

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-151>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Определение специфического Т-клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19

Бляхер М.С., Фёдорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И.,
Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И.

ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора,
125212, г. Москва, Россия

Введение. Развитие пандемии, связанной с COVID-19, послужило стимулом к научным исследованиям, направленным на изучение механизмов формирования иммунитета против SARS-CoV-2. В настоящее время имеется необходимость разработки отечественного специфического, несложного и экономичного метода, пригодного для мониторинга в популяции Т-клеточного ответа в отношении SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных людей.

Цель работы заключалась в отработке скринингового метода оценки специфического Т-клеточного иммунитета в отношении SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Исследованы 40 человек, перенёвших COVID-19 лёгкой или средней степени тяжести, и 20 здоровых добровольцев, не имевших в анамнезе данного заболевания. Серологические исследования по наличию и уровню антител класса IgG и IgM к SARS-CoV-2 проводили методом ИФА на тест-системах АО «Вектор-Бест». Антигенную стимуляцию мононуклеаров проводили на коммерческих планшетах с сорбированным цельновирионным инактивированным антигеном SARS-CoV-2 (ФБУН ГНЦ «Вектор», Россия). Концентрацию IFN- γ определяли методом ИФА на тест-системах АО «Вектор-Бест». Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel и Statistica 10.

Результаты. Стимуляция цельновирионным инактивированным антигеном SARS-CoV-2, фиксированным на дне лунок полистиролового планшета, мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови доноров, показала значительно более высокий медианный ответ по продукции IFN- γ у 40 человек, перенёвших COVID-19, по сравнению с 20 здоровыми донорами крови (172,1 [34,3–575,1] пг/мл против 15,4 [6,9–25,8] пг/мл, $p < 0,0001$). Не было различий в медианном уровне IFN- γ в супернатантах, собранных с нестимулированных мононуклеарных клеток от переболевших COVID-19 и здоровых доноров (2,7 [0,4–11,4] пг/мл против 0,8 [0,0–23,3] пг/мл; $p < 0,05$). Общая чувствительность и специфичность метода составляли 73% (95% доверительный интервал (ДИ) 58–88%) и 100% (95% ДИ 100–100%) соответственно при пороговом значении 50 пг/мл.

Заключение. Разработанный способ определения клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 может быть использован в качестве скринингового для мониторинга в популяции Т-клеточного ответа в отношении новой коронавирусной инфекции у переболевших людей.

Ключевые слова: Т-клеточный иммунитет; антигены SARS-CoV-2; продукция IFN- γ ; скрининг; цельновирионный инактивированный антиген; клеточный иммунный ответ

Для цитирования: Бляхер М.С., Фёдорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И. Определение специфического Т-клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(6): 527-537. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-151>

Для корреспонденции: Бляхер Мария Сергеевна, д-р мед. наук, профессор ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия. E-mail: maria.s.b@bk.ru

Участие авторов: Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической, экспериментальной работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Исследование одобрено этическим комитетом ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (протокол № 41 от 10 декабря 2020 г.).

Поступила 01.11.2022

Принята в печать 10.12.2022

Опубликована 30.12.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-151>

Assesment of specific T-cell immunity to SARS-CoV-2 virus antigens in COVID-19 reconvalescents

Mariya S. Blyakher, Irina M. Fedorova, Elena A. Tulskeya, Ivan V. Kapustin, Svetlana I. Koteleva, Zarema K. Ramazanova, Evgeny E. Odintsov, Svetlana V. Sandalova, Lidia I. Novikova

G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia

Introduction. The development of the COVID-19 pandemic has stimulated the scientific research aimed at studying of the mechanisms of formation the immunity against SARS-CoV-2. Currently, there is a need to develop a domestic simple and cost-effective specific method suitable for monitoring of T-cell response against SARS-CoV-2 in reconvalescents and vaccinated individuals.

Aim: Development of a screening method for evaluation specific T-cell immunity against SARS-CoV-2.

Materials and methods. Total 40 individuals who had mild to moderate COVID-19 and 20 healthy volunteers who did not have a history of this disease were examined. The presence and levels of IgG and IgM antibodies to SARS-CoV-2 were identified in participant's sera by ELISA using the diagnostic kits from JSC "Vector-Best" (Novosibirsk, Russian Federation). Antigenic stimulation of mononuclear cells was carried out on commercial plates with adsorbed whole-virion inactivated SARS-CoV-2 antigen (State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR Novosibirsk, Russian Federation). The concentration of IFN- γ was measured in ELISA using the test systems from JSC "Vector-Best" (Novosibirsk, Russian Federation). The immunophenotyping of lymphocytes was performed on a flow cytometer Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA). Statistical data processing was carried out using the Microsoft Excel and STATISTICA 10 software package.

Results. Stimulation of mononuclear cells isolated from the peripheral blood with whole-virion inactivated SARS-CoV-2 antigen fixed at the bottom of the wells of a polystyrene plate showed a significantly higher median response in terms of IFN- γ production in 40 people who had history of COVID-19 compared to 20 healthy blood donors (172.1 [34.3–575.1] pg/ml versus 15.4 [6.9–25.8] pg/ml, $p < 0.0001$).

There was no difference in median IFN- γ levels in supernatants collected from unstimulated mononuclear cells from COVID-19 reconvalescents and healthy donors (2.7 [0.4–11.4] pg/ml versus 0.8 [0.0–23.3] pg/ml, $p < 0.05$). The overall sensitivity and specificity of this method were 73% (95% CI 58–88%) and 100% (95% CI 100–100%), respectively, at a cut-off of 50 pg/ml.

Conclusion. The developed method for assessment of the cellular immune response to SARS-CoV-2 can be used as a screening method for monitoring the T-cell response in a population against a new coronavirus infection in recovered people.

