DOI: 10.24287/j.1118

Особенности биобанкирования CD45RA-деплетированных продуктов: оценка функционального состояния вирус-специфических Т-клеток памяти при длительном криохранении

И.Н. Казьмина, А.К. Музалева, Я.О. Музалевский, М.В. Ефименко, Р.В. Николаев, П.А. Левин, Е.Ю. Осипова, П.Е. Трахтман

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

© 2026 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 28.04.2026
Принята к печати 05.05.2026

EDN: GBFMLM

Введение. Определение количества и функциональных свойств вирус-специфических Т-лимфоцитов (ВСТ) в донорских клеточных продуктах является важным фактором прогнозирования иммунореконституции и планирования противовирусной терапии у реципиентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.
Цель исследования – оценить количество и функциональные свойства ВСТ в CD45RA-деплетированных продуктах донорских лимфоцитов после длительного срока криоконсервации.
Материалы и методы. В исследование вошли образцы мононуклеарных клеток периферической крови 16 доноров и образцы их CD45RA-деплетированных фракций: свежие продукты, размороженные после 2–4 нед, 5 и 7 лет криохранения. Количество ВСТ, специфичных к цитомегаловирусу (CMV), вирусу Эпштейна–Барр (EBV) и аденовирусу (ADV), определяли методом ELISpot из расчета на 300 000 мононуклеарных клеток в образце. Перед исследованием CD45RA-деплетированных продуктов проводили клеточный рестинг – клетки культивировали в течение 18 ч в среде CTL-Test Medium.
Результаты. Для CD45RA-деплетированных продуктов как до криоконсервации, так и после размораживания без этапа рестинга характерна крайне низкая выявляемость ВСТ, несмотря на высокую частоту обнаружения этих клеток в периферической крови тех же доноров. После проведения рестинга выявляемость ВСТ восстанавливалась как в свежих, так и в размороженных CD45RA-деплетированных образцах. Криохранение в течение 5 лет сопровождалось выраженным снижением выявляемости CMV-, EBV- и ADV-специфичных клеток. При увеличении срока криохранения до 7 лет наблюдалось дальнейшее снижение выявляемости ADV- и EBV-специфичных лимфоцитов, тогда как уровень CMV-специфичных лимфоцитов не сопровождался столь выраженными изменениями.
Заключение. Проведение ELISpot-анализа перед клиническим применением CD45RA-деплетированных образцов после криоконсервации позволяет оценить функциональную активность патоген-специфических клеток. Для достоверного определения содержания ВСТ в CD45RA-деплетированных продуктах необходимо культивирование клеток в течение 18 ч в бессывороточной среде перед проведением исследования методом ELISpot.
Ключевые слова: *ELISpot, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, CD45RA-деплеция, криоконсервация*

Для цитирования: Казьмина И.Н., Музалева А.К., Музалевский Я.О., Ефименко М.В., Николаев Р.В., Левин П.А. и др. Особенности биобанкирования CD45RA-деплетированных продуктов: оценка функционального состояния вирус-специфических Т-клеток памяти при длительном криохранении. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2026;25(2):83–8. DOI: 10.24287/j.1118

Контактная информация:
Казьмина Ирина Николаевна,
врач клинической лабораторной диагностики отделения трансфузиологии, заготовки и процессинга гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России;
младший научный сотрудник ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: rinakazmina@gmail.com

Biobanking of CD45RA-depleted products: assessment of the functional status of virus-specific memory T cells during long-term cryopreservation

I.N. Kazmina, A.K. Muzaleva, Ya.O. Muzalevskiy, M.V. Efimenko, R.V. Nikolaev, P.A. Levin, E.Yu. Osipova, P.E. Trakhtman

The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

© 2026 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 28.04.2026
Accepted 05.05.2026

