

СОПОСТАВЛЕНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2

Афридонова З. Э.¹,

Топтыгина А. П.^{1,4}

Боголюбова А. В.²

Семикина Е. Л.^{3,5}

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора

²ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

³ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

⁴Кафедра иммунологии Биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

⁵Кафедра педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова» Минздрава России.

**COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR EVALUATION
CELLULAR IMMUNITY TO THE SARS-CoV-2 VIRUS**

Afridonova Z. E.^a,

Toptygina A. P.^{a,d},

Bogolyubova A. V.^b,

Semikina E. L.^{c,e}

^aG.N.Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology,
Moscow, Russia.

^bNational Research Center for Hematology, Moscow, Russia

^cFederal State Autonomous Institution "National Medical Research Center of
Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation.

^dChair of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University.

^eChair of Pediatrics and pediatric rheumatology, Federal State Autonomous
Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State
Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Резюме.

Большинство методов оценки Т-клеточного иммунитета трудоемки и непригодны для рутинной лабораторной диагностики. Это стимулирует исследователей к созданию доступных и воспроизводимых тестов. Цель исследования - сопоставление трех методов оценки уровня клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2 у переболевших и привитых от новой коронавирусной инфекции. Обследованы: 26 человек, перенесших COVID-19 в легкой или среднетяжелой форме (группа 1), 19 человек, дважды привитых Спутником V, не болевших COVID-19 (группа 2), 21 человек, перенесших COVID-19 и дважды вакцинированных Спутником V (группа 3) и 14 человек, дважды перенесших COVID-19 (группа 4). Мононуклеары периферической крови выделяли градиентным центрифугированием. При оценке первым методом мононуклеары инкубированы с S-белком вируса SARS-CoV-2, окрашивали флуоресцентно мечеными антителами, затем на проточном цитометре BD FACS Canto II подсчитывали процент CD8^{high}CD107a. При оценке методом ELISpot на наборе «Human IFN- γ ELISpot» продукцию IFN- γ стимулировали S-белком SARS-CoV-2, или смесью пептидов белков SARS-CoV-2 на наборе «Corona-T-test». По уровню экспрессии CD107a на CD8^{high} в группах 1, 2, 3 и 4 и количеству продуцентов IFN- γ на S-белок вируса SARS-CoV-2 на наборе «Human IFN- γ ELISpot» значимых различий не обнаружено. Продукция IFN- γ группы 3 (гибридный иммунитет) значимо ниже (317,29 \pm 19,04 пг/мл) групп 1 и 2 (постинфекционный и поствакцинальный иммунитет) 454,95 \pm 20,32 и 470,77 \pm 26,24 пг/мл. Относительный уровень IFN- γ -продуцирующих клеток в группе 2 был выше (22,34 \pm 3,77) против 16,83 \pm 2,35 в группе 1 и 15,46 \pm 1,83 в группе 3, относительный уровень продукции IFN- γ в этих группах не различался. Стимуляция полноразмерным S-белком обнаружила значимое снижение количества пятен в группе 4 (прорывной иммунитет) 30,59 \pm 2,29 против 58,97 \pm 4,47 в группе 3, а стимуляция смесью пептидов SARS-CoV-2 в

группе 4 по сравнению с группой 3 выявила значимое повышение количества IFN- γ -продуцирующих клеток $86,72 \pm 7,20$ против $69,38 \pm 5,53$ и продукции IFN- γ $991,25 \pm 65,18$ пг/мл против $760,76 \pm 50,70$ пг/мл и в относительном выражении, $10,30 \pm 2,77$ против $8,61 \pm 2,66$ и $68,10 \pm 9,41$ против $48,35 \pm 8,15$ соответственно. Результаты трех методов оценки клеточного иммунного ответа положительно, но с разной силой коррелируют между собой.

Ключевые слова: клеточный иммунитет; SARS-CoV-2; гибридный иммунитет; прорывной иммунитет; ELISpot; цитотоксические лимфоциты; CD8+

Abstract.

Most methods for evaluation T-cell immunity are laborious and unsuitable for routine laboratory diagnostics. This encourages researchers to create accessible and reproducible tests. The purpose of the study is to compare three methods for evaluation the level of cellular immune response to antigens of the SARS-CoV-2 virus in patients who have been ill and vaccinated against a new coronavirus infection. Examined: 26 people who had mild or moderate COVID-19 (group 1), 19 people vaccinated twice with Sputnik V, who did not have COVID-19 (group 2), 21 people who had COVID-19 and were twice vaccinated with Sputnik V (group 3) and 14 people who had COVID-19 twice (group 4). Peripheral blood mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation. In the first method, mononuclear cells were incubated with the S-protein of the SARS-CoV-2 virus, stained with fluorescently labeled antibodies, the percentage of CD8^{high}CD107a was counted on a BD FACS Canto II flow cytometer. When assessed by the ELISpot method on the “Human IFN- γ ELISpot” kit, IFN- γ production was stimulated by SARS-CoV-2 S-protein, or a mixture of SARS-CoV-2 protein peptides on the “Corona-T-test” kit. There were no significant differences in the level of expression of CD107a on CD8^{high} in groups 1, 2, 3, and 4 and the number of IFN- γ producers per SARS-CoV-2 S-protein

on the “Human IFN- γ ELISpot” kit. Production of IFN- γ is significantly lower in group 3 (hybrid immunity) 317.29 ± 19.04 pg/ml than in groups 1 and 2 (post-infection and post-vaccination immunity) 454.95 ± 20.32 and 470.77 ± 26.24 pg /ml. The relative level of IFN- γ -producing cells in group 2 was higher (22.34 ± 3.77) versus 16.83 ± 2.35 in group 1 and 15.46 ± 1.83 in group 3, the relative level of IFN- γ did not differ in these groups. Stimulation with full-length S-protein showed a significant reduction in the number of spots in group 4 (breakthrough immunity) 30.59 ± 2.29 vs. 58.97 ± 4.47 in group 3, and stimulation with a mixture of SARS-CoV-2 peptides in group 4 compared with group 3 revealed a significant increase in the number of IFN- γ -producing cells 86.72 ± 7.20 versus 69.38 ± 5.53 and IFN- γ production 991.25 ± 65.18 pg/ml versus 760.76 ± 50.70 pg/ml and in relative terms, 10.30 ± 2.77 versus 8.61 ± 2.66 and 68.10 ± 9.41 versus 48.35 ± 8.15 , respectively. The results of three methods for evaluation the cellular immune response correlate positively with each other, but with different strengths.

Keywords: cellular immunity; SARS-CoV-2; hybrid immunity; breakthrough immunity; ELISpot; cytotoxic lymphocytes; CD8+

1 **Введение**

2 Характерными признаками адаптивного иммунитета являются
3 антигенная специфичность и иммунологическая память. Способность
4 создавать долговременную иммунологическую память обеспечивает
5 уникальный механизм защиты хозяина при последующих контактах с вирусом
6 [28]. В зависимости от особенностей функционирования гуморального и
7 клеточного адаптивного иммунитета у конкретного больного формируются
8 клинические варианты и исходы заболевания, включая и COVID-19 [10].

