs.3.rs-51964/v1

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	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.		
18.	Ogbe A., Kronsteiner B., Skelly D.T., Pace M., Brown A., Adland E., Adair K., Akhter H.D., Ali M., Serat-E Ali, Angyal A., Ansari M.A., Arancibia-Cárcamo 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., James T. Grist, Hackstein C.P., Jaruthamsophon K., Jeffery K., Lambe	-	DOI: 10.1038/s41467-021-21856-3.

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	T., Lian Lee, Wenqin Li, Nicholas Lim, Philippa C. Matthews, Alexander J. Mentzer, Shona C. Moore, Dean J. Naisbitt, Monday Ogese, Graham Ogg, Peter Openshaw, Munir Pirmohamed, Andrew J. Pollard, Ramamurthy N, Rongkard P., Rowland-Jones S., Sampson O., Screatton G., Sette A., Stafford L., Thompson C., Thomson P.J., Thwaites R., Vieira V., Weiskopf D., Zacharopoulou P.. T cell assays differentiate clinical and subclinical SARS-CoV-2 infections from cross-reactive antiviral responses. Nat. Commun. 2021. Vol. 12. pp. 1-14.		
19.	O'Hara D.M., Xu Y., Liang Z., Reddy M.P., Wu D.Y., Litwin V. Recommendations for the validation of	-	DOI: 10.1016/j.jim.2010.09.036.

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	flow cytometric testing during drug development: II assays. J. Immunol. Methods. 2011. Vol. 363. pp. 120-134.		
20.	Peng Y, Mentzer AJ, 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 OW, Hawkins DE, Ker DS, Turtle L, Subramaniam K, Thomson P, Zhang P, Dold C, Ratcliff J, Simmonds P, de Silva T, Sopp P, Wellington D, Rajapaksa U, Chen YL, Salio M, Napolitani G, Paes W, Borrow P, Kessler B, Fry JW, Schwabe NF, Semple MG, Baillie KJ, Moore S, Openshaw PJ, Ansari A, Dunachie S, Barnes E, Frater J, Kerr G, Goulder P, Lockett T, Levin R, Cornall RJ, Conlon	-	DOI: 10.1038/s41590-020-0782-6.

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	C, Klenerman P, McMichael A, Screaton G, Mongkolsapaya J, Knight JC, 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. pp. 1336–1345.		
21.	Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, 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., Sönerborg 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	-	DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.017

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	Cell Immunity in Convalescent Individuals With Asymptomatic or Mild COVID-19. Cell. 2020. vol. 183(1). pp. 158–168.		
22.	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(6). pp. 1245–1257.	-	DOI: 10.1016/j.immuni.2020.11.004

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

23.	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. <i>Infect. Genet. Evol.</i> 2021. vol. 95.	-	DOI: 10.1016/j.meegid.2021.105075
24.	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. <i>Cytometry B. Clin. Cytom.</i> 2013. vol. 84. pp. 291-308.	-	DOI: 10.1002/cyto.b.21106.
25.	Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., Johannes Van den Akker R.M., Koopmans M.P.G. Eric van Gorp	-	DOI: 10.1126/sciimmunol.abd2071.

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	C.M., Haagmans B.L., Rik de Swart L., Sette A., R.D. de Vries. Phenotype and Kinetics of SARS-CoV-2-Specific T Cells in COVID-19 Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome. <i>Sci. Immunol.</i> 2020. Vol. 5 (48).		
26.	Zweig M.H., Campbell G. Receiver-Operating Characteristics (ROC) Plots: A Fundamental Evaluation Tool in Clinical Medicine. <i>Clin. Chem.</i> 1993. vol. 39(4). pp. 561-577.	-	DOI: 10.1093/clinchem/39.4. 561
27.	ГОСТ Р 5302.3-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности	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 Russian).	https://docs.cntd.ru/document/1200072565

T-CELLS REACTIVITY TO SARS-COV-2

	лабораторных тестов. Стр. 11, раздел 5.6.		
28.	Потеряев Д. А., Аббасова С. Г., Игнатъева 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. сс. 178–192	Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit Poteryaev D.A., Abbasova S.G., Ignatyeva P.E., Strizhakova O.M., Kolesnik S.V., Khamitov R.A. BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2021. vol. 21(3). pp. 178–192.	DOI: 10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192
29.	РМГ 61-2010. Рекомендации по межгосударственной стандартизации. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности,	State system for ensuring the uniformity of measurements. Accuracy, trueness and precision measures of the procedures for quantitative chemical	https://docs.cntd.ru/document/1200094703

	прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. Москва. 2013	analysis. Methods of evaluation. Moscow. 2013 (in Russian).	
--	---	--	--