



T-SPOT[®] COVID



Oxford
Immunotec



PACKUNGSBEILAGE

Für *In-vitro*-Diagnosezwecke

Diese Packungsbeilage bezieht sich auf:

COV.435/300, COV.435/200

Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	3
Zusammenfassung und Erläuterung.....	3
Reagenzien und Lagerung	5
Lagerung und Stabilität	6
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	7
Probenentnahme und -handhabung	7
Gebrauchsanweisung.....	9
Einschränkungen	14
Leistungsmerkmale	15
Erwartete Werte	19
Fehlerbehebung	21
Abkürzungen und Erläuterung der Symbole	21
Literaturnachweise	22
Kontaktdaten.....	23

1. VERWENDUNGSZWECK

Der T-SPOT.COVID-Test ist eine standardisierte, auf ELISPOT (Enzyme Linked ImmunoSpot) basierte Methode zum qualitativen Nachweis einer zellvermittelten (T-Zell-)Immunantwort auf SARS-CoV-2 in menschlichem Vollblut (Natrium- oder Lithiumheparin). Der T-SPOT.COVID-Test dient zur Identifizierung von Personen mit einer adaptiven Immunantwort auf SARS-CoV-2, insbesondere einer T-Zell-Antwort. Dieser Test kann in Kombination mit serologischen Tests zur klinischen Beurteilung von Personen verwendet werden, bei denen ein Verdacht auf COVID-19 besteht, deren PCR-Test auf SARS-CoV-2 jedoch negativ ausfällt. Er ist dabei ergänzend zur Serologie gedacht.

Die Ergebnisse dienen zum Nachweis einer zellvermittelten (T-Zell-)Immunantwort auf SARS-CoV-2. Eine T-Zell-Antwort auf SARS-CoV-2 ist in der Regel innerhalb einiger Tage nach der ursprünglichen Infektion im Blut nachweisbar. Die Dauer der nachweisbaren Antwort nach einer Infektion ist derzeit nicht ausreichend bekannt.

Reaktive Ergebnisse für den T-SPOT.COVID-Test können infolge von Infektionen mit anderen ähnlichen Viren oder infolge einer vorangegangenen Impfung gegen SARS-CoV-2 auftreten.

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

SARS-CoV-2 ist ein Stamm des Coronavirus, der 2019 in der chinesischen Provinz Wuhan entdeckt wurde. Das Virus verbreitete sich innerhalb der ersten paar Monate des Jahres 2020 rasch auf der ganzen Welt und führte zur Erklärung einer Pandemie durch die WHO am 11. März 2020.¹ Einige molekularbasierte Tests wurden schnell entwickelt und sind mittlerweile weltweit verfügbar.² Sie werden nach wie vor weithin zur Bestätigung einer aktiven SARS-CoV-2-Infektion eingesetzt. Diese Tests wurden zunächst als hochempfindlich und spezifisch bezeichnet. Systematische Prüfungen von Studien aus der Praxis legen jedoch nahe, dass eine realistische Schätzung für die Sensitivität von molekularen Tests bei etwa 70 % liegt.^{3,4} Zhao *et al.* zufolge wurde von 173 Patienten, die mit akuten Atemwegsbeschwerden und einem für eine COVID-19-Erkrankung typischen Brust-CT stationär aufgenommen wurden, nur bei 67 % ein positives RT-PCR-Testergebnis anhand einer Atemwegsprobe innerhalb der Tage 1 bis 7 des Krankenhausaufenthalts erzielt.⁵ Dies legt nahe, dass falsch negative Ergebnisse bei einer akuten COVID-19-Erkrankung häufig vorkommen, wenn die Diagnose nur unter Verwendung von molekularen Tests erfolgt. Darüber hinaus können anhand von molekularen Tests keine Personen identifiziert werden, die mit dem Virus infiziert waren, mittlerweile aber wieder genesen sind.⁶ Aus diesem Grund wurden zahlreiche serologische Tests zum Nachweis von Antikörpern im Blut bzw. in den Blutprodukten von Personen mit einer vorangegangenen SARS-CoV-2-Infektion entwickelt. Diese Tests bieten wertvolle Informationen zur Prävalenz der Exposition gegenüber dem Virus in der allgemeinen Bevölkerung.^{2,7} Sie können jedoch auch ergänzend zu molekularen Tests bei der klinischen Diagnose einer akuten COVID-19-Erkrankung eingesetzt werden.⁸

Aus Studien geht hervor, dass eine adaptive Immunantwort in der Regel innerhalb von 2 Wochen nach einer SARS-CoV-2-Infektion eintritt. Allerdings wurde in einer Reihe von Studien festgestellt, dass eine Antikörperantwort nicht immer vorhanden ist bzw. verzögert auftreten kann.^{9,10} Dem derzeitigen Stand der Literatur zufolge entwickeln einige Personen mit positivem PCR-Test auf eine SARS-CoV-2-Infektion unter Umständen keine nachweisbare Antikörperantwort.⁹ Niedrige Werte von SARS-CoV-2-spezifischen Antikörpern wurden häufig bei Personen mit einer leichten oder asymptomatischen COVID-19-Erkrankung beobachtet.^{11,12} Es gibt auch Hinweise darauf, dass der Antikörperspiegel bei einigen Personen nach einer Infektion stark sinkt, sogar noch schneller als bisher bei MERS- und SARS-CoV-1-Infektionen beobachtet wurde.^{13,14}

Im Gegensatz dazu geht aus mehreren Veröffentlichungen hervor, dass T-Zell-Antworten auf menschliche Coronaviren, darunter SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2, robust und langanhaltend sein könnten.¹⁵ So ist bei einigen Personen mit einer 17 Jahre zurückliegenden SARS-CoV-1-Infektion noch heute eine T-Zell-Antwort nachweisbar.¹⁶ Einigen Studien zufolge wird die SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort auch 6 bis 9 Monate nach der primären Infektion aufrechterhalten. Dies weist darauf hin, dass T-Zell-Antworten vermutlich länger anhalten als transiente Antikörperantworten auf eine SARS-CoV-2-Infektion.^{15,17} Diese Erkenntnisse deuten gemeinsam mit Studien, in denen eine kritische Rolle für T-Zellen bei der Virenbeseitigung und Erholung von SARS-CoV-2 nachgewiesen wurde,¹⁸ darauf hin, dass die zellvermittelte Immunität ein wichtiger Aspekt der Immunantwort auf eine SARS-CoV-2-Infektion sein könnte.¹⁹ Zwar wurde die Dynamik der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass die Mehrheit der mit SARS-CoV-2 infizierten Personen funktionale, IFN-gamma (IFN- γ) produzierende SARS-CoV-2-T-Zellen entwickeln, die im peripheren Blut schon 2 bis 4 Tage nach dem Eintreten der Symptome nachgewiesen werden können.¹⁹ Tan *et al.* analysierten die Kinetik der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort während der akuten Phase der Infektion mit positivem RT-PCR-Test. Sie stellten fest, dass spezifische T-Zellen etwa 5 bis 7 Tage nach dem Eintreten der Symptome zum ersten Mal nachgewiesen wurden, wobei die Anzahl bis etwa Tag 15 progressiv anstieg.¹⁸ Sie beobachteten zudem einen positiven Zusammenhang zwischen dem frühen Nachweis SARS-CoV-2-spezifischer T-Zellen und einer frühzeitigen Infektionskontrolle, die einen leichteren Erkrankungsverlauf und eine rasche Virenbeseitigung zur Folge hat. In ähnlicher Weise belegten Weiskopf *et al.*, dass SARS-CoV-2-spezifische CD4- und CD8-T-Zellen im Blut von Patienten mit schwerem COVID-19-Verlauf innerhalb der ersten zwei Wochen nach dem Eintreten der Symptome nachgewiesen werden können.²⁰ Dies deutet darauf hin, dass

SARS-CoV-2-spezifische T-Zellen auch während der frühen Antwort auf die Infektion gebildet werden, obwohl SARS-CoV-2 Berichten zufolge zu Lymphopenie führt.²¹ Darüber hinaus geht aus einer kürzlich durchgeführten Studie von Rydzynski Moderbacher *et al.* hervor, dass SARS-CoV-2-spezifische CD4-T-Zellen bereits 4 Tage nach dem Eintreten der Symptome nachgewiesen werden konnten.²² Ebenso wie bei Tan *et al.* wurde in dieser Studie beobachtet, dass die frühzeitige Bildung von SARS-CoV-2-spezifischen CD4- und CD8-T-Zellen mit besseren Erkrankungsergebnissen einherging. Zusammengefasst verdeutlichen diese Erkenntnisse nicht nur die Bedeutung von T-Zellen bei der Regulation der Immunantwort auf SARS-CoV-2 in der akuten Phase der Infektion. Sie legen auch nahe, dass der Nachweis von T-Zellen während einer akuten SARS-CoV-2-Infektion detailliertere Informationen zur Immunantwort einer Person liefern könnte.

In einer prospektiven Kohortenstudie von Public Health England während der frühen Phasen der COVID-19-Pandemie wurde die Bedeutung der T-Zellen-Überwachung bei einer SARS-CoV-2-Infektion hervorgehoben. Bei der Aufnahme in die Studie wurden 2.826 systemrelevante Arbeiter auf Anti-Spike-IgG (EuroImm AG) und auf SARS-CoV-2-reaktive T-Zellen getestet. Letzteres erfolgte unter Verwendung einer Version des T-SPOT.COVID-Tests (Oxford Immunotec) nur zu Forschungszwecken, auf dessen Basis dieser Test entwickelt wurde.²³ In diese Kohorte von systemrelevanten Arbeitern wurden 154 Personen auf Grundlage eines vorangegangenen positiven RT-PCR-Tests mit bestätigter SARS-CoV-2-Infektion aufgenommen. 5,8 % dieser Population mit positivem PCR-Test waren seronegativ, wohingegen 88,9 % dieser Studienteilnehmer robuste T-Zell-Antworten aufwiesen, die unter Verwendung einer forschungsspezifischen Version des T-SPOT.COVID-Tests nachgewiesen wurden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass einige infizierte Personen zellvermittelte (T-Zell-)Immunantworten auch ohne Antikörperantwort ausbilden können. Dies deckt sich mit Studien unter Haushaltskontakten von SARS-CoV-2-infizierten Personen, aus denen hervorgeht, dass Kontaktpersonen nach einer Exposition mit einer um etwa 50 % höheren Wahrscheinlichkeit SARS-CoV-2-spezifische T-Zellen entwickeln als Antikörper.^{24,25} Zusammengefasst legen diese Ergebnisse nahe, dass T-Zellen ein sensitiverer Indikator für eine vorangegangene Exposition gegenüber SARS-CoV-2 sein könnten als Antikörperantworten.

Im Rahmen derselben Studie von Public Health England wurden die verbleibenden 2.672 Studienteilnehmer auf die Entwicklung einer PCR-bestätigten SARS-CoV-2-Infektion hin beobachtet.²³ Diese Nachbeobachtung lieferte den ersten Hinweis darauf, dass SARS-CoV-2-spezifische T-Zellen mit einem Schutz vor einer erneuten Infektion in Verbindung stehen könnten, da bei Personen mit einer hohen Anzahl an reaktiven T-Zellen, die unter Verwendung einer Version des T-SPOT.COVID-Tests nur zu Forschungszwecken nachgewiesen wurden, während der Nachbeobachtungsphase mit einer deutlich geringeren Wahrscheinlichkeit eine PCR-bestätigte SARS-CoV-2-Infektion auftrat. Diese vorläufigen Ergebnisse decken sich mit denen von Primatenstudien, in denen gezeigt wurde, dass die Depletion von T-Zellen bei Affen nach einer überstandenen SARS-CoV-2-Infektion bei einer erneuten Exposition gegenüber dem Virus zu einer Reinfektion führte, obwohl die SARS-CoV-2-spezifischen Antikörperantworten noch intakt waren. Im Gegensatz dazu konnten Affen mit erhaltenen SARS-CoV-2-spezifischen T-Zellen eine erneute Infektion erfolgreich abwehren.²⁶ In Übereinstimmung mit früheren Studien wurde in dieser Tierstudie außerdem ein Rückgang der Antikörperantworten nach einer Infektion beobachtet, woraus die Autoren schlossen, dass T-Zellen für einen langfristigen Schutz vor dem Virus notwendig sein könnten. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass T-Zellen eine wichtige Rolle bei Immunantworten gegen eine natürliche SARS-CoV-2-Infektion spielen und daher ist es wichtig dass SARS-CoV-2-Impfstoffe eine robuste T-Zell-Antworten induzieren sollten.²⁷ SARS-CoV-2-spezifische T-Zellen wurden als Reaktion auf viele der derzeitigen Impfstoffkandidaten nachgewiesen^{28,29,30} und die Bedeutung von Nachweis und Überwachung dieser Reaktionen wird immer mehr anerkannt.²⁷ Anhand der forschungsspezifischen Version des T-SPOT.COVID-Tests wurde eine spezifische T-Zell-Antwort infolge einer Impfung nachgewiesen. Vorläufige Daten weisen auf einen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl von T-Zellen vor und nach einer Impfung hin (interne Daten).