Introduction. The quantification and functional assessment of virus-specific T cells (VSTs) in donor cell products is an important factor for predicting immune reconstitution and planning antiviral treatment in recipients after hematopoietic stem cell transplantation.
Aim: to assess the quantity and functionality of VSTs in CD45RA-depleted donor lymphocyte products after long-term cryopreservation.
Materials and methods. This study included peripheral blood mononuclear cell samples obtained from 16 donors and samples of their CD45RA-depleted fractions: fresh and thawed after 2–4 weeks, 5 and 7 years of cryopreservation. The number of VSTs specific to cytomegalovirus (CMV), Epstein–Barr virus (EBV) and adenovirus (ADV) was determined by the ELISpot assay (300 000 mononuclear cells per sample). Before analysis of the CD45RA-depleted products, the cells were rested for 18 hours in CTL Test Medium.
Results. CD45RA-depleted products, both before cryopreservation and after thawing without subsequent cell resting, exhibited very low detectability of VSTs, despite the high frequency of such cells in the peripheral blood of the same donors. After resting,

Correspondence:
Irina N. Kazmina,
MD in Clinical Laboratory Medicine at the Department of Transfusiology, Procurement and Processing of Hematopoietic Stem Cells of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation;
a research assistant at the Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Science
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: rinakazmina@gmail.com

the detectability of VSTs recovered both in fresh and thawed CD45RA-depleted samples. Cryopreservation for 5 years was associated with a marked reduction in the detectability of CMV-, EBV-, and ADV-specific cells. When the cryopreservation period extended to 7 years, a further reduction in the detectability of ADV- and EBV-specific T cells was observed; however, the level of CMV-specific T cells did not show such significant changes.
Conclusion. The ELISpot assay performed on cryopreserved CD45RA-depleted samples prior to clinical use helps to assess the functional activity of pathogen-specific cells. For reliable quantification of VSTs in CD45RA-depleted products, cells should be cultured for 18 hours in serum-free medium before the ELISpot assay.
Keywords: *ELISpot, hematopoietic stem cells transplantation, CD45RA-depletion, cryopreservation*

For citation: Kazmina I.N., Muzaleva A.K., Muzalevskiy Ya.O., Efimenko M.V., Nikolaev R.V., Levin P.A. et al. Biobanking of CD45RA-depleted products: assessment of the functional status of virus-specific memory T cells during long-term cryopreservation. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2026;25(2):83–8 . DOI: 10.24287/j.1118

Инфекции, вызванные цитомегаловирусом (CMV), вирусом Эпштейна–Барр (EBV) и аденовирусом (ADV), представляют собой одни из наиболее частых осложнений после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Несмотря на широкое применение противовирусных препаратов, их эффективность ограничена из-за лекарственной устойчивости, токсичности и задержки восстановления иммунитета. Адоптивный перенос вирус-специфических Т-лимфоцитов (ВСТ) зарекомендовал себя как эффективный метод иммунной терапии, способный обеспечить восстановление патоген-специфического иммунитета без усиления реакции «трансплантат против хозяина» [1–3]. Использование CD45RA-деплетированных Т-клеточных продуктов позволяет избирательно вводить клетки памяти, снижая риск аллореактивности. Эффективность данного подхода доказана во множестве исследований. В НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева этот тип терапии успешно применяется более 10 лет [4, 5]. По протоколам терапии требуется многократное введение клеточного препарата с интервалами в несколько недель, что делает необходимым создание запаса деплетированного материала, пригодного для хранения и последующего использования. Кроме того, длительное хранение биоматериала позволяет формировать банк клеток, потенциально совместимых с другими реципиентами, и использовать его для последующей экспансии ВСТ *in vitro* [6]. Однако ключевым фактором остается оценка частоты и функциональной активности ВСТ в донорских продуктах после длительного криоконсервирования.

Целью данного исследования является оптимизация методики выявления и определения функциональной активности Т-лимфоцитов, специфичных к CMV, EBV и ADV в CD45RA-деплетированных продуктах донорских клеток до и после длительной (до 7 лет) криоконсервации, а также оценка целесообразности длительного криобанкирования данного типа клеточных продуктов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования служили мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови и образцы CD45RA-деплетированных фракций 16 доноров, полученные методом иммуномагнитной сепарации продуктов афереза на приборе CliniMACS (Miltenyi Biotec). Исследование ВСТ проводили для каждого донора: 1) в МНК периферической крови до получения CD45RA-деплетированных фракций; 2) в продуктах CD45RA-деплеции до криоконсервирования; 3) в продуктах CD45RA-деплеции после криохранения в течение 2–4 нед, более 5 и более 7 лет.

Все доноры клеточного материала проходили стандартное клиническое обследование и подписывали информированное согласие, распространяющееся на использование образцов в данном исследовании.

