

· 标准与规范 ·

# 流式细胞术检测新型冠状病毒抗原特异性 T 细胞的方法和操作规程专家共识

中国免疫学会

通信作者:曹雪涛,海军军医大学免疫学研究所暨免疫与炎症全国重点实验室,上海 200433,中国医学科学院免疫治疗研究中心,北京 100005, Email: caoxt@immunol.org; 吴玉章,陆军军医大学基础医学院免疫学教研室,重庆 400038, Email: wuyuzhang@iiicq.vip; 钟南山,广州医科大学呼吸疾病全国重点实验室 广州国家实验室,广州 510120, Email: nanshan@vip.163.com

**【摘要】** 抗原特异性 T 细胞是抗病毒免疫应答的重要组成部分,了解其数量、相对频数与功能状态对评估个体或群体抗原特异性免疫具有重要意义,然而抗原特异性 T 细胞相关的检测技术和操作流程目前尚缺乏一致性的指南或共识。在新型冠状病毒感染疫情期间和疫情后评估群体的新型冠状病毒特异性 T 细胞均有必要性。为规范新型冠状病毒特异性 T 细胞的检测方法和操作,中国免疫学会在新型冠状病毒特异性 T 细胞的检测方法、生物标志物组合方案、操作技术要点和注意事项、质量控制、数据分析和结果解读、人员培训等方面形成相关共识。本共识对建立新型冠状病毒特异性 T 细胞标准检测方法和操作流程具有指导意义,有利于提高不同中心检测结果的一致性和可比性,也为制订其他病原(如流感病毒)感染的抗原特异性 T 细胞检测规范提供参考。

**【关键词】** 冠状病毒属; 新型冠状病毒; 免疫应答; 抗原特异性 T 细胞; 流式细胞术

基金项目:广州实验室应急攻关项目(EKPG21-30-3)

实践指南注册:国际实践指南注册与透明化平台(PREPARE-2024CN507)

## Expert consensus on flow cytometry-based assays for SARS-CoV-2-specific T cells and related operating procedure

Chinese Society for Immunology

Corresponding authors: Cao Xuetao, National Key Laboratory of Immunity and Inflammation, Institute of Immunology, Naval Medical University, Shanghai 200433, China, Center for Immunotherapy, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China, Email: caoxt@immunol.org; Wu Yuzhang, Institute of Immunology, School of basic Medicine, the Army Medical University, Chongqing 400038, China, Email: wuyuzhang@iiicq.vip; Zhong Nanshan, State Key Laboratory of Respiratory Disease of Guangzhou Medical University, Guangzhou Laboratory, Guangzhou 510120, China, Email: nanshan@vip.163.com

**【Abstract】** T-cell immune response is an important component of antiviral immunity, it is of great significance to determine their absolute counts, relative frequencies and functionalities for evaluating protective immunity in individuals and population. However, there is a lack of guidelines or a consensus on assays for antigen-specific T cells. It is necessary to evaluate the SARS-CoV-2-specific T cells in population during and after COVID-19 epidemic. To standardize the detection method for SARS-CoV-2-specific T cells, the Chinese Society for Immunology organized experts and reached a consensus on the detection method, biomarker combination scheme, technical points of SOP, quality control, data analysis and interpretation of results, personnel

DOI: 10.3760/ema.j.cn112137-20240923-02164

收稿日期 2024-09-23 本文编辑 吕相征

引用本文:中国免疫学会.流式细胞术检测新型冠状病毒抗原特异性 T 细胞的方法和操作规程专家共识[J].中华医学杂志,2025,105(4):261-270. DOI: 10.3760/ema.j.cn112137-20240923-02164.



training, etc. The consensus is of guiding significance to establish standard detection methods and operating procedures for SARS-CoV-2-specific T cells, which is beneficial for the consistency and comparability of results from different laboratories, and also provides reference for antigen-specific T cell standard detection methods for other pathogens (such as influenza) infection.

**【Key words】** Coronavirus; SARS-CoV-2; Immune responses; Antigen-specific T cell; Flow cytometry

**Fund program:** Emergency Key Program of Guangzhou Laboratory (EKPG21-30-3)

**Practice guideline registration:** Practice Guideline Registration for Transparency (PREPARE-2024CN507)

新型冠状病毒(简称新冠病毒)特异性 T 细胞检测,主要用于评估新冠病毒疫苗诱导的 T 细胞免疫应答和群体感染后的细胞免疫状态,对新冠病毒疫情的监测和流行趋势的研判等均具有重要意义。抗原特异性 T 细胞识别抗原受主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)编码分子的限制<sup>[1]</sup>,由于人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)具有高度多态性,导致检测人群中抗原特异性 T 细胞的变异度较大。此外,抗原特异性 T 细胞在总 T 细胞中的频率较低,一般在外周血单个核细胞中的检出率低于 1%,增加了检测结果可靠性的难度;对抗原特异性 T 细胞的现有检测技术均基于活细胞,对细胞活性和样本前处理的要求较高。以上原因导致难以控制抗原特异性 T 细胞检测的质量,也难以建立适用于群体评估的通用型标准物。

目前,新冠病毒特异性 T 细胞检测方法主要是酶联免疫斑点检测(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)和流式细胞术(fluorescence cytometry, FC)两种方法<sup>[2-5]</sup>。ELISPOT 技术虽然是目前检测抗原特异性 T 细胞的常用方法,但是该方法检测指标通常只有一个,无法获得更多信息,并且无法排除样品中其他类型免疫细胞的贡献,也无法获得 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的各自水平。因此,中国免疫学会对新冠病毒抗原特异性 T 细胞的检测方法和标准操作规程形成相关共识,以期为将来建立新冠病毒特异性 T 细胞的标准检测方法提供指导原则,也为其他抗原特异性 T 细胞检测方法标准化规范提供参考。

### 一、共识制订方法

本共识的发起和撰写人由承担广州实验室应急攻关项目《新冠疫苗免疫后细胞免疫评价》的课题组人员组成,包含免疫、呼吸病、检验、病毒、生物制品技术标准制订和生物医药研发的 6 个领域的专业团队。2021 年 8 月至 2024 年 5 月,撰写组从研究经验、文献和多实验室平行检测实践相结合,对新

冠病毒特异性 T 细胞检测方法、技术要点和注意事项等方面进行了多轮次反复论证,形成《流式细胞术检测新型冠状病毒特异性 T 细胞及其标准操作流程》共识草案。在此期间,课题组以“SARS-CoV-2”“severe acute respiratory syndrome corona-virus 2”“COVID-19”“coronavirus disease 2019”“antigen-specific T cell”“T cell response”“flow cytometry”“新型冠状病毒抗原”“peripheral blood mononuclear cell & storage / processing/isolation/preservation/ shipping/temperature”“抗原特异性 T 细胞”和“流式细胞术”为关键词,检索自建库至 2024 年 5 月 PubMed、Embase、Web of Science 检索平台, Springer Link 检索平台、IEEE Xplore 检索平台、MedRxiv、中国知网、万方数据知识服务平台和维普数据库中的中、英文文献,经去重和同类文献优选等处理,最终纳入符合本共识主题文献 50 篇。

