



**T-SPOT<sup>®</sup> COVID**



 **Oxford**  
**Immunotec**

## PŘÍBALOVÁ INFORMACE

Pro účely diagnostiky *in vitro*

Tato příbalová informace pokrývá použití:

*COV.435/300, COV.435/200*

## Obsah

Zamýšlené použití .....	3
Souhrn a princip .....	3
Činidla a uchovávání .....	5
Uchovávání a stabilita .....	5
Upozornění a bezpečnostní pokyny .....	6
Odběr vzorků a manipulace s nimi .....	7
Návod k použití .....	8
Omezení .....	13
Funkční charakteristiky.....	14
Očekávané hodnoty .....	17
Řešení potíží .....	18
Zkratky a vysvětlivky značek .....	19
Literatura .....	19
Kontaktní údaje.....	21

## 1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Test T-SPOT.COVID je standardizovaná technika na bázi ELISPOT (Enzyme Linked ImmunoSpot) určená ke kvalitativní detekci buňkami (T-lymfocyty) zprostředkované imunitní odpovědi na SARS-CoV-2 v lidské plné krvi (s heparinem sodným či lithným). Test T-SPOT.COVID je určen k použití jako pomůcka při identifikaci osob s adaptivní imunitní odpovědí na SARS-CoV-2, konkrétně odpovědí T-lymfocytů. Tento test se může používat spolu se sérologickými testy k podpoře klinického vyhodnocení jednotlivců, např. těch, kteří vykazují podezření na COVID-19, avšak mají negativní PCR test na SARS-CoV-2, a je doplňkem k sérologii.

Výsledky slouží k detekci buňkami (T-lymfocyty) zprostředkované imunitní odpovědi na SARS-CoV-2. Odpověď T-lymfocytů na SARS-CoV-2 je obecně detekovatelná v krvi několik dní po prvotní infekci, a doba trvání detekovatelné odpovědi po infekci v současné době není dobře charakterizována.

Reaktivní výsledky testu T-SPOT.COVID se mohou objevit v důsledku infekce jinými podobnými viry či předchozího očkování proti viru SARS-CoV-2.

## 2. SOUHRN A PRINCIP

SARS-CoV-2 je kmen koronaviru objevený v čínské provincii Wu-Chan v roce 2019. Virus se během prvních několika měsíců roku 2020 rychle rozšířil po celém světě, což vedlo k tomu, že WHO dne 11. března 2020 vyhlásila pandemii<sup>1</sup>. Bylo rychle vyvinuto množství testů na molekulární bázi, které jsou nyní široce dostupné na celém světě<sup>2</sup>. Tyto testy se používaly a nadále se široce používají k potvrzení aktuální infekce SARS-CoV-2. U těchto testů se zpočátku uvádělo, že jsou vysoce citlivé a specifické, avšak systematická vyhodnocení studií z reálné praxe napovídají, že přiměřený odhad citlivosti molekulárních testů činí cca 70 %<sup>3,4</sup>. Zhao *et al.* uvedl, že ze 173 pacientů, kteří byli hospitalizováni s akutními respiračními příznaky a charakteristickými projevy onemocnění COVID-19 na CT vyšetření, mělo pouhých 67 % pozitivní výsledky testu RT-PCR ze vzorku z dýchacích cest během 1. až 7. dne hospitalizace<sup>5</sup>. Tato zjištění napovídají, že pokud se diagnostika spoléhá výhradně na molekulární testování, jsou falešně negativní výsledky u akutního onemocnění COVID-19 časté. Kromě toho molekulární testy nejsou schopny identifikovat jednotlivce, kteří sice byli nakaženi, ale od té doby se již viru zbavili<sup>6</sup>. Bylo vyvinuto množství sérologických testů k detekci protilátek v krvi či krevních produktech osob, které byly dříve infikovány virem SARS-CoV-2. Tyto testy poskytují cenné informace o prevalenci expozice viru v celkové populaci<sup>2,7</sup>, ale lze je také použít jako doplněk k molekulárním testům při stanovování klinické diagnózy při akutním onemocnění COVID-19<sup>8</sup>.

Studie ukázaly, že adaptivní imunitní odpověď se obvykle vytváří v průběhu 2 týdnů od infekce SARS-CoV-2, nicméně mnohé studie také ukázaly, že odpověď protilátek nemusí být vždy přítomna, nebo může být opožděna<sup>9,10</sup>. Současná literatura ukazuje, že některé osoby, které byly pozitivně testovány na infekci SARS-CoV-2 pomocí PCR, nemusí vytvářet detekovatelnou odpověď protilátek<sup>9</sup>. Nízké hladiny protilátek specifických pro SARS-CoV-2 byly často pozorovány u osob, které trpěly mírným či asymptomatickým průběhem onemocnění COVID-19<sup>11,12</sup>. Existuje také důkaz napovídající, že u některých osob protilátky po infekci významně klesnou a to dokonce ještě rychleji, než bylo pozorováno u infekce MERS a SARS-CoV-1<sup>13,14</sup>.

V kontrastu s tím několik publikací ukázalo, že odpovědi T-lymfocytů na lidské koronaviry, včetně SARS-CoV-1 a SARS-CoV-2 mohou být silné a dlouhodobé<sup>15</sup>, přičemž některé osoby, infikované virem SARS-CoV-1 před 17 lety stále vykazují T-lymfocytární odpověď<sup>16</sup>. Na základě několika studií se ukázalo, že imunitní odpověď T-lymfocytů specifických pro SARS-CoV-2 je zachována v době 6–9 měsíců po primární infekci, což ukazuje, že odpovědi T-lymfocytů mohou vydržet déle, než přechodné odpovědi protilátek na infekci SARS-CoV-2<sup>15,17</sup>. Tato zjištění, spolu se studiemi, které prokázaly zásadní úlohu T-lymfocytů v clearance viru a zotavení ze SARS-CoV-2<sup>18</sup>, napovídají, že buněčně zprostředkovaná imunita může být důležitým aspektem imunitní odpovědi na infekci SARS-CoV-2<sup>19</sup>. Kromě toho, zatímco dynamika odpovědi T-lymfocytů specifických na SARS-CoV-2 nebyla dosud plně osvětlena, důkazy nasvědčují tomu, že většina osob infikovaných virem SARS-CoV-2 vytváří funkční, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) produkující T-lymfocyty proti SARS-CoV-2, které lze detekovat v periferní krvi již 2–4 dny od nástupu příznaků<sup>19</sup>. Tan *et al.* analyzovali kinetiku odpovědi T-lymfocytů specifických pro SARS-CoV-2 během akutní fáze infekce s pozitivním testem RT-PCR, a zjistili, že specifické T-lymfocyty byly poprvé detekovány přibližně 5–7 dní po nástupu příznaků s progresivně se zvyšující četností až přibližně do 15. dne<sup>18</sup>. Pozorovali také pozitivní korelaci mezi časnou detekcí T-lymfocytů specifických pro SARS-CoV-2 a časnou kontrolou infekce, vedoucí k mírnějšímu průběhu onemocnění a rychlé virové clearance. Podobně Weiskopf *et al.* prokázali, že CD4 a CD8 T-lymfocyty specifické pro SARS-CoV-2 lze detekovat v krvi u pacientů s těžkým průběhem onemocnění COVID-19 v době prvních dvou týdnů po nástupu příznaků<sup>20</sup>. To ukazuje, že ačkoli bylo hlášeno, že těžký průběh SARS-CoV-2 vede k lymfopenii<sup>21</sup>, T-lymfocyty specifické pro SARS-CoV-2 jsou nadále vytvářeny během časné fáze odpovědi na infekci. Kromě toho bylo při nedávné studii prováděné doktorkou Rydzynski Moderbacher *et al.* pozorováno, že CD4 T-lymfocyty specifické pro SARS-CoV-2 mohou být detekovány již 4 dny po nástupu příznaků<sup>22</sup>. Tato studie, v souladu se závěry autora Tan *et al.*, také ukázala, že časné objevení se CD4 a CD8 T-lymfocytů specifických pro SARS-CoV-2 bylo spojováno s lepšími výsledky průběhu onemocnění. Tato zjištění společně nejen že zdůrazňují důležitost T-lymfocytů při organizaci imunitní odpovědi proti SARS-CoV-2 v akutní fázi infekce, ale naznačují také, že detekce T-lymfocytů během akutní fáze infekce SARS-CoV-2

by mohla poskytnout podrobnější informace o imunitní odpovědi jednotlivců.

Prospektivní kohortová studie prováděná anglickou státní zdravotnickou agenturou Public Health England během raných fází pandemie COVID-19 znovu zdůraznila důležitost monitorování T-lymfocytů při infekci SARS-CoV-2. V této studii bylo testováno 2 826 osob identifikovaných jako klíčoví pracovníci při zařazení na anti-spike IgG (EuroImm AG) a T-lymfocyty reaktivní na SARS-CoV-2 pomocí verze testu T-SPOT.COVID určené pouze pro výzkumné účely (RUO, research use only) (Oxford Immunotec)<sup>23</sup>, na jehož základě byl vyvinut tento test. Z této kohorty klíčových pracovníků bylo 154 zařazeno na základě předchozího pozitivního testu RT-PCR potvrzujícího infekci SARS-CoV-2. Z dříve PCR pozitivní populace bylo 5,8 % séronegativních, avšak 88,9 % z těchto subjektů vykazovalo silné odpovědi T-lymfocytů, které byly detekovány pomocí RUO verze testu T-SPOT.COVID. Toto zjištění naznačuje, že někteří infikovaní jednotlivci mohou vytvářet buňkami (T-lymfocyty) zprostředkované imunitní odpovědi za nepřítomnosti odpovědi protilátek. To odpovídá výsledkům studií prováděných u osob infikovaných SARS-CoV-2 při kontaktu v domácnosti, při nichž se zjistilo, že existovala přibližně o 50 % větší pravděpodobnost, že se u kontaktovaných osob vyvinou T-lymfocyty specifické pro SARS-CoV-2, než protilátky po expozici<sup>24,25</sup>. Tato zjištění společně napovídají, že T-lymfocyty mohou být citlivějším ukazatelem předchozí expozice viru SARS-CoV-2 než protilátkové odpovědi.

Ve stejné studii Public Health England, byl u zbývajících 2 672 účastníků studie sledován následný vývoj infekce SARS-CoV-2 potvrzené PCR testem<sup>23</sup>. Toto následné sledování poskytlo první náznak toho, že T-lymfocyty specifické pro SARS-CoV-2 mohou být spojeny s ochranou vůči opakované infekci, protože u osob s vysokým množstvím reaktivních T-lymfocytů detekovaných pomocí RUO verze testu T-SPOT.COVID byla významně nižší pravděpodobnost, že se u nich vyvine PCR potvrzená infekce SARS-CoV-2 během období následného sledování. Tato předběžná zjištění korelují se studii prováděnými u primátů, které prokázaly, že deplece T-lymfocytů u opic, které se zotavily z infekce SARS-CoV-2 měla za následek opakovanou infekci po vystavení viru, i když odpovědi protilátek specifických pro SARS-CoV-2 zůstaly beze změn. V kontrastu s tím byly opice, které si zachovaly T-lymfocyty specifické pro SARS-CoV-2, schopny úspěšně bojovat proti opakované infekci<sup>26</sup>. V souladu s předchozími studii bylo v této studii na zvířatech také pozorován pokles odpovědí protilátek po infekci, což vedlo autory k závěru, že k dlouhodobé ochraně před virem mohou být potřebné T-lymfocyty. Tato zjištění ukazují, že T-lymfocyty hrají zásadní úlohu při imunitních odpovědích proti přirozené infekci virem SARS-CoV-2, a je tedy důležité, aby byly navozeny robustní odpovědi T-lymfocytů v odpovědi na vakcíny proti SARS-CoV-2<sup>27</sup>. T-lymfocyty specifické pro SARS-CoV-2 byly detekovány v odpovědi na mnoho současných kandidátů vakcín<sup>28,29,30</sup> a důležitost detekce a sledování těchto odpovědí je stále více uznávaná<sup>27</sup>. Výzkumná verze testu T-SPOT.COVID byla použita k prokázání odpovědi specifických T-lymfocytů po očkování. Předběžné údaje ukazují významný rozdíl mezi počtem T-lymfocytů před a po očkování (vlastní údaje).