Криоконсервацию проводили с использованием программируемого замораживателя IceCube (Sy-lab®) со скоростью охлаждения 1°C/мин с компенсацией фазового перехода. В качестве криопротектора применяли раствор 7,5% диметилсульфоксида (ДМСО). Выбор концентрации ДМСО обусловлен необходимостью минимизации инфузионной токсичности при сохранении жизнеспособности и функциональной активности ВСТ после размораживания, которое осуществляли на водяной бане при 37°C. Жизнеспособность клеток оценивали методом проточной цитометрии на приборе NAVIOS (Beckman Coulter) с использованием витального красителя 7-AAD.

Культивирование клеток перед выявлением ВСТ проводили в планшетах Corning (6-луночных) при концентрации 2×10^6 клеток/мл, по 3 мл на лунку, в бессывороточной среде CTL-Test Medium при 37°C в течение 18 ч.

Количество ВСТ определяли методом ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot assay) после инкубации с пептидными пулами CMV pp65, EBV consensus и AdV5 hexon (все реагенты – Miltenyi Biotec) в конечной концентрации 0,15 нмоль/мл. Методика ELISpot выполнялась согласно инструкции производителя к набору Human IFN-γ Single-Color ELISPOT (CTL ImmunoSpot): 300 000 исследуемых клеток в 200 мкл бессывороточной среды CTL-Test Medium на лунку 96-луночного планшета инкубировали в течение 20–24 ч. Анализ проводили на приборе S6 Flex M2. Результаты представлены как количество пятен (spots) после вычета значений в лунках с негативным контролем (спонтанной активацией).

Позитивным контролем служили лунки с клетками, стимулированными поликлональным активатором фитогемагглютинином в конечной концентрации 10 мкг/мл. Результат расценивали валидным при значениях спонтанной активации <10 пятен и положительной активации >50 пятен. Пример результатов исследования методом ELISpot для одного из доноров представлен на *рисунке 1*.

Статистический анализ выполнен в программе Microsoft Excel 2016 и программной среде R версии 4.5.1. Количественные показатели описывались медианой и первым и третьим квартилями. Различия между количеством патоген-специфичных Т-лимфоцитов в 2 временных точках тестировались при помощи парного критерия Манна–Уитни. Где необходимо, применялась поправка Бонферрони–Холма для множественных сравнений. Уровень значимости принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В МНК периферической крови ВСТ выявлялись с медианами 231,5 для CMV-, 93,5 для EBV- и 36,5 для ADV-специфичных Т-лимфоцитов. Данные представлены на *рисунке 2*.

Использование 7,5% ДМСО продемонстрировало эффективность для криоконсервации продуктов CD45RA-деплеции, обеспечивая сохранение их жизнеспособности и функциональной активности патоген-специфичных Т-лимфоцитов после размораживания, что соответствует опубликованным данным по оптимизации условий криобанкирования клеточных продуктов [7, 8]. Во всех вошедших в исследование продуктах CD45RA-деплеции жизнеспособность клеток после криоконсервации была более 80%.

Исследование содержания ВСТ в CD45RA-деплетированных образцах без предварительного этапа

