



národní  
úložiště  
šedé  
literatury

## **Vývoj metodiky pro analýzu T-buněčné odpovědi proti viru SARS-CoV-2**

Šmahel, Michal; Pavliš, Oto; Beran, Ondřej; Bohoněk, Miloš; Tachezy, Ruth; Holub, Michal; Poláková, Ingrid; Saláková, Martina; Schreiberová, Lucie  
2022

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-621023>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 28.09.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://nusl.cz) .

## CERTIFIKACE METODIKY

# VÝVOJ METODIKY PRO ANALÝZU T-BUNĚČNÉ ODPOVĚDI PROTI VIRU SARS-COV-2

Realizační výstup projektu MV ČR „Vývoj metodiky pro komplexní hodnocení imunitní připravenosti příslušníků bezpečnostních a záchranných složek zasahujících při epidemii COVID-19“ (VI04000078).

<b>Čj.</b>	<b>Vydání č.:</b>	1	<b>Výtisk č.:</b>	1
<b>Platnost od:</b>	<b>Účinnost od:</b>		<b>Platnost do:</b>	revize
<b>Počet stran:</b>	<b>Počet příloh: 0</b>			
<b>Zpracoval:</b>		<b>Dne:</b>		<b>Podpis:</b>
<b>Schválil:</b>		<b>Dne:</b>		<b>Podpis:</b>

# Obsah

1	Úvod.....	3
2	Cíl.....	3
3	Popis metodiky.....	4
3.1	Podstata metody ELISpot.....	4
3.2	Obecné požadavky pro provedení metody.....	5
3.3	Použitý laboratorní materiál a chemikálie.....	6
3.3.1	Přístrojové vybavení a software.....	6
3.3.2	Spotřební a laboratorní materiál a pomůcky.....	6
3.3.3	Chemikálie a roztoky.....	7
3.4	Průběh metody ELISpot.....	9
3.4.1	Bezpečnostní opatření.....	9
3.4.2	Okolní podmínky zkoušky.....	9
3.4.3	Postup.....	10
3.5	Vyhodnocení výsledků.....	18
3.5.1	Stanovení počtu spotů.....	18
3.5.2	Vyhodnocení reaktivity vzorků.....	18
3.6	Validace.....	19
3.7	Optimalizace.....	21
3.8	Operativní řízení jakosti.....	26
4	Srovnání novosti postupů.....	26
5	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	26
6	Použitá literatura.....	27

## 1 Úvod

**SARS-CoV-2** (z angl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) je virus z čeledi *Coronaviridae*, který se objevil na konci roku 2019 a způsobuje onemocnění **covid-19** (Corman et al., 2020). Infekce virem SARS-CoV-2 byla dne 11. března 2020 Světovou zdravotnickou organizací označena za celosvětovou pandemii (Acuti Martellucci et al., 2020). Doposud bylo identifikováno **528 milionu případů** a na následky covidu-19 zemřelo více než 6,2 milionu lidí (dle WHO k 3. červnu 2022). Virion SARS-CoV-2 tvoří obalená částice, uvnitř které se nachází virový genom tvořený jednořetězcovou molekulou RNA pozitivní polarity, která je asociována s nukleoproteinem (N) do podoby nukleokapsidy s helikální symetrií. Ve virovém obalu se nachází strukturální virové proteiny, jmenovitě membránový protein (M), obalový protein (E) a v neposlední řadě povrchový glykoprotein S (z angl. *spike*), který je stěžejní pro vstup viru do buňky a vývoj vakcín (V'kovski et al., 2021).

Virus je v těle rozpoznáván jak vrozenými, tak adaptivními imunitními mechanismy. Ukazuje se, že je potřebná včasná a adekvátní vrozená imunitní odpověď vedoucí k adekvátní produkci interferonů (IFN) typu I a III, což umožní včasnou aktivaci adaptivní imunitní odpovědi. SARS-CoV-2 efektivně omezuje produkci IFN a je tak schopen prodloužit čas, za který dojde k aktivaci buněk adaptivního imunitního systému zahrnující lymfocyty T a B. U většiny jedinců dochází i přes zpoždění k adekvátní reakci lymfocytů T a B, což vede k eliminaci patogenu a asymptomatickému či mírnému průběhu covidu-19. U zbylé části pacientů je zpoždění aktivace imunitní odpovědi asociováno s vážným průběhem covidu-19 (Sette a Crotty, 2021).

Aktivované lymfocyty T produkují při boji s virovou infekcí primárně IFN typu II tzn. IFN- $\gamma$ . Po proběhlé infekci zůstávají v krevním oběhu specifické subtypy paměťových lymfocytů T zodpovědné za sekundární imunitní odpověď (Dan et al., 2021). Tyto paměťové buňky jsou detekovány i 12 měsíců po proběhlé infekci (Dan et al., 2021; Jung et al., 2021; Lu et al., 2021) a pro jejich detekci lze využít **metodu ELISpot** (z angl. *Enzyme Linked Immuno Spot Assay*), jejíž výhodou je vysoká citlivost detekce efektorových molekul sekretovaných po stimulaci antigenem. Mezi detekovatelné efektorové molekuly patří mimo jiné právě zmíněný IFN- $\gamma$  produkovaný především lymfocyty T (Sherina et al., 2021).

## 2 Cíl

Předkládaná metoda umožňuje kvantifikovat interferonovou odpověď paměťových T lymfocytů namířených proti proteinům, které jsou produkovány virem SARS-CoV-2. Metoda ELISpot tak může napomoci ke stanovení imunitní připravenosti jedince při opakovaném setkání se SARS-CoV-2.

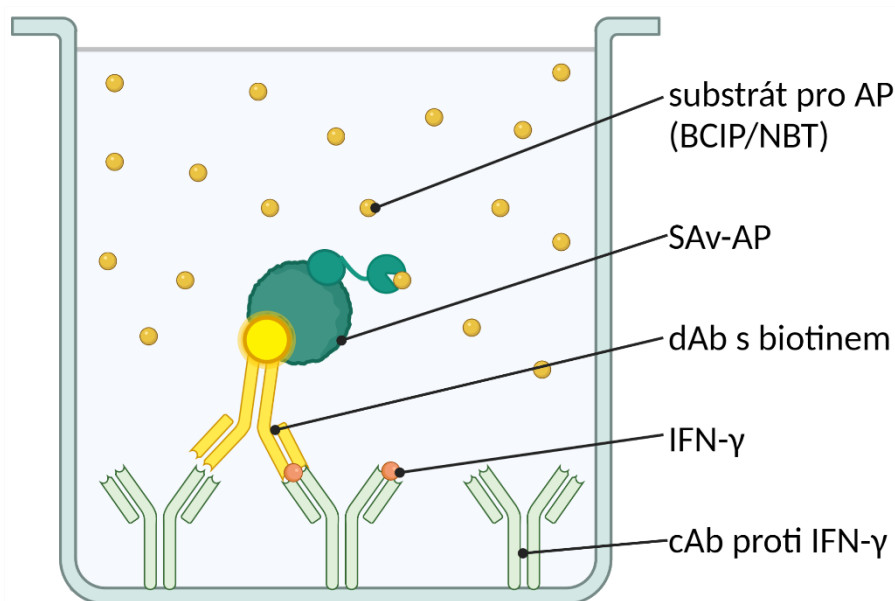
## 3 Popis metodiky

### 3.1 Podstata metody ELISpot

Od roku 1983 se stal ELISpot významnou součástí studií charakterizujících imunitní odpověď jedince (Sedgwick a Holt, 1983). ELISpot je jednou z nejcitlivějších metod pro kvantifikaci buněk sekretujících protilátky nebo jiné efektorové molekuly, zejména cytokiny (Kalyuzhny, 2005; Tanguay a Killion, 1994). Z periferní krve lze obecně izolovat imunitní buňky označované jako periferní mononukleární buňky (PBMC; z angl. *peripheral blood mononuclear cells*), jejichž součástí jsou právě výše zmíněné paměťové lymfocyty. Pomocí ELISPotu lze analyzovat odpověď buněk přímo izolovaných z krve nebo také odpověď buněk, které byly po izolaci zamrazeny v tekutém dusíku (Kalyuzhny, 2005).

Pro metodu ELISpot jsou využívány 96-jamkové destičky, které mají na dně polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu. Na membránu je možné navázat tzv. vazebnou protilátku (cAb; z angl. *capture antibody*), která je cílená proti dané molekule (v tomto případě proti IFN- $\gamma$ ). Přidáním PBMC stimulovaných antigenem dojde k antigeně specifické produkci cytokinů lymfocyty specifickými pro daný antigen. Produkováný cytokin je následně detekován pomocí protilátek. Při detekci lymfocytů T produkujících IFN- $\gamma$  pomocí metody ELISpot (obr. 1) není nutné PBMC předem stimulovat k proliferaci.

Pro analýzu T-buněčné odpovědi jsou jako antigen využívány komerčně dostupné syntetické směsi peptidů. Směsi peptidů umožňují prezentaci antigenních peptidů pomocí molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z angl. *major histocompatibility complex*), což vede k aktivaci antigeně specifických lymfocytů T k produkci IFN- $\gamma$ . Pro detekci efektorových molekul pomocí zde předkládaného tzv. enzymatického ELISpotu lze pro výslednou vizualizaci produkovaného IFN- $\gamma$  použít barvení s využitím detekční protilátky konjugované s biotinem cílené proti IFN- $\gamma$ . Následně je přidána alkalická fosfatáza (AP) fúzovaná se streptavidinem (SAv), který specificky váže molekulu biotinu na detekční protilátce. Do reakce je v posledním kroku přidán substrát BCIP/NBT (5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát/nitrotetrazolium). AP katalyzuje přeměnu substrátu na modře zbarvený produkt, což se projeví vytvořením spotu (tzv. SFU; z angl. *spot forming unit*) na dně jamky v místě, kde byl přítomný antigeně specifický lymfocyt (Kalyuzhny, 2005). SFU lze poté kvantifikovat pod mikroskopem s využitím přístroje zvaného ELISpot reader.