Test T-SPOT.COVID je zjednodušená, standardizovaná varianta techniky testu ELISPOT. Testy ELISPOT detekují a měří odpovědi T-lymfocytů vyčíslením počtu T-lymfocytů, které produkují cytokin v odpovědi na stimulaci antigeny. Testy ELISPOT jsou významně citlivé, protože cílový cytokin je zachycen přímo v okolí sekretující buňky, než dojde k jeho zředění v supernatantu, navázání na receptory sousedních buněk nebo degradaci. Díky tomu jsou testy ELISPOT mnohem citlivější než konvenční testy ELISA<sup>31,32,33,34</sup>. Citlivost je důležitá při detekci odpovědi T-lymfocytů na SARS-CoV-2, protože četnost výskytu T-lymfocytů může být nižší než u jiných virů, které navozují odpovědi T-lymfocytů<sup>35</sup>, a mnoho různých faktorů, včetně věku<sup>22</sup>, závažnosti onemocnění<sup>24</sup> a imunosuprese<sup>36</sup> souvisí s variabilitou magnitudy odpovědi T-lymfocytů specifických pro SARS-CoV-2.

Tento test zjišťuje počet efektorových T-lymfocytů odpovídajících na stimulaci pomocí dvou samostatných peptidových směsí odvozených od spike a nukleokapsidových proteinů SARS-CoV-2. Odpověď T-lymfocytů na každý protein se měří paralelně v jednotlivých jamkách. Antigenní panely testu T-SPOT.COVID jsou navrženy jako spanningové sekvence překryvných peptidů spike (COV-A) a nukleokapsidových (COV-B) proteinů. Toto uspořádání peptidů poskytuje maximální pokrytí epitopů zajišťující lepší detekci reaktivity T-lymfocytů a žádná omezení HLA. Antigenní složení z 253 peptidů pokrývajících většinu imunogenních oblastí genomu viru umožňuje měření šíře imunity a zajišťuje minimalizaci dopadu bodových mutací. Specifita k SARS-CoV-2 byla posílena odstraněním potenciálně zkřížené reagujičích peptidových sekvencí s vysokou homologií k ostatním koronaviřům.

## PRINCIP TESTU

Imunitní odpověď na infekci SARS-CoV-2 je zprostředkovaná aktivací B-lymfocytů i T-lymfocytů. Jako součást odpovědi T-lymfocytů se T-lymfocyty senzitivizují na antigeny SARS-CoV-2 určené k aktivaci CD4 i CD8 efektorových T-lymfocytů, které následně při stimulaci těmito antigeny produkují cytokin interferon gamma (IFN- $\gamma$ )<sup>37,38</sup>. Test T-SPOT.COVID používá metodu ELISPOT (Enzyme Linked ImmunoSpot) ke zjištění počtu T-lymfocytů senzitivizovaných SARS-CoV-2 zachycením interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) v blízkosti T-lymfocytů, kterými byl vylučován<sup>39</sup>.

Jednojaderné buňky z periferní krve (PBMC) se separují ze vzorku plné krve, promyjí a poté spočítají, než se přidají k testu.

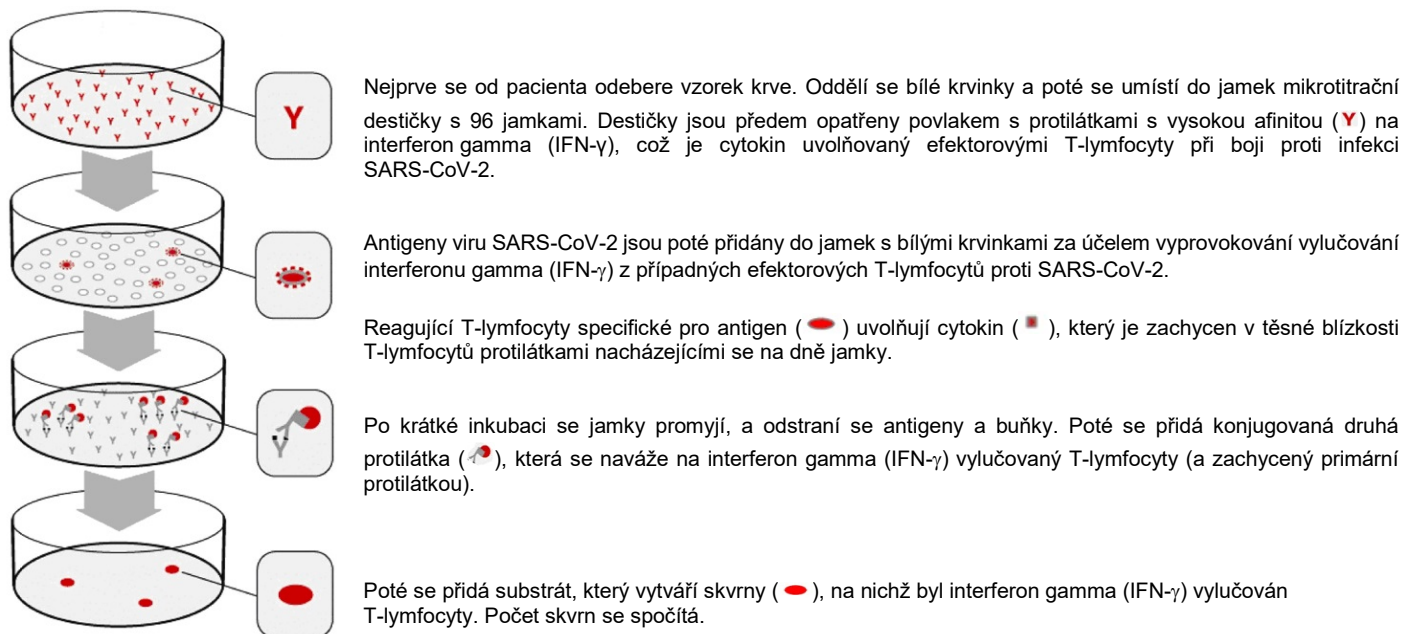
Izolované PBMC (leukocyty) se umístí do mikrotitračních jamek, kde jsou vystaveny kontrole v podobě fytohemaglutininu (PHA) (mitogenní stimulátor indikující funkci buněk), kontrole NIL, nebo dvěma samostatným panelům antigenů SARS-CoV-2 získaných ze spike proteinů, respektive nukleokapsidových proteinů. PBMC jsou

inkubovány s antigeny, aby se umožnila stimulace veškerých přítomných senzitivovaných T-lymfocytů.

Vylučovaný cytokin je zachycen specifickými protilátkami na povrchu membrány, což vytvoří základnu jamky a buňky a další nežádoucí materiál se odstraní promytím. Druhá protilátka, konjugovaná s alkalickou fosfatázou a nasměrovaná na odlišný epitop na molekule cytokinu, je přidána a naváže se na cytokin zachycený na povrchu membrány. Veškerý nenavázaný konjugát je odstraněn promytím. Do každé jamky se přidá rozpustný substrát; ten se rozštěpí vázaným enzymem a vytvoří (tmavě modrou) skvrnu nerozpustného precipitátu v místě reakce.

Vyhodnocení počtu získaných skvrn poskytne měření početnosti efektorových T-lymfocytů v periferní krvi s imunitní odpovědí proti SARS-CoV-2. Tyto principy platformy testu T-SPOT jsou popsány na obrázku 1 níže.

**Obrázek 1.** Principy systému testu T-SPOT. Pouze pro ilustrační účely, podrobné pokyny postupu viz část 6, Návod k použití.



### 3. ČINIDLA A UCHOVÁVÁNÍ

#### DODANÉ MATERIÁLY

T-SPOT.COVID COV.435/300 (verze s 12 proužky/stripy  $\times$  8 jamkami pro více použití) a COV.435/200 obsahuje:

- 1 mikrotitrační destičku: 96 jamek, dodané jako 12 $\times$  8jamkové jednotlivé proužky v samostatném rámečku (COV.435/300) nebo 12 $\times$  8 jamek na samostatné destičce (COV.435/200), s povlakem monoklonální protilátkou z myši proti cytokinu interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ).
- 2 zkumavky (každá 0,8 mL) Panel A (COV-A): obsahuje spike antigeny, hovězí sérový albumin a antimikrobiální látky.
- 2 zkumavky (každá 0,8 mL) Panel B (COV-B): obsahuje nukleokapsidové antigeny, hovězí sérový albumin a antimikrobiální látky.
- 2 zkumavky (každá 0,8 mL) pozitivní kontrola: obsahuje fytohemaglutinin (PHA), k použití jako kontrola funkce buněk, hovězí sérový albumin a antimikrobiální látky.
- 1 zkumavka (50  $\mu$ l) s 200 $\times$  koncentrovaným konjugačním činidlem: myši monoklonální protilátka na cytokin interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ALP).
- 1 lahvička (25 mL) roztoku substrátu: roztok BCIP/NBT<sup>plus</sup> připravený k použití.
7. Příbalová informace.

Poznámka: Pevné 96jamkové mikrotitrační destičky použitelné v soupravě T-SPOT.COVID COV.435/200 a 8jamkové proužky použitelné v soupravě COV.435/300 jsou určeny k jednorázovému použití. Měly by se použít bezprostředně po otevření a nesmí se používat opakovaně. Nesměšujte komponenty z různých souprav.

#### UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

Neotevřenou soupravu uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Komponenty soupravy jsou stabilní až do data expirace vytištěného na krabici soupravy, pokud jsou uchovávány a je s nimi manipulováno v doporučených podmínkách. Souprava se nesmí používat po vypršení data expirace uvedeného na štítku soupravy. Pokud má komponenta datum expirace pozdější než je vyznačeno na (vnější) krabici soupravy, neuchovávejte ji a nepoužívejte s jinou soupravou;

nepoužívejte jakoukoli komponentu v soupravě po vypršení data expirace vyznačeného na vnější krabici soupravy.

Komponenty otevřené soupravy uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Otevřené komponenty pro test T-SPOT.COVID (COV.435/300) musí být použity do 8 týdnů od otevření a pro T-SPOT.COVID (COV.435/200) do 4 týdnů od otevření, přičemž toto období nesmí končit později, než je datum expirace uvedené na štítku soupravy. **Vyhnete se delšímu vystavení roztoku substrátu světlu.**

## POTŘEBNÉ VYBAVENÍ A MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

1. Rámeček destičky s 8jamkovým proučkem (k dispozici od společnosti Oxford Immunotec).
2. Mikrobiologický bezpečnostní box třídy II (doporučeno).
3. Zkumavky na odběr krve, např. Vacutainer® CPT™ nebo heparinizované zkumavky.
4. Činidlo T-Cell *Xtend*® – vzorky plné krve uchovávané při pokojové teplotě (18–25 °C) 0 až 32 hodin po venepunkci, je možné zpracovat pomocí činidla T-Cell *Xtend*.
5. Ficoll® (pokud se nepoužívají zkumavky CPT).
6. Centrifuga k přípravě PBMC (schopna dosahovat alespoň 1800 RCF (g)) a udržovat vzorky při pokojové teplotě (18–25 °C) pokud se k oddělení PBMC používají metody odstředění na základě rozdílných hustot.
7. Vybavení a činidla k umožnění počítání PBMC; buď manuálně pomocí trypanové modři (nebo jiného vhodného barviva) a hemocytometru na mikroskopu nebo automaticky pomocí vhodného hematologického analyzátoru.
8. Inkubátor se zvlhčováním schopný dosáhnout teploty 37 ± 1 °C s přívodem 5 % CO<sub>2</sub>.
9. Automatická promývačka mikrotitračních destiček nebo 8kanálová či kroková dávkovací pipeta k manuálnímu promytí destiček.
10. Nastavitelné pipety k pokrytí různých objemů 1–1000 µl (např. čtyři pipety schopné dodat objemy 1–10 µl, 2–20 µl, 20–200 µl a 100–1000 µl) a sterilní pipetovací špičky.
11. Sterilní roztok PBS: např. GIBCO® 1× D-PBS (Life Technologies; katalogové číslo 14040-133).
12. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
13. Prostředky pro vizualizaci jamek nebo zachycení digitálního snímku jamky, např. stereomikroskop, lupa nebo zobrazovač destiček pro počítání skvrn.
14. Sterilní buněčné kultivační médium, např. GIBCO AIM V® (Life Technologies; katalogové číslo 31035-025 v kvalitě pro výzkum). (Poznámka: Médium AIM V je k dispozici od společnosti Oxford Immunotec). **Důrazně se doporučuje použití tohoto média bez séra pro inkubační krok.** RPMI 1640 (Invitrogen; katalogové číslo 11875-093) se může použít pouze při prvotních krocích přípravy vzorku. Doporučuje se, aby buněčné kultivační médium bylo uchováváno v náležitých alikvotních podílech a nadbytečný materiál se po použití zlikvidoval. **Buněčné kultivační médium by se mělo před použitím s testem T-SPOT.COVID předebrat na teplotu 37 °C.** Aby se zabránilo problémům s kontaminovaným médiem, může být užitečné rozdělit obsah lahvíček AIM-V nebo RPMI 1640 na menší alikvotní podíly.