Рисунок 2
Выявляемость ВСТ в МНК периферической крови доноров

Figure 2
Detection of VSTs in donor peripheral blood mononuclear cells

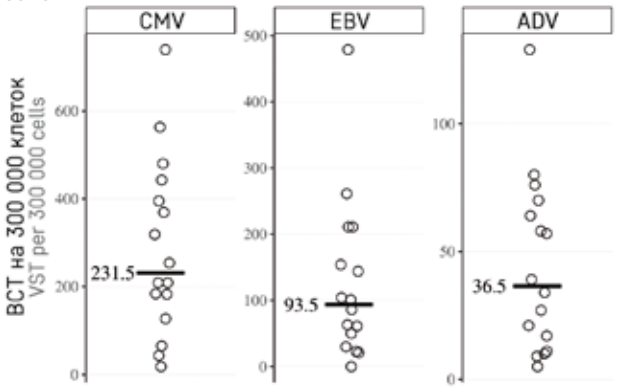
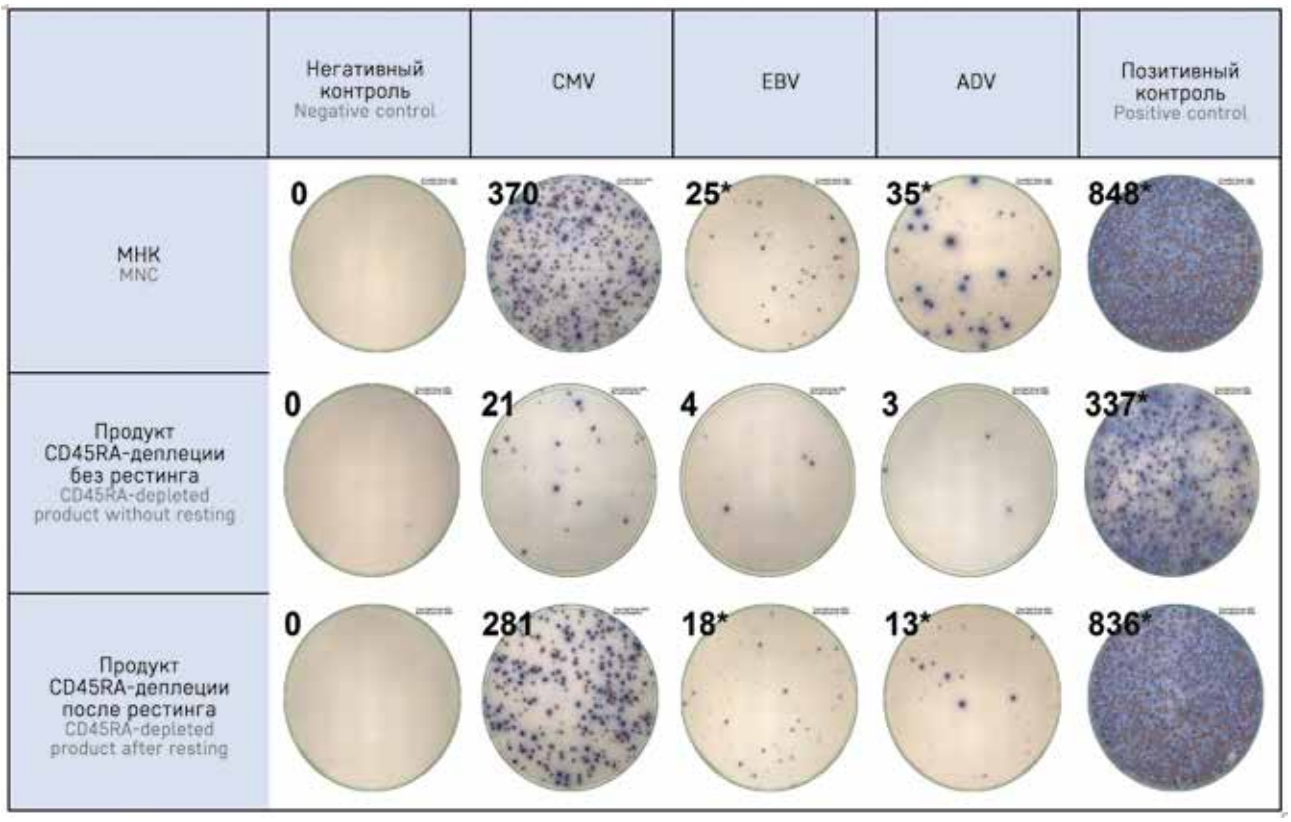


Рисунок 1
Пример выявления ВСТ в МНК периферической крови и CD45RA-деплетированном продукте методом ELISpot

Figure 1
An example of the detection of virus-specific T cells (VSTs) in peripheral blood mononuclear cells (MNC) and in a CD45RA-depleted product by an ELISpot assay
Here and in *figures 2–4*: CMV – cytomegalovirus; EBV – Epstein–Barr virus; ADV – adenovirus



клеточного рестинга показало свою неэффективность. В продуктах CD45RA-деплеции частота выявления ВСТ была низкой как в свежих, так и в размороженных после 2–4 нед криоконсервации образцах – медианы составили 4,5; 2,0 и 0,5 для свежих образцов и 10,0; 1,5 и 2,5 для размороженных образцов для CMV-, EBV- и ADV-специфичных лимфоцитов соответственно, несмотря на высокие показатели выявляемости ВСТ в крови тех же доноров.