Obr. 1 Princip metody ELISpot pro detekci antigeně specifických lymfocytů produkujících IFN- $\gamma$

Na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu je navázána vazebná protilátka (cAb) proti lidskému interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Do jamky jsou přidány periferní mononukleární buňky vyizolované z periferní krve pacienta nebo dárce a také antigen v podobě směsi peptidů. Směs peptidů je tvořena krátkými peptidy, které mohou být prezentovány pomocí molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), což umožní antigeně specifickou produkci IFN- $\gamma$  lymfocyty T. Sekretovaný IFN- $\gamma$  je zachytáván na cAb. Buňky jsou po inkubaci odstraněny a vázaný IFN- $\gamma$  je detekován pomocí detekční protilátky (dAb) konjugované s biotinem. Následně je přidána alkalická fosfatáza (AP) fúzovaná se streptavidinem (SAv), který se specificky váže na biotinylovanou detekční protilátku. Po přidání substrátu BCIP/NBT (5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát/nitrotetrazolium) katalyzuje AP přeměnu substrátu na modře zbarvený produkt. V místě, kde byla přítomná buňky sekretující IFN- $\gamma$  vzniká barevný spot (v angl.) tzv. *spot forming unit*, (SFU).

### 3.2 Obecné požadavky pro provedení metody

Metoda ELISpot vyžaduje práci s PBMC vyizolovanými z krve pacientů nebo dárců. Pro zajištění validních výsledků je nutná sterilní práce s těmito buňkami v laminárním boxu včetně použití sterilních roztoků a spotřebního materiálu. Pro předkládaný ELISpot je doporučeno používat výhradně chemikálie dodávané výrobcem komerčních souprav pro T-buněčný ELISpot uvedené v kap. 3.3.3 Chemikálie a roztoky. Při práci s koncentrovanými zásobními roztoky peptidových směsí a s rekombinantními proteiny je doporučeno používat silikonizované zkumavky nebo zkumavky, které omezují vazbu proteinů na vnitřní povrch (např. zkumavky typu LoBind®). Další přístrojové vybavení a pomůcky lze považovat za doporučené, pokud není v protokolu (viz kap. 3.4.3 Postup) uvedeno jinak.

### 3.3 Použitý laboratorní materiál a chemikálie

#### 3.3.1 Přístrojové vybavení a software

- ImmunoSpot® Analyzer S6 Ultimate M2 (CTL)
- Centrifuga Heraeus Megafuge 16R (ThermoFisher Scientific)
- Vortex mixer (Labnet)
- Mini centrifuga PRISM™ mini (Labnet)
- Software ImmunoSpot® Single-Color ELISPOT Enzymatic (CTL)
- Software Fluoro-X™ FluoroSpot (CTL)
- Software pro statistickou analýzu Prism 8 (GraphPad)

#### 3.3.2 Spotřební a laboratorní materiál a pomůcky

- Pipeta Biopette PLUS 100-1000 µl (Labnet)
- Pipeta Biopette PLUS 20-200 µl (Labnet)
- Pipeta Biopette PLUS 2-20 µl (Labnet)
- Pipeta Biopette PLUS 0,5-10 µl (Labnet)
- Pipetus® (Hirschmann)
- Multikanálová pipeta Acura 855 5-50 µl (Socorex)
- Multikanálová pipeta Finnpipette™ F2 30-300 µl (ThermoFisher Scientific)
- Automatická multikanálová pipeta Finnpipette™ Novus 30-300 µl (ThermoFisher Scientific)
- Automatická multikanálová pipeta Finnpipette™ Novus 100-1000 µl (ThermoFisher Scientific)
- Zamrazovací zkumavky CryoKING® (Biologix®)
- Zkumavky Protein LoBind® (Eppendorf)
- Špičky s širokým ústím (SSI Bio) na pipety Biopette PLUS 100-1000 µl a 20-200 µl
- 1,5ml zkumavky (Eppendorf)
- 15ml a 50ml polypropylenové zkumavky (Biofil®)
- Izolační zkumavky SepMate™ PBMC Isolation Tubes (StemCell® Technologies)
- Souprava Human IFN-γ Single-Color ELISPOT (CTL)
- Hemocytometer Pack for 100-samples (CTL)
- Vlhká komůrka (uzavíratelná nádoba větší než 96-jamková destička)
- Polystyrenové vaničky na roztoky pro pipetování multikanálovou pipetou o objemu 55 ml (Biologix®)

### 3.3.3 Chemikálie a roztoky

- Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- 10× PBS (Gibco)
- CTL-Cryo™ ABC Media Kit (CTL)
- CTL-LDC™ Live/Dead Cell Counting Kit (CTL)
- 70% etanol (Sigma-Aldrich)
- 100× L-glutamin (Biosera)
- 100× penicilin-streptomycin (Sigma-Aldrich)
- Tween® 20 (Sigma-Aldrich)
- dimetyl-sulfoxid (Sigma-Aldrich)
- dH<sub>2</sub>O
- SARS-CoV-2 **S** defined peptide pool (MabTech)
- SARS-CoV-2 **NMO** defined peptide pool (MabTech)
- **CEF** Pool – extended (PM-CEF-E-4) (JPT Peptide Technologies)

#### 3.3.3.1 Příprava médií a roztoků

##### **CTL-Wash™ médium**

- RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)
- CTL-Wash™ Supplement 10× (CTL)
- 100× L-glutamin (Biosera)

CTL-Wash™ médium se připravuje smícháním CTL-Wash™ Supplement 10× s RPMI-1640 v poměru 1:9 v potřebném objemu podle počtu vzorků (~ 5,1 ml/vzorek). K roztoku je přidán L-glutamin tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 2mM. Takto připravený roztok je možné uchovávat 20 dní při 4°C. L-glutamin je nutné do roztoku po 7 dnech znovu přidat, protože je v roztoku nestabilní. Přidání L-glutaminu je ale možné maximálně dvakrát. Roztok je nutné chránit před světlem.

##### **CTL-Test™ médium**

- CTL-Test™ Medium (CTL)
- 2mM L-glutamin (Biosera)
- 100× penicilin-streptomycin (Sigma-Aldrich)

Médium je rovnou připraveno k použití a neředí se, je však nutné do média přidat L-glutamin tak, aby byl ve výsledném objemu v 2mM koncentraci, a také antibiotika v koncentraci 100U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu. Médium je vhodné si připravit den před vlastním



provedením ELISpotu a je možné jej uchovávat při 4 °C max. 1 měsíc. Po týdnu je ale nutné znovu přidat L-glutamin (maximálně je možné jej přidat dvakrát). Médium je nutné chránit před světlem.

### **CTL-anti-Aggregate Wash™ (aAGW) médium**

- 20× CTL-Anti-Aggregate Wash™ Supplement (CTL)
- RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)

Roztok aAGW je připravován v objemu dle počtu buněk, kdy počet milionů rozmrazených buněk odpovídá potřebnému objemu aAGW v ml (např. pro rozmražení  $3,5 \times 10^6$  PBMC je potřeba min. 3,5 ml aAGW bez rezervy na pipetování). Roztok aAGW média je připravován smícháním RPMI-1640 a 20× CTL-Anti-Aggregate Wash™ Supplement v poměru 19:1. Před použitím je nutné roztok aAGW inkubovat v termostatu při 37°C s 7% CO<sub>2</sub> po dobu 20 min. Ideální je roztok použít do 1 h od jeho přípravy.

### **1× PBS**

- 10× PBS (Gibco)
- dH<sub>2</sub>O

Roztok 1x PBS je připraven smícháním koncentrovaného 10× PBS (Gibco) s dH<sub>2</sub>O v poměru 1:9.

### **Roztok Tween-PBS**

- 1× PBS
- Tween® 20 (Sigma- Aldrich)

Roztok Tween-PBS je připraven smícháním 1× PBS s Tween® 20 tak, aby byl Tween® 20 ve výsledku 0,05%. Pro jednu 96-jamkovou destičku je potřeba připravit ~ 200 ml Tween-PBS.

### **Roztok PBS-EDTA**

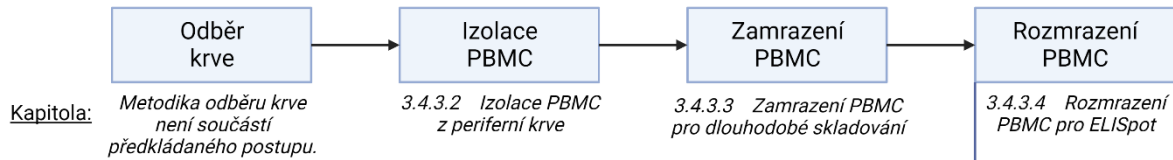
- 1× PBS
- 0,5M kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)

Roztok PBS-EDTA je připraven smícháním 4 ml 0,5M EDTA s 1× PBS v celkovém objemu 1 litr. Konečná koncentrace EDTA v 1× PBS je 2mM.

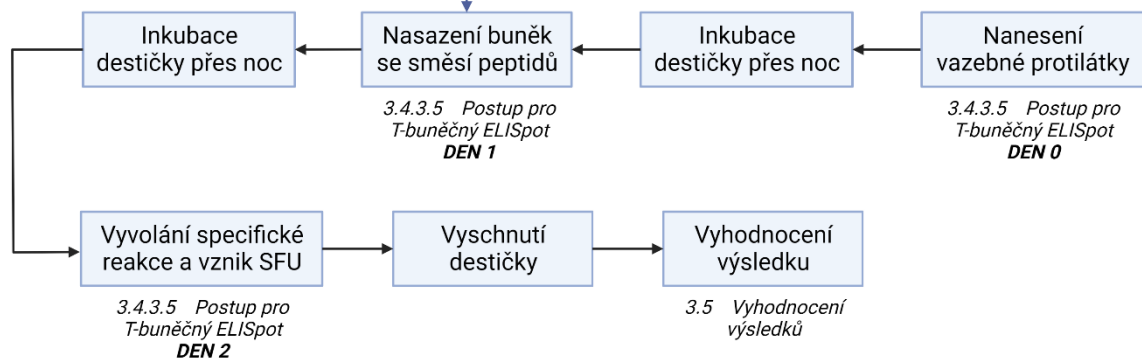
## 3.4 Průběh metody ELISpot

Průběh metody ELISpot pro analýzu T-buněčné odpovědi proti viru SARS-CoV-2 je znázorněn na obr. 2.