## 4. VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Pouze pro profesionální použití.
- Obsluhující pracovníci by měli být před prováděním testu proškoleni ohledně postupu testu a musí chápat návod k použití.
- Před použitím si pečlivě přečtete pokyny k testu. Odchyly od návodu k použití uvedeného v této příbalové informaci mohou mít za následek chybné výsledky.
- Při manipulaci s materiálem lidského původu je třeba dbát opatrnosti. Veškeré vzorky krve je nutné považovat za potenciální zdroj infekce. Manipulace se vzorky krve a komponenty testu, jejich použití, uchování a likvidace musí být v souladu s postupy definovanými v příslušných národních, státních či místních pokynech či předpisech pro ochranu před biologickým nebezpečím.
- Při práci s chemikáliemi je nutné dbát opatrnosti. Veškeré chemikálie je nutné považovat za potenciálně nebezpečné. Materiálový bezpečnostní list pro tuto soupravu je k dispozici u společnosti Oxford Immunotec.
- Nepoužitá činidla a biologické vzorky zlikvidujte v souladu s místními, státními a federálními předpisy.
- Do každé jamky musí být přidán správný počet PBMC. V opačném případě může dojít k nesprávné interpretaci výsledku.
- Nesměšujte dohromady komponenty z různých šarží souprav.
- Dodržujte aseptickou techniku, aby se zabránilo kontaminaci činidel, jamek testu, buněčných suspenzí a buněčného kultivačního média.
- Odchyly od uvedených technik pipetování a promývání, dob inkubace a/nebo teplot může ovlivnit skutečné získané výsledky a je nutné se jim vyhnout.
- Krev je nutné odebrat a zpracovat co nejdříve.
- Vzorky krve uchovávejte a přepravujte do laboratoře při pokojové teplotě (18–25 °C). Vzorky plné krve nechladte ani nezmrazujte.
- Nedodržení doporučených inkubačních dob a teplot může vést k nesprávné interpretaci výsledků.

- Prohlubně v membráně způsobené špičkami pipety či promývačky jamek se mohou vyvinout jako artefakty v jamkách, což může způsobit chybné počítání skvrn.

## VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI POUŽITÍ ČINIDLA T-CELL XTEND

- Činidlo T-Cell *Xtend* nebylo vyhodnoceno k jinému použití než s platformou testu T-SPOT.
- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Pouze pro profesionální použití.
- Nepoužívejte činidlo po uplynutí data expirace.
- Při používání tohoto výrobku dodržujte aseptické techniky, aby se zabránilo kontaminaci činidla.
- S činidlem T-Cell *Xtend* nepoužívejte zkumavky CPT (Cell Preparation Tubes, Becton Dickinson) ani zkumavky na odběr krve obsahující jako antikoagulant ethylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA).
- Činidlo T-Cell *Xtend* přidejte k plné krvi před zpracováním vzorku.
- Činidlo T-Cell *Xtend* neředte ani přímo do něj nepřidávejte další komponenty.
- Pro odběr vzorku žilní krve používejte pouze jednorázové nádoby.
- Nesměšujte dohromady různé šarže činidel.

## 5. ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE S NIMI

Jednotlivé laboratoře musí validovat své postupy pro odběr a separaci PBMC, aby získali dostatečné množství. Doporučuje se následující:

1. Vzorky plné krve by se měly až do okamžiku zpracování uchovávat při teplotě 18–25 °C.
2. Odeberte vzorek krve v souladu s pokyny dodanými s odběrovým prostředkem. Obsah zkumavky je nutné převrátit (8–10krát), aby se zajistilo důkladné promíchání plné krve s antikoagulantem. Odebranou krev uchovávejte při pokojové teplotě (18–25 °C). **Nechladte ani nezmrazujte.**
3. U imunokompetentního pacienta lze obvykle dostatečné množství PBMC pro provedení testu získat ze vzorků žilní krve dle následujících pokynů:

Jedna 8mL nebo dvě 4mL zkumavky (CPT) nebo jedna 6mL zkumavka s heparinem lithným.

PBMC lze v případě potřeby spojit, aby se získalo dostatečné množství PBMC z více zkumavek krve, které byly odebrané a zpracované současně.

4. Při používání testu T-SPOT.COVID **bez použití činidla T-Cell Xtend** je nutné vzorky krve zpracovat do 8 hodin od odběru. Vzorky je možné odebrat do zkumavek Vacutainer CPT (Becton Dickinson) s citrátem sodným nebo heparinem sodným s oddělenými PBMC ve zkumavce s použitím pokynů výrobce. Alternativně lze vzorky krve odebrat do zkumavek s heparinem lithným s tím, že PBMC budou následně odděleny pomocí standardních separačních technik, např. Ficoll-Paque® nebo alternativních metod k vyčištění frakce PBMC. Zkumavky pro odběr vzorků s obsahem EDTA antikoagulantu nesmí být použity.
  - a. U zkumavek CPT pro odběr vzorků odstředíte 8mL zkumavky CPT při 1600 RCF(g) po dobu 28 minut nebo 4mL zkumavky CPT při 1800 RCF (g) po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18–25 °C).
  - b. Pokud používáte médium Ficoll-Paque Plus, zředte krev stejným objemem média RPMI 1640 (1 díl krve na 1 díl RPMI). Zředěnou krev opatrně uložte ve vrstvě do Ficoll-Paque Plus (2–3 díly zředěné krve na 1 díl Ficoll-Paque) a odstředíte při 1000 RCF (g) po dobu 22 minut při pokojové teplotě (18–25 °C).

**Poznámka:** Před použitím zkumavek CPT nebo média Ficoll-Paque si přečtěte pokyny výrobce. Ujistěte se, že jsou zkumavky odstředovány při správných otáčkách. Otáčky uvedené výše jsou udávány v g nebo relativní odstředivé síle (RCF). Nejde o stejnou veličinu jako otáčky za minutu (RPM). Pokud centrifuga umožňuje měření pouze v otáčkách za minutu (RPM), převedte doporučenou hodnotu RCF změřením poloměru rotoru a použitím převodní tabulky. Zkumavky Leucosep (Greiner Bio-One) šetří čas díky separaci na základě hustoty. Zkumavky obsahují porézní bariéru, která umožňuje přenést vzorek krve do separačního média na základě hustoty, čímž se odstraní nutnost opatrného vytvoření vrstev vzorku.

5. Při používání testu T-SPOT.COVID **s použitím činidla T-Cell Xtend** lze vzorky krve odebrat do zkumavek s heparinem lithným. Zkumavky Vacutainer CPT a zkumavky pro odběr vzorků s obsahem antikoagulantu EDTA nesmí být použity. Činidlo T-Cell *Xtend* je nutné přidat před separací PBMC s použitím standardních separačních technik. Vzorky plné krve by se měly uchovávat při pokojové teplotě (18–25 °C) po dobu 0 až 32 hodin po venepunkci s použitím činidla T-Cell *Xtend*.

V případě použití činidla T-Cell *Xtend* bezprostředně před separací buněk odstraňte víčko ze zkumavky pro odběr krve a přidejte 25 µl roztoku činidla T-Cell *Xtend* na jeden mL vzorku krve. Opět nasadte víčko a opatrně zkumavku pro odběr krve 8 až 10krát převraťte, aby se obsah promíchal. Inkubujte po dobu 20 ± 5 minut při pokojové teplotě (18–25 °C) a poté zpracujte za účelem izolace vrstvy PBMC pomocí centrifugace Ficoll dle hustoty, jak je uvedeno v částech 4b, a 6–9. Další podrobnosti naleznete v příbalové informaci činidla T-Cell *Xtend*.

- Pomocí pipety odeberte bílou zakalenou vrstvu PBMC a přeneste do 15mL centrifugační zkumavky s kónickým dnem. Doplňte objem na 10 mL pomocí buněčného kultivačního média. **Buněčné kultivační médium pro promývací kroky by mělo být před kontaktem s PBMC předeřháto na teplotu 37 °C.**

Je známo, že cirkulační faktory ve vzorcích plné krve narušují testy interferonu gamma z plné krve, např. na revmatoidní faktor, heterofilní protilátky a preexistující množství interferonu gamma. Separace a promytí PBMC umožňuje odstranit tyto potenciálně interferující látky před provedením testu.

*Poznámka: Po centrifugaci by se PBMC měly extrahovat pomocí pipetovací špičky s velkým otvorem (např. 1 mL), ponořením špičky pipety do vrstvy PBMC. Tuto kalnou vrstvu je nutné opatrně nasát a přenést do sterilní kónické zkumavky k provedení kroků promytí. Ujistěte se, že odeberete celou zakalenou vrstvu PBMC. Je lepší odebrat i trochu vrstvy plazmy, než ponechat zbývající PBMC ve zkumavce na odběr krve. V případě použití CPT se však vyhněte přenosu separačního gelu, který by mohl ucpat špičku. Pokud k tomu dojde, přeneste buňky, které jsou již odebrány ve špičce, do centrifugační zkumavky a poté použijte novou špičku k přenosu zbývajících PBMC. K promytí buněk během kroků 3–5 lze použít různá média; úspěšně bylo používáno jak AIM V, tak RPMI 1640 a tato média jsou doporučena.*

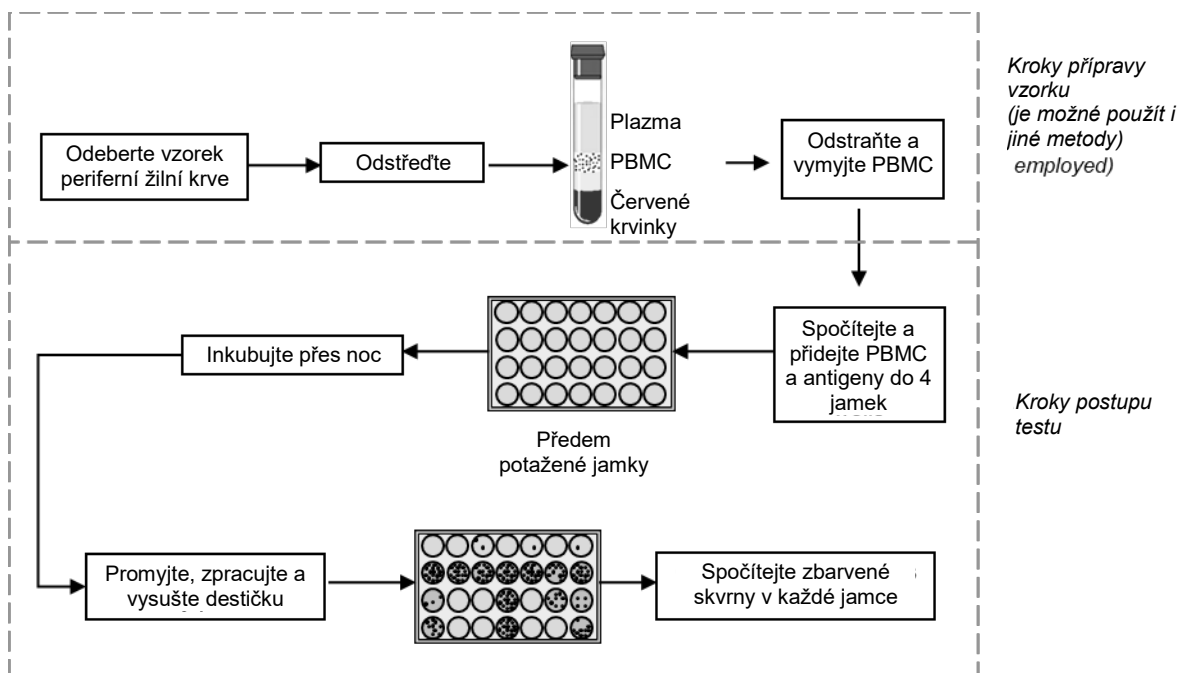
- Odstřeďuje 7 minut při 600 RCF (g). Odlijte supernatant a resuspendujte peletu v 1 mL média.
- Doplňte objem na 10 mL čerstvým médiem a odstřeďujte 7 minut při 350 RCF (g).
- Odlijte supernatant a resuspendujte peletu v 0,7 mL buněčného kultivačního média. **Médium AIM V bez séra bylo úspěšně používáno a důrazně jej doporučujeme.**

*Poznámka: Kroky 2–7 by se měly provádět v mikrobiologickém bezpečnostním boxu třídy II za účelem ochrany uživatele a zabránění kontaminace vzorků.*

## 6. NÁVOD K POUŽITÍ

Při plně naplněné destičce testu T-SPOT.COVID lze zpracovat 24 vzorků od pacientů. Test se obvykle provádí odpoledne jeden den a ráno následujícího dne, aby bylo možné provést inkubační krok po dobu 16–20 hodin přes noc. V případě, že je použit tento harmonogram, pak se odpoledne 1. dne se zpracují vzorky krve k přípravě PBMC pro test a zahájí se test přidáním PBMC a antigenů na testovací destičku, která se umístí do inkubátoru. 2. dne se destička vyjme z inkubátoru a provedou se vývojové kroky a interpretace výsledků destičky. Doba ke zpracování plné destičky je 1. den přibližně 3 hodiny (skutečná manuální práce bude kratší vzhledem k odstředovacím krokům) a 30 minut práce (bez zahrnutí 1 hodiny inkubace sekundárních protilátek a doby na schnutí destičky) 2. den. Postup provedení testu je shrnut na obrázku 2 a dále popsán níže:

**Obrázek 2.** Schéma zobrazující hlavní kroky potřebné k provedení testu T-SPOT.COVID. Mějte na paměti, že na obrázku není zobrazeno všech 96 jamek na destičkách.