共识草案形成后,提交中国免疫学会,由免疫学会推荐的 22 位专家组成共识专家组,通过线下会议和线上函审对共识草案中的关键技术要点和科学问题进行逐一讨论,并提出修改意见。全部意见经撰写组成员逐条讨论后,对共识草案再进行了两次修订,每次都提交给专家组每位成员审核,最终形成该共识。

本共识采用德尔菲方法结合 GRADE 分级,请每位专家针对每一条推荐意见进行投票(分级包括完全同意、修改后同意(给出修改意见、部分同意、和不同意)<sup>[6]</sup>。本共识设定:针对单条推荐意见,完全同意、修改后同意和部分同意的专家超过 80%,则对该条推荐意见达成共识。本共识共凝练出 9 条共识意见,最终根据投票的结果,对每条共识意见分为二级,包括:强烈建议和推荐。强烈建议是所有专家都同意和修改后同意(100%);推荐是针对部分同意的共识,即第二条共识-生物标志物组合方案,专家有不同意见,但都有科学意义,分歧在于研究目的需求和实验条件等因素各异,不适合形成一致性的共识,因此在这条共识下推荐了多样



性的方案。最终形成的共识终稿,包括9条共识核心意见和标准操作流程(扫描本文首页二维码可浏览附件:《流式细胞技术检测新型冠状病毒特异性T细胞的标准操作流程》)。

## 二、新冠病毒抗原特异性T细胞的检测方法

目前抗原特异性T细胞检测技术的立足点有三个:抗原刺激T细胞活化后诱导表达的膜表面分子,即活化诱导的标志物(activation-induced marker, AIM)和分泌的功能性细胞因子,以及抗原表位和MHC复合物与相应T细胞受体(T Cell receptor, TCR)的结合。目前常用的技术方案包括:单纯检测抗原刺激诱导特异性T细胞活化后分泌的细胞因子的固相或液相酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和ELISPOT,以及FC检测AIM、胞内细胞因子(intracellular cytokine staining, ICS)<sup>[7]</sup>和抗原肽-MHC多聚体。

### (一)ELISPOT技术

ELISPOT技术,能够在单细胞水平检测细胞因子的分泌情况,具有较高的灵敏度和通量,已被广泛用于评估特异性T细胞应答<sup>[8-9]</sup>。但是,ELISA和ELISPOT都不能精准地反映抗原特异性T细胞的情况,复杂群体中的其他类型细胞会造成干扰,如自然杀伤(NK)细胞、黏膜相关恒定T细胞(mucosal-associated invariant, MAIT)和 $\gamma\delta$ T细胞在抗原刺激后也可分泌 $\gamma$ 干扰素(interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )<sup>[10-11]</sup>,此外也不能区分CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T细胞分泌IFN- $\gamma$ 的情况。

### (二)FC

1. ICS方案:不同T细胞亚群在抗原活化后被诱导分泌不同的细胞因子(cytokines, CK),检测不同功能亚群的代表性CK是目前鉴定特定抗原特异性T细胞亚群较为可靠的方法,如辅助性T细胞亚群1(T helper cells 1, Th1)和CD8<sup>+</sup>杀伤性T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)分泌的IFN- $\gamma$ , Th2分泌的白细胞介素4(interleukin, IL-4)和IL-13, Th17分泌的IL-17, 滤泡辅助性T细胞亚群(T follicular helper cells, Tfh)分泌的IL-21<sup>[12-15]</sup>。不同功能亚群的Th细胞活化后表达CK的时相存在差异,因此要根据研究目的选择CK以及检测时间点。但是,ICS方案无法检测活化后不分泌细胞的亚群;此外,ICS方案需要进行细胞的固定、破膜和胞内染色等步骤,增加了质控的难度。

2. AIM方案:AIM技术是一种相对简便、快速

和较为全面的分析抗原特异性T细胞亚群的方法。AIM包括但不限于CD40L(CD154)、CD69、OX40(CD134)、4-1BB(CD137)、CD107a、CD25、程序性细胞死亡配体1(programmed cell death ligand-1, PD-L1)(CD274)、CD38、HLA-DR等<sup>[16-21]</sup>,它们在表达时相、持续时间、不同亚群T细胞上的分布等方面各有特点,其中有些AIM还预示了抗原特异性T细胞的功能状态,有的AIM因受体介导的内化而难以检测,如CD154<sup>[22]</sup>。许多AIM分子,尤其CD69和CD25,有相当比例的T细胞在未受到抗原致敏的时候也会表达,因此一般选择表达时相相近的2个及以上AIM分子组合,获得抗原特异性T细胞亚群的精准信息。目前,常用于新冠病毒特异性T细胞检测的AIM包括活化早期(刺激24h以内)表达的CD69、CD154和CD137以及活化中晚期(48h最佳)表达的CD25和OX40<sup>[23]</sup>。AIM组合反映的特定抗原特异性T细胞包含多种功能不同的T细胞亚群。如抗原致敏活化的CD134<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Th包含了目前已知的Th1、Th2、Th17、Tfh以及调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)等亚群。因此采用标记AIM的同时,联合鉴定特定Th亚群的表面标志可以了解该Th亚群中抗原特异性T细胞的含量。

3. 抗原肽-MHC(pMHC)多聚体方案:在明确特定的抗原表位及其相应MHC限制性的情况下,用合成的pMHC多聚体,结合流式细胞技术,可以检测识别该pMHC的T细胞群体<sup>[24-25]</sup>。该方法最大的局限性在于需要预先明确抗原表位和MHC分型,且只反映识别特定pMHC的T细胞应答的水平,并不能反映该抗原特异性T细胞总克隆的水平。

总之,FC检测AIM或(和)ICS,能够在亚群水平精准检测抗原特异性T细胞,但是由于操作过程复杂,质控难度高,目前缺乏标准的操作流程。需要注意的是,不同AIM组合之间并不完全重合,目前也没有明确哪个AIM组合能够包含所有该抗原特异性T细胞亚群的总和;同样,表达某一代表特定T细胞功能亚群CK的细胞也并不全部表达AIM。在检测条件允许的情况下,AIM联合CK不仅可以从较宽(多个T细胞亚群)的维度上,还可以从特定功能亚群两方面了解某一抗原特异性T细胞的水平。对于COVID-19来说,分泌IFN- $\gamma$ 的Th1细胞和CD8<sup>+</sup>CTL细胞,辅助抗体产生的Tfh是发挥抗病毒效应的主要T细胞亚群<sup>[26]</sup>,最能体现机体对该病毒的细胞免疫保护,因此Th1和CD8<sup>+</sup>CTL分泌的IFN- $\gamma$ 和标识Tfh亚群活化的生物标志物是