Keywords: *T-cell immunity; SARS-CoV-2 antigens; IFN- γ production; screening; whole virion inactivated antigen; cellular immune response*

For citation: Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tulskeya E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I. Assesment of specific T-cell immunity to SARS-CoV-2 virus antigens in COVID-19 reconvalescents. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 527-537 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-151>

For correspondence: Maria S. Blyakher, Dr. Sci. (Med.), G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia. E-mail: maria.s.b@bk.ru

Information about the authors:

Blyakher M.S., <https://orcid.org/0000-0003-3480-6873>

Fedorova I.M., <https://orcid.org/0000-0002-0335-2752>

Tulskeya E.A., <https://orcid.org/0000-0003-1969-4009>

Kapustin I.V., <https://orcid.org/0000-0001-6191-260X>

Koteleva S.I., <https://orcid.org/0000-0003-1878-2234>

Ramazanova Z.K., <https://orcid.org/0000-0002-9314-3312>

Odintsov E.E., <https://orcid.org/0000-0001-5895-2520>

Sandalova S.V., <https://orcid.org/0000-0002-4548-9888>

Novikova L.I., <https://orcid.org/0000-0002-0307-4561>

Contribution: All authors made a significant contribution to the experimental work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Funding. The research was funded by the State budget.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 41 dated Dec. 10, 2020).

Received 01 November 2022

Accepted 10 December 2022

Published 30 December 2022

Введение

Стремительное развитие пандемии, связанной с коронавирусом SARS-CoV-2, и тяжесть протекания заболевания COVID-19 послужили стимулом к научным исследованиям, направленным на изучение патогенеза данного заболевания, поиск способов его лечения, механизмов формирования иммунитета против SARS-CoV-2 и разработку вакцин.

В целом ряде исследований после активации лимфоцитов антигенами SARS-CoV-2 были выявлены Т-клетки памяти среди как CD4⁺, так и CD8⁺ в большинстве образцов мононуклеаров из крови взрослых пациентов с COVID-19 (80–100 и 70–80% соответственно) [1–8]. Установлено, что формирование этих клеток вызывается широким кругом структурных и неструктурных белков вируса, выявлено множество иммунодоминантных эпитопов. Оценивались специфичность, величина и кинетика ответа у пациентов, связь этих аспектов с тяжестью заболевания [9–11]. Изучали значение перекрёстной реактивности Т-клеток памяти к сезонным коронавирусам (OC43, HKU1, NL63 и 229E) для тяжести течения COVID-19 [12].

При разработке вакцин против SARS-CoV-2 стимуляция не только гуморального, но и Т-клеточного иммунитета рассматривалась как важный целевой пункт [13–16]. Для этого требуются скрининговые методы, отвечающие следующим требованиям:

- невысокая стоимость;
- отсутствие необходимости в высокотехнологичном оборудовании;
- отсутствие необходимости в большом объёме крови пациента;
- возможность получения ответа в короткие сроки.

Кандидаты в такие методы были разработаны в 2020 г. и относятся к группе технологий IGRA (Interferon Gamma Releasing Assay – тесты, основанные на регистрации антиген-стимулированного выделения интерферона гамма (IFN- γ)).

В наборе «Тигра-Тест SARS-CoV-2» результат обследования достигается использованием готовой комбинации пептидов S-белка (AG1) и комбинации пептидов белков N, M, ORF3a и ORF7a (AG2), измерение проводится на оборудовании для ELISPOT и требует соответствующей квалификации сотрудников, а также содержит дорогостоящие реагенты [17].

Технология QuantiFERON, как и ELISPOT, относится к группе технологий IGRA. Первоначально эта технология имела коммерческую реализацию в виде набора для диагностики Т-клеточного иммунитета против туберкулёза (QuantiFERON-TB Gold), затем для диагностики Т-клеточного иммунитета против цитомегаловирусной инфекции (QuantiFERON-CMV), а в настоящее время и против SARS-CoV-2 (QuantiFERON SARS-CoV-2)¹. Набор реагентов

QuantiFERON SARS-CoV-2 предназначен для определения клеточного ответа к пептидным антигенам S1/S2 RBD из спайкового белка коронавируса SARS-CoV-2 по уровню продукции IFN- γ в образцах цельной гепаринизированной крови. Для реализации метода цельную кровь делят на 4 порции: негативный контроль (QuantiFERON Nil), позитивный контроль (QuantiFERON Mitogen), антиген S1, антиген S2 RBD (QuantiFERON AntigenTube). Полученные 4 пробирки (по 1 мл крови в каждой) сутки инкубируют в термостате, затем отделяют плазму центрифугированием. Уровень продукции IFN- γ определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА). Однако реализация данного метода требует использования реагентов от зарубежных производителей, что делает его неэкономичным и усложняет его применение для массовых исследований.

В связи с вышеперечисленным имеется необходимость разработки отечественного специфичного, несложного и экономичного метода, пригодного для мониторинга в популяции Т-клеточного ответа в отношении SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных людей.

Цель работы заключалась в отработке скринингового метода оценки активации специфического Т-клеточного иммунитета, предназначенного для наблюдения за формированием иммунологической памяти в отношении SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- оценить специфичность антигенной стимуляции лимфоцитов, выделенных из крови людей, переболевших COVID-19, в лунках готовых полистироловых планшетов ИФА-тест-систем;
- оценить иммунофенотип лимфоцитов, активирующихся при стимуляции антигенами SARS-CoV-2;
- оценить чувствительность и специфичность предлагаемого метода.

Материалы и методы

Клинические образцы цельной венозной крови и сыворотки были получены от 60 человек обоего пола в возрасте 18–70 лет, постоянно проживающих в Московском регионе. В число обследованных включены: 40 человек, перенёвших COVID-19 лёгкой или средней степени тяжести в период с декабря 2020 г. по октябрь 2021 г. (диагностика и лечение проведены в поликлиниках и клиниках г. Москвы); 20 здоровых добровольцев, не имеющих в анамнезе данного заболевания и планирующих вакцинацию против инфекции SARS-CoV-2. Работы с клиническим материалом проводились в соответствии с международными этическими нормами при информированном добровольном согласии обследуемых. Исследование одобрено этическим комитетом ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» (МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского) (протокол № 41 от 10 декабря 2020 г.).

Переболевшие COVID-19 обследовались через 1–1,5 месяца после перенесённого заболевания,

¹QuantiFERON SARS-CoV-2 RUO. A comprehensive immune response assessment toolset to maximize T cell immune response research insights. Available at: <https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/infectious-disease/quantiferon-sars-cov-2-ruo?clear=true#orderinginformation>

здоровый контроль – непосредственно перед вакцинацией (в день введения 1-го компонента вакцины).

Кровь брали в пробирки с гепарином (4 мл крови для исследования лимфоцитов) и в пробирки с активатором образования сгустка (2 мл крови на сыворотку).