## PŘÍPRAVA ČINIDEL

- Zkumavky se spike antigeny SARS-CoV-2 (Panel A), nukleokapsidovými antigeny SARS-CoV-2 (Panel B) a pozitivní kontrolou se dodávají připravené k použití.



2. Připravte ředění 1:200 pracovního roztoku konjugačního činidla. Vypočítejte objem potřebného pracovního roztoku konjugačního činidla. Konjugační činidlo lze připravit na potřebnou pracovní koncentraci a uchovat při teplotě 2–8 °C až po dobu šesti týdnů před použitím testu.

*Poznámka: Pro každý vzorek pacienta se použijí 4 jamky. Do každé jamky bude přidáno 50 µl zředěného konjugačního činidla. Pro jeden pásek (2 vzorky, 8 jamek) tedy připravte 500 µl roztoku pracovní koncentrace přidáním 2,5 µl koncentrovaného konjugačního činidla do 497,5 µl PBS. Pro jednu 96jamkovou destičku (24 vzorků) připravte 5 mL roztoku pracovní koncentrace přidáním 25 µl koncentrovaného konjugačního činidla do 497,5 µl PBS.*

3. Substrátový roztok se dodává připravený k použití. Před vyjmutím destičky z inkubátoru (2. den) vytáhněte substrátový roztok z místa jeho uchovávání a ponechte jej ohřát na pokojovou teplotu.

## POČÍTÁNÍ BUNĚK A ŘEDĚNÍ

Test T-SPOT.COVID vyžaduje 250 000 ± 50 000 PBMC na jamku. Pro každý vzorek pacienta jsou zapotřebí celkem čtyři jamky; na každého pacienta je tedy zapotřebí 1×10<sup>6</sup> PBMC. Počet T-lymfocytů proti SARS-CoV-2 ve vzorků je normalizován na fixní počet PBMC.

1. Proveďte počítání PBMC. Buňky lze spočítat několika různými metodami, včetně manuálního počítání pomocí trypanové modři (nebo jiného vhodného barviva) a hemocytometru, nebo pomocí automatizovaného hematologického analyzátoru.
2. Ve stručnosti, pro manuální počítání pomocí Neubauerova hemocytometru s použitím trypanové modři, přidejte 10 µl konečné buněčné suspenze do 40 µl 0,4 % (obj.) roztoku trypanové modři. Umístěte příslušný alikvotní podíl do hemocytometru a spočítejte buňky na mřížce. U dalších typů hemocytometrů a automatických zařízení se řiďte pokyny výrobce.

*Poznámka: Je nutné dbát na to, aby byla buněčná suspenze dobře promíchána bezprostředně před rozdělením na alikvotní podíly pro účely počítání. Buňky by se mohly usadit na dně zkumavky, a to by mohlo vést k nesprávné interpretaci skutečného počtu buněk. Promíchání lze provést buď jemným zatočením zkumavkou v ruce, nebo opatrným promícháním suspenze několikerým nasátím a vypuštěním pipetou.*

3. Vypočítejte koncentraci PBMC přítomných v zásobní buněčné suspenzi.

*Poznámka: Ujistěte se, že je výpočet správný pro použitý systém počítání buněk, protože použití nedostatečného či nadměrného množství buněk může vést k nesprávné interpretaci výsledku.*

4. Připravte 500 µl konečné buněčné suspenze v koncentraci 2,5 × 10<sup>5</sup> buněk/100 µl (což dává celkem 1,25 × 10<sup>6</sup> PBMC).

*Poznámka: Před odebráním alikvotního podílu k ředění se ujistěte, že jsou buňky dobře promíchány tak, že suspenzi opatrně několikrát nasajete a vypustíte pipetou. Počty PBMC mezi 200 000 a 300 000 na jamku dávaly konzistentní výsledky testu T-SPOT.*

## PŘÍPRAVA DESTIČKY A INKUBACE

Test T-SPOT.COVID vyžaduje použití čtyř jamek pro každý vzorek pacienta. S každým jednotlivým vzorkem je nutné zpracovat kontrolu Nil a pozitivní kontrolu. Doporučuje se, aby byly vzorky uspořádány na destičce svisle dle obrázku níže.

- Kontrola Nil
- Panel A (COV-A) (spike)
- Panel B (COV-B) (nukleokapsid)
- Pozitivní

Na každé 96jamkové destičce lze zpracovat až 24 vzorků pacientů. Použijte potřebné množství destiček pro množství vzorků, které chcete zpracovat. U soupravy COV.435/300; lze na každém pásku zpracovat 2 vzorky. Použijte pouze potřebný počet pásků. Zbývající pásky uzavřete do fóliového sáčku spolu se silikagelem. Zbývající pásky se musí použít do osmi týdnů od prvního otevření sáčku za předpokladu, že jsou během této doby uchovávány při teplotě 2–8 °C.

T-SPOT.COVID je test k měření funkce T-lymfocytů; žádné standardní křivky nejsou zapotřebí. Pro každého pacienta budou tedy zapotřebí pouze 4 jamky, které se použijí pro každý vzorek. Doporučené uspořádání destičky pro 24 vzorků je znázorněno níže:

Řada	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	3N	5N	7N	9N	11N	13N	15N	17N	19N	21N	23N
B	1A	3A	5A	7A	9A	11A	13A	15A	17A	19A	21A	23A
C	1B	3B	5B	7B	9B	11B	13B	15B	17B	19B	21B	23B
D	1M	3M	5M	7M	9M	11M	13M	15M	17M	19M	21M	23M
E	2N	4N	6N	8N	10N	12N	14N	16N	18N	20N	22N	24N
F	2A	4A	6A	8A	10A	12A	14A	16A	18A	20A	22A	24A
G	2B	4B	6B	8B	10B	12B	14B	16B	18B	20B	22B	24B
H	2M	4M	6M	8M	10M	12M	14M	16M	18M	20M	22M	24M

Klíč: N = kontrola Nil, A = Panel A, B = Panel B, M = mitogenová pozitivní kontrola

- U soupravy COV.435/300 vyjměte potřebné předem potažené 8jamkové proužky z obalu, nasadte je na rámeček destičky a ponechte ohřát na pokojovou teplotu. Vyjměte pouze požadovaný počet proužků, znovu uzavřete případné zbývající nepoužité pásky a sáček s vysoušedlem vložte do vnějšího fóliového obalu a vraťte do místa uchovávání při teplotě 2–8 °C.

*Poznámka: Proužky, které budete používat, zacvakněte do prázdného rámečku destičky vybaveného spodním krytem a víčkem. Rámečky, kryty a víčka je zapotřebí uchovat a znovu použít.*

- Přidejte panely a kontroly;

- Přidejte 50 µl buněčného kultivačního média AIM-V do každé jamky s kontrolou Nil.
- Přidejte 50 µl roztoku Panel A do každé požadované jamky.
- Přidejte 50 µl roztoku Panel B do každé požadované jamky.
- Přidejte 50 µl roztoku pozitivní kontroly do každé jamky ke kontrole funkce buněk.

Špička pipety se nesmí dotknout membrány. Prohlubně v membráně způsobené špičkami pipety mohou způsobit artefakty v jamkách.

- Do každé ze 4 jamek použitých pro vzorek pacienta přidejte 100 µl konečné suspenze buněk pacienta (obsahující 250 000 PBMC). Pro přidání buněk každého jednotlivého pacienta použijte novou špičku, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci mezi jamkami. Pokud jsou pipetovací špičky použity pro více jamek, dbejte, abyste nekontaminovali sousední jamky při přenášení tekutiny z jedné jamky do druhé.

*Poznámka: Před odebráním každého 100µl alikvotního podílu zajistěte náležitě promíchání (jako při krocích pro Počítání buněk a ředění).*

- Inkubujte destičku s nasazeným víčkem v inkubátoru se zvlhčovačem při teplotě 37 °C s přívodem 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 16–20 hodin. Jakmile je destička v inkubátoru, nenarušujte průběh inkubace. Neumísťujte destičky na sebe, protože to může vést k nerovnoměrné distribuci teploty a větrání.

*Poznámka: Inkubátor s přívodem CO<sub>2</sub> musí být vybaven zvlhčováním. Zkontrolujte, zda je v nádobce na vodu dostatečné množství vody k zajištění zvlhčeného ovzduší.*

## VÝVOJ SKVRN A POČÍTÁNÍ

- Vyjměte destičku z inkubátoru a zlikvidujte buněčné kultivační médium setřesením obsahu do příslušné nádoby.

*Poznámka: V tuto chvíli vyjměte substrátový roztok ze soupravy a ponechte ohřát na pokojovou teplotu.*

- Do každé jamky přidejte 200 µl roztoku PBS. **Nepoužívejte PBS obsahující Tween® nebo jiné detergenty. Mohlo by to způsobit vysoký počet buněk na pozadí.**

*Poznámka: Použijte čerstvě připravený sterilní PBS.*

- Roztok PBS zlikvidujte. Zopakujte promývání jamky ještě 3krát pomocí čerstvého roztoku PBS pro každé promytí. Pro promývací kroky lze použít automatickou promývačku.

*Poznámka: Pro promývání je možné použít vícekanálovou pipetu nebo promývačku destiček. Po každém promytí zlikvidujte PBS do vhodné nádoby. Pro odstranění PBS nepoužívejte pipety, protože hrozí nebezpečí poškození membrány. Pokud použijete promývačku destiček, ujistěte se, že je rozdělovač nastaven tak, aby se špičky nedotýkaly membrány. Po konečném promytí vyklepněte destičku na utěrku nepouštějící vlas, aby se zajistilo odstranění veškerého PBS – jeho případné zbytky by dále naředily konjugační činidlo.*

- Pokud již není připraveno během kroku přípravy činidel; zředte koncentrované konjugační činidlo 200× v PBS, abyste získali roztok o pracovní koncentraci.
- Přidejte 50 µl roztoku konjugačního činidla v pracovní koncentraci do každé jamky a inkubujte při teplotě 2–8 °C po dobu 1 hodiny.

*Poznámka: Doporučuje se použít vícekanálovou pipetu nebo krokovací pipetu. Je nutné dbát na to, že bude konjugační činidlo přidáno do každé jamky, protože roztok je čirý a bezbarvý – může být proto obtížné zjistit pohledem, do kterých jamek již byl přidán.*

6. Konjugát zlikvidujte a proveďte čtyři promytí PBS dle popisu v krocích 2 a 3 výše.
7. Přidejte 50 µl substrátového roztoku do každé jamky a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 7 minut.
8. Destičku důkladně promyjte destilovanou nebo deionizovanou vodou, aby se zastavila detekční reakce.
9. Ponechte destičku vyschnout postavením na dobře větrané místo nebo do pece o teplotě do 37 °C.

*Poznámka: Skvrny mohou být lépe viditelné po vyschnutí destičky; proto se před zjištěním výsledků ujistěte, že je destička dobře vysušena. Ponechte ji schnout 4 hodiny při teplotě 37 °C nebo alespoň 16 hodin při pokojové teplotě.*

10. Spočítejte a zaznamenejte počet výrazných tmavě modrých skvrn na membráně každé jamky. Ke stanovení, zda je vzorek pacienta „Reaktivní“ nebo „Nereaktivní“ použijte Interpretaci výsledků a kritéria testu (viz níže). **skvrny vytvořené v důsledku stimulace antigenů by měly vypadat jako velké, okrouhlé a tmavé skvrny (skvrny). Často lze pozorovat efekt postupného zvýraznění s tmavším středem a nevýraznějšími okraji. Nespecifické artefakty, které se mohou objevit, jsou menší, méně výrazné a nepravidelného tvaru.**

*Poznámka: Skvrny lze spočítat přímo na jamce pomocí lupy nebo stereomikroskopu či na digitálním snímku zachyceném na mikroskopu nebo zobrazovací destičce.*

Po vyvinutí zůstávají dokončené destičky testu stabilní a není je nutné interpretovat okamžitě. Destičky je možné archivovat pro zpětnou kontrolu kvality nebo opětovné vyšetření po dobu až 12 měsíců, pokud jsou uchovávány v suchém a tmavém prostředí při pokojové teplotě.