9 Ключевая роль в элиминации вируса принадлежит цитотоксическим
10 CD8⁺ лимфоцитам. При COVID-19 CD8⁺ клетки препятствуют репликации
11 вируса в дыхательных путях. Именно CD8⁺ лимфоцит распознает зараженные
12 вирусом клетки и либо контактным путем через взаимодействие FAS-FASL,
13 либо за счет выброса содержимого цитотоксических гранул индуцирует
14 апоптоз таких клеток, уничтожая также реплицирующийся вирус. CD4⁺ Т-
15 хелперы координируют противовирусный иммунный ответ. Медиатором
16 противовирусного ответа считают IFN- γ , который усиливает фагоцитоз
17 макрофагами апоптотических клеток и вирусов, нейтрализованных
18 антителами. Ответ CD4⁺ Т-хелперов отличается в зависимости от вида вируса,
19 в некоторых случаях реакция является защитной, в других случаях она может
20 быть даже опасной для макроорганизма [6]. Функциональная активность
21 иммунных клеток определяется скоординированной активностью сигнальных
22 путей [8]. Измерение функционального состояния клеточного иммунного
23 ответа в образце крови пациента способно улучшить прогнозирование
24 клинического исхода заболевания или сохранения симптомов (длительный
25 COVID), поддержать разработку вакцин и безопасных иммуномодулирующих
26 методов лечения [13]. Продемонстрированы формирование
27 иммунологической памяти Т-клеток и эффекторные реакции против широкого
28 спектра эпитопов вируса SARS-CoV-2 [9, 14, 22, 24, 29].

29 Оценка противовирусного Т-клеточного ответа является крайне важным
30 аспектом изучения адаптивного иммунитета в дополнение к серологическим
31 тестам. Большинство анализов на Т-клетки трудоемки и непригодны для
32 рутинной лабораторной диагностики. Ввиду отсутствия единой системы
33 тестирования характеристик клеточного иммунного ответа против SARS-
34 CoV-2 многими исследовательскими группами предприняты усилия по
35 созданию доступных и воспроизводимых тестов [15, 17]. Количество и
36 функции лимфоцитов исследуют в анализе с предельным разведением
37 (Limiting dilution assay), внутриклеточным окрашиванием цитокинов
38 (Intracellular Cytokine Staining), методом тетрамеров [11] и ELISpot [27]. По
39 чувствительности анализ ELISpot превосходит другие методы определения
40 антигенспецифических лимфоцитов [19]. Чувствительность ELISpot
41 позволяет обнаружить антигенспецифичные Т-клетки, которые секретируют
42 цитокины и эффекторные молекулы, такие как гранзим В и перфорин [19].
43 Мониторинг цитотоксических клеток с помощью ELISpot - золотой стандарт
44 для оценки антигенспецифического Т-клеточного иммунитета в клинических
45 испытаниях вакцинных препаратов. Наиболее часто используемым анализом
46 ELISpot является тест на IFN- γ [19, 20, 25]. ELISpot может быть применён для
47 определения разных субпопуляций активированных Т-клеток с
48 использованием цитокинов, таких как Th1 (цитокины IFN- γ , IL-2, IL-12, и
49 TNF- α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13) и Th17 (IL-17). Однако IFN- γ
50 синтезируют Th1, CD8⁺ цитотоксические лимфоциты, NK- и NKT-клетки [21],
51 а выделение CD8⁺ субпопуляции приводит к большим потерям клеток, как и
52 пермеабиллизация для внутриклеточного окрашивания, а использование
53 тетрамеров рестрицировано по HLA, что делает этот тест непригодным для
54 популяционных исследований.

55 Мы также попытались внести свой вклад, используя хорошо известную
56 способность CD8⁺ клеток при распознавании вирусных пептидов в составе
57 MHC-I на поверхности зараженной клетки формировать синапс и

58 выбрасывать перфорин и гранзимы в синаптическую щель. В этот момент на
59 поверхности такой CD8⁺ клетки оказывается молекула CD107a [5]. Экспрессия
60 молекул CD107a может выступать в качестве маркера дегрануляции CD8⁺
61 клеток после антигенспецифической стимуляции [12]. Мы апробировали
62 такой подход к исследованию Т-клеточного иммунитета при исследовании
63 ответа на антигены вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита [2, 3].

64 Целью нашего исследования было сопоставление трех методов оценки
65 уровня клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2 у
66 переболевших и привитых от новой коронавирусной инфекции.

67

68 **Материалы и методы**

69 С сентября 2021 по май 2022 г было проведено простое открытое
70 сравнительное обследование 80-и взрослых добровольцев. Из них 26 человек
71 перенесли COVID-19 в легкой или среднетяжелой форме, имели ПЦР-
72 подтвержденный клинический диагноз заболевания давностью от 2 до 12 мес.
73 (постинфекционный иммунитет, Группа 1); 19 человек были дважды привиты
74 Спутник V и не болели COVID-19, срок от первой прививки от 3 до 9 мес.
75 (поствакцинальный иммунитет, Группа 2); 21 человек перенесли COVID-19 и
76 были дважды вакцинированы Спутник V (гибридный иммунитет, Группа 3);
77 14 человек перенесли COVID-19 дважды: первый раз в 2020-2021гг и повторно
78 – в январе-феврале 2022 (штамм омикрон), они составили Группу 4
79 (прорывной иммунитет). Кровь из локтевой вены брали утром натощак в
80 вакуумную пробирку с гепарином 4 мл. Исследование одобрено локальным
81 этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им Г.Н.Габричевского (протокол №
82 58), обследованные подписывали информированное согласие.

83 Мононуклеары периферической крови выделяли с помощью
84 центрифугирования на градиенте плотности фиколл-верографин, $\rho = 1,077$
85 (ООО «ПанЭко», РФ), отмывали центрифугированием и добавляли 1мл среды

86 RPMI-1640 с добавлением 2мМ L-глутамина, гентамицина и 10%
87 эмбриональной телячьей сыворотки. Суспензию мононуклеаров делили на 3
88 порции. Клеточный иммунитет на антигены вируса SARS-CoV-2 определяли
89 тремя разными способами.