Антитела (АТ) класса IgG к SARS-CoV-2 определяли методом ИФА на тест-системе SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ (АО «Вектор-Бест», Россия, № РЗН 2020/10388 от 18.05.2020), антитела класса IgM к SARS-CoV-2 определяли методом ИФА на тест-системе SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ (АО «Вектор-Бест», Россия, № РЗН 2020/10389 от 18.05.2020 г.) в соответствии с инструкцией разработчика. Трактовка результатов ИФА-тестирования проводилась в зависимости от коэффициента позитивности (КП). Реакция отрицательна при $KП < 0,8$, положительна при $KП \geq 1,1$, сомнительна при $0,8 \leq KП < 1,1$.

Мононуклеары выделяли из цельной венозной крови в градиенте плотности Histopaque-1077, разводили до концентрации 5×10^6 /мл в полной среде RPMI-1640 (ООО «ПанЭко», Россия) с антибиотиками и 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FCS). Доля лимфоцитов среди выделенных мононуклеаров колебалась от 85 до 92%.

Для антигенной стимуляции мононуклеаров использовали коммерческие полистироловые 96-луночные планшеты с сорбированным цельновирионным инактивированным антигеном SARS-CoV-2, предназначенные для выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 (производство ФБУН ГНЦ «Вектор», № РЗН 2020/10017 от 10.04.2020). Митогенную стимуляцию лимфоцитов проводили в лунках другого полистиролового планшета фитогемагглютинином Р (Sigma, США). Планшеты инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Для контроля специфичности антигенной стимуляции использовали полистироловые планшеты, предназначенные для выявления IgG-антител к вирусу денге (Vircell, S.L., Испания, REF-G1018), с сорбированным вирусом денге (тип 1 – штамм Гавайи, тип 2 – Новая Гвинея, тип 3 – штамм H87 и тип 4 – штамм H241) – возбудителем, с которым большинство жителей Московского региона не контактировало. Спонтанная продукция IFN- γ оценивалась в пробах, инкубированных в аналогичных условиях без антигена.

Супернатанты, собранные через 24 ч культивирования, хранили до исследования в замороженном состоянии (-40 °С). Концентрацию IFN- γ определяли методом ИФА на тест-системах фирмы АО «Вектор-Бест» (№ РЗН 2017/16008 от 24.07.2017). Результаты учитывали как разницу (Δ) между антиген-стимулированной и спонтанной продукцией IFN- γ и представляли в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q₁-Q₃]. В качестве порогового значения концентрации IFN- γ использовали 50 пг/мл (среднее значение различий между концентрациями IFN- γ , измеренными в триплетах, при определении уровня антиген-стимулированной продукции IFN- γ выделенными лимфоцитами).

Имунофенотип активированных лимфоцитов определяли на проточном цитометре Cytomics FC 500 (Beck-

man Coulter, США) с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США), которые содержали следующие флуоресцентные метки: CD69-PC5, CD3-FITC, CD8-PC7, CD4-PE, CD(16+56)-PE. Для исследования применяли две комбинации флуоресцентно меченных антител (CD69, CD3, CD8, CD4), которая давала сведения о количестве активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD69⁺), активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ, CD3⁺CD8⁺CD69⁺) или (CD69, CD3, CD8, CD(16+56)), с помощью которой оценивали количество активированных NK (CD3⁻CD16⁺56⁺CD69⁺) и NKT-клеток (CD3⁺CD16⁺56⁺CD69⁺). Результаты учитывали как разницу (Δ) между интактной пробой и SARS-CoV-2-стимулированной пробой и представляли в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q₁-Q₃].

Статистический анализ данных проведен с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel и Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Справедливость проверяемой гипотезы исследования оценивали по величине *p* value, критическим значением которой считали *p* < 0,05.

Результаты

Исследование проводилось с декабря 2020 г. по октябрь 2021 г. среди лиц, постоянно проживающих в Московском регионе. По данным интернет-ресурса GoGov², с момента начала вакцинации в РФ по май 2021 г. в Москве против SARS-CoV-2 был вакцинирован 1 млн 500 тыс. человек, количество людей с активной инфекцией оценивалось в 1 млн 180 тыс. К началу сентября эти цифры увеличились до 3 млн 611 тыс. и 1 млн 568 тыс. соответственно. Таким образом, в период исследования (особенно в его начале) возможность подбора неиммунного контроля была высокой.

У всех обследованных одновременно с забором крови для исследования Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 в сыворотке крови определяли концентрацию антител против того же вируса.

Все переболевшие COVID-19 через 1–1,5 месяца после выздоровления имели антитела класса IgG (среднее значение коэффициента позитивности КП = $11,5 \pm 1,1$), 25 человек сохраняли антитела класса IgM (КП = $3,3 \pm 0,4$). Здоровые лица, обследованные на неиммунный контроль, не имели определяемых уровней специфических АТ ни в одном из проводимых тестов.

Стимуляция цельновирионным инактивированным антигеном SARS-CoV-2 мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови доноров, показала значительно более высокий медианный ответ IFN- γ у 40 человек, перенёсших COVID-19, по сравнению с 20 здоровыми донорами крови (172,1 [34,3–575,1] пг/мл

²Статистика вакцинации от COVID-19 в Москве. Доступно на: <https://gogov.ru/covid-v-stats/msk#data>

против 15,4 [6,9–25,8] пг/мл; $p < 0,0001$). Не было различий в медианном уровне IFN- γ в супернатантах, собранных с нестимулированных мононуклеарных клеток от переболевших COVID-19 и здоровых доноров (2,7 [0,4–11,4] пг/мл против 0,8 [0,0–23,3] пг/мл; $p < 0,05$). Увеличение продукции IFN- γ лимфоцитами в присутствии этого антигена у половины пациентов происходила даже интенсивнее, чем теми же лимфоцитами, стимулированными митогеном фитогемагглютинином (107,5 [43,4–261,5] пг/мл).

Используя индекс Юдена [18], подсчитали, что общая чувствительность и специфичность составляли 73% (95% доверительный интервал (ДИ) 58–88%)

и 100% (95% ДИ 100–100%) соответственно при пороговом значении 50 пг/мл.