评价机体产生新冠病毒特异性 T 细胞免疫应答的关键标志物。

**推荐意见 1:** 为了精准获得抗原特异性 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的水平,采用 FC 检测 AIM 或(和)代表不同功能亚群的 CK 评估新冠病毒特异性 T 细胞的数量、相对频数和功能状态更加具有优势。(推荐分级:强烈建议)

三、FC 检测新冠病毒特异性 T 细胞的生物标志物组合方案

选择流式细胞技术检测的生物标志物分子的种类和数量,要综合考虑研究目的、样品性质、仪器配置、通道之间的荧光溢漏,成本和质量控制等因素,检测方案的设计也要与 AIM 和 CK 的表达特点相适应。专家组推荐的组合方案中至少含有 5 个参数,其中要有区分细胞死活的染料和 CD3、CD4 和 CD8 的 3 个基础标志物,再根据研究目的等因素明确其他标志物的种类和数量。包括 3 种基础方案:(1)AIM 方案,只检测 AIM 组合;(2)CK 方案,只检测胞内 CK;(3)AIM+CK 方案,同时检测 AIM 和胞内 CK,可更全面地了解新冠病毒特异性 T 细胞的宽度和特定 Th 亚群的情况。但是,AIM 和 CK 检测的技术方法有所不同,CK 分泌检测需要阻断高尔基体转运以提高灵敏度,而高尔基体转运的抑制剂同样会影响有些 AIM 分子的膜表达,这种情况需要考虑阻断剂的添加时机和作用时间,确保 AIM 有充分的时间表达在膜上再添加抑制剂;抑制剂作用时长要保证能够较好地检测到 CK 且不能过长影响 AIM 的表达和细胞进入到增殖期,一般选择在终止抗原刺激培养前 4~6 h 添加。选择与 CK 检测一起胞内染色 AIM 要甄别是诱导性表达还是组成性表达,抗原刺激诱导从头合成 AIM 或激活胞内组成性 AIM 膜转运被认为与抗原特异性 T 细胞活化有关。在以上 3 个基础方案上,还可以联合其他标志物,如鉴定 T 细胞亚群的标志物[如 Tfh 的 CXC 基序趋化因子受体 5(C-X-C chemokine receptor-5, CXCR5)和程序性细胞死亡受体 1(programmed cell death receptor-1, PD-1), Th1 倾向表达的 CXCR3、Th17 倾向表达的 CC 基序趋化因子受体 6(C-C chemokine receptor-6, CCR6)],分化阶段标志(CD45RA 和 CCR7,区分不同记忆 T 亚群)和细胞功能状态的分析(PD-1, Tim3)等<sup>[15,27-32]</sup>,以获得更多的 T 细胞亚群和功能状态的精准信息。表 1 列出了不同 AIM、CK 及其组合适用检测的 T 细胞亚群和时相。需要注意的是,不同性质的样品中抗原特异性

T 细胞的状态存在差异,对相同 AIM 的检出率有较大的影响,如 CD137(4-1BB),我们发现在疫苗接种人群样品 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 中的检出率都较低,而相关文献表明感染后刚进入恢复期不久的患者中却有较高的阳性率<sup>[32-33]</sup>。抗原刺激时间是选择生物标志物的另一个重要因素,需要考虑“旁观者”活化效应和活化诱导增殖带来的影响。综上,建议研究者根据研究目的、样品性质和实验条件通过预实验明确较优的标志物组合方案。

**推荐意见 2:** 对以了解免疫保护为目的检测新冠病毒特异性 T 细胞水平,推荐重点关注 CD4<sup>+</sup>Th1、CD8<sup>+</sup>T 和 CD4<sup>+</sup>Tfh 细胞的数量和功能;FC 检测的生物标志物种类和数量要综合考虑研究目的、样品性质、仪器配置、通道之间的荧光溢漏,成本和质控等因素,在包含区分活细胞和死细胞的染料、CD3、CD4 和 CD8 四个参数的基础上,根据研究目的、利用部分待检样本进行预实验筛选和明确其他标志物及最佳检测时相。表 1 列出不同组合推荐方案,研究者可在此基础上根据各自需求和实验条件再进行增减组合。(推荐分级:推荐)

四、标准操作流程中的关键技术要点和注意事项

检测抗原特异性 T 细胞表达 AIM 和 CK,需要预先用抗原刺激 T 细胞活化,最常用的样品来源是全血中的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。因抗原特异性 T 细胞的检测是基于对细胞功能活化的检测,所以对样品中活细胞数量和活性有较高的要求,专家组对操作流程中的关键技术要点和注意事项形成以下共识,并附以新冠病毒 S1 肽库刺激 PBMC,流式细胞术检测 CK(包括 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-2)、CD3、CD4、CD8 和死活染料共 7 个参数的标准操作流程(扫描本文首页二维码可浏览附件:《流式细胞术检测新型冠状病毒特异性 T 细胞的标准操作流程》)。

(一)全血样品的处理、PBMC 的分离、冻存和复苏

样本从采集、运输、后续保存、处理到结果检出全程中每一操作都需标注和审核志愿者的唯一识别信息。

PBMC 是最常用的检测 T 细胞应答的样品。PBMC 中各种细胞成分的完整性和功能活性决定了检测结果的准确性,因此抗凝全血从采集、富集分离到冻存复苏等各个环节均需严格要求:包括采集集中选用的收集管和抗凝剂,采集后放置和运送途中的时间和温度;从全血中分离 PBMC 的分离液介