Der T-SPOT.COVID-Assay ist eine vereinfachte, standardisierte Variante der ELISPOT-Assaymethode. ELISPOT-Assays dienen zum Nachweis und zur Messung von T-Zell-Antworten durch Auszählung der T-Zellen, die als Reaktion auf die Stimulation mit Antigenen Zytokine sezernieren. ELISPOT-Assays sind außergewöhnlich empfindlich, da das Zielzytokin direkt in der Nähe der sezernierenden Zelle abgefangen wird, bevor es im Überstand verdünnt, von den Rezeptoren der Nachbarzellen gebunden oder abgebaut wird. Aus diesem Grund sind ELISPOT-Assays viel empfindlicher als herkömmliche ELISA-Assays.^{31,32,33,34} Die Empfindlichkeit ist beim Nachweis von T-Zell-Antworten auf SARS-CoV-2 wichtig, da die Anzahl der T-Zellen geringer sein kann als bei anderen Viren, die T-Zell-Antworten induzieren.³⁵ Weiterhin wurden eine Vielzahl von Faktoren, darunter Alter²², Schwere der Erkrankung²⁴ und Immunsuppression³⁶, mit der Variabilität des Ausmaßes von SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antworten in Verbindung gebracht.

Der Test zählt T-Effektorzellen aus, die auf die Stimulation mit zwei separaten Peptidpools, die von den Spike- und Nukleokapsidproteinen von SARS-CoV-2 abgeleitet sind, reagieren. Die T-Zell-Antwort auf jedes Protein wird parallel in einzelnen Vertiefungen gemessen. T-SPOT.COVID-Antigen-Panels sind als überlappende Peptidsequenzen des Spikeproteins (COV-A) und Nukleokapsidproteins (COV-B) hinweg konzipiert. Dieses Peptiddesign ermöglicht eine maximale Epitopabdeckung für den verbesserten Nachweis von T-Zell-Antworten ohne HLA-Einschränkungen. Antigene Formulierungen von 253 Peptiden, die die immunogensten Regionen des Virusgenoms abdecken, ermöglichen die Messung der Breite der Immunität und sorgen dafür, dass die Auswirkungen von Punktmutationen

minimiert werden. Die Spezifität für SARS-CoV-2 wurde durch die Entfernung potenziell kreuzreaktiver Peptidsequenzen mit hoher Homologie zu anderen Coronaviren verbessert.

TESTPRINZIP

Die Immunantwort auf eine Infektion mit SARS-CoV-2 wird durch die Aktivierung von B-Zellen und T-Zellen vermittelt. Im Rahmen der T-Zell-Antwort werden T-Zellen gegenüber SARS-CoV-2-Antigenen sensibilisiert, die CD4- und CD8-T-Effektorzellen aktivieren sollen, die dann bei einer Stimulation mit diesen Antigenen das Zytokin Interferon-gamma (IFN- γ) produzieren.^{37,38} Beim T-SPOT.COVID-Test kommt die Methode Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) zur Auszählung der SARS-CoV-2-sensibilisierten T-Zellen durch die Erfassung von Interferon-gamma (IFN- γ) in der Umgebung der T-Zellen, aus denen es sezerniert wurde, zum Einsatz.³⁹

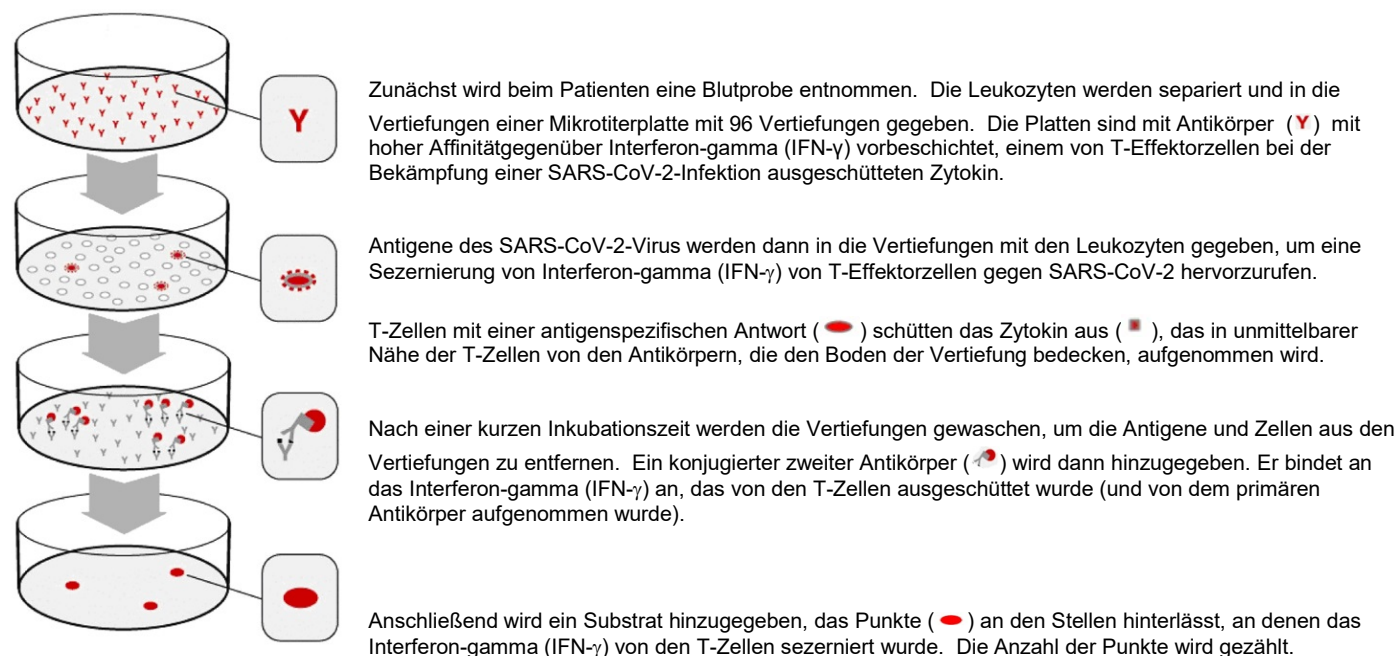
Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC-Zellen) werden aus der Blutprobe gewonnen, gewaschen, ausgezählt und zum Assay gegeben.

Isolierte PBMC-Zellen (Leukozyten) werden in Mikrotitervertiefungen gegeben. Dort werden Sie einer Phytohämagglutinin-Kontrolle (PHA) (einem mitogenen Stimulator als Indikator für die Zellfunktionalität), einer Nullkontrolle oder zwei separaten Panels der von den Spike- und Nukleokapsidproteinen abgeleiteten SARS-CoV-2-Antigenen ausgesetzt. Die PBMC-Zellen werden mit den Antigenen inkubiert, damit eine Stimulation etwaiger sensibilisierter T-Zellen stattfinden kann.

Sezerniertes Zytokin wird mithilfe spezifischer Antikörper auf der Membranoberfläche festgehalten, welche die Basis der Vertiefung bildet. Die Zellen und andere unerwünschte Materialien werden durch Waschen entfernt. Ein zweiter, mit alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des Zytokin-Moleküls gerichtet ist, wird hinzugefügt und bindet an das auf der Membranoberfläche festgehaltene Zytokin. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Jede Vertiefung wird mit einem löslichen Substrat versetzt; dieses wird von gebundenem Enzym gespalten, mit dem Ergebnis, dass sich am Reaktionsort ein (dunkelblauer) punktförmiger, unlöslicher Niederschlag bildet.

Die Anzahl der entstandenen Punkte ist ein Maß für die Menge der T-Effektorzellen gegen SARS-CoV-2 im peripheren Blut. Diese Grundsätze der T-SPOT-Testplattform sind in der nachfolgenden Abbildung 1 beschrieben.

Abbildung 1: Grundsätze des T-Spot-Assaysystems. Nur zu Illustrationszwecken. Ausführliche Informationen zum Verfahren sind in Abschnitt 6 „Gebrauchsanweisung“ enthalten.



3. REAGENZIEN UND LAGERUNG

IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

Inhalt von T-SPOT.COVID COV.435/300 (Version mit 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen zur Wiederverwendung) und COV.435/200:

1. 1 Mikrotiterplatte: 96 Vertiefungen in Form von 12 einzelnen Streifen mit je 8 Vertiefungen in einem separaten Rahmen (COV.435/300) bzw. 12 x 8 Vertiefungen in einer einzigen Platte (COV.435/200), die mit einem murinen monoklonalen Antikörper gegen das Zytokin Interferon-gamma (IFN- γ) beschichtet sind.
2. 2 Fläschchen (à 0,8 mL) Panel A (COV-A): enthält Spike-Antigene, Rinderserumalbumin und antimikrobielle Wirkstoffe.
3. 2 Fläschchen (à 0,8 mL) Panel B (COV-B): enthält Nukleokapsid-Antigene, Rinderserumalbumin und antimikrobielle Wirkstoffe.
4. 2 Fläschchen (à 0,8 mL) Positivkontrolle: enthält Phytohämagglutinin (PHA) zur Kontrolle der Zellfunktionalität, Rinderserumalbumin und antimikrobielle Wirkstoffe.
5. 1 Fläschchen (50 μ l) 200-fach konzentriertes Konjugatreagenz: mit alkalischer Phosphatase konjugierter, muriner monoklonaler Antikörper gegen das Zytokin Interferon-gamma (IFN- γ).
6. 1 Fläschchen (25 mL) Substratlösung: gebrauchsfertige BCIP/NBT^{plus} Lösung.
7. Packungsbeilage

Hinweis: Die festen Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen für das T-SPOT.COVID COV.435/200-Kit und die Streifen mit 8 Vertiefungen für das COV.435/300-Kit sind nur zur einmaligen Verwendung vorgesehen. Sie sollten nach dem Öffnen sofort eingesetzt und nicht wiederverwendet werden. Es dürfen keine Komponenten verschiedener Kits untereinander vermischt werden.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Das ungeöffnete Kit bei 2–8 °C lagern. Solange die empfohlenen Lager- und Handhabungsbedingungen gegeben sind, sind die Bestandteile des Kits bis zu dem auf der Verpackung gedruckten Verfallsdatum stabil. Das Kit darf nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden. Wenn eine Komponente ein Verfallsdatum hat, das nach dem auf der (äußeren) Kitverpackung angegebenen Datum liegt, diese Komponente nicht aufbewahren und nicht mit einem anderen Kit verwenden; keine Komponente des Kits nach dem Verfallsdatum auf der äußeren Kitverpackung verwenden.