В нашем исследовании было показано, что при культивировании образцов клеток с цельновирионным инактивированным антигеном SARS-CoV-2 происходит специфическая активация лимфоцитов, выделенных из крови переболевших COVID-19 людей. В табл. 1 и 2 для доноров, у которых было достаточное количество мононуклеарных клеток для стимуляции всеми видами антигенов и митогеном, представлен ответ *in vitro* не только на вирусные частицы SARS-CoV-2, но и на аналогичный антигенный материал, полученный на основе вируса – возбудите-

Таблица 1. Продукция IFN- γ мононуклеарными клетками периферической крови доноров, перенёсших COVID-19
Table 1. IFN- γ production by peripheral blood mononuclear cells from COVID-19 reconvalescents

№ донора Donor's ID	Продукция IFN- γ , пг/мл IFN- γ production, pg/ml				
	спонтанная Spontaneous	стимулированная вирусом SARS-CoV-2 Stimulated by a SARS-CoV-2 virus	Δ_1	стимулированная вирусом денге Stimulated by the dengue virus	Δ_2
1	2,5	27,9	25,4	16,6	14,1
2	7,1	99,2	92,2	20,3	13,2
3	9,3	35,8	26,5	9,7	0,4
4	1,3	27,9	26,6	3,8	2,5
5	5,9	39,5	33,6	10,2	4,3
6	3,0	46,1	43,1	11,2	8,1
7	1,1	96,7	95,6	28,9	27,8
8	7,4	64,1	56,7	26,7	19,3
9	0,0	40,5	40,5	0,0	0,0
10	20,3	75,7	55,4	0,7	0,0
11	29,6	246,8	217,2	35,4	5,8
12	2,7	204,1	201,4	14,9	12,3
13	4,3	86,1	81,8	15,3	11,0
14	4,6	122,2	117,5	22,4	17,8
15	1,3	81,0	79,7	2,8	1,5
16	1,5	255,1	253,6	3,4	1,9
17	1,5	81,1	79,6	2,2	0,7
18	2,0	32,5	30,5	2,2	0,2
19	18,1	359,0	340,9	13,5	0,0
20	14,3	1703,8	1689,5	15,2	1,0
21	1,3	716,3	714,9	8,3	7,0
22	85,3	623,2	537,9	111,0	25,7
23	0,0	198,5	198,5	2,0	2,0
24	0,0	425,9	425,9	22,0	22,0
25	11,9	184,8	172,8	14,5	2,6
26	23	1245,1	1221,9	47,0	23,7
27	0,2	56,5	56,3	1,8	1,6
28	1,5	67,1	65,6	2,5	1,0
29	0,0	230,0	230,0	10,5	10,5
30	0,0	184,5	184,5	15,5	15,5
31	33,8	121,2	87,4	35,7	1,9

Примечание. Δ_1 – разность между спонтанной и SARS-CoV-2-индуцированной продукцией; Δ_2 – разность между спонтанной и индуцированной вирусом денге продукцией.

Note. Δ_1 – difference between spontaneous and SARS-CoV-2-induced production; Δ_2 – difference between spontaneous and dengue virus induced production.

ля лихорадки денге.

Из **табл. 1** видно, что для каждого из обследованных людей, перенёсших COVID-19, увеличение продукции IFN- γ при стимуляции их мононуклеаров на ИФА-планшете, содержащем цельновирионный антиген SARS-CoV-2, превышает таковую при стимуляции на планшете с антигенами вируса денге в 1,5–40 раз, а само увеличение этого ответа на вирус денге у половины доноров не превышает 5 пг/мл.

Из **табл. 2** видно, что у лиц, не болевших COVID-19, реакция мононуклеаров на антигены SARS-CoV-2 практически такая же низкая, как и на антигены вируса денге.

Медианы ответов IFN- γ и межквартильный диапазон на АГ-стимуляцию мононуклеаров людей, перенёсших COVID-19 (группа 1) и не болевших им (группа 2), представлены в **табл. 3**.

Статистическая обработка результатов данного исследования, приведённая в **табл. 3**, показывает, что после стимуляции *in vitro* антигенами SARS-CoV-2, фиксированными в лунках полистиролового планшета, продукция IFN- γ мононуклеарными клетками периферической крови доноров, не болевших

COVID-19, значимо ниже, чем у лиц, перенёсших это заболевание. На стимуляцию антигенами вируса денге, не связанными с SARS-CoV-2, и также фиксированными в лунках полистиролового планшета, реакция мононуклеаров в обеих группах была низкой и практически одинаковой.

По данным литературы [19, 20], распознавание антигена клетками памяти и запуск ими синтеза IFN- γ свойственны Т-лимфоцитам. В нашем исследовании также было необходимо показать, что запуск реакции активации обеспечивается именно антигенспецифическими Т-лимфоцитами.

Для количественной оценки активации Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) или цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) после их стимуляции антигенами SARS-CoV-2, поместили четырёхкомпонентной смесью флюоресцентно меченных моноклональных антител: CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PC7, CD69-PC5 и исследовали на проточном цитометре.

В **табл. 4** представлены результаты иммунофенотипирования SARS-CoV-2-стимулированных лимфоцитов у 25 пациентов, перенёсших COVID-19, и 20 здоровых доноров в виде Δ изменения процента лимфо-

Таблица 2. Продукция IFN- γ мононуклеарными клетками периферической крови доноров, не болевших COVID-19

Table 2. Production of IFN- γ by peripheral blood mononuclear cells of donors who had no history of COVID-19

№ донора Donor's No.	Продукция IFN- γ , пг/мл IFN- γ production, pg/ml				
	спонтанная Spontaneous	стимулированная вирусом SARS-CoV-2 Stimulated by a SARS-CoV-2 virus	Δ_1	стимулированная вирусом денге Stimulated by the dengue virus	Δ_2
1	58,3	58,3	0,0	65,9	7,5
2	0,3	6,9	6,6	0,8	0,5
3	2,4	3,0	0,6	3,0	0,6
4	0,0	1,9	1,9	0,0	0,0
5	26,3	26,3	0,0	26,3	0,0
6	2,7	19,5	16,8	19,5	16,8
7	35,1	35,1	0,0	12,4	0,0
8	23,9	26,2	2,3	11,3	0,0
9	0,0	3,2	3,2	1,2	1,2
10	0,0	2,0	2,0	0	0,0
11	0,0	11,1	11,1	0	0,0
12	0,0	7,6	7,6	0	0,0
13	0,0	12,3	12,3	0,0	0,0
14	3,1	15,4	12,4	22,5	19,4
15	0,8	21,8	21,0	23,3	22,5
16	1,4	20,1	18,7	9,9	8,5
17	23,3	25,9	2,6	24,8	1,5
18	0,0	16,4	16,4	0,0	0,0
19	0,0	13,9	13,9	21,6	21,6

Примечание. Δ_1 – разность между спонтанной и SARS-CoV-2-индуцированной продукцией; Δ_2 – разность между спонтанной и индуцированной вирусом денге продукцией.