### Příprava vzorku



### Provedení testu



Obr. 2 Schéma průběhu metody ELISpot

Schematické znázornění průběhu metody ELISpot pro analýzu T-buněčné odpovědi cílené proti viru SARS-CoV-2 s odkazy na jednotlivé kapitoly, které obsahují dílčí postupy. Schéma bylo vytvořeno na Biorender.com

### 3.4.1 Bezpečnostní opatření

Metodu ELISpot pro detekci buněčné odpovědi proti viru SARS-CoV-2 lze v uvedeném uspořádání provádět v laboratoři bez nadstandardních bezpečnostních opatření. Při práci s PBMC je nutné využívat laminární box pro zajištění bezpečnosti a zamezení kontaminace vzorku. Při práci s tekutým dusíkem je nutné používat všechny povinné ochranné pomůcky.

### 3.4.2 Okolní podmínky zkoušky

Provedení metody ELISpot pro analýzu imunitní odpovědi proti SARS-CoV-2 nevyžaduje kontrolu žádných limitních podmínek.

### 3.4.3 Postup

#### 3.4.3.1 Příprava zásobních směsí peptidů

##### **Směs peptidů SARS-CoV-2 S a NMO (MabTech)**

Lyofilizované peptidové směsi jsou rekonstituovány dle protokolu výrobce:

1. Do zkumavky s lyofilizovanou směsí peptidů je přidáno 40 µl DMSO.
2. Poté je přidáno 85 µl 1× PBS
3. Obsah zkumavky je promíchán na minitřepačce.
4. Tento zásobní roztok o koncentraci 200 µg/ml je rozplněn do silikonizovaných nebo Protein LoBind® zkumavek dle požadovaného objemu (12 µl zásobního roztoku je potřeba pro jednu 96-jamkovou destičku).
5. Rozplněné směsi peptidů je nutné uchovávat v mrazáku při teplotě -20 °C nebo nižší.

##### **Kontrolní směs peptidů CEF (IPT)**

Lyofilizovaná peptidová směs je rekonstituována dle protokolu výrobce:

1. Ke směsi peptidů je přidáno 40 µl DMSO. Zkumavka je intenzivně promíchána na minitřepačce.
2. Objem je doplněn do 1 ml přidáním 1× PBS (koncentrace zásobního roztoku 200 µg/ml).
3. Zásobní roztok je rozplněn do silikonizovaných nebo Protein LoBind® zkumavek v požadovaném objemu (26 µl je objem potřebný pro jednu 96-jamkovou destičku).
4. Zásobní roztok je nutné uchovávat v mrazáku při teplotě -20 °C nebo nižší.

#### 3.4.3.2 Izolace PBMC z periferní krve

Do odběrových zkumavek s heparinem sodným je odebírána nesrážlivá krev. Zkumavky s krví je nutné skladovat při pokojové teplotě a izolaci PBMC provést do 24 h od odběru. Standardně jsou vzorky zpracovány do ~ 5 h. V ideálním případě by měly být buňky izolovány do 8h od odběru (Janetzki et al., 2005). Pokud by byly buňky izolovány s větším časovým odstupem je vhodné ponechat zkumavky v pokojové teplotě na třepačce (případně s nimi otáčet) anebo ještě lépe naředit krev s roztokem PBS-EDTA (příprava roztoku viz kap. 3.3.3.1 Příprava médií a roztoků) v poměru 1:1. Předem je potřeba připravit všechny potřebné roztoky a vytemperovat je na pokojovou teplotu (Ficoll-Paque Plus, PBS-EDTA, CTL-Wash médium) a roztoky pro zamrazení buněk, které jsou součástí kitu CTL-Cryo™ ABC Media Kit (CTL-Cryo™ A, CTL-Cryo™ B a CTL-Cryo™ C) na teplotu 37 °C (viz kapitola 3.4.3.3 Zamrazení PBMC pro dlouhodobé skladování).

Práce s krví a PBMC vyžaduje použití laminárního boxu. Pro veškerou práci s buňkami je nutné používat špičky se širokým ústím.

1. Příprava CTL-Wash™ média a PBS-EDTA viz kapitola 3.3.3.1 Příprava médií a roztoků.
2. Krev je přenesena z odběrových zkumavek (2× 7 ml) do nové 50ml zkumavky a naředěna 1:1 s PBS-EDTA (14 ml krve + 14 ml PBS-EDTA). Pro promíchání naředěné krve s PBS-EDTA je zkumavka šetrně 2× obrácena. Pro míchání se nesmí používat pipeta, protože smykové síly indukují apoptózu v lymfocytech.
3. Roztok Ficoll-Paque Plus je opakovaným převrácením promíchán. Do 50ml SepMate zkumavek je přes díru v membráně přidáno 15 ml Ficollu. V tomto kroku je dobré držet ústí pipety kolmo k otvoru, aby se nevytvořily pod membránou bubliny. Případné malé bubliny by neměly ovlivnit výsledek.
4. Do SepMate zkumavky (do její horní části nad membránou) je po stěně pomalu přidána naředěná krev. Objem ředěné krve se musí pohybovat v rozmezí 8-36 ml, aby bylo možné použít 50 ml SepMate zkumavky!
5. Krev v SepMate zkumavkách je centrifugována při 1200× g po dobu 10 min při teplotě 20 °C (tolerance 15–25 °C) se zapnutou brzdou centrifugy.
6. Do čisté 50ml zkumavky je slit celý objem tekutiny ze SepMate zkumavky. Důležité je zkumavku nedržet v obrácené poloze víc než 2 sec!
7. Polovina objemu tekutiny s buňkami v čisté 50ml zkumavce je přenesena do druhé 50ml zkumavky. Tekutina s buňkami je v obou zkumavkách 4× naředěna do 1× PBS. Následně jsou zkumavky centrifugovány při 300× g po dobu 8 min při teplotě ~ 20°C se zapnutou brzdou centrifugy.
8. Supernatant je slit a buněčný pelet je rozvolněn poklepáním na špičku zkumavky. Po uvolnění peletu ode dna zkumavky je přidáno 5 ml vytemperovaného CTL-Wash™ média. Buňky jsou velmi šetrně resuspendovány pomocí mikropipety se špičkou se širokým ústím. Ze středu objemu ředěné tekutiny s buňkami je odebráno 20 µl do 1,5ml zkumavky. Zbytek PBMC v CTL-Wash™ médiu je uložen s pootevřeným víčkem do termostatu se 7% CO<sub>2</sub> a teplotou 37 °C.
9. K PBMC v 1,5 ml zkumavce je přidáno 20 µl roztoku pro obarvení živých a mrtvých buněk\* CTL-LDC™ Live/Dead Cell Counting Kit (CTL). Roztok je resuspendován a na hemocytometr (CTL) je napipetováno 10 µl roztoku. Pomocí přístroje ImmunoSpot® Analyzer – S6 Ultimate M2 (CTL) se softwarem Fluoro-X™ FluoroSpot (CTL) je spočítáno celkové množství izolovaných živých PBMC.

\*Alternativně lze počet živých a mrtvých buněk stanovit s využitím trypanové modře (např. Sigma-Aldrich), která barví mrtvé buňky. Počet živých (neobarvených) buněk lze stanovit pomocí Bürkerovy komůrky a světelného mikroskopu.

#### 3.4.3.3 Zamrazení PBMC pro dlouhodobé skladování

1. Připraví se směs roztoků CTL-Cryo™ A a CTL-Cryo™ B, které jsou součástí kitu CTL-Cryo™ ABC Media Kit. Objem těchto roztoků je přizpůsoben celkovému počtu vzorků a počtu buněk. CTL-Cryo™ AB směs je připravena smícháním roztoků CTL-Cryo™ A a CTL-Cryo™ B v poměru 4:1. Do potřebného objemu CTL-Cryo™ A je velmi pomalu přikapáván CTL-Cryo™ B a zároveň je zkumavkou krouženo, aby se roztoky během přidávání postupně míchaly. Mix CTL-Cryo™ AB je dán do termostatu na 37 °C. Je doporučeno používat zkumavky pro zamrazování, které nemají duté víčko (např. CryoKING®; Biologix®) tzn. při jejich otočení v procesu rozmrazování (kap. 3.4.3.4 Rozmrazení PBMC pro ELISpot) nedochází k nechtěným ztrátám buněk.

2. Po spočítání buněk (viz kap. 3.4.3.2 Izolace PBMC z periferní krve) jsou buňky centrifugovány při 300× g po dobu 8 min a při teplotě ~ 20 °C se zapnutou brzdou centrifugy.

3. Supernatant je slit a buněčný pelet rozvolněn klepáním na špičku zkumavky. Buňky jsou resuspendovány ve vytemperovaném CTL-Cryo™ C médiu na koncentraci 20×10<sup>6</sup>/ml.

4. K CTL-Cryo™ C médiu s PBMC je velmi pomalu (~ 1 ml/ 5 s) přidán CTL-Cryo™ AB mix v poměru 1:1. Během přidávání roztoku jsou zkumavkou prováděny krouživé pohyby, aby se oba roztoky řádně promíchaly.

5. Suspenze buněk ve směsi roztoků CTL-Cryo™ ABC je přepipetována do předem označených zkumavek určených pro zamrazování buněk v tekutém dusíku. Standardně jsou buňky zamrazovány v objemu 350 µl tzn. 3,5×10<sup>6</sup> buněk na zkumavku. Buňky by neměly ležet v kompletním CTL-Cryo™ ABC déle než 20 min.

6. Vyizolované PBMC jsou nejprve přendány do mrazícího boxu Nalgene® (Mr. Frosty) s izopropylalkoholem a umístěny do mrazáku na -80 °C po dobu 12–48 h. Následně jsou zkumavky přendány do tekutého dusíku (-196 °C).