Geöffnete Kitkomponenten bei 2–8 °C lagern. Geöffnete Komponenten müssen beim T-SPOT.COVID (COV.435/300) innerhalb von 8 Wochen nach dem Öffnen und beim T-SPOT.COVID (COV.435/200) innerhalb von 4 Wochen nach dem Öffnen verwendet werden. Dieser Zeitraum endet spätestens mit dem Verfallsdatum auf dem Etikett des Kits. **Die Substratlösung vor längerer Lichteinwirkung schützen.**

ERFORDERLICHE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE GERÄTE UND MATERIALIEN

1. Mikrotiterplattenrahmen für Streifen mit 8 Vertiefungen (erhältlich von Oxford Immunotec).
2. BLII-Sicherheitswerkbank (empfohlen).
3. Blutentnahmeröhrchen, z. B. Vacutainer® CPT™ oder heparinisierte Röhrchen.
4. T-Cell *Xtend*®-Reagenz – Vollblutproben, die 0 bis 32 Stunden nach der Venenpunktion bei Raumtemperatur (18–25 °C) gelagert werden, können mit dem T-Cell *Xtend*-Reagenz verarbeitet werden.
5. Ficoll® (sofern keine CPT-Röhrchen verwendet werden).
6. Zentrifuge zur Präparation von PBMC-Zellen (mit einer Leistung von mindestens 1800 RZB (g)), die in der Lage ist, die Proben auf Raumtemperatur (18–25 °C) zu halten bei Verwendung von Dichtezentrifugationsmethoden zur Separation der PBMC-Zellen.
7. Geräte und Reagenzien, die eine Zählung der PBMC-Zellen ermöglichen; entweder manuell unter Verwendung von Trypanblau (oder anderen geeigneten Farbstoffen) und eines Hämozytometers auf einem Mikroskop oder automatisch mithilfe eines geeigneten Hämatologie-Analysegerätes.
8. Ein Inkubator mit Befeuchtung und einer Inkubationstemperatur von 37 \pm 1 °C und Zufuhr von 5 % CO₂.
9. Ein automatisches Mikrotiterplattenwaschgerät oder eine 8-Kanal- bzw. Stepper-Pipette zum manuellen Waschen von Platten.
10. Anpassbare Pipetten mit einem Volumenbereich von 1–1000 μ l (beispielsweise vier Pipetten mit Volumenbereichen von 1–10 μ l, 2–20 μ l, 20–200 μ l und 100–1000 μ l) und sterile Pipettenspitzen.
11. Sterile PBS-Lösung, z. B. GIBCO® 1x D-PBS (Life Technologies, Katalognummer 14040-133).
12. Destilliertes oder entionisiertes Wasser.
13. Ein Hilfsmittel zum Visualisieren der Vertiefungen bzw. zum Erfassen einer digitalen Aufnahme der Vertiefungen, z. B. ein Stereomikroskop, ein Vergrößerungsglas oder ein Mikrotiterplatten-Bildgebungsgerät zur Zählung der Punkte.
14. Ein steriles Zellkulturmedium, z. B. GIBCO AIM V® (Life Technologies, Katalog-Nr. 31035-025, in Forschungsqualität). (Hinweis: AIM V-Medien sind erhältlich von Oxford Immunotec.) **Dieses serumfreie Medium wird für den Inkubationsschritt dringend empfohlen.** RPMI 1640 (Invitrogen, Katalog-Nr. 11875-093) darf nur für die ersten Schritte der Probenpräparation verwendet werden. Es wird empfohlen, das Zellkulturmedium in geeigneten Aliquoten aufzubewahren und überschüssiges Material nach dem Gebrauch zu entsorgen. **Das Zellkulturmedium sollte vor der Verwendung mit dem T-SPOT.COVID-Test auf 37 °C vorgewärmt werden.** Um Probleme mit kontaminierten Medien zu vermeiden, sollten die Fläschchen mit AIM-V bzw. RPMI 1640 unter Umständen in kleinere Aliquote umgefüllt werden.

4. WARNTINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.
- Nur zur Verwendung durch Fachkräfte.
- Die Anwender sollten in der Durchführung des Assays geschult werden und sichergehen, dass sie die Gebrauchsanweisung verstehen, bevor sie den Assay anwenden.
- Vor dem Gebrauch die Gebrauchsanweisung des Assays gründlich lesen. Abweichungen von der Gebrauchsanweisung in dieser Packungsbeilage können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Beim Umgang mit Material menschlichen Ursprungs ist Vorsicht geboten. Alle Blutproben sollten als potenziell infektiös behandelt werden. Die Handhabung von Blutproben und Assaybestandteilen sowie deren Verwendung, Lagerung und Entsorgung sollten gemäß den in den einschlägigen nationalen, länderspezifischen oder lokalen Sicherheitsrichtlinien bzw. -vorschriften für biologisch gefährliche Materialien festgelegten Verfahren erfolgen.
- Bei der Arbeit mit Chemikalien ist Vorsicht geboten. Alle Chemikalien sind als potenziell gefährlich anzusehen. Ein Sicherheitsdatenblatt für das Kit ist bei Oxford Immunotec erhältlich.
- Nicht verwendete Reagenzien und biologische Proben gemäß den lokalen, landesspezifischen und nationalen Vorschriften entsorgen.
- In jede Vertiefung muss die korrekte Anzahl PBMC-Zellen gegeben werden. Abweichende Zellzahlen können zu einer inkorrekten Auswertung des Ergebnisses führen.
- Komponenten unterschiedlicher Kit-Chargen nicht miteinander mischen.
- Aseptische Verfahren einhalten, um eine Kontamination der Reagenzien, Assayvertiefungen, Zellsuspensionen und Zellkulturmedien zu vermeiden.
- Abweichungen von den genannten Pipettierungs- und Waschtechniken, Inkubationszeiten und/oder -temperaturen können die tatsächlichen Testergebnisse beeinträchtigen und sind zu vermeiden.
- Das Blut sollte entnommen und so schnell wie möglich verarbeitet werden.
- Blutproben bei Raumtemperatur (18–25 °C) lagern und zum Labor transportieren. Vollblutproben nicht im Kühlschrank aufbewahren oder einfrieren.
- Nichtbeachtung der empfohlenen Inkubationszeiten und -temperaturen kann zu einer fehlerhaften Auswertung der Ergebnisse führen.
- Durch Pipettenspitzen oder Spitzen der Waschgeräte verursachte Einkerbungen in der Membran können zu Artefakten in den Vertiefungen führen, welche die Punktzählung beeinträchtigen könnten.

WARNTINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN IM ZUSAMMENHANG MIT DER ANWENDUNG DES T-CELL XTEND-REAGENZES

- Das T-Cell *Xtend*-Reagenz wurde nicht für andere Anwendungsbereiche als für die T-SPOT-Testplattform geprüft.
- Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.
- Nur zur Verwendung durch Fachkräfte.
- Das Reagenz nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.
- Bei der Handhabung dieses Produkts steril arbeiten, um eine Kontamination des Reagenz zu vermeiden.
- Keine Zellpräparationsröhrchen (CPT, Becton Dickinson) oder Blutentnahmeröhrchen mit dem Antikoagulant Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in Kombination mit dem T-Cell *Xtend*-Reagenz verwenden.
- Das T-Cell *Xtend*-Reagenz vor der Probenverarbeitung zum Vollblut geben.
- Das T-Cell *Xtend*-Reagenz nicht verdünnen oder mit anderen Komponenten versetzen.
- Nur Gefäße zur einmaligen Verwendung für die venöse Blutentnahme verwenden.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen nicht miteinander vermischen.

5. PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Verschiedene Labore müssen ihre Verfahren für die Entnahme und Separation von PBMC-Zellen überprüfen, um ausreichende Mengen zu gewinnen. Es gelten folgende Empfehlungen:

1. Vollblutproben sollten bis zur Verarbeitung bei 18 °C bis 25 °C gehalten werden.
2. Eine Blutprobe gemäß den Anweisungen für das Entnahmegerät nehmen. Das Röhrchen invertieren (8–10 Mal), um das Vollblut gründlich mit dem Antikoagulant zu vermischen. Das Blut bei Raumtemperatur (18–25 °C) lagern.
Nicht kühlen oder einfrieren.
3. Bei immunkompetenten Patienten kann die für den Assay ausreichende Zahl an PBMC-Zellen wie folgt aus venösen Blutproben gewonnen werden:

Ein 8-mL- oder zwei 4-mL-Röhrchen (CPT) oder ein 6-mL-Lithiumheparin-Röhrchen verwenden.

Falls erforderlich, können die PBMC-Zellen eines Patienten zusammengeführt werden, um genügend PBMC-Zellen aus mehreren Röhrchen mit Blut zu gewinnen, die gleichzeitig entnommen und verarbeitet wurden.

4. Bei der Verwendung des T-SPOT.COVID-Tests **ohne T-Cell Xtend-Reagenz** sollten die Blutproben innerhalb von 8 Stunden nach der Entnahme verarbeitet werden. Die Proben können in Natriumcitrat- oder Natriumheparin-Vacutainer-CPT-Röhrchen (Becton Dickinson) entnommen werden, wobei die PBMC-Zellen im Röhrchen gemäß den Herstelleranweisungen separiert werden. Alternativ können die Blutproben in Lithiumheparin-Röhrchen entnommen werden, wobei die PBMC-Zellen anschließend unter Verwendung von Standardseparationsverfahren wie Ficoll-Paque® oder alternativen Methoden separiert werden, um die PBMC-Fraktion zu reinigen. Blutentnahmeröhrchen mit dem Antikoagulant EDTA sollten nicht verwendet werden.
- a. Bei CPT-Blutentnahmeröhrchen 8-mL-CPT-Röhrchen 28 Minuten lang mit 1600 RZB (g) bzw. 4-mL-CPT-Röhrchen 30 Minuten lang mit 1800 RZB (g) bei Raumtemperatur (18–25 °C) zentrifugieren.
- b. Bei Verwendung von Ficoll-Paque Plus das Blut mit dem gleichen Volumen RPMI-1640-Medium verdünnen (1 Teil Blut und 1 Teil RPMI). Das verdünnte Blut vorsichtig auf Ficoll-Paque Plus schichten (2–3 Teile verdünntes Blut und 1 Teil Ficoll-Paque) und 22 Minuten lang mit 1000 RZB (g) bei Raumtemperatur (18–25 °C) zentrifugieren.

Hinweis: Vor der Verwendung von CPT-Röhrchen bzw. Ficoll-Paque die Herstelleranweisungen beachten. Sicherstellen, dass die Röhrchen mit der richtigen Geschwindigkeit zentrifugiert werden. Die Geschwindigkeiten oben sind in g bzw. relativer Zentrifugalbeschleunigung (RZB) angegeben. Dabei handelt es sich nicht um Umdrehungen pro Minute (U/min). Wenn die Zentrifuge Geschwindigkeit nur in U/min messen kann, muss eine Umrechnung auf den empfohlenen RZB-Wert erfolgen, indem der Rotorradius gemessen und eine Umrechnungstabelle verwendet wird. Leucosep-Röhrchen (Greiner Bio-One) bieten einen zeitsparenden Ansatz zur Dichtegradientenseparation. Die Röhrchen enthalten eine poröse Barriere, die es ermöglicht dass die Blutprobe auf das Medium für die Dichtegradientenseparation geschüttet werden kann, wodurch kein vorsichtiges Schichten auf der Probe erforderlich ist.

5. Bei der Verwendung des T-SPOT.COVID-Tests **mit T-Cell Xtend-Reagenz** sollten die Blutproben in Lithiumheparin-Röhrchen entnommen werden. Vacutainer-CPT-Röhrchen und Blutentnahmeröhrchen mit dem Antikoagulant EDTA sollten nicht verwendet werden. Das T-Cell Xtend-Reagenz sollte vor der PBMC-Separation unter Verwendung von Standardtechniken hinzugegeben werden. Vollblutproben sollten bei Verwendung des T-Cell Xtend-Reagenzes 0 bis 32 Stunden nach der Venenpunktion bei Raumtemperatur (18–25 °C) gelagert werden.

Wenn das T-Cell Xtend-Reagenz verwendet werden soll, unmittelbar vor der Zellseparation den Verschluss vom Blutentnahmeröhrchen nehmen und 25 µl der T-Cell Xtend-Reagenzlösung pro mL Blutprobe hinzugeben. Das Blutentnahmeröhrchen wieder verschließen und zum Mischen vorsichtig 8 bis 10 Mal invertieren. 20 ± 5 Minuten lang bei Raumtemperatur (18–25 °C) inkubieren und dann die PBMC-Schicht mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isolieren, wie in den Abschnitten 4b und 6–9 beschrieben. Weitere Informationen sind in der Packungsbeilage des T-Cell Xtend-Reagenzes enthalten.

6. Die weiße, trübe Schicht der PBMC-Zellen mit einer Pipette entnehmen und in ein konisches 15-mL-Zentrifugenröhrchen überführen. Das Röhrchen mit Zellkulturmedium auf ein Volumen von 10 mL auffüllen. **Das Zellkulturmedium für die Waschschritte sollte auf 37 °C vorgewärmt werden, bevor es mit PBMC-Zellen in Kontakt kommt.**

Zirkulierende Faktoren in Vollblutproben beeinträchtigen bekanntermaßen Vollblut-Interferon-Gamma-Tests, darunter Rheumafaktor, heterophile Antikörper und bereits vorhandene Mengen von Interferon-Gamma. Durch die Separation und das Waschen der PBMC-Zellen können diese potenziell störenden Substanzen vor der Durchführung dieses Assays entfernt werden.