90 Первый способ: мононуклеары вносили по $2,5 \times 10^5$ на лунку, в лунки 96-
91 луночной стерильной панели (отрицательный контроль), добавляли раствор
92 моненсина в конечной концентрации 10 мкМ и моноклональные антитела к
93 антигену CD107a-PE-Cy5 в конечном разведении 1:100, конечный объем в
94 лунке составил 200 мкл. Для стимуляции мононуклеаров S-антигеном вируса
95 SARS-CoV-2 использовали лунки панели от набора для определения антител
96 к S-белку вируса SARS-COV-2 методом ИФА, в которых на дно лунок
97 сорбирован полноразмерный S-белок, согласно инструкции производителя.
98 Использован набор «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест,
99 Новосибирск РФ). Перед началом эксперимента лунки были
100 простерилизованы с помощью ультрафиолетового облучения в стерильных
101 условиях в течение 30 минут. Пробы инкубировали при 37°C во влажной
102 атмосфере и 5% CO₂ 20 часов. По окончании инкубации клетки
103 ресуспендировали, переносили в пробирки для проточной цитометрии и
104 отмывали центрифугированием (300g 5 мин) в растворе CellWash. Затем
105 клетки окрашивали антителами к антигену CD8-FITC 20 минут в темноте при
106 4°C, повторно отмывали при тех же условиях, и фенотипировали с помощью
107 проточного цитометра BD FACS Canto II (технологии и программное
108 обеспечение Becton Dickinson, США). Для анализа выделяли лимфоидный
109 гейт, в нем в режиме FITC-SSS выделяли гейт лимфоцитов высоко
110 экспрессирующих антиген CD8 (CD8^{high}) – это субпопуляция цитотоксических
111 Т-лимфоцитов. Далее на графике CD107a-PE-Cy5 против CD8-FITC
112 подсчитывали процент дважды положительных клеток (Рисунок 1).
113 Полученное число отражает процент цитотоксических лимфоцитов,
114 распознавших антигены S-белка коронавируса и ответивших цитотоксической

115 реакцией, заключающейся в выделении содержащегося в цитотоксических гранулах
116 относительно общего количества CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов [4].

117 Второй способ: оценка клеточного иммунитета методом ELISpot.
118 Мононуклеары для контрольной пробы (2,5x10⁵ на лунку) вносили в лунку
119 стрипа от 96-луночной панели стандартного набора для определения
120 продукции IFN- γ методом ELISpot («Human IFN- γ ELISpot», Mabtech,
121 Швеция). Мононуклеары опытной пробы стимулировали S-антигеном, как
122 описано выше (для первого способа определения клеточного иммунитета).
123 Клетки инкубировали 4 часа при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO₂. В
124 предварительных опытах было показано, что этого времени достаточно для
125 того чтобы моноциты собрали антиген. Далее мононуклеары тщательно
126 ресуспендировали и переносили в лунки стрипа от набора для ELISpot и
127 продолжали инкубировать при тех же условиях еще 16 часов. По окончании
128 инкубации содержимое лунок удаляли и промывали 5 раз забуференным
129 фосфатами физиологическим раствором (ЗФР) по 20 мкл на лунку. Конъюгат
130 разводили 1:200 в бессывороточной среде RPMI-1640, добавляли по 100 мкл
131 на лунку и инкубировали 2 часа при комнатной температуре, снова промывали
132 5 раз ЗФР. Готовый ТМБ-субстрат добавляли по 100 мкл на лунку и
133 инкубировали при комнатной температуре до появления видимых пятен,
134 согласно инструкции производителя. После этого жидкость из лунок удаляли,
135 промывали 2 раза деионизированной водой, затем проточной водой. После
136 этого снимали поддон и промывали мембрану с обратной стороны. Сушили
137 стрипы на фильтровальной бумаге в темноте при комнатной температуре.

138 Третий способ: оценка клеточного иммунитета также методом ELISpot,
139 с использованием набора реагентов для определения Т-клеточного ответа на
140 SARS-CoV-2 «Corona-T-test» (ФГБУ «НМИЦ гематологии», Россия) [25],
141 специально разработанном для оценки клеточного иммунитета к пептидам
142 белка вируса SARS-CoV-2. Для стимуляции Т-лимфоцитов в этом наборе
143 используют смесь пептидов из белков коронавируса. Постановка теста
144 Medical Immunology (Russia)

144 осуществлялась в нашей модификации. Для проведения тест мононуклеары
145 вносили в лунки стрипа 96-луночной панели, входящей в набор ($2,5 \times 10^5$ на
146 лунку) в контрольной лунке клетки инкубировали в культуральной среде, а в
147 опытную лунку добавляли смесь пептидов белков вируса SARS-CoV-2 в
148 конечной концентрации $1 \mu\text{M}/\text{мл}$ и инкубировали при 37°C во влажной
149 атмосфере и $5\% \text{CO}_2$ 20 часов. По окончании инкубации содержимое лунок
150 удаляли и промывали 5 раз $200 \mu\text{кл}$ ЗФР, добавляли по $50 \mu\text{кл}$ на лунку раствор
151 А, содержащий антитела к IFN- γ , конъюгированные с биотином, и
152 инкубировали 2 часа при комнатной температуре в темноте, снова промывали
153 5 раз ЗФР. Затем раствор В, содержащий концентрированный раствор
154 стрептавидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, разводили 1:100
155 буфером В, добавляли по $50 \mu\text{кл}$ в каждую лунку, инкубировали 30 мин при
156 комнатной температуре в темноте и промывали 5 раз ЗФР, а затем 2 раз
157 дистиллированной водой. Добавляли раствор С, содержащий субстрат для
158 щелочной фосфатазы BCIP/NBT+, по $50 \mu\text{кл}$, инкубировали 15 мин. в темноте
159 и промывали дистиллированной, а затем проточной водой. После этого
160 снимали поддон и промывали мембрану с обратной стороны. Сушили стрипы
161 на фильтровальной бумаге в темноте при комнатной температуре.

162 Подсчет сформировавшихся пятен для метода 2 и 3 осуществляли с
163 помощью автоматизированного ELISpot-ридера AID (AID GmbH, Германия),
164 Рисунок 2. Программное обеспечение позволяет посчитать не только
165 количество пятен на дне лунки, но также подсчитать их суммарную площадь
166 и интенсивность окраски и рассчитать с помощью встроенных алгоритмов
167 концентрацию IFN- γ в каждой лунке.

168 Результаты исследования были подвергнуты статистической обработке.
169 Для всех параметров было проведено исследование на нормальность
170 распределения методом Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде
171 средней арифметической и ее ошибки ($M \pm SE$). Для сравнения групп

172 использовали t-критерий. Уровень $p < 0,05$ считали значимым. Корреляции
173 рассчитывали по методу Пирсона.