Введение этапа клеточного рестинга перед проведением ELISpot-анализа CD45RA-деплетированных образцов восстанавливало выявляемость ВСТ. Медианы возрастали до 185,2; 90,0 и 27,2 для свежих и до 101,2; 55,5 и 16,0 для размороженных после 2–4 нед криохранения образцов для CMV-, EBV- и ADV-специфичных лимфоцитов соответственно. Результаты представлены на *рисунках 3, 4*.

Дальнейшие исследования содержания ВСТ в CD45RA-деплетированных продуктах проводили только после предварительной 18-часовой клеточной культивации.

После 5-летнего криохранения CD45RA-деплетированных образцов медианы содержания в них ВСТ достоверно снижались до 69, 32 и 5 для CMV-, EBV- и ADV-специфичных лимфоцитов соответственно. Увеличение срока криохранения до 7 лет не приводит к значимому снижению содержания наиболее многочисленных CMV-специфичных Т-лимфоцитов по сравнению с 5-летними образцами. Значимые отличия между выявляемостью ВСТ в группах 5- и 7- летнего хранения наблюдались для EBV- и ADV-специфичных Т-лимоцитов. Данные представлены на *рисунках 5–7*.

Рисунок 3
Выявляемость ВСТ в свежих CD45-деплетированных фракциях донорских лимфоцитов

Figure 3
Detection of VSTs in fresh CD45-depleted fractions of donor T cells

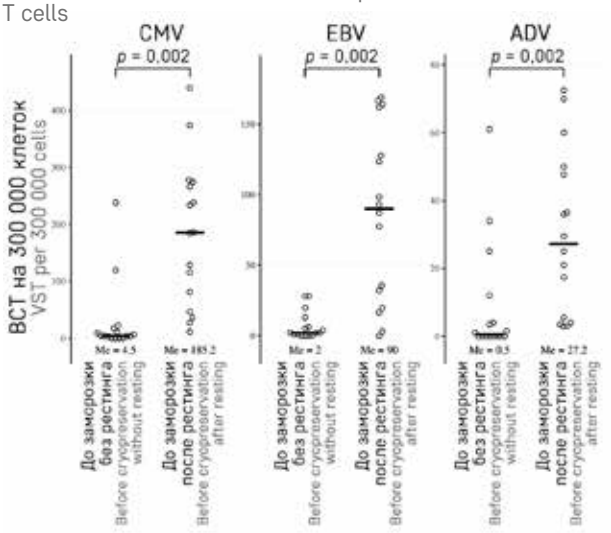
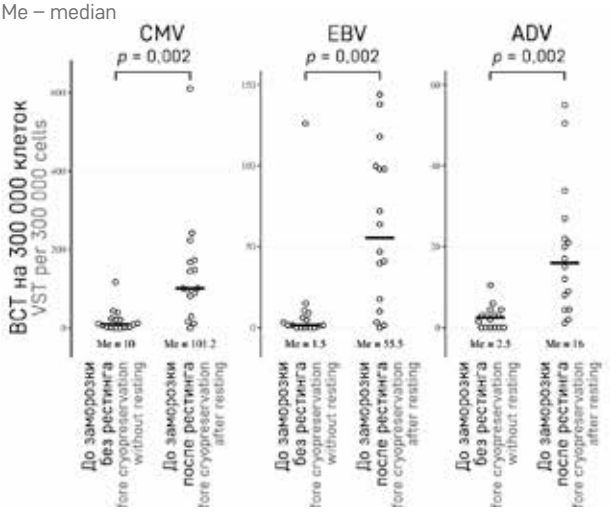


Рисунок 4
Выявляемость ВСТ в размороженных CD45-деплетированных фракциях донорских лимфоцитов
Me – медиана

Figure 4
Detection of VSTs in thawed CD45-depleted fractions of donor T cells
Me – median



ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования показали неэффективность тестирования содержания ВСТ в CD45RA-деплетированных образцах как в свежих, так и после криоконсервации, без этапа рестинга клеток. Влияние предварительной культивации клеток на результаты анализа ВСТ методом ELISpot в CD45RA-деплетированных образцах может быть связано с удалением из анализируемой клеточной популяции избыточного по сравнению с МНК периферической крови количества моноцитов в продуктах афереза, предназначенных для получения CD45RA-деплетированных фракций. Это предположение подтверждается тем, что для МНК рестинг не оказывает влияния на выявляемость ВСТ [9].