Hinweis: Nach der Zentrifugation sollten die PBMC-Zellen mit einer Pipettenspitze mit weiter Öffnung (z. B. 1 mL) durch Einführen der Pipettenspitze in die PBMC-Schicht extrahiert werden. Diese milchige Schicht sollte vorsichtig aspiriert und zum Waschen in ein steriles konisches Röhrchen umgefüllt werden. Sicherstellen, dass die gesamte milchige PBMC-Schicht aufgenommen wird. Es ist sinnvoller, mehr von der Plasmaschicht aufzunehmen, als einen Teil der PBMC-Zellen im Blutentnahmeröhrchen zu lassen. Bei der Verwendung von CPT-Röhrchen sollte jedoch die Umfüllung des Separationsgels verhindert werden, da dieses die Pipettenspitze blockieren kann. Sollte dies geschehen, die bereits in der Spitze befindlichen Zellen in ein Zentrifugenröhrchen umfüllen und dann eine neue Spitze zum Umfüllen der verbleibenden PBMCs verwenden. Zum Waschen der Zellen während dieser Schritte 3–5 kann eine Vielzahl von Medien verwendet werden; sowohl AIM V als auch RPMI 1640 wurden erfolgreich eingesetzt und werden empfohlen.

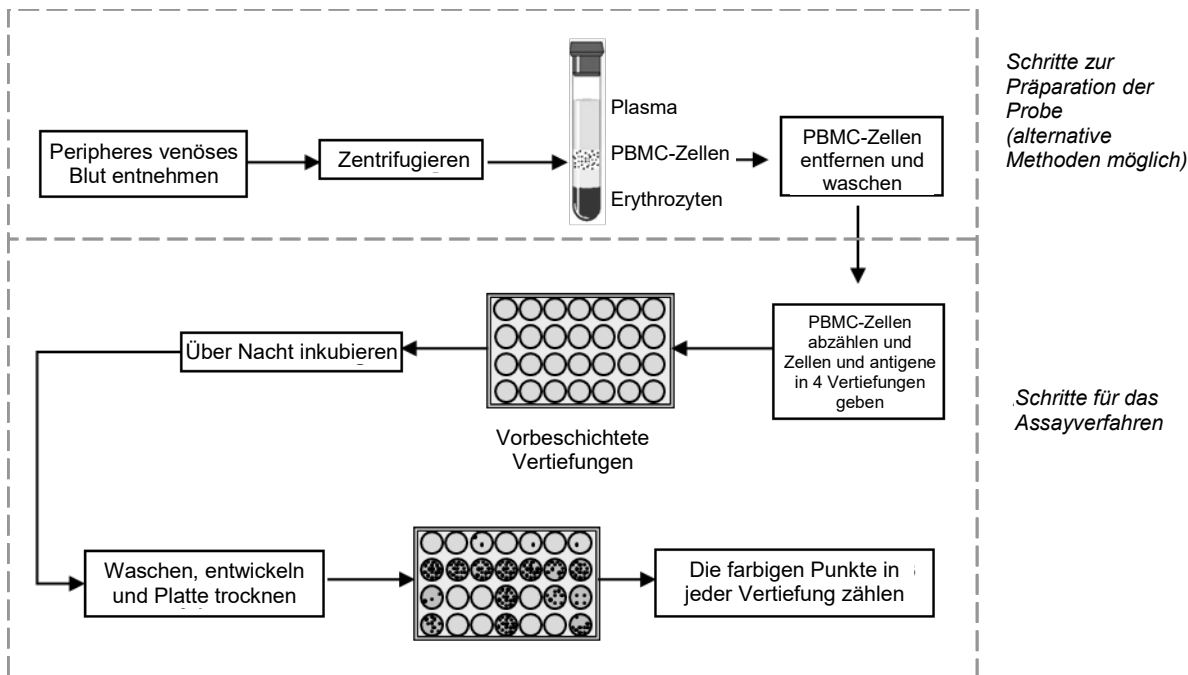
7. 7 Minuten lang mit 600 RZB (g) zentrifugieren. Den Überstand abgießen und das Pellet in 1 mL Medium resuspendieren.
8. Das Röhrchen mit frischem Medium auf 10 mL auffüllen und 7 Minuten lang mit 350 RZB (g) zentrifugieren.
9. Den Überstand abgießen und das Pellet in 0,7 mL Zellkulturmedium resuspendieren. **Das serumfreie Medium AIM V, wurde erfolgreich verwendet und wird ausdrücklich empfohlen.**

Hinweis: Die Schritte 2–7 sollten in einem BII-Sicherheitswerkbank durchgeführt werden, um den Anwender zu schützen und eine Kontamination der Proben zu verhindern.

6. GEBRAUCHSANWEISUNG

Eine vollständige T-SPOT.COVID-Testplatte dient zur Verarbeitung von 24 Patientenproben. Der Assay wird in der Regel nachmittags und am Morgen des darauffolgenden Tages durchgeführt, damit die Inkubation von 16–20 Stunden über Nacht erfolgen kann. Wenn dieses Zeitschema verwendet wird, werden die Blutproben am Nachmittag von Tag 1 verarbeitet, um die PBMC-Zellen für den Assay zu präparieren. Anschließend wird der Assay eingeleitet, indem die PBMC-Zellen und Antigene zur Assayplatte hinzugegeben werden und die Platte in den Inkubator überführt wird. An Tag 2 wird die Platte aus dem Inkubator genommen, die Entwicklungsschritte werden durchgeführt und die Platte wird ausgelesen. Die Verarbeitung einer vollständigen Platte dauert etwa 3 Stunden (die tatsächliche Arbeitszeit ist aufgrund der Zentrifugationsschritte geringer) an Tag 1 und 30 Minuten (ohne die einstündige Inkubation des sekundären Antikörpers und die Zeit zum Trocknen der Platte) an Tag 2. Das Verfahren zur Durchführung des Tests ist in Abbildung 2 zusammengefasst und nachfolgend ausführlicher beschrieben:

Abbildung 2: Diagramm zur Veranschaulichung der wichtigsten Schritte zur Durchführung des T-SPOT.COVID-Tests. Hinweis: Nicht alle 96 Vertiefungen der Platten sind in der Abbildung dargestellt.



REAGENZVORBEREITUNG

1. Die Fläschchen mit SARS-CoV-2-Spike-Antigenen (Panel A), SARS-CoV-2-Nukleokapsidantigenen (Panel B) und die Positivkontrolle sind im Lieferumfang enthalten und gebrauchsfertig.
2. Eine Arbeitslösung aus Konjugatreagenz (Verdünnungsverhältnis 1:200) herstellen. Das benötigte Volumen der Arbeitslösung aus Konjugatreagenz berechnen. Das Konjugatreagenz kann in Arbeitsstärke hergestellt und bei 2–8 °C bis zu sechs Wochen vor der Verwendung im Assay gelagert werden.

Hinweis: Für jede Patientenprobe sind 4 Vertiefungen erforderlich. 50 µl verdünntes Konjugatreagenz werden in jede Vertiefung gegeben. Für jeden Streifen (2 Proben, 8 Vertiefungen) 500 µl Lösung in Arbeitsstärke durch Zugabe von 2,5 µl konzentriertem Konjugatreagenz zu 497,5 µl PBS-Lösung herstellen. Für jede Platte mit 96 Vertiefungen (24 Proben) 5 mL Lösung in Arbeitsstärke durch Zugabe von 25 µl konzentriertem Konjugatreagenz zu 4975 µl PBS-Lösung herstellen.

3. Die Substratlösung ist gebrauchsfertig. Vor dem Entnehmen der Platte aus dem Inkubator (Tag 2) die Substratlösung aus Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

ZELLZÄHLUNG UND VERDÜNNUNG

Für den T-SPOT.COVID-Test sind 250.000 ± 50.000 PBMC-Zellen pro Vertiefung erforderlich. Für jede Patientenprobe werden vier Vertiefungen benötigt. Folglich sind 1×10^6 PBMC-Zellen pro Patient erforderlich. Die Anzahl der SARS-CoV-2-T-Zellen in der Probe wird auf eine festgelegte Anzahl an PBMC-Zellen normalisiert.

1. Eine PBMC-Zählung durchführen. Die Zellen können auf unterschiedliche Weise gezählt werden, z. B. durch manuelles Zählen unter Verwendung von Trypanblau (oder einem anderen geeigneten Farbstoff) und eines Hämozytometers oder durch automatisches Zählen mit einem automatisierten Hämatologie-Analysegerät.
2. Bei manueller Zählung mit einem Neubauer-Hämozytometer unter Verwendung von Trypanblau 10 µl der endgültigen Zellsuspension zu 40 µl 0,4 % (m/V) Trypanblau-Lösung geben. Ein geeignetes Aliquot auf das Hämozytometer

geben und die Zellen im Raster zählen. Bei anderen Hämocytometern und automatisierten Geräten die Anweisungen des Herstellers befolgen.

Hinweis: Es ist darauf zu achten, dass die Zellsuspension unmittelbar vor Entnahme der zu zählenden Aliquote gründlich vermischt wird. Die Zellen können sich am Röhrchenboden abgesetzt haben, was zu einer falschen Auswertung der tatsächlichen Zellzahl führt. Das Mischen sollte entweder durch sanftes Schwenken des Röhrchens mit der Hand oder durch sanftes mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Suspension erfolgen.

- Die Konzentration der in der PBMC-Zellsuspension enthaltenen Zellen berechnen.

Hinweis: Es ist darauf zu achten, dass die Berechnung für das verwendete Zellzählsystem korrekt ist. Die Verwendung von zu wenigen oder zu vielen Zellen kann zu einer fehlerhaften Auswertung des Ergebnisses führen.

- 500 µl der endgültigen Zellsuspension mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/100 µl herstellen (d. h. insgesamt $1,25 \times 10^6$ PBMC-Zellen).

Hinweis: Vor der Entnahme eines Aliquots zur Verdünnung darauf achten, dass die Zellen durch sanftes mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich vermischt sind. PBMC-Werte zwischen 200.000 und 300.000 pro Vertiefung führen nachweislich zu konsistenten T-SPOT-Testergebnissen.

PLATTENVORBEREITUNG UND INKUBATION

Der T-SPOT.COVID-Test erfordert vier Vertiefungen für jede Patientenprobe. Mit jeder Patientenprobe eine Nullkontrolle und eine Positivkontrolle mitlaufen lassen. Es empfiehlt sich, die Proben vertikal wie unten abgebildet auf der Platte zu positionieren.

- Nullkontrolle
- Panel A (COV-A) (Spike)
- Panel B (COV-B) (Nukleokapsid)
- Positivkontrolle

Mit jeder Platte mit 96 Vertiefungen können bis zu 24 Patientenproben verarbeitet werden. Die entsprechende Anzahl an Platten für die zu verarbeitenden Proben verwenden. Bei COV.435/300 werden mit jedem Streifen 2 Proben verarbeitet. Nur die erforderliche Anzahl an Streifen verwenden. Verbleibende Streifen im Folienbeutel zusammen mit einem Kieselgelbeutel versiegeln. Die verbleibenden Streifen müssen innerhalb von acht Wochen nach dem erstmaligen Öffnen des Beutels verwendet werden, sofern die Streifen während dieses Zeitraums bei 2–8 °C gelagert werden.

T-SPOT.COVID ist ein Test zum Messen der T-Zell-Funktion. Es sind keine Standardkurven erforderlich. Daher sind pro Patient und Probe nur 4 Vertiefungen erforderlich. Das folgende Plattenlayout wird für 24 Proben empfohlen:

Reihe	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

Erläuterung: N = Nullkontrolle, A = Panel A, B = Panel B, M = Mitogenpositivkontrolle

- Bei COV.435/300 die erforderlichen vorbeschichteten Streifen mit 8 Vertiefungen aus der Verpackung entnehmen, in einen Plattenrahmen einsetzen und bei Raumtemperatur stehen lassen. Nur die erforderliche Anzahl an Streifen entnehmen. Verbleibende unbenutzte Streifen und den Trockenmittelbeutel erneut in der äußeren Folienverpackung versiegeln und wieder bei 2–8 °C aufbewahren.

Hinweis: Die zu verwendenden Streifen in einen leeren, mit Bodenschutz und Deckel versehenen Plattenrahmen einsetzen. Rahmen, Bodenschutz und Deckel sollten zur Wiederverwendung aufbewahrt werden.

- Die Panels und Kontrollen hinzugeben.

- In jede Nullkontrolle-Vertiefung 50 µl AIM V-Zellkulturmedium geben.