174 **Результаты**

175 Ранее было показано, что спонтанный уровень экспрессии молекулы
176 CD107a на CD8^{high} лимфоцитах при определении клеточного иммунитета к S-
177 белку вируса SARS-CoV-2 не превышает уровень cut off=1% [4]. Аналогичные
178 результаты были получены для контрольной пробы и в настоящем
179 исследовании, уровень клеточного иммунитета, оцененного с помощью
180 способа 1, представлены в процентах. Для методов 2 и 3, основанных на
181 ELISpot, спонтанный уровень составил $7,65 \pm 0,87$ пятен на лунку. Результаты,
182 полученные для разных обследованных лиц, различались. В связи с этим
183 результаты, полученные методом ELISpot, были представлены двумя
184 способами: за вычетом спонтанного уровня для каждого обследованного и как
185 отношение опытного к контрольному уровню для каждого испытуемого
186 (относительный показатель). Следует также отметить, что результаты,
187 полученные методом ELISpot на двух разных тест-системах, несколько
188 различались по методике проявления пятен. Объективно сложилось так, что
189 оценка клеточного иммунитета в группах 1, 2 и половины группы 3 была
190 осуществлена на тест-наборе «Human IFN- γ ELISpot» только вторым
191 способом, а вторая половина группы 3 и группа 4 – на тест-наборе «Corona-T-
192 test» вторым и третьим способом. Уровень ответа на этих наборах различался,
193 поэтому мы провели анализ результатов, полученных на разных тест-наборах
194 отдельно.

195 В таблице 1 представлены результаты для тех обследованных, которые
196 были получены на наборе «Human IFN- γ ELISpot». Из таблицы видно, что
197 результаты, полученные при оценке экспрессии CD107a на CD8^{high}
198 лимфоцитах (первый способ оценки), который характеризует субпопуляцию
199 цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов, способных распознать антигенные

200 детерминанты S-белка вируса SARS-CoV-2 и ответить атакой с выбросом
201 содержимого цитотоксических гранул, в группах 1, 2 и 3 значимо не
202 различаются. По количеству пятен, то есть клеток, ответивших синтезом IFN-
203 γ на S-белок вируса SARS-CoV-2, различий также нет. Однако по продукции
204 IFN- γ группа 3 (гибридный иммунитет) значимо отличается ($317,29 \pm 19,04$
205 пг/мл) от групп 1 и 2 (постинфекционный и поствакцинальный иммунитет)
206 $454,95 \pm 20,32$ и $470,77 \pm 26,24$ пг/мл, соответственно ($p = 0,048$). При анализе
207 результатов ELISpot в относительном выражении выявлено значимое
208 превышение уровня IFN- γ -продуцирующих клеток в группе 2
209 (поствакцинальный иммунитет) $22,34 \pm 3,77$ против $16,83 \pm 2,35$ в группе 1 и
210 $15,46 \pm 1,83$ в группе 3 ($p = 0,033$). В то же время, по уровню продукции IFN- γ
211 различия не были выявлены.

212 В таблице 2 представлены результаты, полученные на наборе «Corona-
213 T-test» и всеми тремя способами. Из таблицы видно, что при оценке
214 клеточного иммунитета по экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах имеется
215 тенденция на повышение уровня ответа в группе 4 (прорывной иммунитет),
216 однако эти различия не значимы. При оценке клеточного иммунитета вторым
217 способом (стимуляция полноразмерным S-белком) обнаружено значимое
218 снижение количества пятен в группе 4 $30,59 \pm 2,29$ против $58,97 \pm 4,47$ в группе
219 3 ($p = 0,0034$), по концентрации IFN- γ это снижение также проявляется ($p <$
220 $0,05$). Интересно, что при относительном расчете различий между группами
221 не выявлено. При использовании для стимуляции клеточного ответа смеси
222 пептидов (третий способ) выявлено значимое повышение количества пятен в
223 группе 4 по сравнению с группой 3 ($p < 0,05$), и также по продукции IFN- γ (p
224 $= 0,043$). При относительном выражении результатов обнаружена тенденция
225 на увеличение количества пятен в группе 4 по сравнению с группой 3:
226 $10,30 \pm 2,77$ и $8,61 \pm 2,66$ и значимое повышение продукции IFN- γ $68,10 \pm 9,41$ и
227 $48,35 \pm 8,15$ ($p = 0,047$).

228 Из-за различий в использованных тест-системах для ELISpot,
229 невозможно корректно сравнить группу 4 (прорывной иммунитет) с группой
230 1 (постинфекционный иммунитет), хотя это было бы очень интересно. Однако
231 поскольку группа 3 была представлена для анализа на обеих тест-системах,
232 хотя это разные люди, с большой степенью натяжки можно отметить, что
233 группа 3 на тест-системе «Corona-T-test» имеет при стимуляции
234 полноразмерным S-белком несколько меньшее количество пятен ($58,97 \pm 4,47$),
235 чем на тест-системе «Human IFN- γ ELISpot» ($80,04 \pm 5,87$). Если принять такую
236 тенденцию, то в группе 4 мы выявили бы значимо меньшее количество пятен,
237 чем в группе 1 ($p = 0,012$). При этом по продукции IFN- γ в группе 3,
238 определенной двумя разными методами, различий нет. При таком допущении
239 продукция IFN- γ в ответ на стимуляцию S-белком в группе с прорывным
240 иммунитетом была бы значимо ниже, чем в группе с постинфекционным ($p =$
241 $0,047$). При относительной оценке количество пятен в группе 3 на тест-системе
242 «Corona-T-test» ниже в 2 раза, и при таком допущении, в группе 4 было бы
243 обнаружено значимое снижение по сравнению с группой 1 ($p = 0,048$), а по
244 отношению уровней IFN- γ различия были бы не значимы. Однако следует
245 подчеркнуть, что сопоставление групп 1 и 4 чисто расчетные, поскольку
246 результаты были получены на разных тест-системах.

247 Расчет корреляций Пирсона не выявил значимых корреляций между
248 уровнями клеточного иммунного ответа, измеренного тремя исследованными
249 нами способами, за исключением умеренной положительной корреляции ($r =$
250 $0,341$) между относительным количеством пятен, индуцированных пептидным
251 комплексом и полноразмерным S-белком. В то же время выявлена сильная
252 положительная корреляционная связь между количеством пятен и уровнем
253 продукции IFN- γ при стимуляции полноразмерным S-белком ($r = 0,79$) и очень
254 сильная положительная корреляция при стимуляции пептидным комплексом
255 ($r = 0,95$).

256 **Обсуждение**

257 В нашем исследовании мы сопоставили три разных способа оценки
258 клеточного иммунитета на антигенные детерминанты вируса SARS-CoV-2 у 4
259 групп обследованных с разной историей контакта с новой коронавирусной
260 инфекцией. Следует подчеркнуть, что первый из использованных нами
261 способов позволяет подсчитать процент цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов,
262 способных распознать антигенные детерминанты S-белка коронавируса и
263 ответить атакой с выбросом содержимого цитотоксических гранул [7]. Эта
264 реакция является основной защитной реакцией клеточного иммунитета,
265 позволяющей выявить и уничтожить зараженные коронавирусом клетки
266 организма. В результате уничтожается размножающийся в клетках вирус и его
267 компоненты, и организм очищается от вируса. При оценке результатов,
268 полученных этим методом, можно видеть, что уровень поствакцинального
269 клеточного иммунитета не отличается от постинфекционного, а повторная
270 стимуляция (гибридный и прорывной иммунитет) не приводит к серьезному
271 изменению уровня клеточной защиты.