#### 3.4.3.4 Rozmrazení PBMC pro ELISpot

Vzorky PBMC zamrazené dle protokolu uvedeném v předchozí kapitole jsou rozmrazeny a následně použity pro analýzu T-buněčné odpovědi (viz kap. 3.4.3.5 Postup pro T-buněčný ELISpot). Před vlastním rozmrazením je nutné připravit a vytemperovat všechny potřebné roztoky (CTL-aAGW a CTL-Test™ médium), jejichž příprava je uvedena v kap. 3.3.3.1 Příprava médií a roztoků. Podle tohoto protokolu je možné rozmrazovat najednou max. 8 analyzovaných vzorků, což je dáno především kapacitou destičky. Lze ale dle časových možností rozmrazit

dvakrát 8 pacientů a poté analyzovat celkem 16 vzorků s časovou náročností (dle našich podmínek) ~ 5 - 6 h.

1. Zkumavka s PBMC je z tekutého dusíku ihned přendána do vodní lázně s teplotou 37 °C a inkubována 8 min. V mezičase je vhodné připravit sterilní 50ml zkumavky označené identifikačním číslem vzorku.

2. Pro resuspendování buněk je zkumavka 2× otočena o 180°.

3. Pomocí mikropipety s rozsahem 200–1000 µl a špičkou se širokým ústím je celý objem suspenze buněk přenesen do označené 50ml zkumavky. Pro odebrání PBMC, které zůstaly na stěně zmrazovací zkumavky, je zkumavka vypláchnuta 1 ml aAGW zahřátého na 37°C a tento objem je poté ze zkumavky přendán k PBMC v 50ml zkumavce. Roztok aAGW se zbylými PBMC je do zkumavky přikapáván pomalu. Zkumavkou je krouženo pro promíchávání roztoků.

4. K suspenzi buněk v 50ml zkumavce je pomalu přikapán i zbylý objem aAGW, tak aby byl konečný objem přidaného aAGW v ml roven polovině počtu rozmrazeného množství buněk v milionech (např. když je rozmrazováno  $3,5 \times 10^6$  buněk, je v tomto kroku přidáno celkem i s 1 ml pro výplach zmrazovací zkumavky 1,75 ml aAGW). Před dalším krokem je doporučeno suspenzi buněk ve zkumavce jemnými krouživými pohyby zamíchat.

5. Zkumavky jsou centrifugovány při 300× g po dobu 10 minut při pokojové teplotě (20-25 °C) se zapnutou brzdou.

6. Supernatant je slit a buněčný pelet je rozvolněn klepáním na špičku zkumavky. K peletu je opět pomalu přidán aAGW ve stejném objemu, jako byl celkový objem přidaného aAGW v kroku 3. Před dalším krokem je doporučeno suspenzi buněk ve zkumavce jemnými krouživými pohyby zamíchat a resuspendovat pomocí mikropipety s rozsahem 200–1000 µl a špičkou se širokým ústím.

7. Do 1,5ml zkumavky je odebráno 20 µl vzorku pro počítání buněk. Zbytek PBMC v aAGW roztoku je uložen s pootvřeným víčkem do termostatu se 7% CO<sub>2</sub> a teplotou 37 °C.

8. K PBMC v 1,5 ml zkumavce je přidáno 20 µl roztoku pro obarvení živých a mrtvých buněk\* CTL-LDC™ Live/Dead Cell Counting Kit. Roztok je resuspendován a na hemocytometr je napipetováno 10 µl. Pomocí přístroje ImmunoSpot® Analyzer – S6 Ultimate M2 (CTL) se softwarem Fluoro-X™ FluoroSpot (CTL) je vypočítáno celkové množství rozmrazených **živých** PBMC.

9. PBMC v 50ml zkumavce jsou centrifugovány stejně jako v bodě 4.

10. Supernatant je slit a PBMC jsou resuspendovány na koncentraci  $2 \times 10^6$  **živých** PBMC/ml. Před přípravou peptidové směsi (viz kapitola 3.4.3.5 Postup pro ELISpot) jsou zkumavky s PBMC ponechány v termostatu s 37 °C a se 7% CO<sub>2</sub>.

\* Alternativně lze počet živých a mrtvých buněk stanovit klasicky s využitím trypanové modře, která barví mrtvé buňky a spočítáním buněk pomocí Bürkerovy komůrky a světelného mikroskopu.

#### 3.4.3.5 [Postup pro ELISpot](#)

Pro T-buněčný ELISpot je využívána souprava Human IFN- $\gamma$  Single-Color ELISPOT od firmy CTL. Uvedený postup je optimalizován na použití jedné 96-jamkové destičky a analýzu T-buněčné odpovědi u 8 vzorků. V celém průběhu protokolu až do kroku č. 34 nesmí dojít k vyschnutí PVDF membrány. V celém průběhu metody je nutné se při pipetování špičkou nedotýkat PVDF membrány, aby nedošlo k jejímu poškození. V průběhu DNE 1 a 2 je nutné pracovat v laminárním boxu. V případě menšího množství vzorků lze využít soupravu Human IFN- $\gamma$  Single-Color ELISPOT od CTL obsahující stripy, se kterými se pracuje obdobně jako s 96-jamkovou destičkou jen je nutné přizpůsobit rozložení jednotlivých vzorků.

#### **DEN 0**

1. Je připraven roztok (*Capture Solution*) vazebné protilátky (cAb; *IFN- $\gamma$  Capture Antibody*) naředěním cAb v roztoku Diluent A. Protilátka se ředí 250 $\times$ , tzn. při použití jedné 96-jamkové destičky je do 10 ml Diluent A přidáno 40  $\mu$ l cAb.
2. Destička je aktivována přidáním 15  $\mu$ l 70% etanolu do každé jamky, což se projeví zešednutím PVDF membrány. Etanol nesmí být na destičce inkubován déle než 60 s. Etanol je vyklepnut z destičky do odpadní nádoby a reziduální kapalina je vyklepnuta do buničité vaty.
3. Ihned poté je do jamek přidáno 150  $\mu$ l 1 $\times$  PBS. Roztok je opět vyklepnut do odpadní nádoby a reziduální kapalina vyklepána do buničité vaty. Následně je přidáno 80  $\mu$ l roztoku cAb na každou jamku.
4. Destička s roztokem cAb je přendána do vlhké komůrky, která je vytvořena vystláním uzavíratelné nádoby navlhčenou buničitou vatou.
5. Destička je ve vlhké komůrce inkubována při 4 °C přes noc.

#### **DEN 1**

6. Jsou rozmrazeny PBMC podle protokolu v kap. 3.4.3.4 Rozmrazení PBMC pro ELISpot.

7. Jsou rozmrazeny zásobní roztoky směsí peptidů. Zkumavky s peptidovou směsí jsou rozmrazovány při pokojové teplotě ~ 15 min. Pokud by byly peptidy rozmrazovány s delším časovým odstupem je nutné je uchovávat po tuto dobu v lednici. Následně jsou připraveny ředěné roztoky (tab. 1).

Tab 1. Ředění směsí peptidů

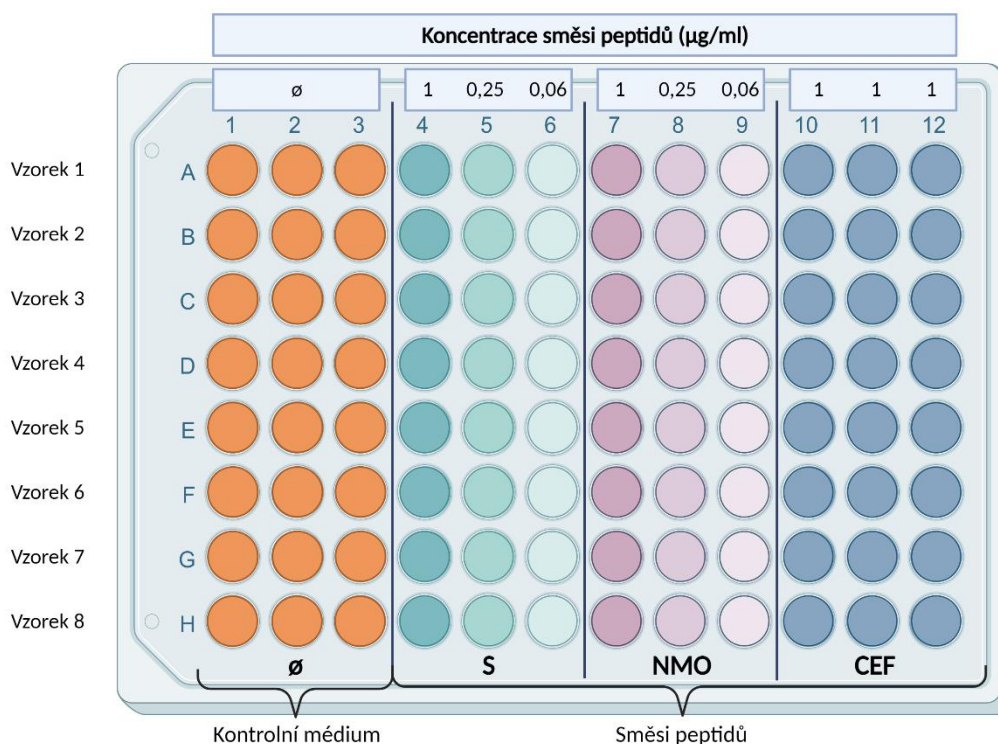
Název	Koncentrace [µg/ml]	Ředění při použití jedné 96-jamkové destičky
<b>A</b>	1	12 µl zásobního roztoku směsi peptidů + 1188 µl CTL-Test™ média
<b>B</b>	0,25	300 µl A + 900 µl CTL-Test™ média
<b>C</b>	0,06	300 µl B + 900 µl CTL-Test™ média
<b>CEF</b>	1	26 µl zásobního roztoku směsi peptidů CEF + 2574 µl CTL-Test™ média

8. Z destičky je vyklepnut roztok cAb do odpadní nádoby a reziduální kapalina do buničité vaty.

9. Destička je opláchnuta přidáním 150 µl sterilního 1× PBS na každou jamku.

10. Kapalina je opět vyklepnuta stejně jako v bodě 8.

11. Do jamek jsou přidány roztoky s peptidovou směsí (100 µl/jamka) nebo samotné CTL-Test™ médium (100 µl/jamka), které slouží jako negativní kontrola. Doporučené rozvržení vzorků na destičce je uvedeno na obr. 3.