## KONTROLA KVALITY

U typického výsledku se očekává, že bude mít je několik skvrn nebo žádné skvrny u kontroly Nil a 20 nebo více skvrn u pozitivní kontroly (typické výsledky z americké klinické studie jsou znázorněny na obrázcích 4a a 4b).

Pokud počet skvrn u kontroly Nil překročí hodnotu 10, měla by být považována za „Neplatnou“.

Počet skvrn pozitivní kontroly funkce buněk měl typicky být  $\geq 20$  nebo ukazovat saturaci (příliš velké množství skvrn ke spočítání). Malý podíl pacientů může mít T-lymfocyty, které vykazují pouze omezenou odpověď na PHA<sup>1</sup>. Pokud je počet skvrn pozitivní kontroly  $< 20$ , měla by být považována za „Neplatnou“, pokud buď Panel A nebo Panel B nejsou „reaktivní“ či „hraniční“ (nejednoznačné), jak je popsáno v části Interpretace výsledků a kritéria testu (viz níže); v takovém případě bude výsledek platný.

V případě, že jsou výsledky neplatné, měly by se uvádět jako „Neplatný“ a doporučuje se odebrat další vzorek a u dané osoby test zopakovat.

## INTERPRETACE VÝSLEDKŮ A KRITÉRIA TESTU

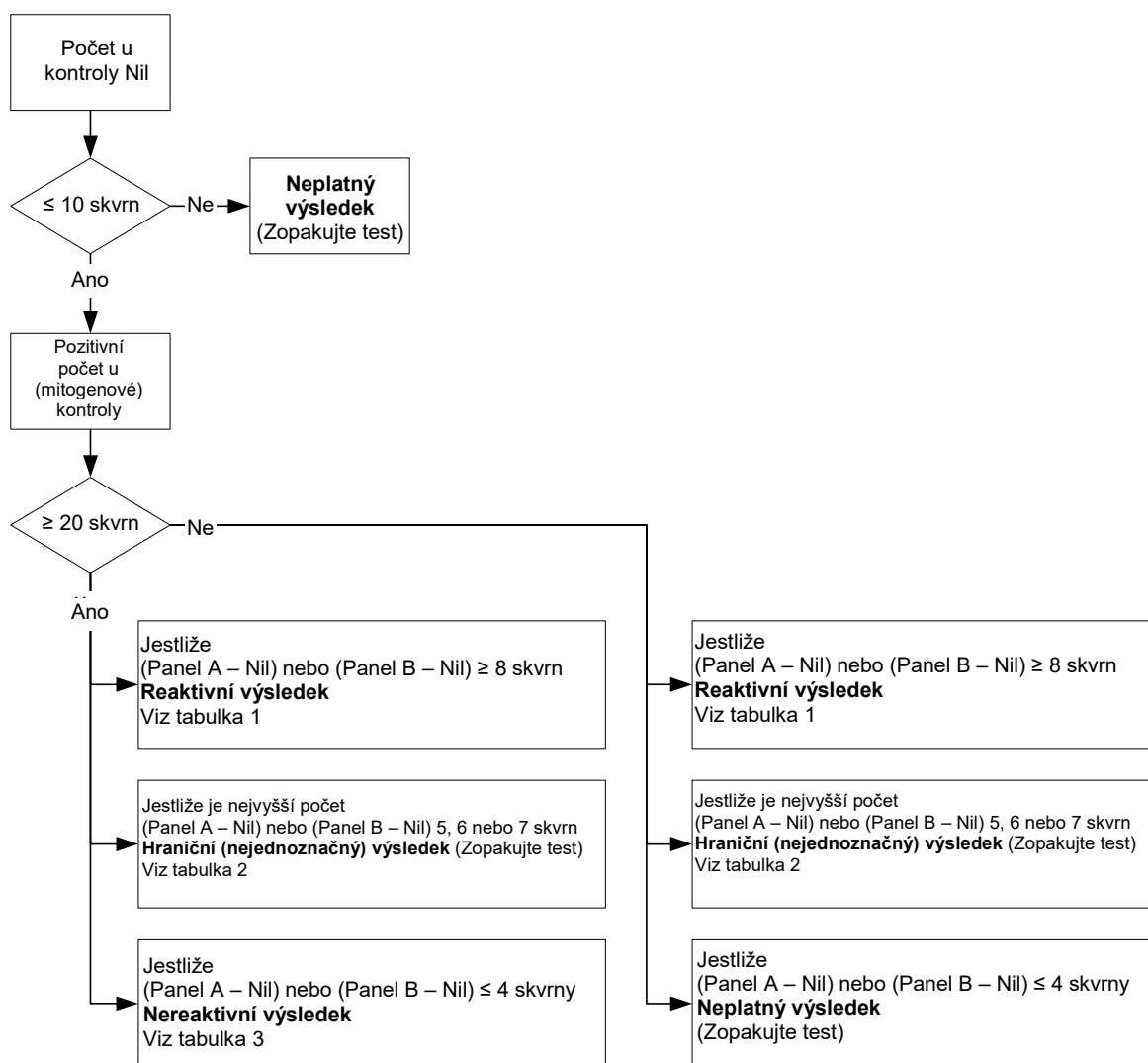
Před použitím následujících kritérií si přečtete část Kontrola kvality.

Výsledky testu T-SPOT.COVID se interpretují odečtením počtu skvrn v jamce s kontrolou Nil od počtu skvrn v každém z panelů podle následujícího algoritmu:

- Výsledek testu je reaktivní v případě, že (Panel A – Nil) a/nebo (Panel B – Nil)  $\geq 8$  skvrn.
- Výsledek testu je nereaktivní v případě, že (Panel A – Nil) a (Panel B – Nil)  $\leq 4$  skvrny. To zahrnuje i hodnoty menší než nula.
- Výsledky, u nichž je nejvyšší počet skvrn pro Panel A nebo Panel B takový, že počet skvrn (Panel minus Nil) je 5, 6 nebo 7 skvrn, by měl být považován za hraniční (nejednoznačný) a doporučuje se opakované testování odběrem dalšího vzorku od pacienta.
- Pokud je výsledek nadále hraniční (nejednoznačný) i při opakovaném testování s dalším vzorkem, měly by se použít další diagnostické testy a/nebo epidemiologické informace, které by pomohly stanovit adaptivní nebo buňkami zprostředkovanou imunitní odpověď na současnou či předchozí infekci SARS-CoV-2.
- **„Reaktivní“ výsledek označuje, že vzorek obsahuje efektorové T-lymfocyty senzitizedované na SARS-CoV-2.**
- **„Nereaktivní“ výsledek označuje, nebyly detekovány žádné efektorové T-lymfocyty senzitizedované na SARS-CoV-2.**

Interpretační algoritmus je popsán v následujícím vývojovém diagramu (obrázek 3) a tabulkách 1–3. Tento algoritmus také zahrnuje kritéria kontroly kvality.

**Obrázek 3.** Vývojový diagram algoritmu.



**Tabulka 1.** Reaktivní interpretace: (Panel A minus Nil) nebo (Panel B minus Nil)  $\geq 8$  skvrn.

Kontrola Nil - počet v jamce	Buď Panel A <b>nebo</b> Panel B má následující počet skvrn <sup>†</sup>	Interpretace výsledku
0	$\geq 8$	<b>Reaktivní</b>
1	$\geq 9$	<b>Reaktivní</b>
2	$\geq 10$	<b>Reaktivní</b>
3	$\geq 11$	<b>Reaktivní</b>
4	$\geq 12$	<b>Reaktivní</b>
5	$\geq 13$	<b>Reaktivní</b>
6	$\geq 14$	<b>Reaktivní</b>
7	$\geq 15$	<b>Reaktivní</b>
8	$\geq 16$	<b>Reaktivní</b>
9	$\geq 17$	<b>Reaktivní</b>
10	$\geq 18$	<b>Reaktivní</b>
>10 skvrn	nevztahuje se	<b>Neplatný**</b>

<sup>†</sup>Poznámka: Ke stanovení výsledku testu je nutné použít nejvyšší počet skvrn Panel - Nil.

**Tabulka 2. Hraniční (nejednoznačná) interpretace: Nejvyšší (Panel A mínus Nil) nebo (Panel B mínus Nil) je 5, 6 nebo 7 skvrn.**

Kontrola Nil - počet v jamce	Nejvyšší počet pro Panel A nebo Panel B má následující počet skvrn	Interpretace výsledku
0	5, 6 nebo 7	<b>Hraniční (nejednoznačný)*</b>
1	6, 7 nebo 8	<b>Hraniční (nejednoznačný)*</b>
2	7, 8 nebo 9	<b>Hraniční (nejednoznačný)*</b>
3	8, 9 nebo 10	<b>Hraniční (nejednoznačný)*</b>
4	9, 10 nebo 11	<b>Hraniční (nejednoznačný)*</b>
5	10, 11 nebo 12	<b>Hraniční (nejednoznačný)*</b>
6	11, 12 nebo 13	<b>Hraniční (nejednoznačný)*</b>
7	12, 13 nebo 14	<b>Hraniční (nejednoznačný)*</b>
8	13, 14 nebo 15	<b>Hraniční (nejednoznačný)*</b>
9	14, 15 nebo 16	<b>Hraniční (nejednoznačný)*</b>
10	15, 16 nebo 17	<b>Hraniční (nejednoznačný)*</b>
>10 skvrn	nevztahuje se	<b>Neplatný**</b>

**Tabulka 3. Negativní interpretace: (Panel A mínus Nil) i (Panel B mínus Nil) ≤ 4 skvrny.**

Kontrola Nil - počet v jamce	Panel A i Panel B má následující počet skvrn	Interpretace výsledku
0	≤ 4	<b>Nereaktivní</b>
1	≤ 5	<b>Nereaktivní</b>
2	≤ 6	<b>Nereaktivní</b>
3	≤ 7	<b>Nereaktivní</b>
4	≤ 8	<b>Nereaktivní</b>
5	≤ 9	<b>Nereaktivní</b>
6	≤ 10	<b>Nereaktivní</b>
7	≤ 11	<b>Nereaktivní</b>
8	≤ 12	<b>Nereaktivní</b>
9	≤ 13	<b>Nereaktivní</b>
10	≤ 14	<b>Nereaktivní</b>
>10 skvrn	nevztahuje se	<b>Neplatný**</b>

\*Výsledky, u nichž je nejvyšší počet skvrn pro Panel A nebo Panel B takový, že počet skvrn (Panel mínus Nil) je 5, 6 nebo 7 skvrn, by měl být považován za hraniční (nejednoznačný) a doporučuje se opakované testování odběrem dalšího vzorku od pacienta.

\*\* V případě, že jsou výsledky neplatné, měly by se uvádět jako „Neplatný“ a doporučuje se odebrat další vzorek a u dané osoby test zopakovat.

## 7. OMEZENÍ

- Odchytky od návodu k použití uvedeného v této příbalové informaci mohou mít za následek chybné výsledky.
- Nesprávná funkčnost testu může být příčinou falešně reaktivních nebo falešně nereaktivních odpovědí.
- Falešný nereaktivní výsledek může být způsoben nesprávným odběrem vzorky krve nebo nesprávným zacházením se vzorkem, což má vliv na funkci lymfocytů.
- Funkčnost testu T-SPOT.COVID, s použitím nebo bez použití činidla T-Cell Xtend, nebyla dostatečně vyhodnocena se vzorky od osob mladších 18 let, u těhotných žen a u pacientů s hemofilii.
- Falešně reaktivní výsledek může být získán u testu T-SPOT.COVID v případě testování u subjektů dříve vystavených SARS-CoV-1 a dalších podobných koronavirů. Pokud existuje podezření na tyto infekce, je zapotřebí použít alternativní testy. Tato souprava byla testována pomocí aktuálně dostupných vzorků. Funkčnost s novými mutacemi SARS-CoV-2 dosud nebyla vyhodnocena.
- Výsledky zjištěné pomocí testu T-SPOT.COVID musí být použity společně s posouzením epidemiologické anamnézy každé osoby, aktuálního zdravotního stavu a výsledků dalších diagnostických vyhodnocení.
- Nereaktivní výsledek testu nevylučuje možnost expozice či infekce virem SARS-CoV-2. U pacientů, kteří byli nedávno v kontaktu s osobami infikovanými SARS-CoV-2, vykazujících nereaktivní výsledek testu T-SPOT.COVID,

by mělo být zvaženo opakované testování během 2 týdnů, pokud další relevantní klinické příznaky ukazují na možnou infekci.

- Reaktivní výsledek testu nevylučuje infekci SARS-CoV-2 nebo onemocnění COVID-19 a může být důsledkem očkování proti SARS-CoV-2; k potvrzení diagnózy onemocnění COVID-19 by měly být provedeny další testy, např. PCR nebo antigenní testování. Reaktivní test nemusí nezbytně znamenat imunitu vůči SARS-CoV-2.
- Použití chlazených a zmrazených vzorků se u testu T-SPOT.COVID nedoporučuje.