**表 1** 新型冠状病毒特异性 T 细胞的生物标志物组合方案

方案	包含 4 个基础参数的组合		T 细胞亚群	抗原刺激时间(h)
	数量	其他标志物		
胞内细胞因子标记	5	IFN- $\gamma$	CD4 <sup>+</sup> Th1, CD8 <sup>+</sup> T	16~48
	7	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2	CD4 <sup>+</sup> Th1, CD8 <sup>+</sup> T	24~48
活化诱导的标志物	6	CD154, CD69	CD4 <sup>+</sup> Th(Th1 占比较大, Treg 占比最少的组合)	6~24
		CD154, CD200	CD4 <sup>+</sup> Th	24
		CD137, CD69	CD4 <sup>+</sup> Th 和 CD8 <sup>+</sup> T	12~24
		CD134, CD25	CD4 <sup>+</sup> Th(应答宽度最大的组合, 含多种 CD4 <sup>+</sup> Th 亚群, 包括 cTh 和抗原反应性 Treg)	18~50 18~24
		CD274, CD25	CD4 <sup>+</sup> Th(含 cTh)	18~50
		CD274, CD134	CD4 <sup>+</sup> Th(Treg 较少)	18~50
	7	CD137, CD69, CD154	CD4 <sup>+</sup> Th, CD8 <sup>+</sup> T	24
活化诱导的标志物+胞内细胞因子标记	7	IFN- $\gamma$ , CD69, CD154	CD4 <sup>+</sup> Th, CD8 <sup>+</sup> T	6~24
		IFN- $\gamma$ , CD69, CD137	CD4 <sup>+</sup> Th, CD8 <sup>+</sup> T	16~24
	9	IFN- $\gamma$ , CD134, CD25, CXCR5, PD-1	CD4 <sup>+</sup> Th1, CD4 <sup>+</sup> Tfh, CD8 <sup>+</sup> T	18~50
其他辅助标志物		CXCR5, PD-1	CD4 <sup>+</sup> Tfh	
		CD45RA, CCR7	排除 CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> naïve T, 增加阳性率	
		CD127, CD25	排除 CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> Treg	

注: IFN- $\gamma$  为干扰素  $\gamma$ ; CD 为分化群; Th 为辅助性 T 细胞; TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; IL-2 为白细胞介素 2; Treg 为调节性 T 细胞; cTh 为循环滤泡辅助性 T 细胞; CXCR5 为 CXC 基序趋化因子受体 5; PD-1 为程序性死亡受体 1; Tfh 为滤泡辅助性 T 细胞; CCR7 为 CC 基序趋化因子受体 7; naïve T 为初始 T 细胞

质、耗材、洗涤和离心条件, 以及冻存液和冻存复苏的条件(表 2)。

全血样品采集方面, 建议采用肝素钠或肝素锂作为抗凝剂, 对比其他抗凝剂如乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) 和柠檬酸-葡萄糖溶液(acidcitratexdextrose, ACD), 使用以上抗凝剂在影响 PBMC 得率和 T 细胞功能方面没有显著差异<sup>[34]</sup>。但 EDTA 影响延时处理全血样本中(如 24 h)的中性粒细胞的性质和功能, 导致 PBMC 中中性粒细胞的污染并对后续 T 细胞应答的检测造成间接影响<sup>[35]</sup>。

采集后的抗凝全血从离体到分离出 PBMC 进入程序降温的时间应越短越好; 时间越长, 后续分离的 PBMC 中出现中性粒细胞污染、各成分细胞的

死亡、活性和功能的改变越多, 这些因素会影响后续检测结果的一致性和稳定性<sup>[34, 36-38]</sup>; 虽然多数实验室均要求 4~6 h 内完成以上工序, 然而考虑到大多数实际场景难以实现, 建议在 8~12 h 内完成<sup>[36, 39]</sup>; 对于从采集到送达实验室进入样品处理的时间超过 24 h 的情况, 建议最长在 32 h 内进入样本处理, 并且在采集时(或后), 用 RPMI1640 培养基按照体积比 1:3 进行稀释抗凝全血, 后续用淋巴细胞分离液分离时延长离心时间至 30 min, 以减少中性粒细胞污染对检测结果的影响<sup>[34, 38, 40]</sup>; 样品采集到 PBMC 冻存前的时间因素需纳入到结果对比分析中, 建议相同时段样品进行比较, 尤其延时处理的样本(超过 24 h), 不适合与常规样品进行对比分析。抗凝全血运送时的温度建议在 25~30 °C 之间,

**表 2** 抗凝全血样品采集到 PBMC 检测前的技术要素和注意事项

技术要素环节	注意事项
血样采集	采样技术、采样管、抗凝剂、加工前的保存条件和时间
血样运送	时间、温度、运动状态
PBMC 分离制备	分离液介质、全血和分离液体积配比、洗涤、离心条件
PBMC 冻存	冻存液配方、冻存细胞的浓度、程序降温速度、长期冻存温度
冻存 PBMC 的运送	运送温度
PBMC 复苏	复苏温度、复苏时间、复苏体积和离心、DNA 降解酶处理、复苏 PBMC 检测前静息时间

注: PBMC 为外周血单个核细胞

接近 30 °C 最佳,避免较长时间暴露在低于 15 °C 和高于 40 °C 温度<sup>[41]</sup>;运输途中避免暴晒;对于较长时间运输的血样,途中温和振荡可以减少后续分离 PBMC 中中性粒细胞的污染<sup>[34]</sup>。

建议采用密度为(1.077±0.001) g/ml 的聚蔗糖(Ficoll)进行密度梯度离心法去除全血中的红细胞、血小板以及中性粒细胞等含量丰富的细胞成分,减少对 T 细胞活化和检测的干扰。注意事项包括:密度梯度离心前,用无菌的生理盐水(或 PBS)进行稀释;Ficoll 密度梯度离心时需要注意测试离心机的加减速度档位;离心温度为 15~25 °C;冻存 PBMC 的细胞浓度在(3~30)×10<sup>6</sup>/ml<sup>[42]</sup>,冻存体积符合规定容量;冻存剂配方为 7.5% 二甲基亚砜(dimethyl-sulfoxide, DMSO)+92.5% 胎牛血清;程序降温(1 °C/min)至-80 °C 后,尽快将冻存细胞转入液氮中长期保存;不同地点转移样本,强烈建议采用液氮或干冰中进行运输,确保冻存管外表面≤-80 °C。

复苏冻存 PBMC 需要注意的事项有:从液氮到完全复融到 37 °C 要快速;复融所需的水浴或同等设备,需要恒温保持在 37~40 °C;复融后的细胞要用 37 °C 预温的 5~7 倍冻存液体积的完全培养基重悬、离心去除冻存剂;计数复苏后的细胞,活细胞比例建议在 80% 以上,低于 70% 的活细胞率将明显降低 T 细胞应答的功能活性<sup>[43]</sup>,严重影响不同批次检测结果的稳定性和一致性。

**推荐意见 3:** 样品采集、运输、PBMC 分离、PBMC 冻存和复苏应建立标准操作规程。样品从采集、分离 PBMC 到冻存应尽可能在 8~12 h 内完成;全血运输过程应保持阴暗干燥,温度控制在 25~30 °C;采用 Ficoll 密度梯度法分离全血中的 PBMC;冻存 PBMC 应在液氮中存储和转移;冻存和复苏严格遵循缓冻速融原则。(推荐强度:强烈建议)