Obr 3. Doporučené rozložení experimentu na 96-jamkové destičce

Obrázek byl vytvořen na Biorender.com.



12. Destička je inkubována 10-20 min v termostatu se 7% CO<sub>2</sub> při teplotě 37°C.
13. K roztokům v jamkách je přidáno 100 µl suspenze PBMC (tzn. 200 000 PBMC/jamka) analyzovaných vzorků (obr. 3).
14. Buňky jsou rozprostřeny po ploše jamky **jemným** postupným poklepáním na všechny boční strany destičky.
15. Destičku se dnem zabaleným do alobalu je nutné ihned umístit do termostatu (37 °C, 7% CO<sub>2</sub>) a inkubovat 20 h. Je vhodné v tomto času termostat neotevírat a zamezit tak nechtěnému posunu buněk.

## DEN 2

16. Příprava Tween-PBS (viz kap. 3.3.3.1 Příprava médií a roztoků).
17. Roztok (*Detection Solution*) s detekční protilátkou (dAb; *Biotin Detection Antibody*) v objemu pro jednu 96-jamkovou destičku je připraven přidáním 40 µl dAb do 10 ml roztoku Diluent B. Protilátka dAb je ředěna 250×.
18. Obsah destičky je vyklepnut do odpadní nádoby s dezinfekcí a reziduální kapalina je vyklepnuta do buničité vaty.
19. Destička je dvakrát opláchnuta přidáním 200 µl 1× PBS/jamka a dvakrát přidáním 200 µl Tween-PBS do každé jamky. Každý promyv je zakončen krokem 18.
20. Do prázdných jamek je přidáno 80 µl/jamka roztoku dAb. Případné vzniklé bubliny je doporučeno propíchnout opatrně jehlou tak, aby nedošlo k porušení membrány.
21. Destička je inkubována ve tmě zabalená v alobalu po dobu 2 h při pokojové teplotě.
22. Přibližně 10 min před koncem inkubace je připraven roztok (*Tertiary Solution*) SAV-AP smícháním 10 ml roztoku Diluent C s 10 µl *Strep-AP*. Připravený roztok je před použitím nutno uschovat ve tmě.
23. Opakování kroku 18.
24. Destička je 3× opláchnuta přidáním 200 µl roztoku Tween-PBS do každé jamky. Po každém proplachu následuje krok 18.
25. Do každé jamky je přidáno 80 µl připraveného roztoku SAV-AP (*Tertiary Solution*). Případné vzniklé bubliny je doporučeno propíchnout opatrně jehlou tak, aby nedošlo k porušení membrány.
26. Destička je inkubována při pokojové teplotě ve tmě po dobu 30 min.

27. Přibližně 10 min před koncem inkubace je připraven roztok se substrátem (*Blue Developer Solution*). Do 10 ml roztoku Diluent Blue je přidáno 160  $\mu$ l roztoku S1, po zamíchání 160  $\mu$ l roztoku S2 a po dalším zamíchání je nakonec přidáno 92  $\mu$ l roztoku S3. Připravený roztok je před použitím nutno uschovat ve tmě.

28. Opakování kroku 18.

29. Destička je 2 $\times$  opláchnuta přidáním 200  $\mu$ l roztoku Tween-PBS na každou jamku a poté 2 $\times$  přidáním 200  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O na každou jamku. Po každém proplachu následuje krok 18.

30. Na destičku je do každé jamky přidáno 80  $\mu$ l roztoku se substrátem (*Blue Developer Solution*). Destička je inkubována při pokojové teplotě 15 min ve tmě.

31. Opakování kroku 18.

32. Celá destička je 3 $\times$  opláchnuta jemným proudem kohoutkové vody.

33. Opakování kroku 18.

34. Ze spodní části destičky je opatrně pomocí pinzety odstraněn plastový kryt.

35. Destička je dnem vzhůru položena na buničitou vatu, kde takto vysychá po dobu 24 h. Alternativně lze destičku nechat vysychat 1 h v zapnutém laminárním boxu.

## 3.5 Vyhodnocení výsledků

Proces vyhodnocování byl optimalizován pro použití přístroje ImmunoSpot® Analyzer – S6 Ultimate M2 (CTL). Pokud je pro vyhodnocení výsledků používán jiný přístroj je nutné optimalizovat nastavení snímání výsledků konkrétně pro daný přístroj. Použití odlišného přístroje ale nemá vliv na nastavení hraničních hodnot pro vyhodnocení positivity/negativity vzorku uvedených v kap. 3.5.2 Vyhodnocení výsledků.

### 3.5.1 Stanovení počtu spotů

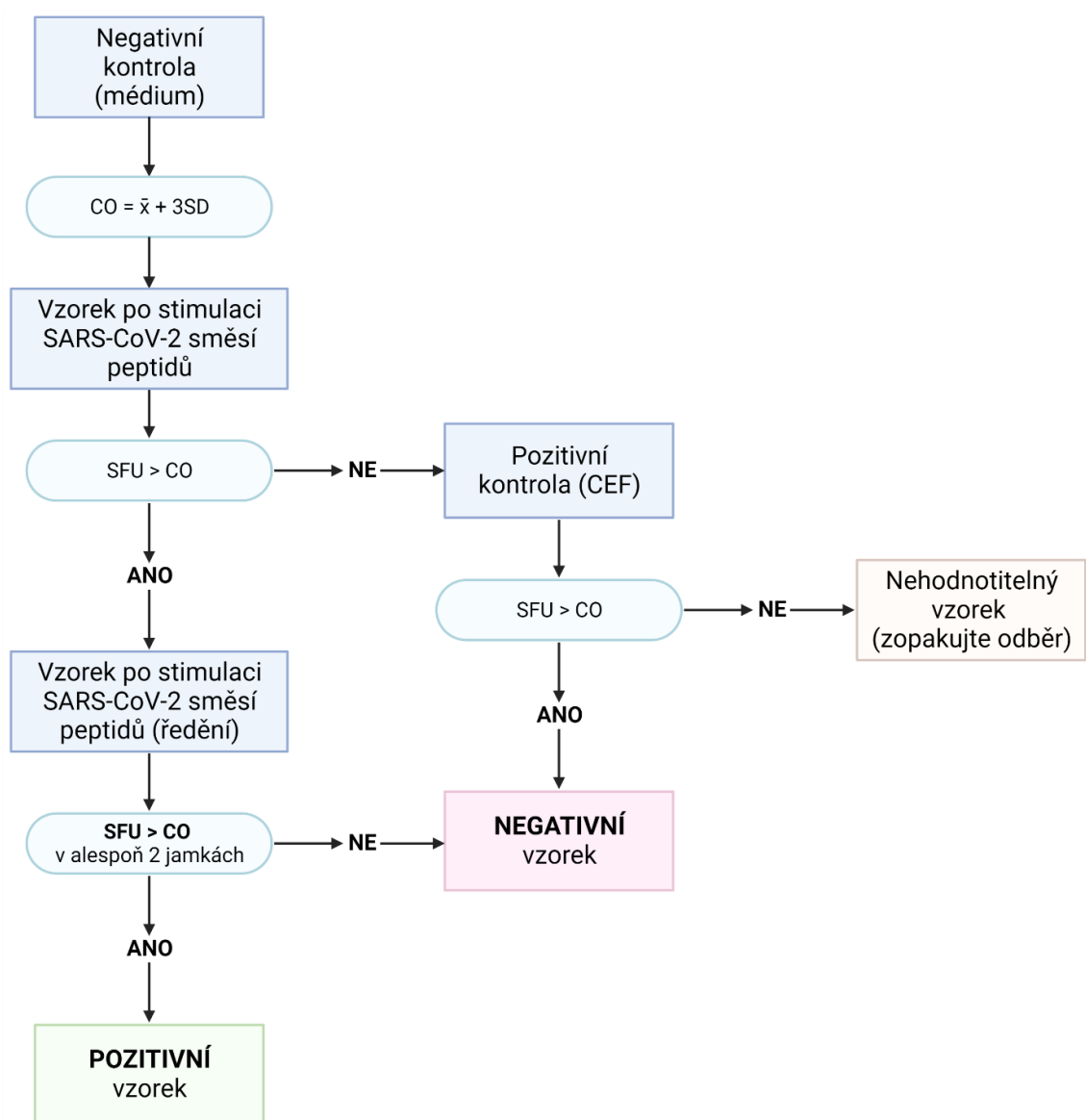
Pro vyhodnocení výsledků je používán přístroj ImmunoSpot® Analyzer – S6 Ultimate M2 a software ImmunoSpot® Single-Color ELISPOT Enzymatic. V režimu Single-Color je destička nasnímána a počet spotů vypočítán s doporučeným nastavením (tab. 2). Při počítání spotů jsou při procesu „count“ (tab. 2) označeny pozitivní (SARS-CoV-2 směsi peptidů) a negativní (kontrolní médium) jamky a následně je senzitivita softwaru při počítání spotů nastavena pomocí funkce v angl. zvané *autogating*. Po kontrole kvality je počet SFU přepočítán na 1 mil. PBMC a vyhodnocen dle postupu v kap. 3.5.2.