Note. Δ_1 – difference between spontaneous and SARS-CoV-2-induced production; Δ_2 – difference between spontaneous and dengue virus induced production.

Таблица 3. Медианы [Q_1 – Q_3] продукции IFN- γ у людей, перенёвших COVID-19 (группа 1) и не болевших им (группа 2), пг/мл
Table 3. Medians [Q_1 – Q_3] of IFN- γ production in COVID-19 reconvalescents (group 1) and participants who had no history of COVID-19 (group 2), pg/ml

Варианты стимуляции Stimulation options	Группа 1 (n = 31) Group 1 (n = 31)	Группа 2 (n = 19) Group 1 (n = 19)
Спонтанная продукция Spontaneous modes	2,7 [1,3–11,9]	0,8 [0,0–23,3]
Продукция после стимуляции антигенами SARS-CoV-2 Production after stimulation with SARS-CoV-2 antigens	99,2 [26,5–246,8]	15,4 [6,9–25,8]
Δ_1 – разница между спонтанной и индуцированной SARS-CoV-2 продукцией Δ_1 – the difference between spontaneous and SARS-CoV-2 induced production	92,2* [55,4–230,0]	6,5 [1,9–13,9]
Продукция после стимуляции антигенами вируса денге Production after stimulation by dengue virus antigens	13,5 [2,8–22,0]	9,9 [0,0–22,5]
Δ_2 – разница между спонтанной и индуцированной вирусом денге продукцией Δ_2 – the difference between spontaneous and dengue induced products	4,3 [1,0–14,1]	0,5 [0,0–8,5]

Примечание. *Различие между Δ_1 в группах 1 и 2 значимо при $p < 0,001$ по критерию Манна–Уитни.

Note. *The difference between Δ_1 in groups 1 and 2 is significant at $p < 0.001$ according to the Mann–Whitney test.

Таблица 4. Иммунофенотип лимфоцитов, активирующихся в присутствии антигенов SARS-CoV-2, и концентрация IFN- γ , секретируемого ими в культуральную жидкость, Me [Q_1 – Q_3]

Table 4. Immunophenotype of lymphocytes activated in the presence of SARS-CoV-2 antigens and the concentration of IFN- γ secreted by them into the culture medium, Me [Q_1 – Q_3]

Группа Group	Δ увеличения лимфоцитов, экспрессирующих CD69 (%) Δ increase in lymphocytes expressing CD69 (%)		Δ концентрации IFN- γ , пг/мл Δ IFN- γ concentration, pg/ml
	среди CD3 ⁺ CD4 ⁺ among CD3 ⁺ CD4 ⁺	среди CD3 ⁺ CD8 ⁺ among CD3 ⁺ CD8 ⁺	
Пациенты, перенёвшие COVID-19 (n = 25) COVID-19 reconvalescents (n = 25)	2,7 [0,6–8,0]*	4,5 [1,5–13,1]*	172,0 [52,7–392,0]*
Здоровые люди (n = 20) Healthy volunteers (n = 20)	0,7 [0,3–1,9]	1,8 [0,8–3,7]	4,1 [1,6–9,8]

Примечание. *Различие между группами значимо при $p < 0,01$ по критерию Манна–Уитни.

Note. *The difference between the groups is significant at $p < 0.01$ according to the Mann–Whitney test.

цитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD69. Кроме того, приведены результаты измерения продукции IFN- γ (в виде Δ концентрации, пг/мл) методом ИФА в супернатантах из соответствующих лунок ИФА-планшета.

У 5 из 25 обследованных переболевших людей не повышалась АГ-стимулированная продукция IFN- γ . Однако у двух пациентов происходила активация лимфоцитов, которая выражалась увеличением доли CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих маркер CD69 на клеточной мембране. У 20 человек, перенёвших COVID-19, в присутствии антигенов SARS-CoV-2 активируются как Т-хелперы, так и Т-цитотоксические лимфоциты, и активация последних выражается большей величиной Δ . Кроме того, CD8⁺ Т-клетки активировались у 19 человек, а CD4⁺ Т-клетки – у 16. Активация обеих субпопуляций происходила у 10 человек.

Для оценки степени участия NK- и NKT-лимфоцитов в продукции IFN- γ , стимулированной антигенами SARS-CoV-2, набор флюоресцентно меченных моноклональных антител был несколько изменён: CD3-FITC, CD(16+56)-PE, CD8-PC7, CD69-PC5. С помощью такой комбинации антител в одной и той

же пробе лимфоцитов непосредственно определялось количество активированных CD8⁺ Т-клеток, NK- и NKT-лимфоцитов, а также косвенно (как разница между процентом Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток) – количество активированных CD4⁺ Т-клеток.

Стимуляция лимфоцитов контрольным антигеном (вируса денге) в парных пробах одних и тех же пациентов (табл. 5) не вызывает активации CD8⁺ Т-клеток и в меньшей степени затрагивает NK- и NKT-субпопуляции, чем стимуляция антигенами SARS-CoV-2 (в 4–8 раз). Сопровождающая этот процесс продукция IFN- γ существенно ниже при стимуляции контрольным антигеном (примерно в 500 раз) с учётом того, что прирост активированных CD8⁺ Т-клеток в пробах, стимулированных антигенами вируса денге, в 10 раз ниже, чем в пробах, стимулированных SARS-CoV-2.