- ii. In jede erforderliche Vertiefung 50 µl Panel-A-Lösung geben.
- iii. In jede erforderliche Vertiefung 50 µl Panel-B-Lösung geben.
- iv. In jede Vertiefung zur Kontrolle der Zellfunktionalität 50 µl Positivkontrolle geben.

Die Pipettenspitze darf die Membran nicht berühren. Durch die Pipettenspitzen verursachte Einkerbungen in der Membran können zu Artefakten in den Vertiefungen führen.

3. Zu jeder der 4 für eine Patientenprobe zu verwendenden Vertiefungen 100 µl der endgültigen Zellsuspension des jeweiligen Patienten hinzugeben (250.000 PBMC-Zellen). Für jedes Hinzufügen patienteneigener Zellen eine neue Spitze verwenden, um die Gefahr einer Kreuzkontamination zwischen den Vertiefungen zu vermeiden. Darauf achten, dass angrenzende Vertiefungen nicht kontaminiert werden, indem Flüssigkeit von einer Vertiefung in eine andere gelangt, wenn Pipettenspitzen für mehrere Vertiefungen wiederverwendet werden.

Hinweis: Vor dem Entfernen jedes 100-µl-Aliquots mischen (wie in den Schritten unter „Zellzählung und Verdünnung“).

4. Die Platte mit aufgesetztem Deckel in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ über 16–20 Stunden inkubieren. Die Platte nicht mehr bewegen, sobald sie sich im Inkubator befindet. Mikrotiterplatten nicht stapeln, da dies zu einer ungleichmäßigen Temperaturverteilung und Belüftung führen kann.

Hinweis: Der CO₂-Inkubator muss befeuchtet sein. Sicherstellen, dass die Wasserschale ausreichend Wasser enthält, um eine feuchte Atmosphäre zu gewährleisten.

PUNKTENTWICKLUNG UND ZÄHLUNG

1. Die Platte aus dem Inkubator nehmen und das Zellkulturmedium entsorgen. Dazu den Inhalt in einen geeigneten Behälter abgießen.

Hinweis: Zu diesem Zeitpunkt Substratlösung aus dem Kit entnehmen und bei Raumtemperatur stehen lassen.

2. In jede Vertiefung 200 µl PBS-Lösung geben. **Keine PBS-Lösung verwenden, die Tween® oder sonstige Detergenzien enthält, da dies zu hohen Hintergrundzählungen führt.**

Hinweis: Frisch zubereitete oder sterile PBS-Lösung verwenden.

3. Die PBS-Lösung abgießen. Das Waschen der Vertiefungen weitere 3 Mal wiederholen. Für jeden Waschvorgang frische PBS-Lösung verwenden. Für das Waschen kann ein automatisiertes Wascherät verwendet werden.

Hinweis: Für das Waschen kann eine Mehrkanalpipette oder ein Plattenwaschgerät verwendet werden. Die PBS-Lösung nach jedem Waschen in einen geeigneten Behälter abgießen. Zum Entfernen der PBS-Lösung keine Pipette verwenden, da dadurch die Membran beschädigt werden könnte. Bei Verwendung eines Plattenwaschgeräts darauf achten, dass der Verteiler so eingestellt ist, dass die Spitzen die Membran nicht berühren. Nach jedem letzten Waschvorgang die Platte auf ein fusselfreies Handtuch klopfen, um sicherzustellen, dass die gesamte PBS-Lösung entfernt wird. Durch überschüssige Lösung wird das Konjugatreagenz weiter verdünnt.

4. Wenn nicht bereits bei der Reagenzvorbereitung geschehen, das konzentrierte Konjugatreagenz im Verhältnis 1:200 mit PBS-Lösung verdünnen, um die Lösung in Arbeitsstärke zu erhalten.
5. In jede Vertiefung 50 µl der Konjugatreagenzlösung in Arbeitsstärke geben und 1 Stunde lang bei 2–8 °C inkubieren.

Hinweis: Die Verwendung einer Multikanalpipette oder einer Stepper-Pipette wird empfohlen. Es sollte darauf geachtet werden, dass das Konjugationsreagenz in jede Vertiefung gegeben wird, denn es kann schwierig zu erkennen sein, in welche Vertiefungen es gegeben wurde, da die Lösung klar und ungefärbt ist.

6. Das Konjugat abgießen und viermal mit PBS-Lösung waschen (siehe Schritt 2 und 3 oben).
7. In jede Vertiefung 50 µl Substratlösung geben und bei Raumtemperatur 7 Minuten lang inkubieren.
8. Die Platte gründlich mit destilliertem oder deionisiertem Wasser waschen, um die Nachweisreaktion zu stoppen.
9. Die Platte an einem gut belüfteten Ort oder in einem Trocknungsöfen bei bis zu 37 °C trocknen lassen.

Hinweis: Während die Platte trocknet, werden die Punkte besser sichtbar. Daher ist darauf zu achten, dass die Platte vor dem Auslesen vollständig trocken ist. 4 Stunden lang bei 37 °C oder mindestens 16 Stunden lang bei Raumtemperatur trocknen lassen.

10. Die auffälligen dunkelblauen Punkte auf der Membran einer jeden Vertiefung zählen und notieren. Anhand der Auswertung der Ergebnisse und Assaykriterien (siehe unten) überprüfen, ob eine Patientenprobe „reaktiv“ oder „nicht reaktiv“ ist. **Die durch die Antigenstimulation entstandenen Punkte sollten als große, runde und dunkle Flecken erscheinen. Oft ist ein Gradienteneffekt mit einem dunkleren Zentrum und einer unschärferen Randfläche zu beobachten. Möglicherweise auftretende unspezifische Artefakte sind kleiner, weniger intensiv und von unregelmäßiger Form.**

Hinweis: Die Punkte können mithilfe eines Vergrößerungsglases oder Stereomikroskops direkt aus der Vertiefung oder von einem mittels Mikroskop oder Platten-Bildgebungsgerät erfassten digitalen Bild abgezählt werden.

Nach der Entwicklung bleiben die abgeschlossenen Assayplatten stabil, weshalb sie nicht unmittelbar im Anschluss

abgelesen werden müssen. Die Platten können für eine retrospektive Qualitätskontrolle oder erneute Untersuchung bis zu 12 Monate lang an einem trockenen, dunklen Ort bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei einem typischen Ergebnis sind wenige oder keine Punkte in der Nullkontrolle und mindestens 20 Punkte in der Positivkontrolle vorhanden (typische Ergebnisse aus einer US-amerikanischen klinischen Studie siehe Abbildungen 4a und b).

Eine Nullkontrolle mit mehr als 10 Punkten sollte als „ungültig“ betrachtet werden.

Die Punktezahl der Positivkontrolle für die Zellfunktionalität sollte im Normalfall bei ≥ 20 liegen oder eine Sättigung zeigen (d. h. zu viele Punkte, um sie zählen zu können). Ein kleiner Anteil von Patienten hat möglicherweise T-Zellen, die nur begrenzt auf PHA ansprechen.¹ Liegt eine Positivkontrolle unter 20 Punkten, sollte sie als „ungültig“ betrachtet werden, sofern nicht Panel A oder Panel B „reaktiv“ oder „grenzwertig (mehrdeutig)“ gemäß der Beschreibung im Abschnitt „Auswertung der Ergebnisse und Assaykriterien“ (siehe unten) sind; in diesem Fall ist das Ergebnis gültig.

Ungültige Ergebnisse sollten als „ungültig“ vermerkt werden, wobei es sich empfiehlt, eine weitere Probe zu entnehmen und die Person erneut zu testen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE UND ASSAYKRITERIEN

Lesen Sie den Abschnitt „Qualitätskontrolle“, bevor Sie die folgenden Kriterien anwenden.

Die Ergebnisse des T-SPOT.COVID-Tests werden ausgewertet, indem man die Punktzahl in der Vertiefung der Nullkontrolle von der Punktzahl in jedem der Panels abzieht und dabei den folgenden Algorithmus anwendet:

- Das Testergebnis ist reaktiv, wenn (Panel A - null) und/oder (Panel B - null) ≥ 8 Punkte aufweisen.
- Das Testergebnis ist nicht reaktiv, wenn sowohl (Panel A - null) als auch (Panel B - null) ≤ 4 Punkte aufweisen. Dies schließt Werte von weniger als null ein.
- Ergebnisse, bei denen die höchste Punktzahl in Panel A oder Panel B (Panel minus null) 5, 6 oder 7 Punkte beträgt, sollten als grenzwertig (mehrdeutig) betrachtet werden, und eine erneute Testung durch Entnahme einer weiteren Patientenprobe wird empfohlen.
- Fällt das Ergebnis dieser erneuten Untersuchung einer neuen Probe immer noch grenzwertig aus, sollten andere diagnostische Tests und/oder epidemiologische Informationen zur Bestimmung der adaptiven oder zellvermittelten Immunantwort auf eine kürzlich aufgetretene oder vorangegangene Infektion mit SARS-CoV-2 herangezogen werden.
- **Ein „reaktives“ Ergebnis deutet darauf hin, dass die Probe T-Effektorzellen enthält, die sensibilisiert gegenüber SARS-CoV-2 sind.**
- **Ein „nicht reaktives“ Ergebnis deutet darauf hin, dass keine T-Effektorzellen nachgewiesen wurden, die sensibilisiert gegenüber SARS-CoV-2 sind.**

Der Auswertungsalgorithmus ist im folgenden Flussdiagramm (Abbildung 3) sowie in den Tabellen 1–3 beschrieben. Dieser Algorithmus beinhaltet auch Kriterien zur Qualitätskontrolle.

Abbildung 3 – Flussdiagramm des Algorithmus

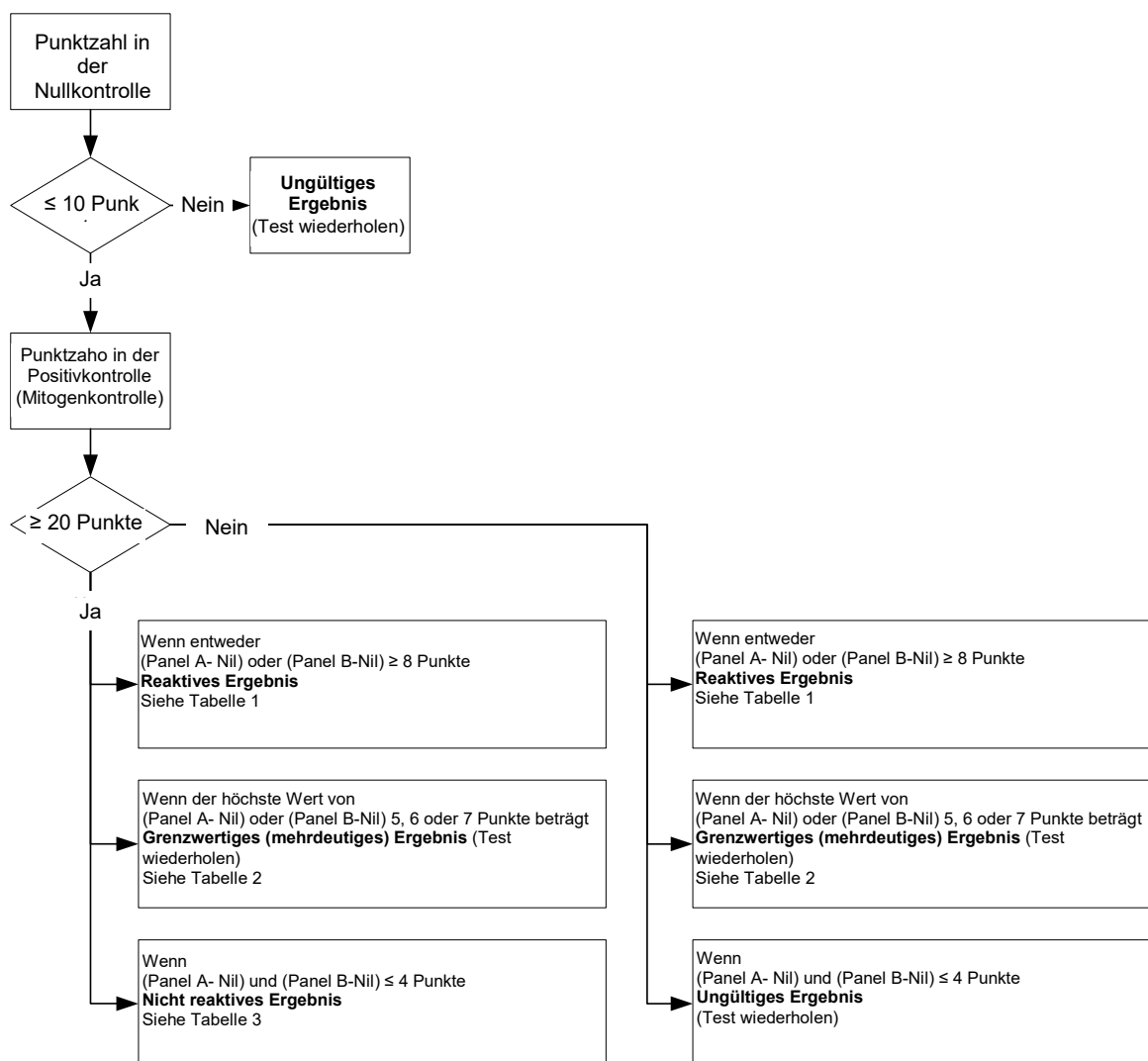


Tabelle 1: Reaktive Auswertung: Entweder (Panel A minus null) oder (Panel B minus null) ≥ 8 Punkte

Nullkontrolle Punktzahl in der Vertiefung	Entweder Panel A oder Panel B weist die folgende Anzahl an Punkten auf [†]	Ergebnisauswertung
0	≥ 8	Reaktiv
1	≥ 9	Reaktiv
2	≥ 10	Reaktiv
3	≥ 11	Reaktiv
4	≥ 12	Reaktiv
5	≥ 13	Reaktiv
6	≥ 14	Reaktiv
7	≥ 15	Reaktiv
8	≥ 16	Reaktiv
9	≥ 17	Reaktiv
10	≥ 18	Reaktiv
> 10 Punkte	n. z.	Ungültig**

[†] Hinweis: Zur Bestimmung des Testergebnisses ist die höchste Punktzahl an Panel minus null zu verwenden.