Tab. 2: Proces a nastavení přístroje ImmunoSpot® Analyzer – S6 Ultimate M2 (CTL)

Proces	Nastavení
Scan	<i>IFN-γ ImmunoSpot Kit Plate</i> <i>Centering mode → Fixed present position with autocentering</i> <i>Exposure: Autoexposure for each well</i>
Count	<i>Background balance = 80</i> <i>Diffuse processing = normal</i> <i>Spot separation = 1</i>

### 3.5.2 Vyhodnocení reaktivity vzorků

Pro vyhodnocení positivity/negativity vzorku byla stanovena mezní hodnota (CO, z angl. *cut-off*) dle Lehmann et al. (2021) individuálně pro každý vzorek zvláště jako průměrný počet ( $\bar{x}$ ) SFU/10<sup>6</sup> PBMC negativní kontroly u každého z analyzovaných vzorků navýšený o trojnásobek směrodatné odchylky (SD; z angl. *standard deviation*), tzn.  $CO = \bar{x} + 3SD$ . U vzorků byla nejprve vyhodnocena odpověď buněk proti směsím peptidů SARS-CoV-2 a následně odpověď na kontrolní směs peptidů CEF. Jako pozitivní je vzorek vyhodnocen, pokud je počet SFU > CO daného vzorku ve 2 nebo 3 jamkách (bez ohledu na konkrétní ředění). Pokud buňky nereagují ani na směs peptidů SARS-CoV-2 (S a NMO) ani na kontrolní peptidovou směs CEF (více o CEF v kap. 3.7 Optimalizace), jedná se o nehodnotitelný vzorek a je doporučeno zopakovat celý proces analýzy T-buněčné odpovědi s novým odběrem krve (obr.4).

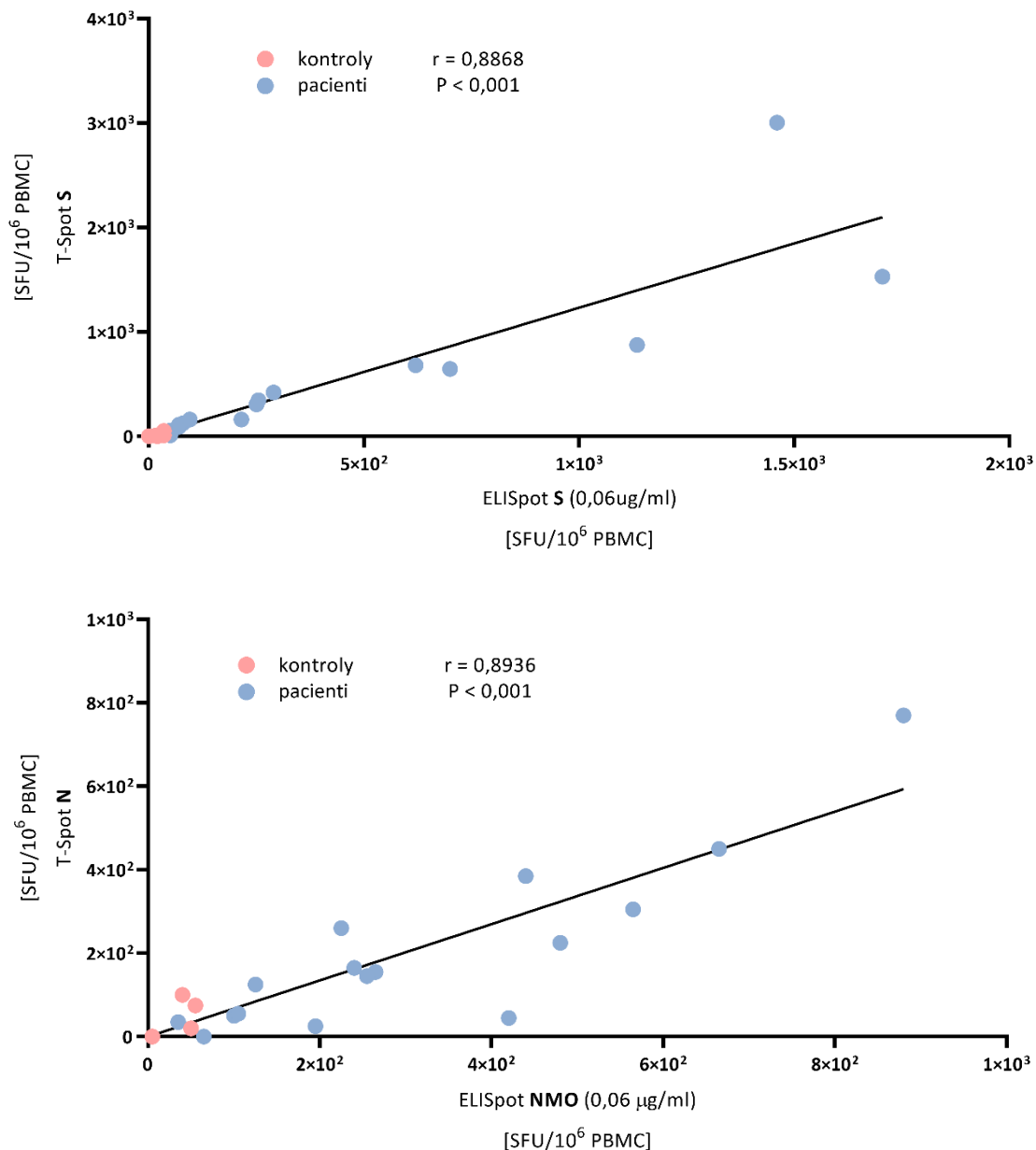


Obr. 4 **Algoritmus pro vyhodnocení positivity/negativity vzorku**

Schéma bylo vytvořeno na Biorender.com

### 3.6 Validace

Předkládaná metodika byla porovnána také s komerční soupravou T-SPOT®.COVID test od firmy Oxford Immunotec, která se stala dostupnou v průběhu vývoje našeho testu. Výsledky byly porovnány u 17 pacientů po prodělaném covidu-19 a 5 séronegativních kontrol. U vzorků séronegativních kontrol byla prokázána testem ELISA nepřítomnost protilátek proti N antigenu (Elecys® Anti-SARS-CoV-2; Roche), kdy byl za negativní považován vzorek, jehož hodnota výsledného indexu (COI; z angl. *cut-off index*)  $COI < 1,0$ . Detekovaná hladina protilátek se u séronegativních vzorků pohybovala v rozmezí 0 - 0,4 U/ml. Výsledky počtu SFU/10<sup>6</sup> PBMC při porovnání obou testů analyzujících množství buněk produkujících IFN- $\gamma$  spolu vzájemně korelují s vysokou statistickou významností  $P < 0,001$  (obr. 5).



**Obr. 5 Porovnání vyvinutého testu ELISpot s komerční soupravou**

T-buněčná odpověď byla stanovena vyvinutým postupem a současně také pomocí komerční soupravy T-SPOT®.COVID test od firmy Oxford Immunotec u 17 pacientů po prodělaném covidu-19 a 5 séronegativních kontrol.

Při použití algoritmů pro vyhodnocení pozitivitu/negativitu vzorku (uvedených v kapitole 3.5.2 a v návodu testu T-SPOT®.COVID<sup>1</sup>) se výsledek shoduje pro N i S antigen v 81 % případů (17/21; 1 vzorek byl z porovnání vyřazen, protože byl komerční soupravou vyhodnocen jako

<sup>1</sup> CO v testu T-SPOT®.COVID je vyhodnocován na základě počtu SFU v negativní kontrole (kontrolní médium). Když je počet buněk v negativní kontrole  $\leq 10$  je výsledek vyhodnocen jako platný, pokud je zároveň počet SFU v pozitivní kontrole (mitogen)  $\geq 20$ . Následně jsou vyhodnocovány vzorky dle počtu SFU v jamkách se SARS-CoV-2 směsí peptidů po odečtení hodnoty SFU pro negativní kontrolu na základě tabulky v návodu od výrobce. Podle hodnoty SFU pro negativní kontrolu je stanoven CO pro pozitivitu vzorků v rozmezí od 8 do 18 SFU/200 000 – 300 000 PBMC.

nehodnotitelný), přičemž u kontrolních vzorků se výsledek shoduje v 60 % případů (3/5) a u patientských vzorků v 88 % případů (14/16) pro N i S antigen. Oba testy přitom vykázaly stejnou reaktivitu: Pro oba antigeny detekovaly 16 pozitivních vzorků ve skupině 17 pacientů a u 5 kontrolních osob potvrdily negativitu pro 4 vzorky u antigenu S a pro 3 vzorky u antigenu N/NMO.

### 3.7 Optimalizace

V předkládané metodice pro analýzu T-buněčné odpovědi pomocí testu ELISpot byla optimalizována vhodná pozitivní kontrola pro stimulaci PBMC, kterou se stala kontrolní směs peptidů s názvem CEF od firmy JPT. Kontrolní směs CEF je považována za zlatý standard při analýze funkčnosti antigeně specifických CD8+ lymfocytů T. CEF je složen z peptidů, které představují imunodominantní epitopy viru chřipky typu A, cytomegaloviru a viru Epstein-Baarové (tab. 3). Bylo popsáno, že existuje část jedinců, kteří na CEF nemusí odpovídat, např. jedinci, kteří v průběhu života nevyvinuli odpověď ani proti jednomu z přítomných imunodominantních epitopů zmíněných virů (Lehmann et al., 2021b).