272 При оценке клеточного иммунитета методом ELISpot по продукции IFN-
273 γ выявляется суммарный эффект, поскольку IFN- γ могут синтезировать Th1-
274 хелперы, цитотоксические CD8⁺ лимфоциты, NK-, NKT-клетки и $\gamma\delta$ -Т клетки.
275 При этом NK, NKT-клетки и $\gamma\delta$ -Т клетки, по-видимому, проявляют себя в тесте
276 как спонтанные продуценты IFN- γ , тогда как Th1-хелперы и цитотоксические
277 CD8⁺ лимфоциты способны распознать антигенные детерминанты S-белка
278 коронавируса и являются индуцированными продуцентами IFN- γ [16].
279 Следует отметить, что хелперов в крови в принципе больше, чем
280 цитотоксических клеток, Th1 являются более мощными продуцентами IFN- γ ,
281 чем CD8⁺ лимфоциты и далеко не все цитотоксические лимфоциты,
282 распознавшие антиген, продуцируют IFN- γ [21]. Более того, IFN- γ не
283 оказывает прямого противовирусного действия. Он является своеобразным

284 дирижером, организатором противовирусного ответа, активируя клетки
285 адаптивного и врожденного иммунитета на борьбу с вирусом. Поэтому
286 продукция IFN- γ является лишь косвенным свидетелем активации клеточного
287 ответа и не коррелирует прямо с эффективностью клеточной защиты от
288 вируса. Тем не менее, метод ELISpot для оценки клеточного иммунитета
289 весьма популярен в западных публикациях, предлагаются различные его
290 модификации [8, 18, 26]. Мы сопоставили 2 варианта этого метода, где
291 индукторами клеточного иммунного ответа были смесь пептидов белков
292 вируса SARS-CoV-2 или полноразмерный S-белок коронавируса. Оказалось,
293 что при индукции полноразмерным S-белком в группах с гибридным и
294 прорывным иммунитетом продукция IFN- γ ниже, чем в группах с
295 постинфекционным и поствакцинальным иммунитетом. Возможно, эти
296 различия связаны с интенсивным процессом мутации коронавируса. Привитые
297 и болевшие в начале пандемии отвечали на уханьский вариант S-белка, и
298 именно этот вариант использовался для стимуляции клеточного иммунитета,
299 тогда как у людей с гибридным и прорывным иммунитетом штаммы при
300 первичной и повторной встрече с коронавирусом могли сильно различаться.
301 При этом доминантные клоны, сформированные на первый контакт, могут
302 оказаться минорными при повторной встрече с антигеном. Стимуляция S-
303 белком уханьского штамма может оказаться не столь эффективной. В то же
304 время при стимуляции комплексом пептидов, специально подобранными
305 наиболее иммуногенными и консервативными последовательностями из
306 разных белков вируса SARS-CoV-2, выявлено значимое превышение
307 количества пятен и продукции IFN- γ в группе с прорывным иммунитетом.
308 Такая дихотомия результатов может свидетельствовать о сужении спектра
309 антигенспецифических клонов Т-лимфоцитов при повторных встречах с
310 измененными мутациями штаммами вируса. С другой стороны, клеточные
311 ответы на антигенные пептиды более консервативных белков коронавируса,

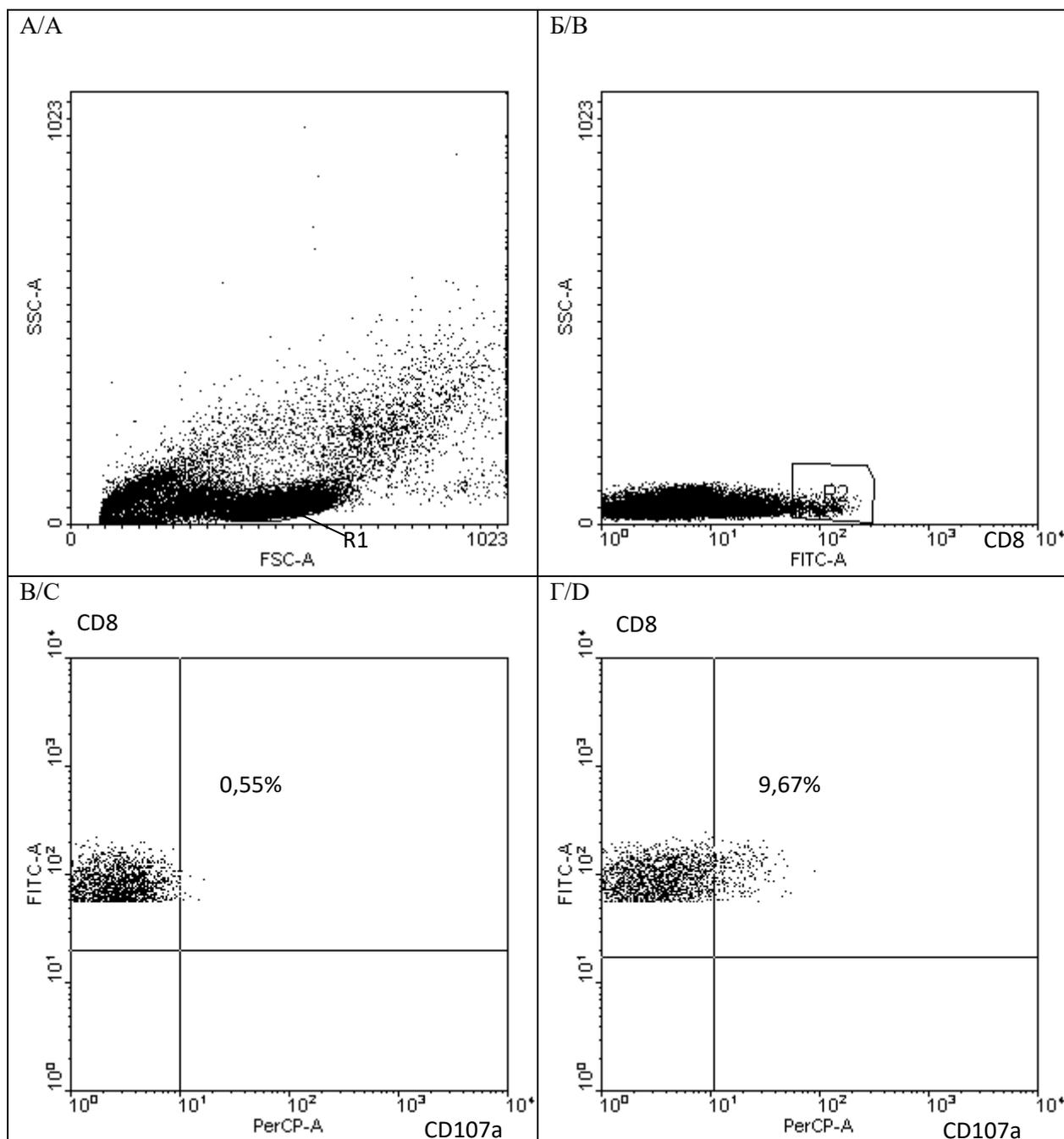
312 например, N-белка, могут оказываться более значимыми при повторных
313 контактах с вирусом, чем ответы на подверженный частым мутациям S-белок.