Table 2: Grenzwertige (mehrdeutige) Auswertung: Die höchste Anzahl an (Panel A minus null) bzw. (Panel B minus null) beträgt 5, 6 oder 7 Punkte

Nullkontrolle Punktzahl in der Vertiefung	Die höchste Anzahl von Panel A oder Panel B weist die folgende Anzahl an Punkten auf	Ergebnisauswertung
0	5, 6 oder 7	Grenzwertig (mehrdeutig)*
1	6, 7 oder 8	Grenzwertig (mehrdeutig)*
2	7, 8 oder 9	Grenzwertig (mehrdeutig)*
3	8, 9 oder 10	Grenzwertig (mehrdeutig)*
4	9, 10 oder 11	Grenzwertig (mehrdeutig)*
5	10, 11 oder 12	Grenzwertig (mehrdeutig)*
6	11, 12 oder 13	Grenzwertig (mehrdeutig)*
7	12, 13 oder 14	Grenzwertig (mehrdeutig)*
8	13, 14 oder 15	Grenzwertig (mehrdeutig)*
9	14, 15 oder 16	Grenzwertig (mehrdeutig)*
10	15, 16 oder 17	Grenzwertig (mehrdeutig)*
> 10 Punkte	n. z.	Ungültig**

Table 3: Negative Auswertung: Sowohl (Panel A minus null) als auch (Panel B minus null) ≤ 4 Punkte

Nullkontrolle Punktzahl in der Vertiefung	Sowohl Panel A als auch Panel B weisen die folgende Anzahl an Punkten auf	Ergebnisauswertung
0	≤ 4	Nicht reaktiv
1	≤ 5	Nicht reaktiv
2	≤ 6	Nicht reaktiv
3	≤ 7	Nicht reaktiv
4	≤ 8	Nicht reaktiv
5	≤ 9	Nicht reaktiv
6	≤ 10	Nicht reaktiv
7	≤ 11	Nicht reaktiv
8	≤ 12	Nicht reaktiv
9	≤ 13	Nicht reaktiv
10	≤ 14	Nicht reaktiv
> 10 Punkte	n. z.	Ungültig**

* Ergebnisse, bei denen die höchste Punktzahl in Panel A oder Panel B so hoch ist, dass die Punktzahl (Panel minus null) 5, 6 oder 7 Punkte beträgt, sollten als grenzwertig (mehrdeutig) betrachtet werden und eine erneute Testung durch Entnahme einer weiteren Patientenprobe wird empfohlen.

** Ungültige Ergebnisse sollten als „ungültig“ vermerkt werden, wobei es sich empfiehlt, eine weitere Probe zu entnehmen und die Person erneut zu testen.

7. EINSCHRÄNKUNGEN

- Abweichungen von der Gebrauchsanweisung in dieser Packungsbeilage können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Eine fehlerhafte Durchführung des Assays kann zu fälschlicherweise reaktiven oder fälschlicherweise nicht reaktiven Ergebnissen führen.

- Ein fälschlicherweise nicht reaktives Ergebnis kann durch eine unsachgemäße Blutprobenentnahme oder eine falsche Handhabung der Probe mit Auswirkung auf die Lymphozytenfunktion verursacht werden.
- Die Leistung des T-SPOT.COVID-Tests mit oder ohne Anwendung des T-Cell *Xtend*-Reagenzes wurde mit Proben von Personen unter 18 Jahren, bei schwangeren Frauen und bei Patienten mit Hämophilie nicht ausreichend untersucht.
- Ein fälschlicherweise reaktives Ergebnis kann für den T-SPOT.COVID-Test bei Anwendung bei Patienten mit vorheriger Exposition gegenüber SARS-CoV-1 und anderen ähnlichen Coronaviren erhalten werden. Alternative Tests sind erforderlich, wenn ein Verdacht auf diese Infektionen vorliegt. Dieses Kit wurde mit derzeit verfügbaren Proben geprüft. Die Leistung bei neuen Mutationen von SARS-CoV-2 muss noch beurteilt werden.
- Die Ergebnisse des T-SPOT.COVID-Tests müssen unter Berücksichtigung der epidemiologischen Anamnese, des aktuellen medizinischen Status und der Ergebnisse anderer diagnostischer Untersuchungen jedes Patienten verwendet werden.
- Ein nicht reaktives Testergebnis schließt die Möglichkeit eines Kontakts oder einer Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus. Patienten mit kürzlich aufgetretener Exposition gegenüber mit SARS-CoV-2 infizierten Personen mit einem nicht reaktiven T-SPOT.COVID-Testergebnis sollten innerhalb von 2 Wochen bzw. bei Auftreten anderer relevanter klinischer Symptome mit Hinweis auf eine potenzielle Infektion erneut getestet werden.
- Ein reaktives Testergebnis ist kein Beweis für eine SARS-CoV-2-Infektion oder eine COVID-19-Erkrankung und kann eine Folge der SARS-CoV-2-Impfung sein; zur Bestätigung der Diagnose einer COVID-19-Erkrankung sollten weitere Tests durchgeführt werden, z. B. ein PCR- oder Antigentest. Ein reaktiver Test weist nicht unbedingt auf eine Immunität gegenüber SARS-CoV-2 hin.
- Im Kühlschrank gelagerte und gefrorene Proben werden nicht für die Verwendung mit dem T-SPOT.COVID-Test empfohlen.

EINSCHRÄNKUNGEN IM ZUSAMMENHANG MIT DER ANWENDUNG DES T-CELL XTEND-REAGENZES

1. Das T-Cell *Xtend*-Reagenz wurde nicht für andere Anwendungsbereiche als für den T-SPOT-Test geprüft.
2. Vollblutproben nicht im Kühlschrank aufbewahren oder einfrieren. Bei der Lagerung und beim Transport zum Labor müssen die Blutproben bei einer Temperatur von 18–25 °C gelagert werden.
3. Jede Abweichung von den empfohlenen Verfahren zu Pipettierung, Waschtechniken, Inkubationszeiten bzw. Temperaturen kann die Ergebnisse beeinflussen.

8. LEISTUNGSMERKMALE

Der Cutoff-Wert des T-SPOT.COVID-Assays wurde während der Entwicklung anhand einer Kurvenanalyse der Operationscharakteristik eines Beobachters (ROC) ermittelt. Die maximale Unterscheidung zwischen PCR-positiven Personen und solchen mit geringem Infektionsrisiko lag bei 6 Punkten. Zusätzlich wurde ein grenzwertiger Bereich von 5–7 festgelegt, um Testvariabilitäten und Ungenauigkeiten im Bereich des Cutoff-Werts zu berücksichtigen.

Analytische Leistungsmerkmale

Interferenzen durch heterophile Antikörper oder intrinsisches Interferon-gamma (IFN- γ) in der Blutprobe werden durch die Separation und das Waschen der PBMC-Fraktion aus dem Vollblut minimiert. Dadurch werden ein eventueller Hintergrund von Interferon-gamma (IFN- γ), andere störende Plasmaanteile, Hämoglobin und jegliche heterophile Antikörper entfernt.

Andere Zytokine als Interferon-gamma (IFN- γ) werden erwartungsgemäß von Leukozyten produziert, darunter IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF α , IFN- α und IFN- β . Diese wurden auf Kreuzreaktivität mit dem beim T-SPOT.COVID-Test verwendeten Antikörperpaar untersucht. Dabei gab es keine Hinweise auf eine Kreuzreaktivität zwischen dem verwendeten Antikörperpaar und anderen Zytokinen.

Die Intra-Assay-Variabilität wurde durch den Vergleich des T-SPOT.COVID-Testlaufs auf derselben Platte durch denselben Anwender analysiert. Die Experimente wurden von drei Anwendern auf neun Platten durchgeführt, was zu einer Reihe von %CV führte, die repräsentativ für die inhärente Variation im Test sind. Der Wertebereich, der für hohe Punktzahlen ($210,4 \pm 11,6$) ermittelt wurde, lag zwischen 2,2 % und 7,7 % CV (mittlerer %CV = 4,4). Mittlere Punktzahlen ($71,2 \pm 8,5$) ergaben einen Wertebereich von 6,6 % bis 16,5 % CV (mittlerer %CV = 11,0 %), während die Punktzahlen nahe dem Cutoff-Wert (mittlere Punktzahl = $5,7 \pm 1,3$) einen mittleren %CV von 22,0 % ergaben.

Daten zur Inter-Assay-Präzision wurden wie folgt gesammelt: drei Kit-Chargen wurden von drei verschiedenen Anwendern verwendet, um die gleichen drei Proben an sechs Testzeitpunkten zu testen. Der über die drei Proben, drei Anwender und drei Chargen gemessene Variationskoeffizient betrug 3,7 % für Proben mit einer mittleren Punktzahl von 210,4. Bei Punktzahlen nahe dem Cutoff-Wert des T-SPOT.COVID-Tests lag die Inter-Assay-Variabilität bei 25,0 %. Bei mittleren Punktzahlen betrug der mittlere %CV 13,9 %. Die Ergebnisse für den %CV waren bei allen getesteten Chargen gleich.

Die Reproduzierbarkeit zwischen Anwendern wurde mit drei Anwendern und je einer Platte aus drei Kit-Chargen beurteilt. Die zwischen den Anwendern beobachtete Variabilität betrug 3,6 % bis 5,8 % CV.

Klinische Leistungsmerkmale

Es wurde eine Studie unter Verwendung des zuvor ermittelten Cutoff-Werts von 6 Punkten (Daten im Archiv) durchgeführt, um die klinische Leistung des T-SPOT.COVID-Tests bei einer PCR-bestätigten SARS-CoV-2-Infektion (bei asymptomatischen und symptomatischen Patienten) zu beurteilen und die Testleistung bei Patienten mit akuter Infektion bzw. bei rekonvaleszenten Patienten zu untersuchen. Außerdem wurde die Testleistung bei Patienten mit einem geringeren relativen Risiko für eine Infektion untersucht. Alle Proben wurden mit einem serologischen Anti-N-IgG-Test (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG)) als Vergleichstest mit dem T-SPOT.COVID-Test getestet.

Insgesamt wurden 281 Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten, in die Studie aufgenommen. Davon wurden 169 Patienten in die Gruppe mit einer PCR-bestätigten SARS-CoV-2-Infektion (die positive Kohorte) aufgenommen. Davon wurde ein Patient aufgrund einer geringen Zellenrückgewinnung und 17 Patienten aufgrund fehlender serologischer Ergebnisse ausgeschlossen, weshalb 151 Patienten in der Analyse berücksichtigt wurden.