## OMEZENÍ TÝKAJÍCÍ SE POUŽITÍ ČINIDLA T-CELL XTEND

1. Činidlo T-Cell *Xtend* nebylo vyhodnoceno k jinému použití než s testy T-SPOT.
2. Vzorky plné krve nechladte ani nezmrazujte. Vzorky krve uchovávejte a přepravujte do laboratoře při teplotě 18–25 °C.
3. Jakékoli odchylky od doporučených postupů pro pipetování, promývací techniky, doby a/nebo teploty inkubace mohou ovlivnit výsledky testu.

## 8. FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Prahová hodnota testu T-SPOT.COVID byla předem stanovena během vývoje s použitím analýzy křivky ROC (Receiver Operating Characteristic). Bylo zjištěno, že maximální rozlišení mezi osobami s pozitivním výsledkem potvrzeným PCR a osobami s nízkým rizikem infekce, činí 6 skvrn. Kromě toho byla stanovena hraniční oblast 5–7 skvrn, aby se pokryly odchylky testu a neurčitost v okolí prahové hodnoty.

### ANALYTICKÉ FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Interference heterofilními protilátkami nebo vlastním interferonem gamma (IFN- $\gamma$ ) ve vzorku krve je minimalizována oddělením a promytím frakce PBMC z plné krve. Tím se odstraní množství interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) na pozadí, dalších interferujících součástí plazmy, hemoglobinu a případných heterofilních protilátek.

Očekává se, že leukocyty budou produkovat kromě interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) i další cytokiny, včetně IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ , IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ . U těchto byla prozkoumána zkřížená reaktivita s dvojicí protilátek použitých v testu T-SPOT.COVID. Výsledky prokázaly, že dvojice protilátek použitých v testu T-SPOT.COVID nevykazovala zkříženou reaktivitu s dalšími cytokiny.

Variabilita mezi testy byla analyzována porovnáním cyklu testu T-SPOT.COVID na stejné destičce se stejným pracovníkem. Tři pracovníci provedli experimenty na devíti destičkách, jejichž výsledky byly v reprezentativním rozmezí procent variačního koeficientu (CV) inherentní odchylky v testu. Rozmezí získané pro vysoké počty skvrn ( $210,4 \pm 11,6$ ) bylo mezi 2,2 % až 7,7 % CV (průměrné % CV = 4,4), střední počty skvrn ( $71,2 \pm 8,5$ ) daly rozmezí 6,6 % až 16,5 % CV (průměrné % CV = 11,0 %), zatímco počet skvrn blízký se prahové hodnotě (průměrný počet skvrn =  $5,7 \pm 1,3$ ) poskytl průměrné % CV = 22,0 %.

Byly shromážděny údaje o přesnosti v rámci testu, kdy byly použity tři šarže souprav třemi různými pracovníky, kteří provedli šestkrát testy se třemi stejnými vzorky. Variační koeficient změřený u těchto tří vzorků, tří pracovníků a tří šarží činil 3,7 % u vzorků dávajících průměrný počet skvrn 210,4. U počtu skvrn blízkým se prahové hodnotě testu T-SPOT.COVID činila odchylka mezi testy 25,0 %. U středních úrovní počtu skvrn byla průměrná hodnota % CV 13,9 %. Výsledky % CV byly konzistentní pro každou testovanou šarží.

Reprodukovatelnost mezi pracovníky byla vyhodnocena s použitím tří pracovníků a jedné destičky z každé ze tří šarží testu. Pozorovaná odchylka mezi pracovníky byla 3,6–5,8 % CV.

### CHARAKTERISTIKY KLINICKÉ FUNKČNOSTI

Byla provedena studie s použitím předem stanovené prahové hodnoty 6 skvrn (data jsou evidována), k vyhodnocení klinické funkčnosti testu T-SPOT.COVID u infekce SARS-CoV-2 potvrzené pomocí PCR (s využitím asymptomatických i symptomatických subjektů) za účelem posouzení funkčnosti testu u osob s akutní infekcí nebo konvalescentních subjektů. Dále byla funkčnost testu vyhodnocena u subjektů účastnících se studie, u nichž bylo relativní riziko infekce považováno za nízké. Všechny vzorky byly testovány pomocí sérologického testu anti-N IgG (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG)) jako komparátoru pro test T-SPOT.COVID.

Do studie bylo zařazeno celkem 281 subjektů, kteří splnili kritéria pro zařazení. Z těchto bylo 169 subjektů zařazeno do skupiny s infekcí SARS-CoV-2 potvrzenou PCR testem (pozitivní kohorta). Z těchto byl jeden subjekt vyloučen v důsledku nízkého buněčného zotavení, a 17 v důsledku chybějících výsledků sérologie, což znamenalo, že zbylo 151 subjektů k analýze.

Celkem 112 subjektů bylo zařazeno do kohorty s nízkým rizikem, přičemž z 4 nebyly k dispozici potvrzovací sérologické výsledky a 6 dalších subjektů bylo vyloučeno po pozitivním potvrzovacím sérologickém testu. Zbylo tedy 102 subjektů, z nichž jeden vzorek byl vyloučen z důvodu nízkého buněčného zotavení, a jeden z důvodů technických problémů s testem T-SPOT.COVID. Do analýzy tak bylo zahrnuto 100 subjektů s nízkým rizikem.

Demografické údaje subjektů v kohortě s PCR potvrzenou infekcí a v kohortě s nízkým rizikem jsou shrnuty níže:

Kohorta	PCR potvrzená infekce SARS-CoV-2	Nízké relativní riziko infekce
Počet subjektů	168	100
Průměrný věk (roky) (SD)	50,5 (15,2) v rozmezí 19–83	54,7 (15,7) v rozmezí 18–87
% mužů	38,7 % (65/168)	36,0 % (36/100)
Průměrná doba od prvního pozitivního PCR testu (dny) (rozmezí)	83,4 (0,249)	Nevztahuje se
% symptomatických	95,8 % (161/168)	Nevztahuje se

#### SHODA POZITIVNÍCH VZORKŮ MEZI OSOBAMI S INFEKCI POTVRZENOU PCR

151 pacientů, identifikovaných předchozími PCR testy jako pozitivní na SARS-CoV-2, bylo vyhodnoceno pomocí testu T-SPOT.COVID a sérologického testu anti-N IgG. Časový bod od prvního záznamu výsledku PCR testu byl od 2 dní do 249 dní. V této kohortě nebyly žádné výsledky testu T-SPOT.COVID neplatné.

**Tabulka 4.** Procentní shoda pozitivních vzorků s PCR v průběhu času zahrnovala všechny výsledky z testu T-SPOT.COVID i sérologického testu anti-N IgG s použitím prahové hodnoty reaktivity 6 skvrn a ignorováním hraniční oblasti (hraniční hodnoty zahrnuty).

Počet dní od prvního pozitivního PCR testu	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Procentní shoda pozitivních vzorků	95 % CI	Procentní shoda pozitivních vzorků	95 % CI
0–6	100,0 % (1/1)	2,5–100,0 %	0,0 % (0/1)	–
7–13	100,0 % (4/4)	39,8–100,0 %	25,0 % (1/4)	6,3–80,6 %
14–30	92,9 % (13/14)	66,1–99,8 %	64,3 % (9/14)	35,1–87,2 %
31–60	92,0 % (69/75)	83,4–97,0 %	80,0 % (60/75)	69,2–88,4 %
<b>Celkem ≤ 60</b>	<b>92,6 % (87/94)</b>	<b>85,3–97,0 %</b>	<b>74,5 % (70/94)</b>	<b>64,4–82,9 %</b>
61–120	84,0 % (21/25)	63,9–95,5 %	76,0 % (19/25)	54,9–90,6 %
121–180	80,0 % (12/15)	51,9–95,7 %	20,0 % (3/15)	4,3–48,1 %
181–240	75,0 % (12/16)	47,6–92,7 %	0,0 % (0/16)	–
>240	100,0 % (1/1)	2,5–100,0 %	0,0 % (0/1)	–
<b>Celkem &gt; 60</b>	<b>80,7 % (46/57)</b>	<b>68,1–90,0 %</b>	<b>38,6 % (22/57)</b>	<b>26,0–52,4 %</b>

**Tabulka 5.** Procentní shoda pozitivních vzorků s PCR v průběhu času zahrnovala všechny výsledky z testu T-SPOT.COVID i anti-N IgG sérologického testu, s využitím pouze reaktivních a nereaktivních výsledků pro test T-SPOT.COVID (tj. s vyloučením výsledků v hraniční oblasti).

Počet dní od prvního pozitivního PCR testu	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Procentní shoda pozitivních vzorků	95 % CI	Procentní shoda pozitivních vzorků	95 % CI
0–6	100,0 % (1/1)	2,5–100,0 %	0,0 % (0/1)	–
7–13	100,0 % (4/4)	39,8–100,0 %	25,0 % (1/4)	6,3–80,6 %
14–30	100,0 % (12/12)	73,5–100,0 %	75,0 % (9/12)	42,8–94,5 %
31–60	95,7 % (67/70)	88,0–99,1 %	82,9 % (58/70)	72,0–90,8 %
<b>Celkem ≤ 60</b>	<b>96,6 % (84/87)</b>	<b>90,3–99,3 %</b>	<b>78,2 % (68/87)</b>	<b>68,0–86,3 %</b>
61–120	90,5 % (19/21)	69,6–98,8 %	85,7 % (18/21)	63,7–97,0 %
121–180	83,3 % (10/12)	51,6–97,9 %	16,7 % (2/12)	2,1–48,4 %
181–240	71,4 % (10/14)	41,9–91,6 %	0,0 % (0/14)	–
>240	100,0 % (1/1)	2,5–100,0 %	0,0 % (0/1)	–
<b>Celkem &gt; 60</b>	<b>83,3 % (40/48)</b>	<b>69,8–92,5 %</b>	<b>41,7 % (20/48)</b>	<b>27,6–56,8 %</b>

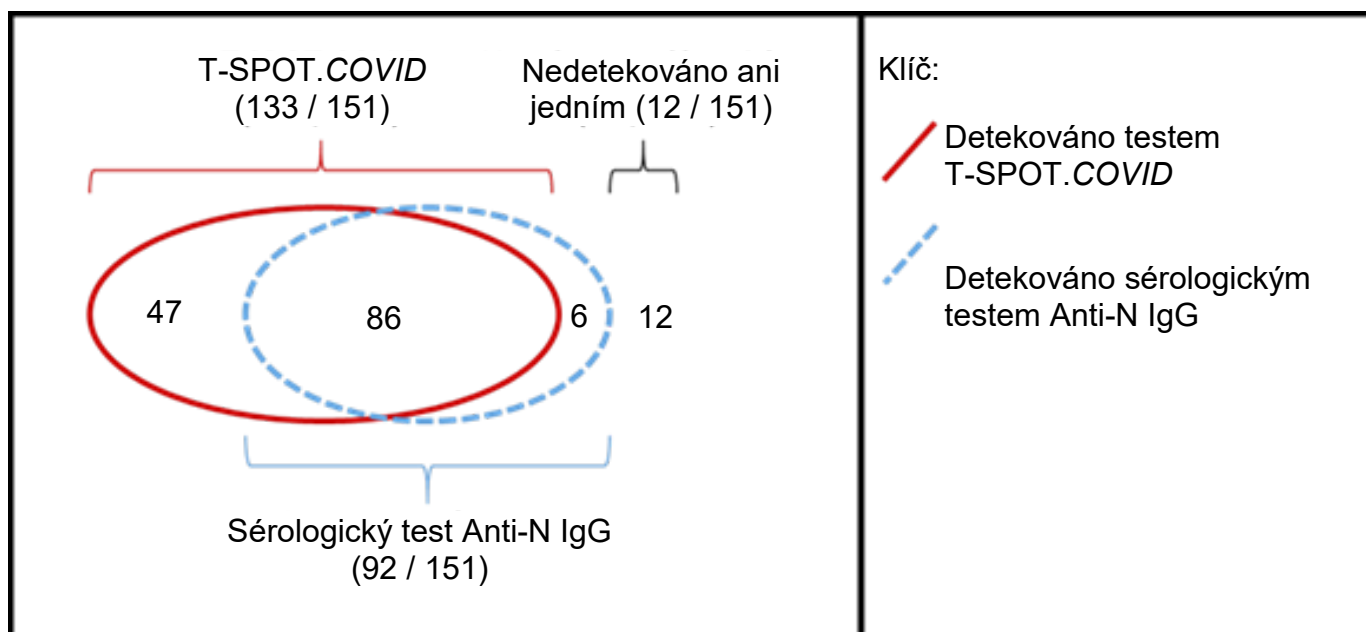
Tyto údaje ukazují procentní shodu pozitivních vzorků mezi testem T-SPOT.COVID a PCR testem 92,6 % (96,6 % s vyloučením hraničních výsledků) až do 60 dní po pozitivním výsledku PCR testu. Po tomto časovém bodě procentní shoda mírně klesá. Pro časové body nad 60 dní od výsledku PCR testu byla procentní shoda pozitivních vzorků 80,7 % (83,3 % s použitím pouze určitelných výsledků).