314 Не было выявлено корреляции уровня клеточного иммунитета,
315 определенного по экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах с результатами,
316 полученными методом ELISpot, что, по-видимому, связано с различиями в
317 клеточных субпопуляциях, ответ которых определяется этими методами.
318 Корреляция между индукцией иммунного ответа комплексом пептидов и
319 полноразмерным S-белком была положительная, но умеренной силы, что
320 объясняется разным составом пептидов, который презентируют моноциты при
321 этих двух разных способах стимуляции. Сильная положительная корреляция
322 между количеством пятен и уровнем IFN- γ вполне понятна. Однако она менее
323 1, поскольку есть образцы, в которых сформировано много очень мелких
324 пятен, а есть другой вариант, когда пятен не так много, но они крупные и
325 интенсивно окрашены (см. рис. 2Б и 2Г). Иными словами, клеточный
326 иммунный ответ имеет индивидуальные черты у разных людей. Отсутствие
327 общепризнанного метода оценки Т-клеточного иммунитета, такого, как
328 иммуноферментный анализ для оценки гуморального иммунитета, и
329 трудоемкость известных методов стимулирует многих авторов к
330 сопоставлению этих методов [18, 20, 24, 26]. Также предпринимаются
331 попытки разработки тестов более подходящих для оценки клеточного
332 иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 [1, 23]. Результаты, полученные
333 разными методами, коррелируют между собой в той или иной степени, однако
334 все еще не удается прийти к консенсусу относительно метода оценки Т-
335 клеточного иммунитета на антигены. Тем не менее, исследование Т-
336 клеточного иммунитета крайне важно для оценки противовирусного
337 иммунного ответа.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Пример оценки клеточного иммунитета по экспрессии CD107a на CD8^{hi} лимфоцитах.

Figure 1. An example of cellular immunity study by CD107a expression on CD8^{hi} lymphocytes.



А – выделение лимфоидного гейта R1

Б – выделение гейта CD8^{hi} R2

В – спонтанная экспрессия CD107a на CD8^{hi} лимфоцитах

Г – индуцированная S-белком экспрессия CD107a на CD8^{hi} лимфоцитах

A - determination of the lymphoid gate R1

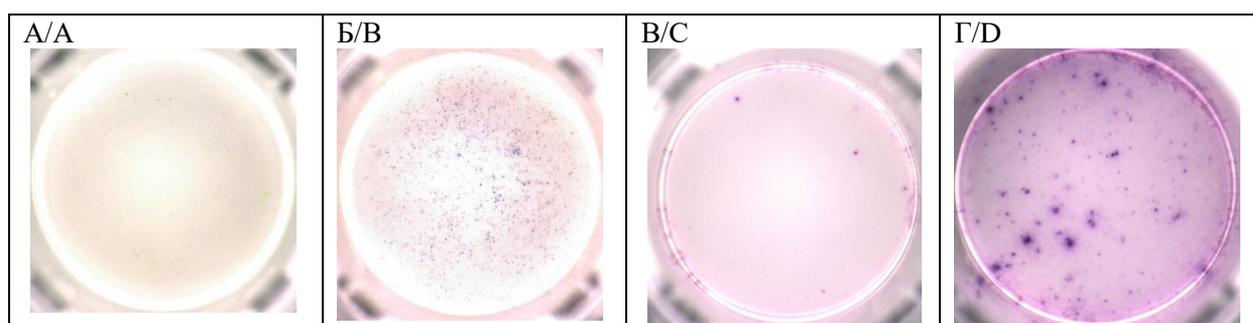
B - selection of the gate CD8^{hi} R2

C – spontaneous expression of CD107a on CD8^{hi} lymphocytes

D – S-protein-induced expression of CD107a on CD8^{hi} lymphocytes

Рисунок 2. Пример исследования клеточного иммунитета методом ELISpot

Figure 2. An example of cellular immunity study using the ELISpot method



А – спонтанный уровень на тест-системе «Human IFN- γ ELISpot»;

Б – антиген-индуцированный уровень на тест-системе «Human IFN- γ ELISpot»;

В – спонтанный уровень на тест-системе «Corona-T-test»;

Г – антиген-индуцированный уровень на тест-системе «Corona-T-test»

A - spontaneous level on the kit "Human IFN- γ ELISpot";

B - antigen-induced level on the kit "Human IFN- γ ELISpot";

C - spontaneous level on the kit "Corona-T-test";

D - antigen-induced level on the kit "Corona-T-test"

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1 Определение клеточного иммунитета по экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах и методом ELISpot при индукции S-белком SARS-CoV-2

Table 1 Determination of cellular immunity by expression of CD107a on CD8^{high} lymphocytes and by the ELISpot method upon induction by SARS-CoV-2 S-protein

	CD8+ CD107a+ %	ELISpot Абсолютное количество / absolute value	IFN-γ пг/мл / pg/ml	ELISpot относительное количество/ relative value	IFN-γ относительное количество/ relative value
Группа 1 / Group 1	10,09± 1,35	83,23± 6,63	454,95 ±20,32	16,83± 2,35	42,79± 8,09
Группа 2 / Group 2	9,45± 1,48	86,25± 7,12	470,77 ±26,24	22,34± 3,77*	42,98± 10,43
Группа 3 / Group 3	9,31± 1,32	80,04± 5,87	317,29 ±19,04*	15,46± 1,83	45,64± 8,84

* p < 0,05

Таблица 2 Сопоставление трех способов определения клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2**Table 2 Comparison of three methods for determining cellular immunity to the SARS-CoV-2 virus**

	Способ 1 / Method 1 (S- белок / S- protein)	Способ 2 / Method 2 (S-белок / S-protein)				Способ 3 / Method 3 (пептиды / peptides)			
	CD8+ CD107a+ %	ELISPot Абсолютное количество / absolute value	IFN- γ пг/мл / pg/ml	ELISPot относительное количество/ relative value	IFN- γ относительное количество/ relative value	ELISPot Абсолютное количество / absolute value	IFN- γ пг/мл / pg/ml	ELISPot относительное количество/ relative value	IFN- γ относительно е количество/ relative value
Группа 3 / Group 3	10,04± 1,37	58,97± 4,47	361,68 ±18,84	7,48± 1,13	46,63± 9,37	69,38± 5,53	760,76 ±50,70	8,61± 2,66	48,35± 8,15
Группа 4 / Group 4	12,27± 2,51	30,59± 2,29*	267,52 ±17,38*	5,79± 0,81	34,06± 8,69	86,72± 7,20*	991,25 ±65,18*	10,89± 2,77	68,10± 9,41*

* p < 0,05

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Топтыгина Анна Павловна, д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов; профессор кафедры иммунологии ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора; Кафедра иммунологии Биологического факультета ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова 10, МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Топтыгиной А.П.