Insgesamt 112 Patienten wurden in die Kohorte mit einem geringeren Risiko aufgenommen. Dabei lagen bei 4 Patienten keine bestätigenden serologischen Ergebnisse vor und 6 weitere Patienten wurden ausgeschlossen, nachdem ein positiver bestätigender serologischer Test vorlag. Übrig blieben 102 Patienten, von denen einer aufgrund einer geringen Zellenrückgewinnung und einer aufgrund von technischen Problemen mit dem T-SPOT.COVID-Test ausgeschlossen wurde. Folglich wurden 100 Patienten mit geringerem Risiko in die Analyse einbezogen.

Nachfolgend sind demographische Daten zur PCR-bestätigten Kohorte und zur Kohorte mit geringerem Risiko zusammengefasst:

Kohorte	PCR-bestätigte SARS-CoV-2-Infektion	Geringeres relatives Risiko einer Infektion
Anzahl der Patienten	168	100
Mittleres Alter (in Jahren) (SA)	50,5 (15,2) Spannweite von 19 bis 83	54,7 (15,7) Spannweite von 18 bis 87
% männlich	38,7 % (65/168)	36,0 % (36/100)
Mittlere Zeit seit dem ersten positiven PCR-Test (in Tagen) (Bereich)	83,4 (0,249)	Nicht zutreffend
% mit Symptomen	95,8 % (161/168)	Nicht zutreffend

Positive Übereinstimmung unter den PCR-bestätigten Patienten

151 Patienten, die zuvor mittels PCR positiv auf SARS-CoV-2 getestet worden waren, wurden mit dem T-SPOT.COVID-Test und dem serologischen Anti-N-IgG-Test untersucht. Der Zeitraum seit dem ersten PCR-Testergebnis wurde vermerkt und lag bei 2 bis 249 Tagen. In dieser Kohorte gab es keine ungültigen T-SPOT.COVID-Ergebnisse.

Tabelle 4: Prozentuale positive Übereinstimmung mit PCR im Zeitverlauf unter Einbeziehung aller Ergebnisse sowohl des T-SPOT.COVID-Tests als auch des serologischen Anti-N-IgG-Tests unter Verwendung eines Cutoff-Werts für die Reaktivität von 6 Punkten und unter Vernachlässigung des grenzwertigen Bereichs (einschließlich grenzwertiger Ergebnisse)

Tage seit dem ersten positiven PCR-Test	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Positive Übereinstimmung	95%iges KI	Positive Übereinstimmung	95%iges KI
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 %
Gesamt ≤ 60	92,6 % (87/94)	85,3–97,0 %	74,5 % (70/94)	64,4–82,9 %

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)	-
Gesamt	80,7 % (46/57)	68,1–90,0 %	38,6 % (22/57)	26,0–52,4 %
> 60				

Tabelle 5: Prozentuale positive Übereinstimmung mit PCR im Zeitverlauf unter Einbeziehung aller Ergebnisse sowohl des T-SPOT.COVID-Tests als auch des serologischen Anti-N-IgG-Tests unter Verwendung nur reaktiver und nicht reaktiver Ergebnisse des T-SPOT.COVID-Tests (d. h. Unter Ausschluss von Ergebnissen die in den grenzwertigen Bereich fallen)

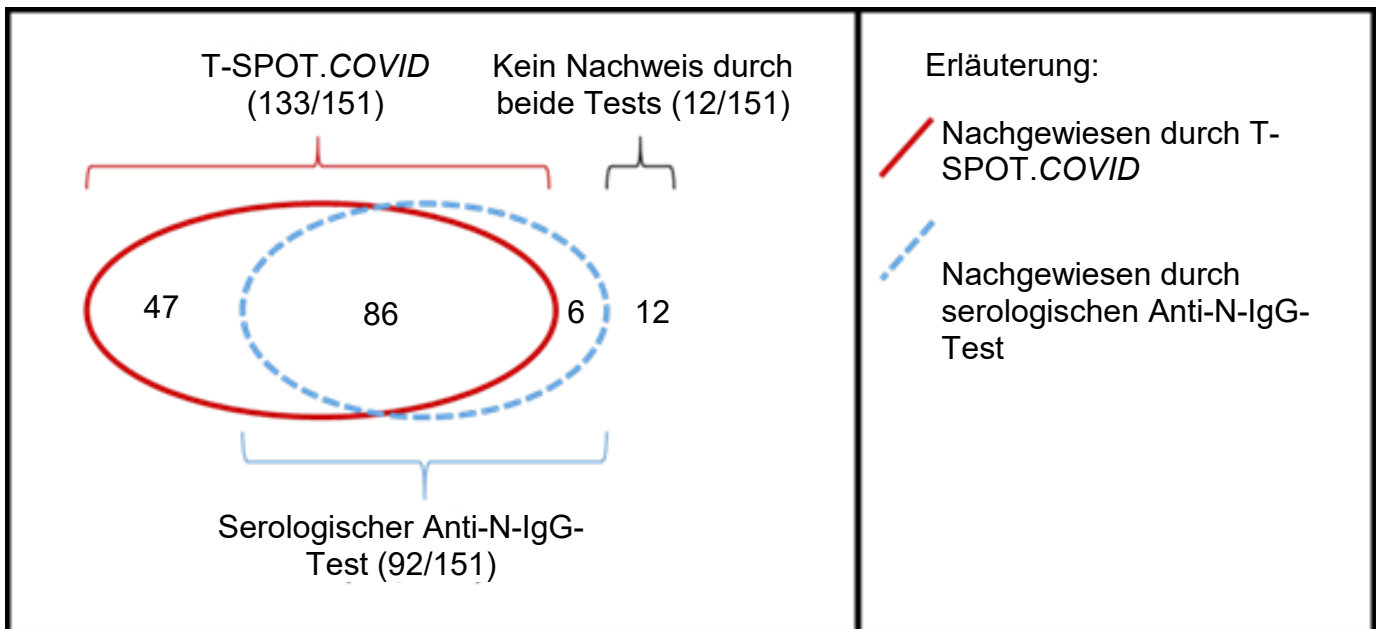
Tage seit dem ersten positiven PCR-Test	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Positive Übereinstimmung	95%iges KI	Positive Übereinstimmung	95%iges KI
0–6	100,0 % (1/1)	2,5–100,0 %	0,0 % (0/1)	-
7–13	100,0 % (4/4)	39,8–100,0 %	25,0 % (1/4)	6,3–80,6 %
14–30	100,0 % (12/12)	73,5–100,0 %	75,0 % (9/12)	42,8–94,5 %
31–60	95,7 % (67/70)	88,0–99,1 %	82,9 % (58/70)	72,0–90,8 %
Gesamt	96,6 % (84/87)	90,3–99,3 %	78,2 % (68/87)	68,0–86,3 %
≤ 60				
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)	-
Gesamt	83,3 % (40/48)	69,8–92,5 %	41,7 % (20/48)	27,6–56,8 %
> 60				

Diese Daten zeigen eine prozentuale positive Übereinstimmung zwischen dem T-SPOT.COVID-Test und dem PCR-Test von 92,6 % (96,6 % ohne grenzwertige Ergebnisse) bis zu 60 Tage nach einem positiven PCR-Testergebnis. Nach diesem Zeitpunkt fällt die prozentuale Übereinstimmung leicht ab. Zu Zeitpunkten ab 60 Tage nach dem PCR-Ergebnis betrug die Übereinstimmung 80,7 % (83,3 % bei Verwendung von ausschließlich eindeutigen Ergebnissen).

Insgesamt zeigen diese Daten eine prozentuale positive Übereinstimmung zwischen dem serologischen Anti-N-IgG-Test und dem PCR-Test von 74,5 % bis zu 60 Tage nach einem positiven PCR-Testergebnis. Nach diesem Zeitpunkt fällt die prozentuale Übereinstimmung ab. Zu Zeitpunkten ab 60 Tage nach dem PCR-Ergebnis betrug die Übereinstimmung für den serologischen Anti-N-IgG-Test 38,6 %.

Die gleichen Daten wurden analysiert, um zu bestimmen, ob Patienten, die mit dem serologischen Anti-N-IgG-Test negativ getestet wurden, ein reaktives T-SPOT.COVID-Testergebnis aufwiesen und umgekehrt. Die Daten sind nachfolgend in einem Venn-Diagramm dargestellt (Abbildung 4) und zeigen, wie sich T-Zell- und Serologie-Daten gegenseitig ergänzen können.

Abbildung 4: Verteilung der reaktiven/positiven Ergebnisse zwischen dem T-SPOT.COVID-Test und dem serologischen Anti-N-IgG-Test bei Patienten mit einer PCR-bestätigten SARS-CoV-2-Infektion (n = 151)



Von den 151 per PCR auf SARS-CoV-2 positiv getesteten Proben wurden mittels T-SPOT.COVID-Test 18 Proben als negativ getestet, wohingegen der serologische Anti-N-IgG-Test 59 negative Proben ergab. Der T-SPOT.COVID-Test ergab bei 79,7 % (47/59) der mittels serologischem Anti-N-IgG-Test negativ getesteten Proben ein positives Ergebnis. Der serologische Anti-N-Test war bei 6 von 18 Fällen positiv, in denen der T-SPOT.COVID-Test negativ ausfiel. Diese Daten verdeutlichen, dass eine Kombination aus Serologie und ELISPOT-T-Zell-Analyse bei der Bestimmung des SARS-CoV-2-Infektionsstatus sinnvoll ist.

Negative Übereinstimmung unter Patienten mit geringerem relativen Risiko einer Infektion

Aufgenommen wurde eine Kohorte von Patienten, die sich in einer endemischen Umgebung befanden, bei denen jedoch ein geringeres relatives Risiko für eine SARS-CoV-2-Infektion festgestellt wurde, und zwar aufgrund folgender Kriterien: (i) Abwesenheit von selbstberichteten Symptomen, die mit einer SARS-CoV-2-Infektion vereinbar sind, (ii) keine Anamnese eines vorherigen positiven SARS-CoV-2-PCR-Tests, (iii) keine Teilnahme an einer Impfstoffstudie und kein Erhalt eines COVID-19-Impfstoffs und (iv) ein negativer serologischer Anti-N-Lateral-Flow-Test (Biohit SARS-CoV-2 IgM/IgG Antibody Test Kit), der als primärer Screeningtest zum Zeitpunkt der Aufnahme verwendet wurde, sowie (iv) die Bestätigung eines negativen serologischen Tests durch einen serologischen Labortest (serologischer Anti-N-IgG-Test (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG))).

Tabelle 6: Prozentuale negative Übereinstimmung

	N	Positiv	Negativ	Negative Übereinstimmung (%) (95%iges KI)
Einschließlich des grenzwertigen Bereichs	100	3	97	97,0 % (91,5–99,4)
Ohne grenzwertigen Bereich	98	2	96	98,0 % (92,8–99,8)

97,0 % der T-SPOT.COVID-Testergebnisse (97/100) lagen unter dem Cutoff-Wert von 6 Punkten (95%ige Konfidenzintervalle von 91,5 bis 99,4 %). Zwei Ergebnisse waren grenzwertig (5 und 7 Punkte). Wenn diese Ergebnisse ausgeschlossen wurden, waren 98,0 % (92,8–99,8%iges KI) der T-SPOT.COVID-Testergebnisse (96/98) nicht reaktiv. Es gab keine ungültigen Ergebnisse.

Obwohl wir alle notwendigen Schritte unternommen haben, um sicherzustellen, dass diese Kohorte ein geringes Infektionsrisiko aufweist, können wir nicht ausschließen, dass ein Teil dieser Gruppe eine asymptomatische Infektion hatte oder immer noch hat, die zum Zeitpunkt des Tests seronegativ war, bei der der T-SPOT.COVID-Test aber eine T-Zell-Antwort nachweisen konnte.

9. ERWARTETE WERTE

Der Bereich der Punktzahlen, die als Reaktion auf die Null- und Positivkontrollantigene und die SARS-CoV-2-Antigene in unseren klinischen Studien beobachtet wurden (Details zu den Kohorten der klinischen Studien siehe Abschnitt 8), ist in Abbildung 5a und b dargestellt.

Abbildung 5a: Histogramm der Ergebnisse der Nullkontrolle aller Patienten (n = 251).