Обсуждение

В мировой научной литературе представлены работы о возможности применения технологии IGRA для диагностики крови *in vitro*, используемой в клинических лабораториях для измерения IFN- γ , высвобождаемого антиген-специфическими Т-клетками после

Таблица 5. Изменение иммунофенотипа Т- и NK-клеток и продукции IFN- γ при их стимуляции антигенами SARS-CoV-2 или вируса денге в группе пациентов после COVID-19 (индивидуальные данные)**Table 5. Changes in the immunophenotype of T- and NK-cells and IFN- γ production during their stimulation with SARS-CoV-2 or dengue virus antigens in the group of COVID-19 reconvalescents (individual data)**

№ пробы Sample No.	Лимфоциты активированы на планшете с антигенами SARS-CoV-2 Lymphocytes are activated on a plate with SARS-CoV-2 antigens					Лимфоциты активированы на планшете с антигенами вируса денге Lymphocytes are activated on a plate with dengue virus antigens				
	Th $\Delta\%$	CTL $\Delta\%$	NK $\Delta\%$	NKT $\Delta\%$	IFN- γ , пг/мл pg/ml	Th $\Delta\%$	CTL $\Delta\%$	NK $\Delta\%$	NKT $\Delta\%$	IFN- γ , пг/мл pg/ml
1	5,5	7,8	3,4	9,4	30,5	0,0	0,0	3,4	5,9	0,2
2	2,8	3,9	46,8	11,3	79,7	0,8	0,8	9,2	6,3	1,5
3	3,8	7,7	55,3	14,1	37,2	1,0	1,5	14,4	3,7	0,0
4	1,0	5,0	28,2	1,3	49,6	0,0	4,9	21,2	4,2	4,4
5	0,7	7,7	26,1	6,1	64,1	0,4	1,1	13,8	0,0	0,2
6	3,0	9,4	50,5	7,6	82,8	1,6	4,5	38,3	3,0	29,9
7	1,2	5,1	64,7	20,3	340,9	2,1	1,2	30,0	0,0	0,0
8	0,9	4,0	14,4	16,0	102,0	0,3	0,7	0,0	0,0	0,0
9	17,7	18,1	55,4	48,0	1600,4	1,0	0,0	0,3	3,0	0,0
10	13,5	2,1	37,5	28,2	714,9	4,5	0,0	19,4	5,7	7,0
11	8,5	25,2	64,2	39,9	1185,2	0,3	0,0	27,5	3,5	5,4
12	0,7	7,7	36,6	19,8	369,3	0,4	1,1	9,9	3,7	0,0
13	1,2	7,7	45,4	21,3	180,8	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0
Me [Q ₁ -Q ₃]	2,8* [1,0-5,5]	7,7* [5,0-7,8]	45,4* [28,2-55,3]	16* [9,4-21,3]	102* [64,1-369,3]	0,4 [0,3-1,0]	0,8 [0,0-1,2]	13,8 [3,4-21,2]	3,5 [0,0-4,2]	0,2 [0,0-4,4]

Примечание. *Различия между значениями в пробах, стимулированных антигенами SARS-CoV-2, и значениями одноимённых параметров в пробах, стимулированных антигенами вируса денге, значимы при $p < 0,001$ по критерию Манна-Уитни.

Note. *Differences between values in samples stimulated with SARS-CoV-2 antigens and values of similar parameters in samples stimulated with dengue virus antigens are significant at $p < 0.001$ according to the Mann-Whitney test.

стимуляции патоген-специфическими пептидами [21–23]. Авторы показывают, что в зависимости от срока обследования после заболевания COVID-19 или выздоровления чувствительность и специфичность теста могут составлять от 81,1% (95% ДИ 74,9–86%) до 90% (95% ДИ 82–95%) и от 90,9% (95% ДИ 74,5–97,6%) до 96% (95% ДИ 86–99%) соответственно.

В современных реалиях чтобы лучше оценить иммунный статус отдельных лиц и групп населения и новые вакцины, необходимы адекватные иммунодиагностические инструменты, которые измеряют клеточный иммунный ответ на SARS-CoV-2. Предложенный нами способ активации лимфоцитов с использованием готовых коммерческих тест-систем показал, что в ходе его реализации происходит АГ-стимуляция, которая специфична с высокой степенью чувствительности – 73% (95% ДИ 58–88%) – и не уступает по своей информативности анализу учёта IFN- γ другим вариантам технологии IGRA.

CD69 довольно давно известен как маркер активации Т-лимфоцитов и NK-клеток [24]. Повышение на Т-лимфоцитах экспрессии CD69 и продукции IFN- γ после антигенной стимуляции используется для выявления клеток памяти при многих инфекциях [25, 26].

В случае, когда синтез IFN- γ регистрируется не внутри клетки с известным иммунофенотипом, а вне её (например, методом ELISPOT), возникает вопрос, какая часть IFN- γ происходит из Т-клеток, а какая – из NK-клеток. Ряд исследователей полагает, что NK-клетки могут напрямую распознавать сложный патоген, такой как цитомегаловирус человека (HCMV). Так, воздействие HCMV (штамм ТВ40/Е) на NK-клетки человека индуцировало экспрессию CD69, стимулировало секрецию IFN- γ и увеличивало их цитотоксическую активность в отношении инфицированных HCMV клеток [27]. Другие считают, что при острой инфекции эти механизмы не имеют большого значения [28].

В нашей работе также мог иметь значение тот факт, что специфические Т-клетки определялись в крови людей, переболевших COVID-19. В работе S. Varshetta и соавт. показано, что у пациентов с COVID-19 (особенно с тяжёлой формой) было изменено распределение лимфоцитов периферической крови с увеличением доли зрелых NK- и низким количеством Т-клеток. NK-клетки и CD8⁺ Т-клетки, в частности, характеризовались повышенной экспрессией CD69. После выздоровления количество CD8⁺ Т-клеток и экспрессия CD69 на них нормализовались [29]. Тем

не менее нельзя было исключить, что, будучи активированы *in vivo*, эти клетки более активно реагируют и *in vitro*.

Оценка степени участия NK- и NKT-лимфоцитов в продукции IFN- γ , стимулированной антигенами SARS-CoV-2, в наших исследованиях позволила показать, что вклад NK-лимфоцитов в результирующий эффект АГ-стимулированной продукции IFN- γ , вероятно, меньше, чем вклад Т-лимфоцитов. NK-лимфоциты одного и того же пациента активируются в присутствии антигенов как SARS-CoV-2, так и вируса денге, однако степень активации NK-клеток (с повышением экспрессии CD69) в присутствии антигенов вируса денге ниже и не приводит к продукции IFN- γ даже на низком уровне, если только не сопровождается активацией CD8⁺ Т-клеток.