Для образцов CD45RA-деплетированных фракций после криоконсервации включение этапа клеточного рестинга в протокол исследования методом ELISpot способствует повышению выявляемости ВСТ, делая анализ более достоверным [10, 11]. Этот эффект может быть объяснен тем, что в течение 18-часовой культивации апоптотические клетки, содержащиеся в размороженных продуктах, погибают, оставляя более высокую частоту жизнеспособных, функциональных клеток для анализа [12–14]. Несмотря на снижение содержания ВСТ в CD45RA-деплетированных продуктах после длительной криоконсервации, ВСТ остаются детектируемыми спустя 5 и 7 лет криохранения, и при клиническом применении могут обеспечить восстановление патоген-специфического иммунитета у реципиента [15]. Полученные результаты подтверждают возможность использования криоконсервированных в течение длительного времени образцов как материала для дальнейшей экспансии ВСТ и клеточной терапии [16, 17]. Для оценки содержания ВСТ в различных

Рисунок 5
Выявление CMV-специфических Т-лимфоцитов в CD45RA-деплетированных продуктах на различных этапах хранения. Данные представлены для образцов, замороженных в течение 2–4 нед, 5 и 7 лет

Figure 5
Detection of CMV-specific T cells in CD45RA-depleted products at different stages of storage. Data are presented for samples cryopreserved for 2–4 weeks, 5 years and 7 years

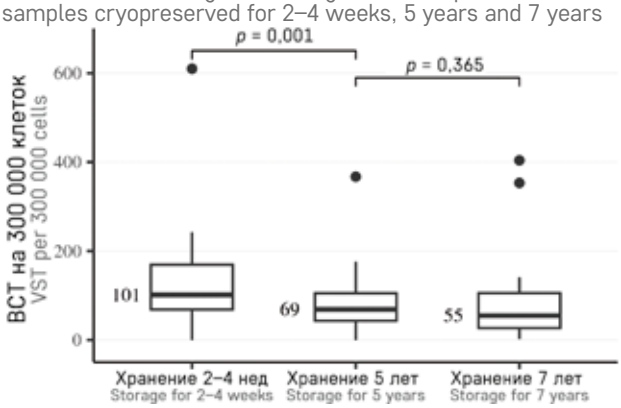


Рисунок 6
Выявление EBV-специфических Т-лимфоцитов в CD45RA-деплетированных продуктах на различных этапах хранения. Данные представлены для образцов, замороженных в течение 2–4 нед, 5 и 7 лет

Figure 6
Detection of EBV-specific T cells in CD45RA-depleted products at different stages of storage. Data are presented for samples cryopreserved for 2–4 weeks, 5 years and 7 years

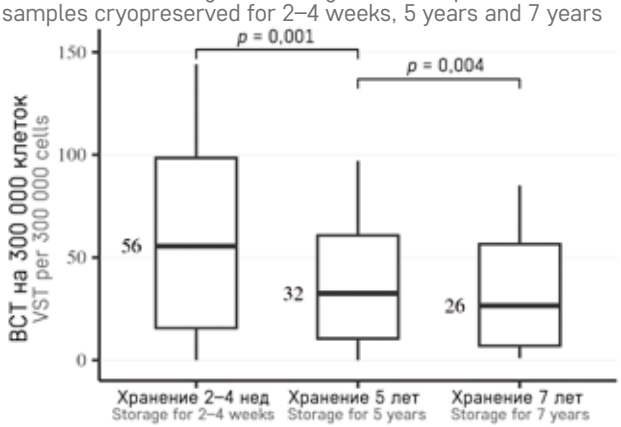
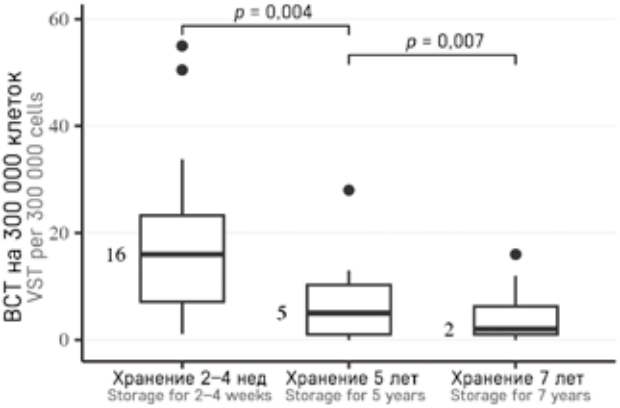