Tab. 3 Směsi peptidů

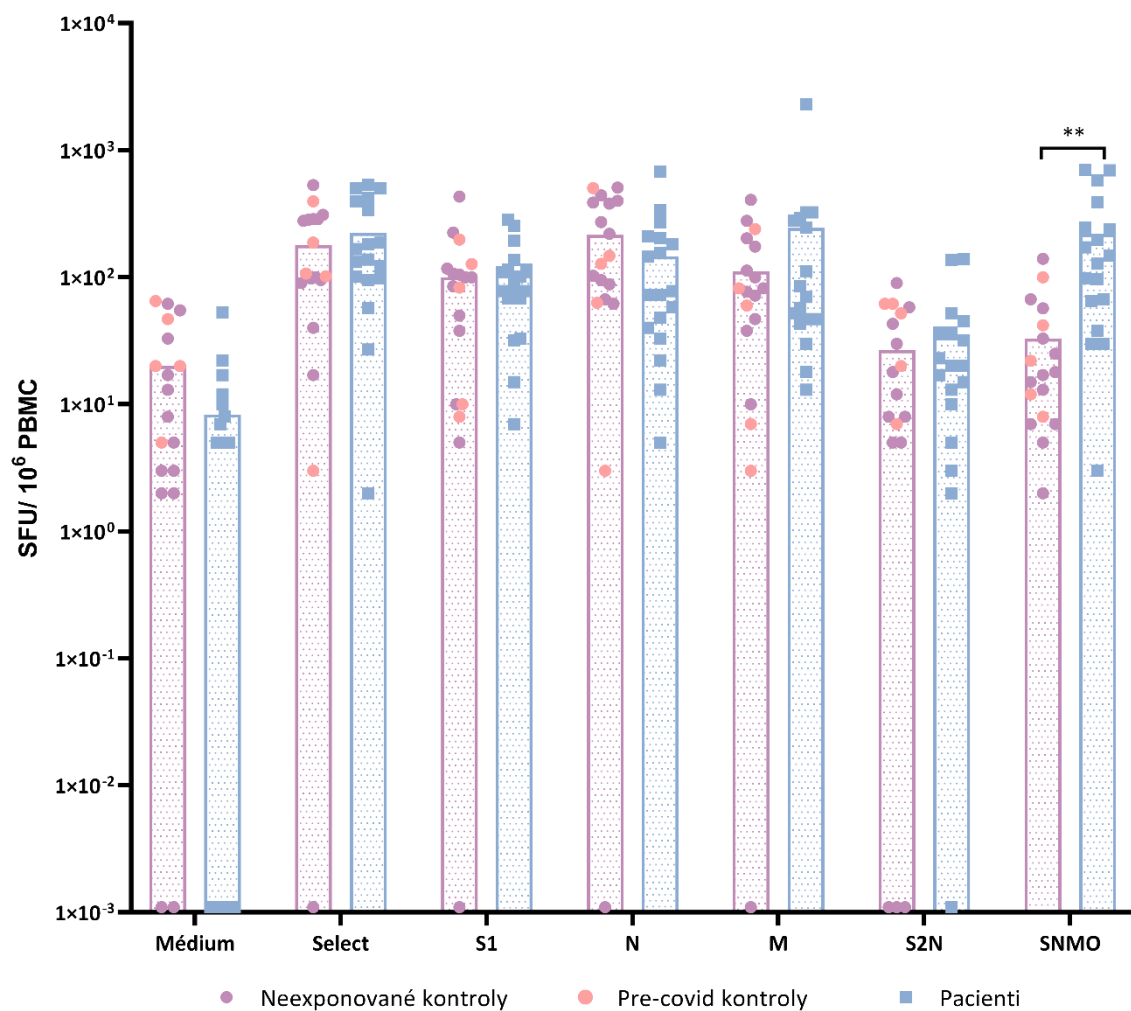
Směs peptidů (název)	Počet peptidů	Zdrojové proteiny	Výrobce
CEF	32	CMV, EBV, IAV	Miltenyi
M	53	M	Miltenyi
N	102	N	Miltenyi
S1	171	S	Miltenyi
S2N	32 (MHC-I) + 9 (MHC-II)	S, N	Mabtech
SNMO	47	S, N, M, ORF3a, ORF7a	Mabtech
Select	63 (MHC-I) + 25 (MHC-II)	S, N, M, E, nsp	Miltenyi
S	100	S	Mabtech
NMO	101	N, M, ORF1, nsp3, ORF3a, ORF7a, ORF8	Mabtech

V tabulce jsou uvedeny všechny směsi peptidů použité při vývoji testu ELISpot. CEF slouží jako pozitivní kontrola a obsahuje peptidy odvozené z imunodominantních epitopů cytomegaloviru (CMV), viru Epstein-Barrové (EBV) a viru chřipky typu A (IAV). SARS-CoV-2 směsi peptidů mají různé složení a mohou obsahovat peptidy odvozené z nukleoposidového proteinu (N), membránového proteinu (M), povrchových glykoproteinů (S, E), nestrukturních proteinů (nsp) a také doplňkových proteinů (ORF3a, ORF7a, ORF8).

Dále bylo optimalizováno množství buněk používaných v testu, stanovené na 200 000 PBMC na jamku. Délka inkubace buněk s peptidovou směsí byla stanovena dle doporučení výrobce soupravy Human IFN- $\gamma$  Single-Color ELISPOT (CTL) a předchozích zkušeností pracovníků laboratoře s obdobným testem na ~ 20 h v termostatu při 37 °C a 7 % CO<sub>2</sub>.

V průběhu optimalizace metodiky byly testovány směsi peptidů odvozené od antigenů SARS-CoV-2 a dodávané výrobcí Miltenyi Biotec a Mabtech (tab. 3). Dle v té době dostupné literatury byly vybrány směsi složené z peptidů vybraných na základě sekvencí imunodominantních epitopů (S2N a SNMO od firmy Mabtech a Select od firmy Miltenyi Biotec) a směsi složené z překrývajících se peptidů, které pokrývají celou sekvenci daného proteinu nebo jeho části (M, N a S1 od firmy Miltenyi Biotec). S těmito směsmi peptidů bylo analyzováno 16 pacientů po covidu-19 s různou závažností onemocnění a 16 kontrolních subjektů. Skupina kontrol sestávala z 11 vzorků séronegativních dárců krve (neexponované kontroly), u nichž byla prokázána nepřítomnost protilátek proti N proteinu ELISA testem (Elecsys® Anti-SARS-CoV-2; Roche) a z 5 vzorků od pacientů odebraných před pandemií covidu-19 (pre-covid kontroly). Výsledky ukázaly, že pouze s použitím peptidové směsi SNMO (Mabtech) byla reaktivita sér pacientů a kontrolních subjektů statisticky významně odlišná (obr. 6). Pro další analýzu byly nakonec vybrány nově dostupné směsi peptidů S a NMO od výrobce Mabtech, které navíc umožňují u vakcinovaných osob prokázat infekci SARS-CoV-2.

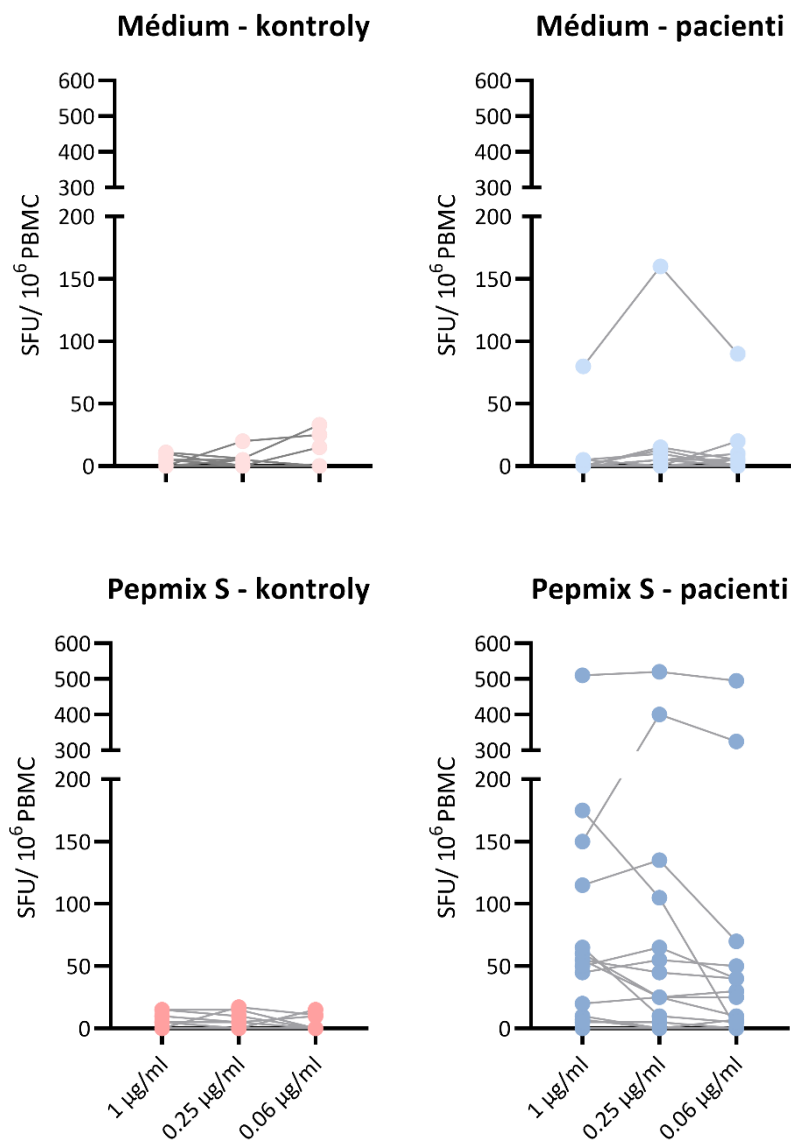
Pro zjištění afinity analyzovaných T buněk k dané směsi peptidů, která umožňuje odlišení jejich možné křížové reaktivity proti jiným běžně cirkulujícím koronavirům, bylo zavedeno sériové ředění směsí (Lehmann et al., 2021a). Analýza vzorků od 16 pacientů po covidu-19 a 8 séronegativních dárců krve ukázala, že při použití vybraných směsí peptidů S (obr. 7) a NMO (obr. 8) nedochází k poklesu počtu SFU (s výjimkou 1 vzorku), což svědčí o detekci reaktivity, která je specifická pro SARS-CoV-2.