## (二) 刺激新冠病毒特异性 T 细胞活化的抗原

新冠病毒基因组包含多达 29 个开放阅读框,虽然编码蛋白的确切数目尚待确定,但 4 种结构蛋白(S、N、M 和 E 蛋白)、至少有 16 种非结构蛋白(nonstructural proteins, NSP)和 6~7 种辅助蛋白被确认,理论上都含 T 细胞表位。虽然目前研究表明 S 蛋白、N 蛋白和 M 蛋白以及一些非结构蛋白如 NSP3 能够诱导较强 T 细胞应答<sup>[44-45]</sup>,但伴随研究的深入、流行趋势的变化以及研究目的需求(如疫苗改造升级),其他蛋白或者几个蛋白的组合都可以作为抗原。对于灭活疫苗评价,4 种结构蛋白都可以选择,推荐含表位较多的 S 蛋白和 N 蛋白作为抗

原;其他技术方案的疫苗评价,要根据疫苗靶向的蛋白来确定。对于感染人群评估,推荐含表位较多的 S 蛋白、N 蛋白、M 蛋白和 NSP3 等作为抗原。抗原有蛋白和肽库两种形式,推荐选择肽库。在选择 S 肽库作为抗原刺激物时,如果考虑肽库容量对刺激效果的影响,推荐将 S 蛋白分为 S1(1-681AA)肽库和 S2 肽库(682-1273AA)。总之根据研究目的、样品和研究条件,选择肽库种类和容量。对于兼顾 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的研究目的,因 MHC-I 和 MHC-II 沟槽结合的表位长度不同,可以采用 15~20 个氨基酸长度,4~10 个氨基酸步移范围内合成单肽,推荐 15 个氨基酸长度,4 个氨基酸步移合成单肽<sup>[44,46]</sup>;目前缺乏肽库容量是否影响抗原特异性 T 细胞应答的明确研究数据,肽库的含量由所检测蛋白的大小决定,新冠病毒不同蛋白对应的肽库含量为 6~388 条不等,因此可根据研究目的决定肽库的组合<sup>[44]</sup>。肽库的配制一般选用 DMSO 配制,可以按照质量浓度和摩尔浓度(每条单肽分子数一致)配制,储存浓度肽库推荐是终浓度肽库的 1 万倍以上,以减少溶剂 DMSO 对细胞的影响;推荐每条单肽终浓度为 250~350 nmol/L;肽库干粉和储存浓度的肽库推荐储存于-80 °C;因肽库的配制和储存等因素均影响后续检测的灵敏度,推荐每条单肽由同一个机构合成,纯度>80%,溶剂选择和用量、单肽的溶解、肽库的配制以及保存、运输应建立标准操作规程。

**推荐意见 4:** 检测新冠病毒特异性 T 细胞应答要根据研究目的和新冠病毒蛋白的性质选择特定的抗原,推荐使用肽库刺激活化的方式;对于同时兼顾 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞表位的肽库,单肽的合成可在 15~20 个氨基酸长度,4~10 个氨基酸步移范围,推荐 15 个氨基酸长度,4 个氨基酸步移(即相邻两肽有 11 个氨基酸重叠);推荐抗原肽库按照摩尔浓度配制,保证每条肽的分子数量一致;肽库的终浓度推荐每肽为 250~350 nmol/L;肽库的配制和储存应建立标准操作规程。(推荐强度:强烈建议)

## (三) 新冠病毒抗原刺激 T 细胞活化

加入一定浓度的 DNA 降解酶可以减少复苏 PBMC 中较多死亡细胞释放的核酸,减少细胞成团影响后续计数细胞的准确性和抗原刺激培养的效果。复苏后的 PBMC 静息 4~8 h 后再接受抗原刺激的活化效果较好。细胞的浓度[(2~3)×10<sup>6</sup>/ml]、培养体积、培养板的规格型号、胎牛血清和培养基的批次、抗原肽库的终浓度和抗原刺激时间、高尔基

体阻断剂的种类和添加的时机等因素都将影响最后的检出率。抗原刺激时间需要根据选定的生物标志物的表达特点和少量待检样品的预实验来确定。对于检测胞内 IFN- $\gamma$  为主要目的方案, 建议选择刺激 24 h; 在终止培养前 4~6 h 加入高尔基体阻断剂。

#### (四) PBMC 样本的膜表面标记和胞内染色

新冠病毒抗原刺激 PBMC 终止培养后, 建议在培养板中进行细胞的标记(扫描本文首页二维码可浏览附件:《流式细胞技术检测新型冠状病毒特异性 T 细胞的标准操作流程》); 按照先区分死活细胞的染料和膜表型分子的标记(避光标记时间 20 min, 室温 15~25  $^{\circ}\text{C}$ ) 再进行固定、破膜的胞内分子标记(标记时间为室温 60 min 或者 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜)的顺序进行; 每一步的标记和清洗过程均需充分混匀试剂和细胞; 选择抗生物标志物的荧光偶联抗体的原则是: 用参考品预先测试筛选抗体的克隆号; 抗体偶联的荧光素要根据仪器的配置尽量避开溢漏较大的通道, 无法避免的情况下将最小溢漏荧光通道分配给最核心的指标, 以减少假阳性结果; 不同批号的荧光偶联抗体在每次启用前需要重新滴定用量。

**推荐意见 5:** 新冠病毒抗原肽库刺激复苏后的 PBMC 中特异性 T 细胞应答和检测, 从复苏 PBMC 的静息时间、新冠病毒抗原刺激 PBMC 到终止培养、到细胞的免疫标记需建立标准操作规程。(推荐强度: 强烈建议)

#### (五) 样品上机和数据获取

流式细胞仪需要按规程定期保养维护和校准, 每批次样品检测前需要运行 CST 质控微球保证样品在仪器处于正常运行状态下检测<sup>[36]</sup>; 上机前做好机器准备, 包括检查鞘液, 开机预热, 管道清洗; 根据选用的检测通道对电脑获取桌面进行设置, 方便调节补偿和数据的存储, 保留 BV510 通道, 以排除自发荧光细胞。

根据要检测的荧光通道建立上机模板; 首先用参考品制备空白管、多色管和单标对照管, 设置各荧光参数的电压和补偿值, 保留调节好的模板, 方便后续不同批次样品检测前进行微调; 对上机的样品进行规律编号以便后续整理和溯源; 上机获取的细胞越多越好, 因为新冠病毒抗原特异性 T 细胞在 PBMC 中的理论值一般低于 1%, 需要满足一定的 T 细胞数量后其结果才反映真实的频率, 建议活 CD3<sup>+</sup>T 细胞总数不少于 5 万个。