Celkově tyto údaje ukazují procentní shodu pozitivních vzorků mezi sérologickým testem anti-N IgG a PCR testem

74,5 % až do 60 dní po pozitivním výsledku PCR testu. Po tomto časovém bodě procentní shoda klesá. Pro časové body nad 60 dní od výsledku PCR testu byla procentní shoda pozitivních vzorků pro sérologii anti-N IgG 38,6 %.

Stejné údaje byly dále analyzovány za účelem stanovení, zda byl u kterýchkoli pacientů s negativním výsledkem sérologického testu anti-N IgG zjištěn reaktivní výsledek testu T-SPOT.COVID a naopak. Údaje jsou prezentovány na Vennově diagramu níže (obrázek 4) ke znázornění toho, jak se mohou vzájemně doplňovat údaje T-lymfocytů a sérologie.

**Obrázek 4.** Distribuce reaktivních/pozitivních výsledků mezi testem T-SPOT.COVID a anti-N IgG sérologickým testem u subjektů s infekcí SARS-CoV-2 potvrzenou PCR testem (n = 151).



Ze 151 PCR pozitivních vzorků na SARS-CoV-2 testovaných pomocí testu T-SPOT.COVID bylo negativních u 18 vzorků, zatímco sérologický test anti-N IgG byl negativní u 59 vzorků. Test T-SPOT.COVID byl pozitivní u 79,7 % (47/59) vzorků negativních dle sérologického testu anti-N IgG. Sérologický test anti-N byl pozitivní u 6 z 18 případů, kdy byl test T-SPOT.COVID negativní. Tyto údaje ukazují, že kombinace sérologické a ELISPOT analýzy T-lymfocytů je užitečná při stanovení stavu infekce SARS-CoV-2.

### SHODA NEGATIVNÍCH VZORKŮ MEZI ÚČASTNÍKY S NIŽŠÍM RELATIVNÍM RIZIKEM INFEKCE

Do studie jsme zařadili kohortu účastníků, v endemickém prostředí, avšak u kterých bylo stanoveno nižší relativní riziko infekce SARS-CoV-2 na základě: (i) nepřítomnosti příznaků infekce SARS-CoV-2 hlášených samotnými pacienty, (ii) žádný předchozí pozitivní PCR test SARS-CoV-2 (iii) žádné předchozí zapojení se do klinického hodnocení očkování a bez očkování vakcínou proti COVID-19 a (iv) negativní sérologický test anti-N slaterální průtokovou imunochromatografií (souprava Biohit SARS-CoV-2 IgM/IgG Antibody Test Kit) použitý jako primární screeningový test v době zařazení a (iv) potvrzení negativního sérologického testu pomocí laboratorního sérologického testu (sérologický test anti-N IgG (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG))).

**Tabulka 6.** Procentní shoda negativních vzorků.

	N	Pozitivní	Negativní	Shoda negativních vzorků (%) (95 % CI)
Včetně hraniční oblasti	100	3	97	97,0 % (91,5–99,4)
Bez hraniční oblasti	98	2	96	98,0 % (92,8–99,8)

97,0 % výsledků testu T-SPOT.COVID (97/100) mělo nižší hodnotu, než je prahová hodnota 6 skvrn (95 % intervaly spolehlivosti 91,5–99,4 %). Dva výsledky byly hraniční (5 a 7 skvrn). Pokud byly tyto výsledky vyloučeny, 98,0 % (92,8–99,8 % CI) výsledků testu T-SPOT.COVID (96/98) bylo nereaktivních. Nebyly zde žádné neplatné výsledky.

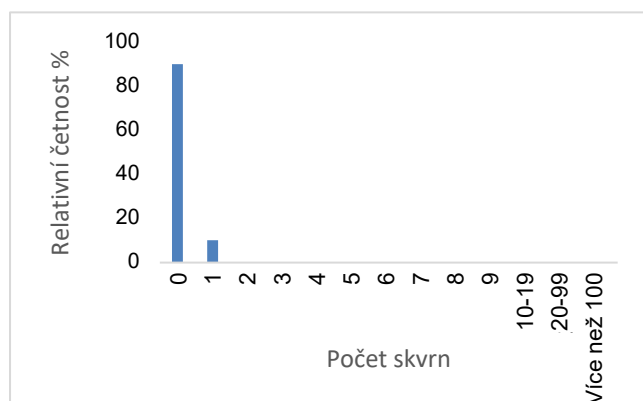
Přestože jsme podnikli veškeré patřičné kroky k zajištění, aby tato kohorta byla složena ze subjektů s nízkým rizikem infekce, nemůžeme vyloučit možnost, že určitá část této skupiny měla nebo stále má asymptomatickou infekci, která byla v okamžiku testování séronegativní, ale u nichž byl test T-SPOT.COVID schopen detekovat odpověď T-lymfocytů.



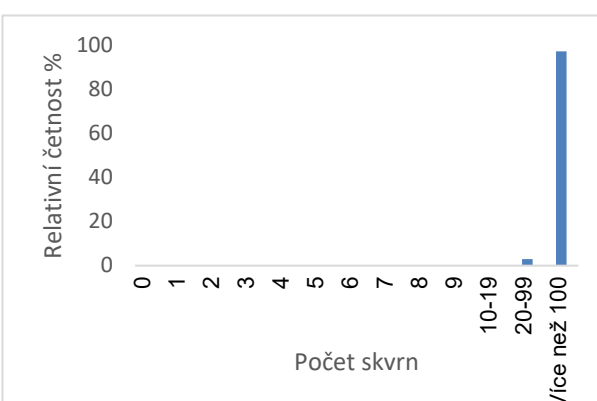
## 9. OČEKÁVANÉ HODNOTY

Rozmezí počtu skvrn zjištěných v odpovědi na antigeny kontroly Nil a pozitivní kontroly a antigeny SARS-CoV-2, které byly pozorovány v našich klinických studiích (podrobnosti o kohortách klinické studie viz část 8) je znázorněno na obrázcích 5a a 5b.

**Obrázek 5a.** Histogram odpovědí na kontrolu NIL od všech subjektů ve studii (n = 251).



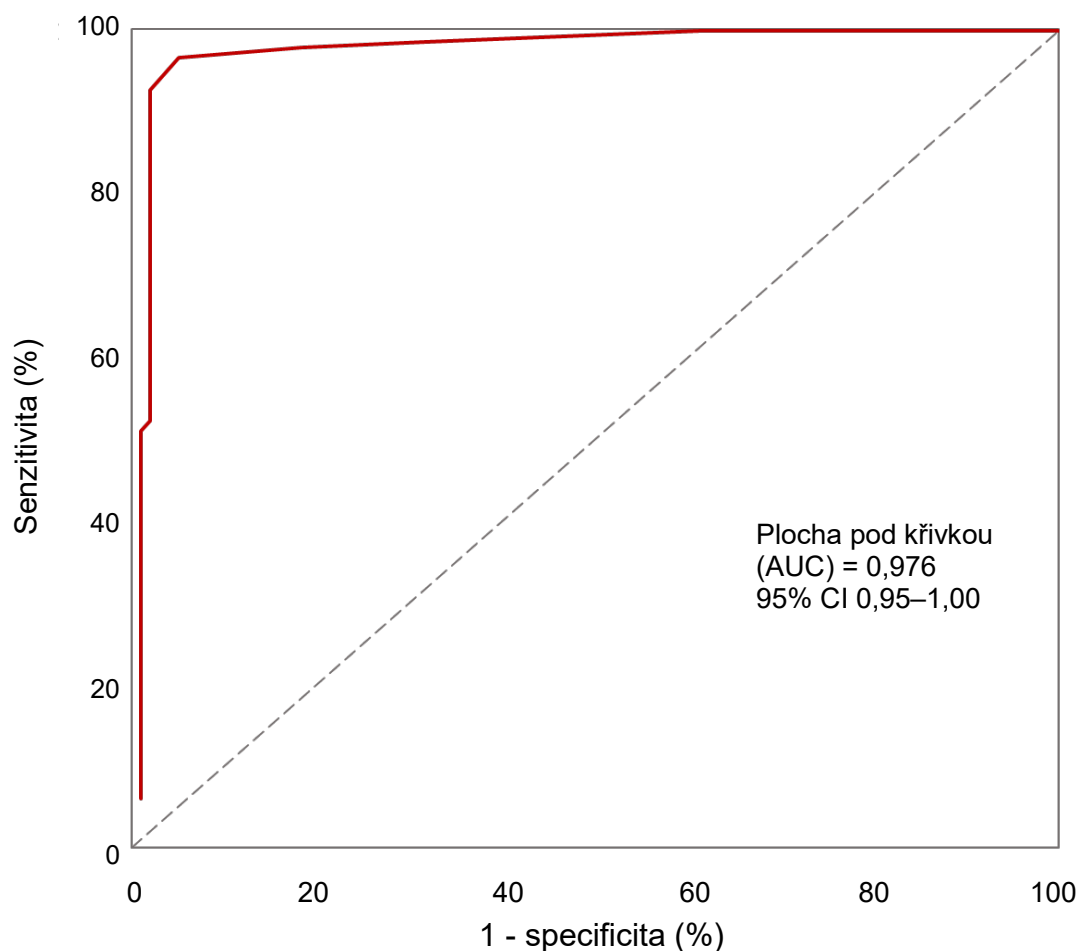
**Obrázek 5b.** Histogram odpovědí na pozitivní kontrolu od všech subjektů ve studii (n = 251).



Naprostá většina jamek s kontrolou Nil vykazala nulový počet skvrn a žádný počet skvrn nebyl vyšší než u kontroly Nil. Odpovědi na pozitivní kontrolu byly robustní a žádné výskyty počtu skvrn nižších než 20 nebyly u pozitivní kontroly pozorovány.

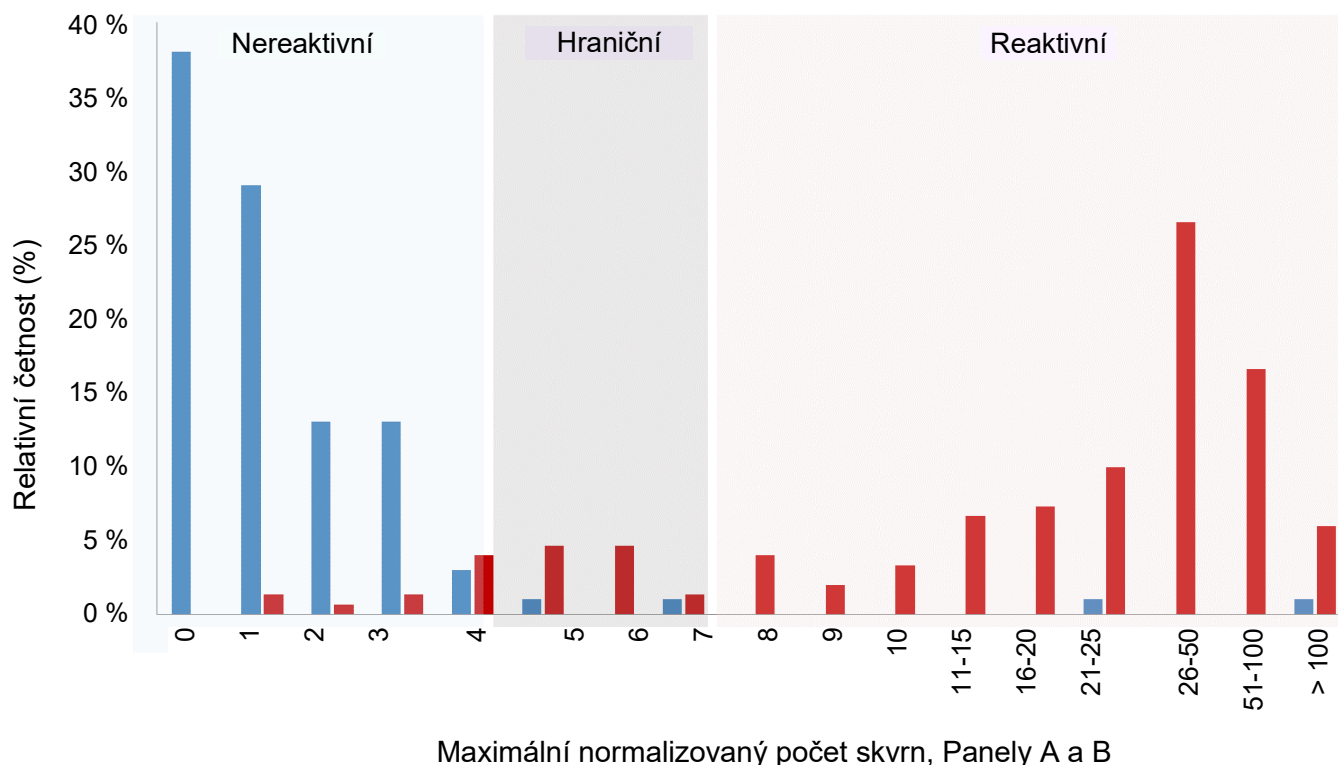
Prahová hodnota testu byla potvrzena během klinických studií. Na obrázku 6 je znázorněna křivka ROC vytvořená pomocí údajů získaných během klinických studií. Prahová hodnota 6 skvrn poskytla maximální oddělení těchto dvou kohort, což znamenalo validaci předem zvolené úrovně.