Тел: +7(495) 452-18-01,

Факс: +7(495) 452-18-30

E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Toptygina Anna P., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head of Laboratory of Cytokines; Professor Chair of Immunology
G.N.Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology,
Moscow, Russia;

Chair of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
10 Admiral Makarov Street, Moscow, 125212, Russia

Phone: +7(495) 452-18-01,

Fax: +7(495) 452-18-30

E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Блок 2. Информация об авторах

Афридонова З.Э., аспирант лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора

E-mail: zuafrid@gmail.com

Afridonova Z.E., PhD Student, Laboratory of Cytokines, of the G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.

Боголюбова А.В., к.б.н., заведующая лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

E-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

Bogolyubova A.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Семикина Е.Л., д.м.н., главный научный сотрудник, заведующая лабораторным отделом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии педиатрического факультета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

E-mail: semikinaelena@yandex.ru

Semikina E. L., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head of Laboratory Department, Federal State Autonomous Institution "National Medical Research Center of Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation; professor of the Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology Pediatric faculty I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Блок 3. Метаданные статьи

**СОПОСТАВЛЕНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОГО
ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2**

**COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR EVALUATION
CELLULAR IMMUNITY TO THE SARS-CoV-2 VIRUS**

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

Оценка клеточного иммунитета к SARS-CoV-2

Evaluation of cellular immunity to SARS-CoV-2

Ключевые слова: клеточный иммунитет; SARS-CoV-2; гибридный иммунитет; прорывной иммунитет; ELISpot; цитотоксические лимфоциты; CD8+

Keywords: cellular immunity; SARS-CoV-2; hybrid immunity; breakthrough immunity; ELISpot; cytotoxic lymphocytes; CD8+

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 12, количество таблиц – 2, количество рисунков – 2.

13.01.2023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

№ ссы лки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском языке	Интернет-адрес цитируемой статьи
1	Потеряев Д.А., Аббасова С.Г., Игнатьева ПЕ., 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., Ignatieva P.E., Strizhakova O.M., Kolesnik S.V., Khamitov R.A. Evaluation of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in recovered patients and vaccinated against COVID-19 using the TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit. // <i>BIOpreparations. Prevention, diagnosis, treatment (Russia)= BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye, 2021, Vol..21, no. 3, pp.178–192. (In Russ.).</i>	doi: 10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192
2	Смердова М. А., Топтыгина А. П., Андреев Ю. Ю., Сенникова С. В., Зеткин А. Ю., Клыкова Т. Г., Беляков С. И. Гуморальный и клеточный иммунитет к антигенам вирусов кори и краснухи у здоровых людей. // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т.9. - №3-4. – С. 607-611	Smerdova M.A., Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Sennikova S.V., Zetkin A.Yu., Klykova T.G., Belyakov S.I. Humoral and cellular immunity to measles and rubella virus antigens in healthy subjects // <i>Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, Vol. 9, no. 3–4, pp. 607–611. (In Russ.).</i>	doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611

3	Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Алешкин В.А. Формирование и поддержание специфического клеточного ответа на вакцинацию «Приорикс». // Иммунология, 2013, том 34, № 5, с. 257-261	Toptygina A.P., Semikina E.L., Alioshkin V. A. The shaping and the maintenance of T-cell specific immune response to vaccination Priorix // <i>Immunology (Russia)= Immunologiya, 2013, Vol.34, no5,pp.257-261. (In Russ.)</i>	eLIBRARY ID: 20781516
4	Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Афридонова З.Э. Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета у переболевших COVID-19. // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т.12, №. 3– С.495-504	Toptygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Afridonova Z.E. Comparison of the humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescents // <i>Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, Vol. 12, no. 3, pp. 495–504(In Russ.)</i> .	doi: 10.15789/2220-7619-COT-1809
5	Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. <i>Cell Immunology, 2009, Vol. 254, №2, pp. 149-154.</i>		doi: 10.1016/j.cellimm.2008.08.007
6	Beňová K, Hancková M, Koči K, Kúdelová M, Betáková T. T cells and their function in the immune response to viruses. <i>Acta Virology, 2020, Vol. 64, №2, pp. 131-143.</i>		doi: 10.4149/av_2020_203
7	Betts M.R., Brenchley J.M., Price D.A., De Rosa S.C., Douek D.C., Roederer M., Koup R.A. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow		doi: 10.1016/s0022-1759(03)00265-5

	cytometric assay for degranulation. <i>Journal of Immunological Methods</i> , 2003, Vol. 281, №1-2, pp. 65-78.		
8	Bouwman W, Verhaegh W, Holtzer L, van de Stolpe A. Measurement of Cellular Immune Response to Viral Infection and Vaccination. <i>Frontier in Immunology</i> , 2020, Vol. 11:575074.		doi: 10.3389/fimmu.2020.575074.
9	Braun J, Loyal L, Frensch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, Hippenstiel S, Dingeldey M, Kruse B, Fauchere F, Baysal E, Mangold M, Henze L, Lauster R, Mall MA, Beyer K, Röhmel J, Voigt S, Schmitz J, Miltenyi S, Demuth I, Müller MA, Hocke A, Witzenrath M, Suttorp N, Kern F, Reimer U, Wenschuh H, Drosten C, Corman VM, Giesecke-Thiel C, Sander LE, Thiel A. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. <i>Nature</i> , 2020, Vol. 587, №7833, pp. 270-274.		doi: 10.1038/s41586-020-2598-9
10	García LF. Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. <i>Frontiers in Immunology</i> , 2020, Vol. 11, 1441.		doi: 10.3389/fimmu.2020.01441
11	Gupta S, Agrawal S, Sandoval A, Su H, Tran M, Demirdag Y. SARS-CoV-2-Specific and Functional Cytotoxic CD8 Cells in Primary Antibody Deficiency: Natural Infection and Response to Vaccine. <i>Journal of Clinical Immunology</i> , 2022, Vol. 42, №5, pp. 914-922.		doi: 10.1007/s10875-022-01256-y