Заключение

Таким образом, наши исследования показали, что предложенный способ определения клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 позволяет различать перенёсших COVID-19 и неинфицированных здоровых доноров крови. Общая чувствительность и специфичность метода не уступают другим аналогичным методам. Следовательно, применение разработанного нами способа определения клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 является обоснованным и перспективным.

Предлагаемый способ определения клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 как любой метод имеет суммарную погрешность оценки АГ-стимулированного увеличения экспрессии маркера активации Т-лимфоцитов CD69 или АГ-стимулированной продукции IFN- γ , которая складывается из точности дозирования лимфоцитов в лунки планшета, аликвотирования клеток и супернатантов, а также из измерительной погрешности автоматических приборов для цито- и фотометрии. Однако эти ограничения не являются определяющими и устраняются путём применения поверенного оборудования и дублирования клеточных проб.

Предложенный способ имеет следующие преимущества перед зарубежными аналогичными методами, которые делают его пригодным для мониторинга Т-клеточного ответа в популяции:

- является более экономичным, так как не требует дорогостоящего оборудования и может быть реализован с использованием реагентов российских производителей;

- позволяет использовать готовые полистироловые планшеты ИФА-тест-систем, прошедших регистрацию для медицинских целей, с фиксированным антигеном вируса SARS-CoV-2, которые применяются для обнаружения антител соответствующей специфичности, что позволяет дополнительно стандартизировать метод;

- подходит для людей с любым гаплотипом по антигенам главного комплекса гистосовместимости (HLA) и может быть осуществлён в течение трёх суток.

Дальнейшие исследования будут направлены на возможность применения предложенного способа для определения клеточного иммунного ответа на разные эпитопы антигенов SARS-CoV-2 (с использованием ИФА-тест-систем с фиксированными антигенами вируса) с целью изучения формирования поствакцинального иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Soresina A., Moratto D., Chiarini M., Paolillo C., Baresi G., Foca E., et al. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2020; 31(5): 565–9. <https://doi.org/10.1111/pai.13263>
2. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., et al. COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science.* 2020; 369(6508): 1209. <https://doi.org/10.1126/science.abc8511>
3. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., et al. Broad and strong memory CD4(+) and CD8(+) T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol.* 2020; 21(11): 1336–45. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
4. Ni L., Ye F., Cheng M.L., Feng Y., Deng Y.Q., Zhao H., et al. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity.* 2020; 52(6): 971–7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.023>
5. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., et al. Targets of T Cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell.* 2020; 181(7): 1489–501. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
6. Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature.* 2020; 587(7833): 270–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>
7. Gimenez E., Albert E., Torres I., Remigia M.J., Alcaraz M.J., Galindo M.J., et al. SARS-CoV-2-reactive interferon-gamma-producing CD8+ T cells in patients hospitalized with coronavirus disease. *J. Med. Virol.* 2021; 93(1): 375–82. <https://doi.org/10.1002/jmv.26213>
8. Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature.* 2020; 584(7821): 457–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
9. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol.* 2020; 21(11): 1336–45. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
10. Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., et al. Robust T cell response toward spike, membrane, and nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins is not associated with recovery in critical COVID-19 Patients. *Cell Rep. Med.* 2020; 1(6): 100092. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100092>
11. Oja A.E., Saris A., Ghandour C.A., Kragten N.A.M., Hogema B.M., Nossent E.J., et al. Divergent SARS-CoV-2-specific T and B cell responses in severe but not mild COVID-19. *bioRxiv.* 2020; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.06.18.159202>
12. Auladell M., Jia X., Hensen L., Chua B., Fox A., Nguyen T.H.O., et al. Recalling the future: immunological memory toward unpredictable influenza viruses. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1400. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01400>
13. Robbiani D.F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Wang Z., Cho A., et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature.* 2020; 584(7821): 437–42. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2456-9>
14. Folegatti P.M., Ewer K.J., Aley P.K., Angus B., Becker S., Bellij-Rammerstorfer S., et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2020; 396(10249): 467–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)

15. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Schleblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020; 396(10255): 887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
16. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*. 2020; 55: 102763. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102763>
17. 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; 21(3): 178–92. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192>
18. Youden W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950; 3(1): 32–5. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:1<32:aid-cn-cr2820030106>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32:aid-cn-cr2820030106>3.0.co;2-3)
19. Solano C., Benet I., Clari M.A., Nieto J., de la Cámara R., López J., et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon gamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*. 2008; 93(9): 1434–6. <https://doi.org/10.3324/haematol.12880>
20. de Araújo-Souza P.S., Hanschke S.C.H., Nardy A.F.F.R., Sécca C., Oliveira-Vieira B., Silva K.L., et al. Differential interferon- γ production by naive and memory-like CD8 T cells. *J. Leukoc. Biol*. 2020; 108(4): 1329–37. <https://doi.org/10.1002/JLB.2AB0420-646R>
21. Murugesan K., Jagannathan P., Pham T.D., Pandey S., Bonilla H.F., Jacobson K., et al. Interferon- γ release assay for accurate detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 T-cell response. *Clin. Infect. Dis*. 2021; 73(9): 3130–2. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1537>
22. Fernández-González M., Agulló V., Padilla S., García J. A., García-Abellán J., Botella Á., et al. Clinical performance of a standardized severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) interferon- γ release assay for simple detection of T-cell responses after infection or vaccination. *Clin. Infect. Dis*. 2022; 75(1): e338–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1021>
23. Echeverría G., Guevara Á., Coloma J., Ruiz A.M., Vasquez M.M., Tejera E., et al. Pre-existing T-cell immunity to SARS-CoV-2 in unexposed healthy controls in Ecuador, as detected with a COVID-19 interferon-gamma release assay. *Int. J. Infect. Dis*. 2021; 105: 21–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.034>
24. Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol*. 2017; 47(6): 946–53. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>
25. Chen Z.Y., Wang L., Gu L., Qu R., Hu Z., et al. Decreased expression of CD69 on T Cells in tuberculosis infection resisters. *Front. Microbiol*. 2020; 11: 1901. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01901>
26. Murata K., Hoshina T., Onoyama S., Tanaka T., Kanno S., Ishimura M., et al. Reduction in the number of Varicella-Zoster virus-specific T-Cells in immunocompromised children with varicella. *Tohoku J. Exp. Med*. 2020; 250(3): 181–90. <https://doi.org/10.1620/tjem.250.181>
27. Muntasell A., Costa-Garcia M., Vera A., Marina-Garcia N., Kirschning C.J., López-Botet M. Priming of NK cell anti-viral effector mechanisms by direct recognition of human cytomegalovirus. *Front. Immunol*. 2013; 4: 40. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00040>
28. Della Chiesa M., De Maria A., Muccio L., Bozzano F., Sivori S., Moretta L. Human NK cells and herpesviruses: mechanisms of recognition, response and adaptation. *Front. Microbiol*. 2019; 10: 2297. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02297>
29. Varchetta S., Mele D., Oliviero B., Mantovani S., Ludovisi S., Cerino A., et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell. Mol. Immunol*. 2021; 18(3): 604–12. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00557-9>