**Obrázek 6.** Křivka ROC vytvořená s použitím validačních údajů vytvořených od 151 subjektů s potvrzením pomocí PCR testu (použitých k odhadu citlivosti) a 100 subjektů s nižším relativním rizikem infekce (použitých k odhadu specifity).



Stejné údaje byly také použity k potvrzení přínosu zařazení hraniční oblasti, jak je znázorněno na obrázku 7.

**Obrázek 7.** Graf znázorňující distribuci počtu skvrn pozorovaných u testu T-SPOT.COVID v klinických studiích prováděných v USA s překryvem instruovaných interpretačních kritérií testu. „Max. normalizovaný počet skvrn“ je maximální počet (panel minus nula) odpovědí u Panelu A nebo Panelu B (n = 251). Relativní četnost různých počtů skvrn je znázorněna pro kohortu s nižším rizikem (modré sloupce) a pro kohortu s potvrzením pomocí PCR testu (červené sloupce).



Většina subjektů v kohortě s nižším rizikem (modré sloupce) vykázala žádnou až nízkou úroveň reaktivity s 96,0 % v rámci rozmezí 0–4 skvrny. Subjekty s PCR potvrzenou infekcí (červené sloupce) vykázala vysoké úrovně reaktivity s 23,2 % v rozmezí 8–20 skvrn a většinovým počtem (58,9 %) > 20 skvrn. Oblast s šedým pozadím představuje nejednoznačnou hraniční oblast (5, 6 nebo 7 skvrn), kde, jak se očekávalo, je pozorován překryv mezi distribucemi počtu skvrn obou kohort studie. Veškeré testy s výsledky v rámci této oblasti by měly být zopakovány.

## 10. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Tento test by se měl provádět v souladu se zásadami správné laboratorní praxe a za přísného dodržování tohoto návodu k použití.

### HRANIČNÍ (NEJEDNOZNAČNÉ) VÝSLEDKY

Hraniční (nejednoznačné) výsledky jsou takové, u nichž maximum ze dvou výsledků (Panel minus Nil) počtů skvrn spadá do množiny  $\pm 1$  spotu od prahové hodnoty testu stanovené dle ROC, což je  $\geq 6$  skvrn. Přestože jsou hraniční (nejednoznačné) výsledky platné, jsou méně spolehlivé než výsledky, u nichž byl počet skvrn více vzdálen od prahové hodnoty. Proto se doporučuje zopakování testu pacienta s použitím nového vzorku. Pokud je výsledek při opakovaném testu stále hraniční (nejednoznačný), je nutné použít další diagnostické testy a/nebo epidemiologické informace, které pomohou stanovit stav imunity pacienta.

### NEPLATNÉ VÝSLEDKY

Neplatné výsledky jsou méně časté a mohou souviset se stavem imunity testované osoby. Mohou také souviset s mnoha technickými faktory, potenciálně vedoucími k výsledkům „vysoké pozadí“, „nízký mitogen“ a „vysoký NIL“:

- Použití nevhodných zkumavek na odběr krve.
- Uchovávání krve po delší dobu než 8 hodin před zpracováním bez použití činidla T-Cell Xtend.
- Uchovávání krve mimo doporučený rozsah teplot před zpracováním vzorků krve.
- Kontaminace buněčného kultivačního média.
- Nedokonalé promytí destiček.











U neplatných výsledků se doporučuje zopakovat test s použitím nového vzorku pacienta. Pro nejzásadnější body řešení potíží jsou k dispozici technické dokumenty. Můžete je získat kontaktováním společnosti Oxford Immunotec.

## 11. ZKRATKY A VYSVĚTLIVKY ZNAČEK

### Zkratky

AUC	Oblast pod křivkou
BCIP/NBT	5-brom, 4-chlor, 3-indoylfosfát/nitrotetrazoliová modř
CDC	Centra pro kontrolu a prevenci nemocí
CI	Interval spolehlivosti
CLIA	Dodatky pro zkvalitnění klinické laboratorní techniky
CPT	Zkumavky pro přípravu buněk
CV	Variační koeficient
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme Linked Immunospot Assay
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
PBMC	Jednojaderné buňky z periferní krve
PBS	Fyziologický roztok pufovaný fosfátem
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PHA	Fytohemagglutinin
RCF	Relativní odstředivá síla
RoC	Křivka ROC (Receiver Operating Characteristic)
RPM	Otáčky za minutu
RT-PCR	Reverzní transkripce s následným PCR
TNF	Tumor nekrotizující faktor

### Slovník značek

	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>
	Datum použití/expirace (rok-měsíc-den)
	Číslo šarže
	Katalogové číslo
	Upozornění, konzultujte návod k použití
	Datum výroby
	Výrobce
	Omezení teploty/Teplota uchovávání
	Čtete návod k použití
	Oprávněný zástupce pro EU

BS EN ISO 15223-1:2016

Značky použité pro test T-SPOT.COVID splňují mezinárodní normu EN ISO 15223-1:2016; 'Zdravotnické prostředky – Značky pro štítky, označování a informace poskytované se zdravotnickými prostředky'.

## 12. LITERATURA

1. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed.* 2020; 91(1): 157–160.
2. Ravi N, Cortade DL, Ng E, Wang SX. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. *Biosensors and Bioelectronics.* 2020; doi: 10.1016/j.bios.2020.112454.
3. Woloshin S, Patel N, Kesselheim AS. False negative tests for SARS-CoV-2 infection – challenges and implications. *N Eng J Med.* 2020; 383: e38.
4. Yang Y, Yang M, Shen C, *et al.* Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. *medRxiv.* 2020; doi: 10.1101/2020.02.11.20021493v2.
5. Zhao J, Yuan Q, Wang H, *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020.
6. Centers for Disease Control and Prevention. COVID-19: Test for current infection. *CDC.* 2020.
7. Watson J, Richter A. Testing for SARS-CoV-2 antibodies. *BMJ.* 2020; 370: m3325.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidelines for COVID-19 antibody testing in clinical and public health settings. *CDC.* 2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html> (podle přístupu z února 2021).
9. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P *et al.* Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med.* 2020; 383: 1724–1734.
10. Altmann DM, Boyton RJ. SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection. *Sci Immunol.* 2020; 5: eabd6160.
11. Piccoli L, Park YJ, Tortorici *et al.* Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell;* 183(4): 1024–1042.

12. Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y *et al.* Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *J Allergy Clin Immunol.* 2020; 147(2): 545–557.
13. Long QX, Tang XJ, Shi QL *et al.* Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nature Medicine.* 2020; 26:1200–1204.
14. Ibarrondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D *et al.* Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild Covid-19. *N Engl J Med.* 2020; 383: 1085–1087.
15. Zuo J, Dowell A, Pearce H *et al.* Robust SARS-CoV-2-specific T-cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.11.01.362319.
16. Le Bert N, Tan AT, Kunasgaran K *et al.* SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature.* 2020; 584: 457–462.
17. Dan JM, Mateus J, Kato Y *et al.* Immunological memory of SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science.* 2021; 371(587).
18. Tan AT, Linster M, Tan CW *et al.* Early induction of functional SARS-CoV-2 specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Reports.* 2021; 34(6).
19. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021; 184(4): 861–880.
20. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP *et al.* Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol.* 2020; 5(48).
21. Zhao Q, Meng M, Kumar R *et al.* Lymphopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases.* 2020; 96: 131–135.
22. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM *et al.* Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and association with age and disease severity. *Cell.* 2020; 183(4): 996–1012.
23. Wyllie D, Mulchandani R, Jones HE *et al.* SARS-CoV-2 Reactive T cell numbers are associated with protection from COVID-19: A prospective cohort study. *medRxiv.* doi: 10.1101/2020.11.02.20222778.
24. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O *et al.* Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell.* 2020; 183(1):158–168.
25. Gallais F, Aurelie V, Wendling MJ *et al.* Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 induces cellular immune responses without seroconversion. *Emerging Infectious Diseases.* 2021; 27(1): 113–121.
26. McMahan K, Yu J, Mercado NB *et al.* Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature.* 2020. doi: 10.1038/s41586-020-03041-6.
27. Sauer K, Harris T. An effective COVID-19 vaccine needs to engage T cells. *Front. Immunol.* 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.581807>.
28. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E *et al.* COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and Th1 responses. *Nature.* 2020; 586: 594–599.
29. Jackson LA, Anderson EJ, Rouphael NG *et al.* An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 – Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2020; 383: 1920–1931.
30. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK *et al.* Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomized controlled trial. *The Lancet.* 2020; 396(10249): 467–478.
31. Koller MD, Kiener HP, Aringer M, Graninger WB, Meuer S, Samstag Y, Smolen JS. Functional and molecular aspects of transient T cell unresponsiveness: role of selective interleukin-2 deficiency. *Clin Exp Immunol.* 2003; 132(2): 225–231.
32. Kouwenhoven M, Ozenci V, Teleshova N *et al.* Enzyme-linked immunospot assays provide a sensitive tool for detection of cytokine secretion by monocytes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 2001; 8(6): 1248–1257.
33. Tanguay S, Killion J. Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994; 13: 259–263.
34. Cox JH, Ferrari G, Janetzki S. Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay. *Methods.* 2006; 38(4): 274–82.
35. Lehmann A, Kirchenbaum G, Zhang T, Reche P, Lehmann P. Deconvoluting the T cell response to SARS-CoV-2: specificity versus chance – and cognate cross-reactivity. *bioRxiv.* doi:10.1101/2020.11.29.402677.
36. Wei J, Zhao J, Han M, Meng F, Zhou J. SARS-CoV-2 infection in immunocompromised patients: humoral versus cell-mediated immunity. *Journal for Immunotherapy of Cancer.* 2020; 8(2).
37. Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, van Dissel JT, Theisen M, Andersen P and Ottenhoff T. Antigenic equivalence of Human T Cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and Culture Filtrate Protein 10 and to mixtures of synthetic proteins. *Infection and Immunity,* 2000; 68(6):

3314–3321.

38. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G and Hill AVS. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001; 163: 824–828.
39. NCCLS Approved Guideline. Performance of Single Cell Immune Response Assays, I/LA26-A.

## 13. KONTAKTNÍ ÚDAJE

Oxford Immunotec Ltd  
94C Innovation Drive, Milton Park,  
Abingdon, Oxfordshire, OX14 4RZ, UK  
Tel: +44 (0) 1235 442780

Soubory ke stažení produktové podpory a další technické informace naleznete na našich webových stránkách:  
[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

T-SPOT a T-Cell Xtend jsou registrované ochranné známky společnosti Oxford Immunotec Ltd.  
Logo Oxford Immunotec logo je registrovaná ochranná známka společnosti Oxford Immunotec Ltd.  
AIM V a GIBCO jsou registrované ochranné známky společnosti Life Technologies Corporation.  
CPT a Vacutainer jsou ochranné známky společností Becton, Dickinson and Company.  
Ficoll a Ficoll-Paque jsou registrované ochranné známky společnosti Cytiva, dceřiné společnosti Global Life Sciences Solutions USA LLC.  
Tween je registrovaná ochranná známka společnosti Croda Americas LLC.

Použití činidla T-Cell Xtend je chráněno následujícími patenty a probíhajícími patentovými řízeními:  
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Číslo revize: 1

Datum vydání: 30. duben 2021

© 2021 Oxford Immunotec. Všechna práva vyhrazena.

### Výrobce

Oxford Immunotec Ltd  
94C Innovation Drive, Milton Park, Abingdon Oxfordshire,  
OX14 4RZ, UK [www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

**EC REP** Oprávněný zástupce pro EU

Oxford Immunotec (Irsko)  
Unit 3d North Point House,  
North Point Business Park,  
New Mallow Road,  
Cork  
T23 AT2P



Oxford Immunotec Ltd  
94C Innovation Drive, Milton Park,  
Abingdon, Oxfordshire, OX14 4RZ, UK  
Tel: +44 (0) 1235 442780  
[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