Obr. 6 Porovnání reaktivity u směsi peptidů SARS-CoV-2

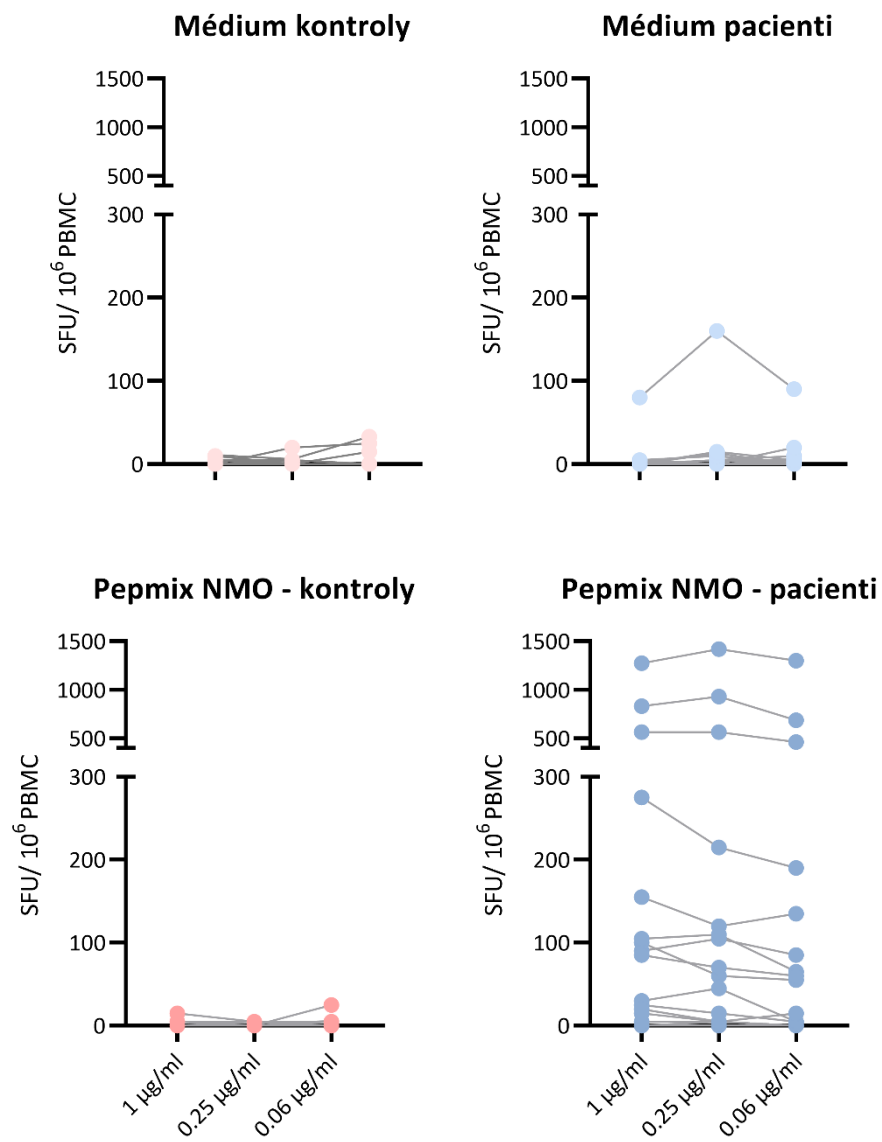
T-buněčná odpověď byla analyzována u 16 pacientů po covidu-19, 11 séronegativních dárců krve (neexponované kontroly) a 5 jedinců odebraných před pandemií covidu-19 (pre-covid kontroly). Skupina pacientů (n=16) a neexponovaných kontrol (n=16) byla statisticky porovnána t-testem (\*\* P ≤ 0.01). Vzorky, kde byl počet SFU/10<sup>6</sup> PBMC roven 0, jsou z důvodu logaritmické osy y stanoveny na hodnotu 0,0011.





Obr 7. Seriové ředění směsi peptidů S

T-buněčná odpověď byla analyzována u 16 pacientů po covidu-19, 8 séronegativních dárců krve (kontroly).



Obr 8. Seriové ředění směsi peptidů NMO

T-buněčná odpověď byla analyzována u 16 pacientů po covidu-19, 8 séronegativních dárců krve (kontroly).

### **3.8 Operativní řízení jakosti**

Operativní řízení jakosti je řešeno zavedením negativní kontroly (PBMC inkubované pouze v médiu bez přítomnosti směsi peptidů) a pozitivní kontroly (stimulace PBMC směsí peptidů CEF).

## **4 Srovnání novosti postupů**

Vyvinutá metoda ELISpot pro detekci buněčné imunitní odpovědi zahrnuje použití komerční soupravy, která umožňuje analyzovat frekvenci antigenně specifických lymfocytů produkujících cytokin IFN- $\gamma$  po specifické stimulaci. Námí vyvinutý postup umožňuje využití této soupravy na stanovení imunity proti SARS-CoV-2. Je přitom možné odlišit, zda tato imunita pochází pouze z očkování nebo zda došlo k infekci SARS-CoV-2. Metoda ELISpot je nejcitlivější metodou pro detekci specifických imunitních buněk a při standardním uspořádání testu dosahuje detekční limit 0,00025 % (Lehmann a Zhang, 2012). Zavedenou metodiku lze také díky použití inovativních komerčně dostupných souprav transformovat do podoby tzv. FluoroSpot metody, při které jsou pro detekci produkovaného cytokinu používány fluorescenčně značené protilátky, což případně umožňuje detekci i většího spektra sekretovaných molekul. Pro vyhodnocení metody FluoroSpot je ale potřebný specifický přístroj, který umožňuje detekovat fluorescenční signál.

## **5 Popis uplatnění certifikované metodiky**

Pomocí vyvinuté metody ELISpot lze analyzovat buněčnou imunitu zprostředkovanou lymfocyty T. Tato metoda může být uplatněna při analýze imunitní odpovědi u jedinců po prodělaném covidu-19 a očkování proti SARS-CoV-2 a může se tak uplatnit při stanovení imunitní připravenosti pracovníků záchranných složek. Analýza imunitní odpovědi většího počtu jedinců a porovnání možných rizikových faktorů a průběhu onemocnění pak může přispět při boji s pandemií covidu-19. Metodu lze upravit pro detekci imunitní odpovědi i proti jiným virům, které se vyskytují v populaci, eventuálně i pro případy dalších pandemií novými viry.

## 6 Použitá literatura

- Acuti Martellucci, C., Flacco, M.E., Cappadona, R., Bravi, F., Mantovani, L., Manzoli, L., 2020. SARS-CoV-2 pandemic: An overview. *Adv Biol Regul* 77, 100736. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2020.100736>
- Corman, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L., Mulders, D.G., Haagmans, B.L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M.P., Drosten, C., 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 25, 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Dan, J.M., Mateus, J., Kato, Y., Hastie, K.M., Yu, E.D., Faliti, C.E., Grifoni, A., Ramirez, S.I., Haupt, S., Frazier, A., Nakao, C., Rayaprolu, V., Rawlings, S.A., Peters, B., Krammer, F., Simon, V., Saphire, E.O., Smith, D.M., Weiskopf, D., Sette, A., Crotty, S., 2021. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 371, eabf4063. <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
- Janetzki, S., Cox, J.H., Oden, N., Ferrari, G., 2005. Standardization and validation issues of the ELISPOT assay. *Methods Mol Biol* 302, 51–86. <https://doi.org/10.1385/1-59259-903-6:051>
- Jung, J.H., Rha, M.-S., Sa, M., Choi, H.K., Jeon, J.H., Seok, H., Park, D.W., Park, S.-H., Jeong, H.W., Choi, W.S., Shin, E.-C., 2021. SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells. *Nat Commun* 12, 4043. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24377-1>
- Kalyuzhny, A.E., 2005. Chemistry and biology of the ELISPOT assay. *Methods Mol Biol* 302, 15–31. <https://doi.org/10.1385/1-59259-903-6:015>
- Lehmann, A.A., Kirchenbaum, G.A., Zhang, T., Reche, P.A., Lehmann, P.V., 2021a. Deconvoluting the T Cell Response to SARS-CoV-2: Specificity Versus Chance and Cognate Cross-Reactivity. *Front Immunol* 12, 635942. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635942>
- Lehmann, A.A., Reche, P.A., Zhang, T., Suwansaard, M., Lehmann, P.V., 2021b. CER1, CEFX, and CPI: Largely Improved Positive Controls for Testing Antigen-Specific T Cell Function in PBMC Compared to CEF. *Cells* 10, 248. <https://doi.org/10.3390/cells10020248>
- Lehmann, P.V., Zhang, W., 2012. Unique strengths of ELISPOT for T cell diagnostics. *Methods Mol Biol* 792, 3–23. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-325-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-325-7_1)
- Lu, Z., Laing, E.D., Pena DaMata, J., Pohida, K., Tso, M.S., Samuels, E.C., Epsi, N.J., Dorjbal, B., Lake, C., Richard, S.A., Maves, R.C., Lindholm, D.A., Rozman, J.S., English, C., Huprikar, N., Mende, K., Colombo, R.E., Colombo, C.J., Broder, C.C., Ganesan, A., Lanteri, C.A., Agan, B.K., Tribble, D., Simons, M.P., Dalgard, C.L., Blair, P.W., Chenoweth, J., Pollett, S.D., Snow, A.L., Burgess, T.H., Malloy, A.M.W., EPICC COVID-19 Cohort Study Group, 2021. Durability of SARS-CoV-2-Specific T-Cell Responses at 12 Months Postinfection. *J Infect Dis* 224, 2010–2019. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab543>
- Sedgwick, J.D., Holt, P.G., 1983. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 57, 301–309. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90091-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90091-1)
- Sette, A., Crotty, S., 2021. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* 184, 861–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>
- Sherina, N., Piralla, A., Du, L., Wan, H., Kumagai-Braesch, M., Andréll, J., Braesch-Andersen, S., Cassaniti, I., Percivalle, E., Sarasini, A., Bergami, F., Di Martino, R., Colaneri, M., Vecchia, M., Sambo, M., Zuccaro, V., Bruno, R., Sachs, M., Oggionni, T., Meloni, F., Abolhassani, H., Bertoglio, F., Schubert, M., Byrne-Steele, M., Han, J., Hust, M., Xue, Y., Hammarström, L., Baldanti, F., Marcotte, H., Pan-Hammarström, Q., 2021. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6-8 months after the infection. *Med (N Y)* 2, 281-295.e4. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.02.001>
- Tanguay, S., Killion, J.J., 1994. Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res* 13, 259–263.

V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., Thiel, V., 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19, 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>

WHO, 2022. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [WWW Document]. URL <https://covid19.who.int> (accessed 6.6.22).