REFERENCES

1. Soresina A., Moratto D., Chiarini M., Paolillo C., Baresi G., Foca E., et al. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatr. Allergy Immunol*. 2020; 31(5): 565–9. <https://doi.org/10.1111/pai.13263>
2. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., et al. COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*. 2020; 369(6508): 1209. <https://doi.org/10.1126/science.abc8511>
3. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., et al. Broad and strong memory CD4(+) and CD8(+) T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol*. 2020; 21(11): 1336–45. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
4. Ni L., Ye F., Cheng M.L., Feng Y., Deng Y.Q., Zhao H., et al. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity*. 2020; 52(6): 971–7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.023>
5. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., et al. Targets of T Cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*. 2020; 181(7): 1489–501. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
6. Braun J., Loyal L., Frensch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*. 2020; 587(7833): 270–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>
7. Gimenez E., Albert E., Torres I., Remigia M.J., Alcaraz M.J., Galindo M.J., et al. SARS-CoV-2-reactive interferon-gamma-producing CD8+ T cells in patients hospitalized with coronavirus disease. *J. Med. Virol*. 2021; 93(1): 375–82. <https://doi.org/10.1002/jmv.26213>
8. Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020; 584(7821): 457–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
9. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol*. 2020; 21(11): 1336–45. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
10. Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., et al. Robust T cell response toward spike, membrane, and nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins is not associated with recovery in critical COVID-19 Patients. *Cell Rep. Med*. 2020; 1(6): 100092. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100092>
11. Oja A.E., Saris A., Ghandour C.A., Kragten N.A.M., Hogema B.M., Nossent E.J., et al. Divergent SARS-CoV-2-specific T and B cell responses in severe but not mild COVID-19. *bioRxiv*. 2020; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.06.18.159202>
12. Auladell M., Jia X., Hensen L., Chua B., Fox A., Nguyen T.H.O., et al. Recalling the future: immunological memory toward unpredictable influenza viruses. *Front. Immunol*. 2019; 10: 1400. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01400>
13. Robbiani D.F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Wang Z., Cho A., et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature*. 2020; 584(7821): 437–42. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2456-9>
14. Folegatti P.M., Ewer K.J., Aley P.K., Angus B., Becker S., Bellij-Rammerstorfer S., et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020; 396(10249): 467–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)
15. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Schleblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020; 396(10255): 887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
16. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*. 2020; 55: 102763. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102763>

17. Poteryaev D.A., Abbasova S.G., Ignat'eva P.E., Strizhakova O.M., Kolesnik S.V., Khamitov R.A. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2021; 21(3): 178–92. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192> (in Russian)
18. Youden W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950; 3(1): 32–5. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:1<32:aid-cnrc2820030106>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32:aid-cnrc2820030106>3.0.co;2-3)
19. Solano C., Benet I., Clari M.A., Nieto J., de la Cámara R., López J., et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon gamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*. 2008; 93(9): 1434–6. <https://doi.org/10.3324/haematol.12880>
20. de Araújo-Souza P.S., Hanschke S.C.H., Nardy A.F.F.R., Sécca C., Oliveira-Vieira B., Silva K.L., et al. Differential interferon- γ production by naive and memory-like CD8 T cells. *J. Leukoc. Biol*. 2020; 108(4): 1329–37. <https://doi.org/10.1002/JLB.2AB0420-646R>
21. Murugesan K., Jagannathan P., Pham T.D., Pandey S., Bonilla H.F., Jacobson K., et al. Interferon- γ release assay for accurate detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 T-cell response. *Clin. Infect. Dis*. 2021; 73(9): 3130–2. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1537>
22. Fernández-González M., Agulló V., Padilla S., García J. A., García-Abellán J., Botella Á., et al. Clinical performance of a standardized severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) interferon- γ release assay for simple detection of T-cell responses after infection or vaccination. *Clin. Infect. Dis*. 2022; 75(1): e338–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1021>
23. Echeverría G., Guevara Á., Coloma J., Ruiz A.M., Vasquez M.M., Tejera E., et al. Pre-existing T-cell immunity to SARS-CoV-2 in unexposed healthy controls in Ecuador, as detected with a COVID-19 interferon-gamma release assay. *Int. J. Infect. Dis*. 2021; 105: 21–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.034>
24. Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol*. 2017; 47(6): 946–53. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>
25. Chen Z.Y., Wang L., Gu L., Qu R., Lowrie D.B., Hu Z., et al. Decreased expression of CD69 on T Cells in tuberculosis infection resisters. *Front. Microbiol*. 2020; 11: 1901. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01901>
26. Murata K., Hoshina T., Onoyama S., Tanaka T., Kanno S., Ishimura M., et al. Reduction in the number of Varicella-Zoster virus-specific T-Cells in immunocompromised children with varicella. *Tohoku J. Exp. Med*. 2020; 250(3): 181–90. <https://doi.org/10.1620/tjem.250.181>
27. Muntasell A., Costa-Garcia M., Vera A., Marina-Garcia N., Kirschning C.J., López-Botet M. Priming of NK cell anti-viral effector mechanisms by direct recognition of human cytomegalovirus. *Front. Immunol*. 2013; 4: 40. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00040>
28. Della Chiesa M., De Maria A., Muccio L., Bozzano F., Sivori S., Moretta L. Human NK cells and herpesviruses: mechanisms of recognition, response and adaptation. *Front. Microbiol*. 2019; 10: 2297. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02297>
29. Varchetta S., Mele D., Oliviero B., Mantovani S., Ludovisi S., Cerino A., et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell. Mol. Immunol*. 2021; 18(3): 604–12. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00557-9>