Рисунок 7
Выявление ADV-специфических Т-лимфоцитов в CD45RA-деплетированных продуктах на различных этапах хранения. Данные представлены для образцов, замороженных в течение 2–4 нед, 5 и 7 лет

Figure 7
Detection of ADV-specific T cells in CD45RA-depleted products at different stages of storage. Data are presented for samples cryopreserved for 2-4 weeks, 5 years and 7 years



типах клеточного материала методом ELISpot важны дифференцированный подход и стандартизация условий тестирования продуктов, предназначенных для клеточной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

CD45RA-деплетированные продукты давно применяются в клинической практике как источник Т-клеток памяти для восстановления противовирусного иммунитета у пациентов после ТГСК. В ряде случаев повторная инфузия таких продуктов требуется спустя длительное время после ТГСК, в этих случаях важно оценивать количество и функциональное состояние клеток памяти перед клиническим применением. Проведенное исследование демонстрирует эффективные лабораторные подходы для выявления патоген-специфических клеток методом ELISpot в CD45RA-деплетированных продуктах для клеточной терапии как до, так и после криоконсервации. Перед клиническим применением образцов после криоконсервации рекомендуется проводить ELISpot-анализ для оценки сохранности функциональных свойств, содержащихся в них ВСТ.

ВКЛАД АВТОРОВ
И.Н. Казьмина: процессинг клеток, подготовка образцов к криохранению, написание текста статьи;
А.К. Музалева, Я.О. Музалевский: процессинг клеток, подготовка образцов к криохранению;
М.В. Ефименко, Р.В. Николаев: постановка исследований вирус-специфических клеток, анализ результатов;
П.А. Левин: статистическая обработка данных;
Е.Ю. Осипова: написание текста статьи, анализ результатов, научное редактирование статьи, руководство исследованием;
П.Е. Трахтман: анализ результатов, научное редактирование статьи, руководство исследованием.

AUTHOR CONTRIBUTIONS
I.N. Kazmina: cell processing, sample preparation for cryopreservation, manuscript writing;
A.K. Muzaleva, Ya.O. Muzalevskiy: cell processing, sample preparation for cryopreservation;
M.V. Efimenko, R.V. Nikolaev: performance of virus-specific T cell assays, analysis of results;
P.A. Levin: statistical data analysis;
E.Yu. Osipova: manuscript writing, analysis of results, scientific revision of the manuscript, project supervision;
P.E. Trakhtman: analysis of results, scientific revision of the manuscript, project supervision.

ЭТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА
Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

ETHICS REVIEW
The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.
FUNDING
Not specified.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ
Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.
CONFLICT OF INTEREST
The authors confirm that there is no conflict of interest to declare.

ORCID
I.N. Kazmina: https://orcid.org/0009-0000-0448-504X
A.K. Muzaleva: https://orcid.org/0009-0000-3801-0931
Ya.O. Muzalevskiy: https://orcid.org/0000-0003-3513-8299
M.V. Efimenko: https://orcid.org/0000-0002-4075-3133
R.V. Nikolaev: https://orcid.org/0000-0001-7281-5354
P.A. Levin: https://orcid.org/0000-0002-2410-1223
E.Yu. Osipova: https://orcid.org/0000-0002-1873-3486
P.E. Trakhtman: https://orcid.org/0000-0002-0231-1617