**推荐意见 6:** 流式细胞仪的使用应注意每次检测过程中的仪器质量控制, 定期进行维护保养和校

准评估。建议合理选择和搭配所需荧光抗体, 并合理选择和设置对照。检测新冠病毒抗原特异性 T 细胞, 建议活 CD3<sup>+</sup>T 细胞总数不少于 5 万个。(推荐强度: 强烈建议)

#### 五、标准操作流程中的质量控制

检测抗原特异 T 细胞从采集到培养终止需全程无菌操作, 避免因污染产生假阳性或假阴性结果; 不同于其他免疫学指标, 抗原特异性 T 细胞检测目前尚无通常意义的标准物质, 建议预先筛选对新冠病毒抗原或感染人群较大的其他常见病原体高应答的志愿者的 PBMC 作为质控参考品, 如巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV) 高应答者。常用多种病原体混合肽库, 包括 CMV、EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)、流感病毒(influenza virus, Flu) 混合的 CEF(CD8<sup>+</sup>T) 和 CEFTA(CD4<sup>+</sup>T)、拓展的 CEFSX(兼顾 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T) 肽库<sup>[47]</sup>(扫描本文首页二维码可浏览附件中质量控制参考品的制备)。

对照设置原则上包括 3 种: 仪器对照、灵敏度/特异性对照和生物学对照; 仪器对照包括阴性对照(空白对照)和补偿对照(单荧光标记), 用于流式细胞仪检测通道电压和荧光参数之间补偿的调整; 灵敏度/特异性对照用于设定阴性群和阳性群的边界, 包括同型抗体对照和 FMO 对照(fluorescenceminusone, FMO)<sup>[48-49]</sup>; 生物学对照包括阴性对照, 推荐无抗原刺激的溶剂组, 样品条件允许的情况下可以再加一组明确的不相关肽刺激组(如植物蛋白来源的短肽)对照, 通过新冠病毒抗原刺激组和阴性对照组的差异反映是否存在新冠病毒抗原特异性 T 细胞, 需 3 个重复, 用于本底均值计算; 阳性对照组可采用 CMV 结构蛋白步移全肽库、覆盖更多病原体的 CEFX 或 CEFSX 肽库刺激。实际检测场景下, 因待检样品的细胞数量、成本、时间等限制, 每批次检测建议用参考品细胞设置上述完整的 3 种对照, 即仪器、灵敏度和生物学对照; 待检样品只设置生物学对照。

死细胞数量和比例过高是导致假阴性结果的主要因素。死细胞数量过多可以很容易地通过流式物理参数点图判断, 表现为大部分细胞集中在低 FCS 和 SSC 位置。此外, CMV 肽库阳性对照组如果在同一批次多个样品中没有阳性结果(即远低于人群感染百分比)也可以用于辅助判断本批次实验的质量。样品的潜在污染是导致假阳性结果的主要因素, 结果表现常为明显的拖尾现象, 较高的阳性率, 一般在阴性对照组中也出现这种情况。如果是

较多样品都产生类似现象,需要考虑有试剂污染的可能性。

**推荐意见 7:**建议筛选对新冠病毒待检抗原肽库或其他病原体(混合)肽库的高应答志愿者来源的 PBMC 作为每批次实验质量控制的参考品,样品内部的质量控制可通过设置复孔、阴性对照和阳性对照。(推荐强度:强烈建议)

#### 六、数据分析和结果判读

采用第三方软件 FlowJo(美国 BD Biosciences 公司)分析;因抗原特异性 T 细胞是稀有群体,需要更加严谨的设门路径(扫描本文首页二维码可浏览附件:《流式细胞术检测新型冠状病毒特异性 T 细胞的标准操作流程》),尤其对物理参数 FSC-A/SSC-A 的设门,因抗原特异性 T 细胞活化后的细胞大小和粒度都会增加,门设定的过小,会导致一部分活化的抗原特异性 T 细胞丢失,降低灵敏度。

如果样本有污染或者死细胞含量过高,则舍弃。质控合格的同批次样品,可以采用 FlowJo 批量处理分析,但因群体存在个体差异,需要对所有检测样品的各级门控进行审核;利用软件的表格导出功能导出结果,采用阳性率作为原始值,再进行统计分析。原始数据包括:活 CD3<sup>+</sup>T 细胞、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 的数量和在上一级门中的百分率,抗原特异性 T 细胞的数量和阳性率(AIM<sup>+</sup>或 CK<sup>+</sup>细胞在 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 的阳性率);以新冠病毒抗原刺激组各复孔减去阴性对照组的复孔均值作为真实阳性率,如果结果为负值判定为 0。

#### 七、数据保存和归档

每个样品通过唯一标识码或与唯一标识码的关联编码溯源;样品完成上机后,应该及时导出原始数据,以 fcs 格式保存;每个样品数据的完整文件应包括:全程实验记录,数据的 fcs 文件,分析后的 ACS(FlowJo)文件,2D 点图(门控路径分级和初始数据图)以及导出的相应 excel 或 csv 格式的原始数据(包括细胞数量,CD3<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 的活细胞数和百分率,新冠病毒抗原特异性 AIM<sup>+</sup>或 CK<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞数量和阳性率)和计算后的真实阳性率。

**推荐意见 8:**流式细胞术数据的分析和结果判读需要建立标准操作规程,实现样品追溯管理,做好全程实验记录、原始数据和分析数据的归档和储存。(推荐强度:强烈建议)

#### 八、规范管理及人员培训

抗原特异性 T 细胞的检测来自于人类资源样

品,需要获得伦理批准且所有操作要遵守《生物安全法规》。因 FC 检测的操作步骤复杂,注意事项和细则都将影响结果的灵敏度、可靠性和重复性,质控难度高,对操作人员的培训极其重要,除了建立标准操作规程并进行实验操作流程的定期培训,还需要建立实验记录和实验结果的整理和归档体系<sup>[50]</sup>。

**推荐意见 9:**流式细胞术检测操作人员的培训、数据监督审查应进行规范管理。(推荐强度:强烈建议)

虽然目前流式细胞术检测抗原特异性 T 细胞在实际应用中依然存在局限性,但该技术的诊断价值高于现有其他技术。本共识在流式细胞术检测新冠病毒特异性 T 细胞的重要相关问题上形成推荐意见,希望为将来建立相关技术标准提供指导原则和参考,也希望为临床、科研、疾控和疫苗制备企业等机构科学评估其他抗原特异性 T 细胞提供参考。