12	Keshavarz M, Shafiee A, Nicknam MH, Khosravani P, Yousefi A, Izad M. Immune Response to the Mumps Virus in Iranian Unvaccinated Young Adults. <i>Japan Journal of Infectious Diseases</i> , 2017, Vol. 70, №2, pp. 127-131.		doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.078
13	Kundura L, Cezar R, André S, Campos-Mora M, Lozano C, Vincent T, Muller L, Lefrant JY, Roger C, Claret PG, Duvnjak S, Loubet P, Sotto A, Tran TA, Estaquier J, Corbeau P. Low perforin expression in CD8+ T lymphocytes during the acute phase of severe SARS-CoV-2 infection predicts long COVID. <i>Frontiers in Immunology</i> , 2022, Vol. 13:1029006.		doi: 10.3389/fimmu.2022.1029006
14	Le Bert N, Clapham HE, Tan AT, Chia WN, Tham CYL, Lim JM, Kunasegaran K, Tan LWL, Dutertre CA, Shankar N, Lim JME, Sun LJ, Zahari M, Tun ZM, Kumar V, Lim BL, Lim SH, Chia A, Tan YJ, Tambyah PA, Kalimuddin S, Lye D, Low JGH, Wang LF, Wan WY, Hsu LY, Bertoletti A, Tam CC. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. <i>Journal of Experimental Medicine</i> , 2021, Vol. 218, №5, e20202617.		doi: 10.1084/jem.20202617

15	Lind Enoksson S, Bergman P, Klingström J, Boström F, Da Silva Rodrigues R, Winerdal ME, Marits P. A flow cytometry-based proliferation assay for clinical evaluation of T-cell memory against SARS-CoV-2. <i>Journal of Immunological Methods</i> , 2021, Vol. 499, 113159.	doi: 10.1016/j.jim.2021.113159
16	Moss P., The T cell immune response against SARS-CoV-2. <i>Nature Immunology</i> , 2022, Vol. 23, №2, pp. 186-193.	doi:10.1038/s41590-021-01122-w
17	Paolini A, Borella R, Neroni A, Lo Tartaro D, Mattioli M, Fidanza L, Di Nella A, Santacroce E, Gozzi L, Busani S, Trenti T, Meschiari M, Guaraldi G, Girardis M, Mussini C, Gibellini L, De Biasi S, Cossarizza A. Patients Recovering from Severe COVID-19 Develop a Polyfunctional Antigen-Specific CD4+ T Cell Response. <i>International Journal of Molecular Science</i> 2022, Vol. 23, №14, 8004.	doi: 10.3390/ijms23148004
18	Phillips E, Adele S, Malone T, Deeks A, Stafford L, Dobson SL, Amini A, Skelly D, Eyre D, Jeffery K, Conlon CP, Dold C, Otter A, D'Arcangelo S, Turtle L; PITCH Consortium, Klenerman P, Barnes E, Dunachie SJ. Comparison of two T-cell assays to evaluate T-cell responses to SARS-CoV-2 following vaccination in naïve and convalescent healthcare workers. <i>Clinical and Experimental Immunology</i> , 2022, Vol. 209, №1, pp. 90-98.	doi: 10.1093/cei/uxac042

19	Ranieri E., Netti G.S., Gigante M. CTL ELISPOT Assay and T Cell Detection. <i>Methods Mol Biol.</i> , 2021, Vol. 2325, pp. 65-67	doi: 10.1007/978-1-0716-1507-2_5.
20	Ruan Y, Guo W, Liang S, Xu Z, Niu T. Diagnostic performance of cytomegalovirus (CMV) immune monitoring with ELISPOT and QuantiFERON-CMV assay in kidney transplantation: A PRISMA-compliant article. <i>Medicine (Baltimore)</i> , 2019, Vol. 98, №16, e15228.	doi: 10.1097/MD.0000000000015228
21	Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. <i>Advances in Immunology</i> , 2007, Vol. 96, pp. 41-101.	doi: 10.1016/S0065-2776(07)96002-2
22	Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, Llewellyn-Lacey S, Kamal H, Bogdanovic G, Muschiol S, Wullimann DJ, Kammann T, Emgård J, Parrot T, Folkesson E; Karolinska COVID-19 Study Group, Rooyackers O, Eriksson LI, Henter JJ, Sönnernborg A, Allander T, Albert J, Nielsen M, Klingström J, Gredmark-Russ S, Björkström NK, Sandberg JK, Price DA, Ljunggren HG, Aleman S, Buggert M. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. <i>Cell</i> , 2020, Vol. 183, №1, pp.158-168.	doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017

23	Shomuradova A. S., Vagida M. S., Sheetikov S. A., Zornikova K. V., Kiryukhin D., Titov A., Peshkova Iu. O., Khmelevskaya A., Dianov D. V., Malasheva M., Shmelev A., Serdyuk Ya., 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., Shugay M., Efimov G. A. SARS-CoV-2 Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire of Human T Cell Receptors <i>Immunity</i> 2020. – Vol. 53, 1245–1257		doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.004
24	Tarke A, Sidney J, Kidd CK, Dan JM, Ramirez SI, Yu ED, Mateus J, da Silva Antunes R, Moore E, Rubiro P, Methot N, Phillips E, Mallal S, Frazier A, Rawlings SA, Greenbaum JA, Peters B, Smith DM, Crotty S, Weiskopf D, Grifoni A, Sette A. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. <i>Cell Reports Medicine</i> , 2021, Vol. 2, №2, 100204		doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100204
25	Titov A., Shaykhutdinova R., Shcherbakova O.V., Serdyuk Y.V., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Maleeva A.V., Khmelevskaya A., Dianov D.V., Shakirova N.T., Malko D.B., Shkurnikov M., Nersisyan S., Tonevitsky A., Khamaganova E., Ershov A.V., Osipova E.Y., Nikolaev R.V., Pershin D.E., Vedmedskia V.A., Maschan M., Ginanova V.R., Efimov G.A. Immunogenic epitope panel		doi: 10.1172/jci.insight.157699

	for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2. <i>JCI Insight.</i> , 2022, Vol. 7(9):e157699.		
26	Villemonteix J, Cohen L, Guihot A, Guérin V, Moulin C, Caseris M, Carol A, Bonacorsi S, Carcelain G. Comparison between enzyme-linked immunospot assay and intracellular cytokine flow cytometry assays for the evaluation of T cell response to SARS-CoV-2 after symptomatic COVID-19. <i>Immunity, Inflammation and Disease</i> , 2022, Vol. 10, №10, e617.		doi: 10.1002/iid3.617
27	Wherry EJ., Masopust D. Adaptive Immunity: Neutralizing, Eliminating, and Remembering for the Next Time. <i>Viral Pathogenesis (Third Edition), From Basics to Systems Biology</i> , 2016, pp. 57-69.		doi: 10.1016/B978-0-12-800964-2.00005-7
28	Zajac AJ., Harrington LE., Immune Response to Viruses: Cell-Mediated Immunity. <i>Encyclopedia of Virology, Elsevier eBooks</i> , 2008, pp. 70-77.		doi:10.1016/B978-012374410-4.00799-8
29	Zornikova KV, Khmelevskaya A, Sheetikov SA, Kiryukhin DO, Shcherbakova OV, Titov A, Zvyagin IV, Efimov GA. Clonal diversity predicts persistence of		doi: 10.1038/s42003-022-04250-7.

	SARS-CoV-2 epitope-specific T-cell response. <i>Commun Biol.</i> , 2022, Vol.5(1), pp.1351.		
--	---	--	--