Литература / References

1. Tapuchova I., Pytlik R., Simara P., Tesarova L., Koutna I. Cytomegalovirus and other herpesviruses after hematopoietic cell and solid organ transplantation: From antiviral drugs to virus-specific T cells. Transpl Immunol 2022;71:101539.
2. Moosmann A., Hammerschmidt W., Kolb H.J. Virus-specific T cells for therapy – approaches, problems, solutions. Eur J Cell Biol 2012;91(1):97–101.
3. Triplett B.M., Muller B., Kang G., Li Y., Cross S.J., Moen J. et al. Selective T-cell depletion targeting CD45RA reduces viremia and enhances early T-cell recovery compared with CD3-targeted T-cell depletion. Transpl Infect Dis 2018;20(1):1–17.
4. Dunaikina M., Zhekhovtsova Z.., Shelikhova L, Glushkova S., Nikolaev R., Blagov S. et al. Safety and efficacy of the low-dose memory (CD45RA-depleted) donor lymphocyte infusion in recipients of αβ T cell-depleted haploidentical grafts: results of a prospective randomized trial in high-risk childhood leukemia. Bone Marrow Transplant 2021;56(7):1614–24.
5. Maschan M., Blagov S., Shelikhova L., Shekhovtsova Z., Balashov D., Starichkova J. et al. Low-dose donor memory T-cell infusion after TCR alpha/beta depleted unrelated and haploidentical transplantation: results of a pilot trial. Bone Marrow Transplant 2018;53(3): 264–73.
6. Hont A.B., Powell A.B., Sohai D.K., Valdez I.K., Stanojevic M., Geiger A.E. et al. The generation and application of antigen-specific T cell therapies for cancer and viral-associated disease. Mol Ther 2022;30(6):2130–52.
7. Smagur A., Mitrus I., Giebel S., Sadus-Wojciechowska M., Najda J., Kruzel T. et al. Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. Vox Sang 2013;104(3):240–7.
8. Bennett B., Hanotaux J., Pasala A.R., Hasan T., Hassan D., Shor R. et al. Impact of lower concentrations of dimethyl sulfoxide on cryopreservation of autologous hematopoietic stem cells: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical studies. Cytotherapy 2024;26(5):482–9.
9. Ефименко М.В., Казьмина И.Н., Илюшина М.А., Хисматуллина Р.Д., Музалевский Я.О., Казаченок А.С. и др. Влияние G-CSF на определение CMV-специфических клеток в периферической крови доноров для ТГСК. Клеточная терапия и трансплантация 2026;14(2):274. [Efimenko M.V., Kazmina I.N., Ilyushina M.A., Khismatullina R.D., Muzalevskiy Ya.O., Kazachenok A.S. et al. The effect of G-CSF on the detection of CMV-specific cells in the peripheral blood of HSCT donors. Cellular Therapy and Transplantation 2026;14(2):274. (In Russ.)].
10. Santos R., Buying A., Sabri N., Yu J., Gringeri A., Bender J. et al. Improvement of IFNg ELISPOT performance following overnight resting of frozen PBMC samples confirmed through rigorous statistical analysis. Cells 2014;4(1):1–18.
11. Kuerten S., Batoulis H., Recks M.S., Karacsony E., Zhang W., Subbramanian R.A. et al. Resting of cryopreserved PBMC does not generally benefit the performance of antigen-specific T cell ELISPOT assays. Cells 2012;1:409–27.
12. Malyguine A., Strobl S.L., Shafer-Weaver K.A., Ulderich T., Troke A., Baseler M. et al. A modified human ELISPOT assay to detect specific responses to primary tumor cell targets. J Transl Med 2004;2(1):1–11.
13. Janetzki S., Panageas K.S., Ben-Porat L., Boyer J., Britten C.M., Clay T.M. et al. Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). Cancer Immunol Immunother 2008;57(3):303–15.
14. Janetzki S., Cox J.H., Oden N., Ferrari G. Standardization and validation issues of the ELISPOT assay. Methods Mol Biol 2005;302:51–86.
15. Espada E., Cheng M.P., Kim H.T., Woolley A.E., Avigan J.I., Forcade E. et al. BK virus-specific T-cell immune reconstitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Blood Adv 2020;4(9):1881–93.
16. Ono T., Fujita Y., Matano T., Takahashi S., Morio T., Kawana-Tachikawa A. Characterization of *in vitro* expanded virus-specific T cells for adoptive immunotherapy against virus infection. Jpn J Infect Dis 2018;71(2):122–8.
17. Withers B., Clancy L., Burgess J., Simms R.., Brown R, Micklethwaite K. et al. Establishment and operation of a third-party virus-specific T cell bank within an allogeneic stem cell transplant program. Biol Blood Marrow Transplant 2018;24(12):2433–42.