**共识制定组长:**曹雪涛(海军军医大学免疫学研究所免疫与炎症全国重点实验室 中国医学科学院免疫治疗研究中心);吴玉章(陆军军医大学全军免疫学研究所基础医学院免疫教研室);钟南山(广州医科大学呼吸疾病全国重点实验室 广州国家实验室)

**执笔专家组组长:**刘书逊(海军军医大学免疫学研究所免疫与炎症全国重点实验室);王忠芳(广州医科大学呼吸疾病全国重点实验室 广州国家实验室);李志清(海军军医大学免疫学研究所免疫与炎症全国重点实验室)

**执笔专家:**刘书逊(海军军医大学免疫学研究所免疫与炎症全国重点实验室);李志清(海军军医大学免疫学研究所免疫与炎症全国重点实验室);王忠芳(广州医科大学呼吸疾病全国重点实验室 广州国家实验室);黄杰(中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所);赵金存(广州医科大学呼吸疾病全国重点实验室 广州医科大学附属第一医院 广州国家实验室);崔婷婷(广州医科大学呼吸疾病全国重点实验室 广州国家实验室);朱爱如(广州医科大学呼吸疾病全国重点实验室 广州医科大学附属第一医院 广州国家实验室);张文新(中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所)

**专家组成员(按姓氏汉语拼音排序):**曹雪涛(海军军医大学免疫学研究所免疫与炎症全国重点实验室 中国医学科学院免疫治疗研究中心);陈永文(陆军军医大学全军免疫学研究所基础医学院免疫教研室);储以微(复旦大学基础医学院免疫学系);崔婷婷(广州医科大学呼吸疾病国家重点实验室 广州国家实验室);黄波(中国医学科学院基础医学研究所北京协和医学院基础学院免疫学系);黄杰(中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所);李平超(中国科学院广州生物医药与健康研究院);李志清(海军军医大学





免疫学研究所免疫与炎症全国重点实验室);刘书逊(海军军医大学免疫学研究所免疫与炎症全国重点实验室);陆前进(中国医学科学院皮肤病医院);裴荣娟(中国科学院武汉病毒研究所);单保恩(河北医科大学第四医院科研中心);孙兵(中国科学院分子细胞科学卓越科学创新中心上海生物化学与细胞生物学研究所);王忠芳(广州医科大学呼吸疾病国家重点实验室 广州国家实验室);吴励(清华大学医学院免疫学研究所);吴玉章(陆军军医大学全军免疫学研究所基础医学院免疫教研室);徐胜(海军军医大学免疫学研究所免疫与炎症全国重点实验室);姚智(天津医科大学免疫学系天津市免疫学研究所);于益芝(海军军医大学免疫学研究所免疫与炎症全国重点实验室);张利宁(山东大学基础医学院免疫学系);张文新(中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所);赵金存(广州医科大学呼吸疾病国家重点实验室 广州医科大学附属第一医院 广州国家实验室);朱爱如(广州医科大学呼吸疾病国家重点实验室 广州医科大学附属第一医院 广州国家实验室)

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] La Gruta NL, Gras S, Daley SR, et al. Understanding the drivers of MHC restriction of T cell receptors[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(7): 467-478. DOI: 10.1038/s41577-018-0007-5.
- [2] Guo L, Wang G, Wang Y, et al. SARS-CoV-2-specific antibody and T-cell responses 1 year after infection in people recovered from COVID-19: a longitudinal cohort study[J]. *Lancet Microbe*, 2022, 3(5): e348-e356. DOI: 10.1016/S2666-5247(22)00036-2.
- [3] Zhu F, Zhuang C, Chu K, et al. Safety and immunogenicity of a live-attenuated influenza virus vector-based intranasal SARS-CoV-2 vaccine in adults: randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials[J]. *Lancet Respir Med*, 2022, 10(8): 749-760. DOI: 10.1016/S2213-2600(22)00131-X.
- [4] Zuo J, Dowell AC, Pearce H, et al. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(5): 620-626. DOI: 10.1038/s41590-021-00902-8.
- [5] Angyal A, Longuet S, Moore SC, et al. T-cell and antibody responses to first BNT162b2 vaccine dose in previously infected and SARS-CoV-2-naive UK health-care workers: a multicentre prospective cohort study[J]. *Lancet Microbe*, 2022, 3(1): e21-e31. DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00275-5.
- [6] 中华医学会细菌感染与耐药防治分会,国家呼吸医学中心,国家呼吸系统疾病临床医学研究中心.抗新型冠状病毒小分子药物临床应用专家共识[J].*中华医学杂志*, 2024, 104(20): 1812-1824. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20240124-00177.
- [7] Horton H, Thomas EP, Stucky JA, et al. Optimization and validation of an 8-color intracellular cytokine staining (ICS) assay to quantify antigen-specific T cells induced by vaccination[J]. *J Immunol Methods*, 2007, 323(1): 39-54. DOI: 10.1016/j.jim.2007.03.002.
- [8] Tassignon J, Burny W, Dahmani S, et al. Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid: comparison of the measurement of IFN-gamma production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR[J]. *J Immunol Methods*, 2005, 305(2): 188-198. DOI: 10.1016/j.jim.2005.07.014.
- [9] Karlsson AC, Martin JN, Younger SR, et al. Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 283(1-2): 141-153. DOI: 10.1016/j.jim.2003.09.001.
- [10] Bohlen J, Zhou Q, Philippot Q, et al. Human MCTS1-dependent translation of JAK2 is essential for IFN- $\gamma$  immunity to mycobacteria[J]. *Cell*, 2023, 186(23): 5114-5134.e27. DOI: 10.1016/j.cell.2023.09.024.
- [11] Kim H, Byun JE, Yoon SR, et al. SARS-CoV-2 peptides bind to NKG2D and increase NK cell activity[J]. *Cell Immunol*, 2022, 371:104454. DOI: 10.1016/j.cellimm.2021.104454.
- [12] Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses[J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 423-474. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.423.
- [13] Nakayama T, Hirahara K, Onodera A, et al. Th2 cells in health and disease[J]. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35: 53-84. DOI: 10.1146/annurev-immunol-051116-052350.
- [14] Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(4): 248-256. DOI: 10.1038/nri2742.
- [15] Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH)[J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 621-663. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101400.
- [16] Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+T cells by a flow cytometric assay for degranulation[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 281(1-2): 65-78. DOI: 10.1016/s0022-1759(03)00265-5.
- [17] Havenar-Daughton C, Reiss SM, Carnathan DG, et al. Cytokine-independent detection of antigen-specific germinal center T follicular helper cells in immunized nonhuman primates using a live cell activation-induced marker technique[J]. *J Immunol*, 2016, 197(3): 994-1002. DOI: 10.4049/jimmunol.1600320.
- [18] Callan MF, Tan L, Annelis N, et al. Direct visualization of antigen-specific CD8+T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo[J]. *J Exp Med*, 1998, 187(9):1395-1402. DOI: 10.1084/jem.187.9.1395.
- [19] Zaunders JJ, Munier ML, Seddiki N, et al. High levels of human antigen-specific CD4+T cells in peripheral blood revealed by stimulated coexpression of CD25 and CD134 (OX40) [J]. *J Immunol*, 2009, 183(4): 2827-2836. DOI: 10.4049/jimmunol.0803548.
- [20] Reiss S, Baxter AE, Cirelli KM, et al. Comparative analysis of activation induced marker (AIM) assays for sensitive identification of antigen-specific CD4 T cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186998. DOI: 10.1371/journal.pone.0186998.
- [21] Painter MM, Mathew D, Goel RR, et al. Rapid induction of antigen-specific CD4(+) T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination[J]. *Immunity*, 2021, 54(9): 2133-2142.e3. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.08.001.
- [22] Yellin MJ, Sippel K, Inghirami G, et al. CD40 molecules



- induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function[J]. *J Immunol*, 1994, 152(2):598-608.
- [23] Poloni C, Schonhofer C, Ivison S, et al. T-cell activation-induced marker assays in health and disease [J]. *Immunol Cell Biol*, 2023, 101(6): 491-503. DOI: 10.1111/imcb.12636.
- [24] Bacher P, Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells[J]. *Cytometry A*, 2013, 83(8): 692-701. DOI: 10.1002/cyto.a.22317.
- [25] Huang J, Zeng X, Sigal N, et al. Detection, phenotyping, and quantification of antigen-specific T cells using a peptide-MHC dodecamer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(13): E1890-E1897. DOI: 10.1073/pnas.1602488113.
- [26] Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19[J]. *Cell*, 2021, 184(4):861-880. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.007.
- [27] Takata H, Takiguchi M. Three memory subsets of human CD8+T cells differently expressing three cytolytic effector molecules[J]. *J Immunol*, 2006, 177(7): 4330-4340. DOI: 10.4049/jimmunol.177.7.4330.
- [28] Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties[J]. *Nat Med*, 2011, 17(10):1290-1297. DOI: 10.1038/nm.2446.
- [29] Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation[J]. *Immunity*, 2016, 44(5): 989-1004. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.05.001.
- [30] Liechti T, Roederer M. OMIP-060: 30-parameter flow cytometry panel to assess T cell effector functions and regulatory T cells[J]. *Cytometry A*, 2019, 95(11): 1129-1134. DOI: 10.1002/cyto.a.23853.
- [31] Wang SR, Zhong N, Zhang XM, et al. OMIP 071: a 31-parameter flow cytometry panel for in-depth immunophenotyping of human T-cell subsets using surface markers[J]. *Cytometry A*, 2021, 99(3): 273-277. DOI: 10.1002/cyto.a.24272.
- [32] Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection[J]. *Science*, 2021, 371(6529): eabf4063. DOI: 10.1126/science.abf4063.
- [33] RydzynskiModerbacher C, Ramirez SI, Dan JM, et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity[J]. *Cell*, 2020, 183(4): 996-1012. e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.038.
- [34] Afonso G, Scotto M, Renand A, et al. Critical parameters in blood processing for T-cell assays: validation on ELISpot and tetramer platforms[J]. *J Immunol Methods*, 2010, 359(1-2):28-36. DOI: 10.1016/j.jim.2010.05.005.
- [35] Thornthwaite JT, Rosenthal PK, Vazquez DA, et al. The effects of anticoagulant and temperature on the measurements of helper and suppressor cells[J]. *Diagn Immunol*, 1984, 2(3):167-174.
- [36] Bonilauri B, Santos M, Camillo-Andrade AC, et al. The impact of blood-processing time on the proteome of human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2021, 1869(3): 140581. DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140581.
- [37] Thébaud P, Cailhier JF, Lapointe R. Blood sample processing and banking for functional and molecular analyses[J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2614: 37-46. DOI: 10.1007/978-1-0716-2914-7\_3.
- [38] McKenna KC, Beatty KM, Vicetti Miguel R, et al. Delayed processing of blood increases the frequency of activated CD11b+CD15+granulocytes which inhibit T cell function [J]. *J Immunol Methods*, 2009, 341(1-2): 68-75. DOI: 10.1016/j.jim.2008.10.019.
- [39] Kierstead LS, Dubey S, Meyer B, et al. Enhanced rates and magnitude of immune responses detected against an HIV vaccine: effect of using an optimized process for isolating PBMC[J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2007, 23(1):86-92. DOI: 10.1089/aid.2006.0129.
- [40] Li X, He S, Thomas J, et al. Optimization of peripheral blood mononuclear cell processing for improved clinical ELISpot assay performance[J]. *AAPS J*, 2023, 25(6): 93. DOI: 10.1208/s12248-023-00861-y.
- [41] Olson WC, Smolkin ME, Farris EM, et al. Shipping blood to a central laboratory in multicenter clinical trials: effect of ambient temperature on specimen temperature, and effects of temperature on mononuclear cell yield, viability and immunologic function[J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 26. DOI: 10.1186/1479-5876-9-26.
- [42] Disis ML, dela Rosa C, Goodell V, et al. Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation[J]. *J Immunol Methods*, 2006, 308(1-2): 13-18. DOI: 10.1016/j.jim.2005.09.011.
- [43] Weinberg A, Zhang L, Brown D, et al. Viability and functional activity of cryopreserved mononuclear cells[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000, 7(4): 714-716. DOI: 10.1128/CDLI.7.4.714-716.2000.
- [44] Tarke A, Sidney J, Kidd CK, et al. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases[J]. *Cell Rep Med*, 2021, 2(2):100204. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100204.
- [45] Schnatbaum K, Holenya P, Pfeil S, et al. An overview of peptides and peptide pools for antigen-specific stimulation in T-cell assays[J]. *Methods Mol Biol*, 2024, 2768:29-50. DOI: 10.1007/978-1-0716-3690-9\_3.
- [46] Kiecker F, Streitz M, Ay B, et al. Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose? [J]. *Hum Immunol*, 2004, 65(5): 523-536. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.02.017.
- [47] Janetzki S, Britten CM. The impact of harmonization on ELISPOT assay performance[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 792:25-36. DOI: 10.1007/978-1-61779-325-7\_2.
- [48] Maecker HT, Trotter J. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity[J]. *Cytometry A*, 2006, 69(9):1037-1042. DOI: 10.1002/cyto.a.20333.
- [49] 国家医学检验临床医学研究中心(中国医科大学附属第一医院), 中华医学会检验医学分会, 国家卫生健康委临床检验中心, 等. 流式细胞术的临床应用专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2023, 46(8): 792-801. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20230308-00143.
- [50] 广州实验室新型冠状病毒核酸应急检测专家组. 大规模多场景移动实验室新型冠状病毒核酸应急检测专家共识[J]. *中华医学杂志*, 2021, 101(40):3271-3277. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20210810-01775.