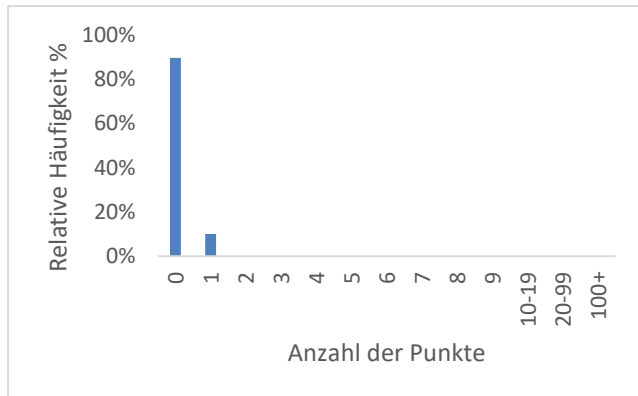
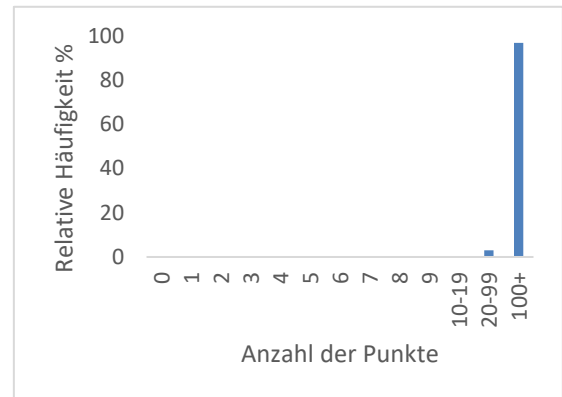


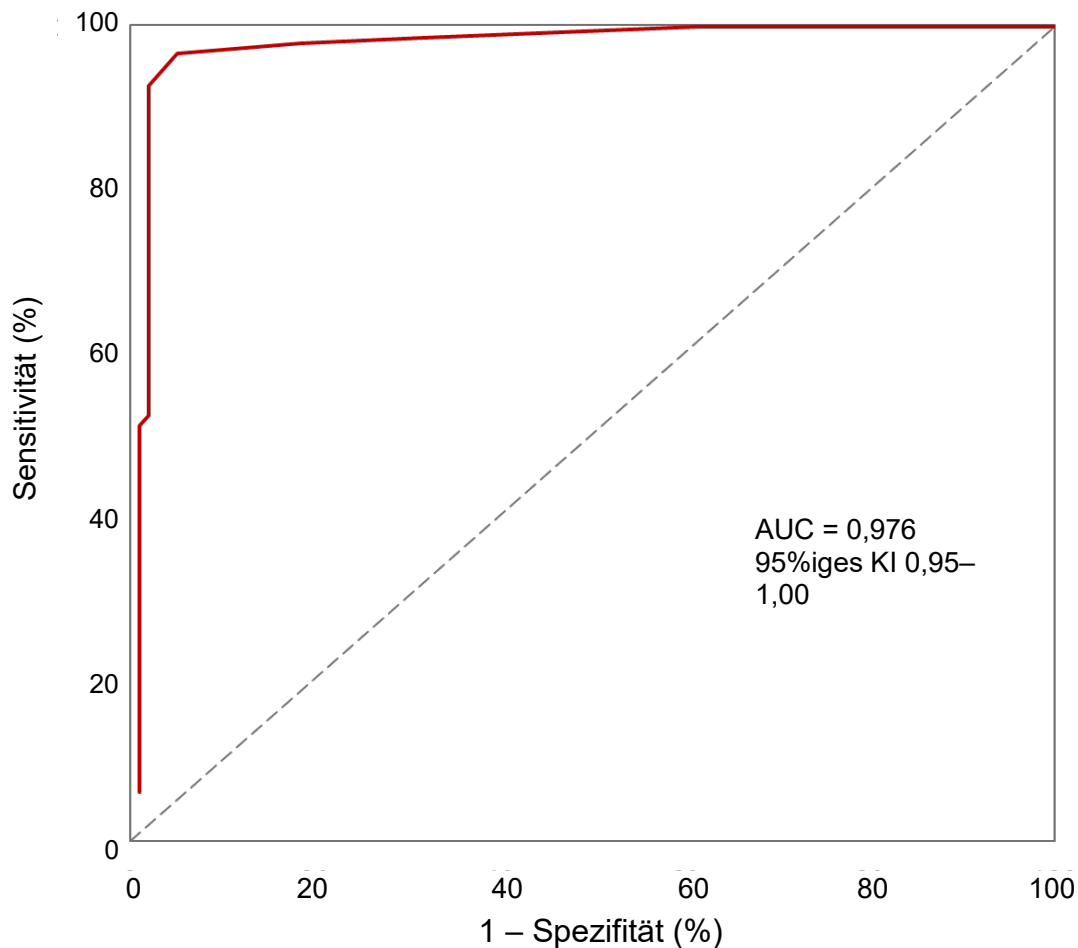
Abbildung 5b: Histogramm der Ergebnisse der Positivkontrolle aller Patienten (n = 251).



Die überwiegende Mehrheit der Vertiefungen der Nullkontrolle ergab null Punkte. In der Nullkontrolle wurden keine Punktzahlen von mehr als eins beobachtet. Die Antworten auf die Positivkontrolle waren robust und es wurden keine Fälle von Punktzahlen von weniger als 20 beobachtet.

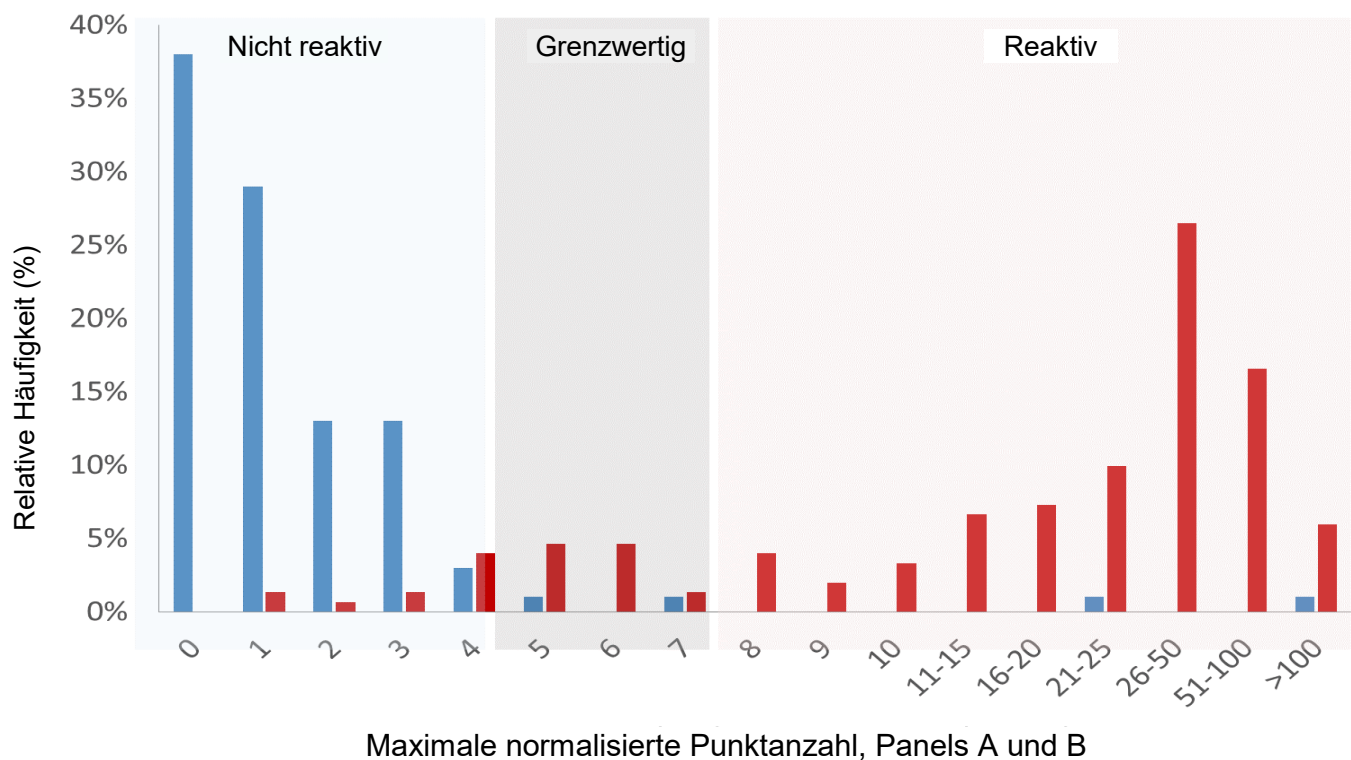
Der Cutoff-Wert des Assays wurde im Rahmen der klinischen Studien bestätigt. In Abbildung 6 ist die ROC-Kurve dargestellt, die anhand der Daten aus den klinischen Studien erstellt wurde. Ein Cutoff-Wert von 6 Punkten ermöglichte die maximale Trennung zwischen den beiden Kohorten und bestätigte damit den zuvor festgelegten Wert.

Abbildung 6: Eine Kurve der Operationscharakteristik eines Beobachters wurde unter Verwendung der Validierungsdaten von 151 PCR-bestätigten Patienten (zur Abschätzung der Sensitivität verwendet) und 100 Patienten mit einem geringeren relativen Risiko einer Infektion (zur Abschätzung der Spezifität verwendet) erstellt.



Die gleichen Daten wurden auch verwendet, um den Vorteil der Einbeziehung eines grenzwertigen Bereichs zu bestätigen, wie in Abbildung 7 dargestellt.

Abbildung 7: Die Grafik zeigt die Verteilung der mit dem T-SPOT.COVID-Test in klinischen Studien in den USA beobachteten Punktzahlen mit einer Überlagerung der vorgegebenen Testauswertungskriterien. „Maximale normalisierte Punktzahl“ ist die maximale Antwort (Panel minus null) von Panel A oder Panel B (n = 251). Die relative Häufigkeit der verschiedenen Punktzahlen ist für die klinische Kohorte mit geringerem Risiko (blaue Balken) und für die PCR-bestätigte Kohorte (rote Balken) dargestellt.



Die Mehrheit der Patienten in der Kohorte mit geringerem Risiko (blaue Balken) wies mit 96,0 % im Bereich von 0 bis 4 Punkten keine bis geringe Reaktivität auf. PCR-bestätigte Patienten (rote Balken) wiesen eine hohe Reaktivität mit 23,2 % bei 8 bis 20 Punkten und einer Mehrheit (58,9 %) bei > 20 Punkten auf. Der grau schattierte Bereich stellt den grenzwertigen (mehrdeutigen) Bereich (5, 6 oder 7 Punkte) dar, in dem erwartungsgemäß eine Überlappung zwischen den Punktzahlverteilungen der beiden Studienkohorten zu beobachten ist. Alle Tests mit Ergebnissen in diesem Bereich sollten wiederholt werden.

10. FEHLERBEHEBUNG

Dieser Assay ist unter Anwendung der Grundsätze der guten Laborpraxis und bei strikter Einhaltung dieser Gebrauchsanweisung durchzuführen.

Grenzwertige (mehrdeutige) Ergebnisse

Grenzwertige (mehrdeutige) Ergebnisse sind solche, bei denen das Maximum der beiden Punktzahlergebnisse (Panel minus Nullkontrolle) innerhalb von ± 1 Punkt vom ROC-bestimmten Assay-Cutoff-Wert von ≥ 6 Punkten liegt. Obwohl sie Gültigkeit besitzen, sind grenzwertige (mehrdeutige) Ergebnisse weniger verlässlich als solche, bei denen die Punktzahl weiter vom Grenzwert entfernt liegt. Deshalb wird eine erneute Untersuchung des Patienten unter Verwendung einer neuen Probe empfohlen. Fällt das Ergebnis dieser neuen Untersuchung immer noch grenzwertig aus, sollten andere diagnostische Tests und/oder epidemiologische Informationen zur Bestimmung des Immunstatus bei diesem Patienten herangezogen werden.

Ungültige Ergebnisse

Ungültige Ergebnisse sind selten und können mit dem Immunstatus der getesteten Person zusammenhängen. Sie können auch mit einer Reihe von technischen Faktoren zusammenhängen, die möglicherweise zu Ergebnissen wie „hoher Hintergrundwert“, „niedriger Mitogenwert“ und „hoher Nullwert“ führen:

- Verwendung nicht geeigneter Blutentnahmeröhrchen
- Lagerung von Blut länger als 8 Stunden vor der Verarbeitung ohne Verwendung des T-Cell *Xtend*-Reagenzes
- Lagerung von Blut außerhalb des empfohlenen Temperaturbereichs vor der Verarbeitung der Blutproben
- Kontamination des Zellkulturmediums
- Unvollständiges Waschen der Platte

Bei ungültigen Ergebnissen wird eine Wiederholung des Tests mit einer neuen Patientenprobe empfohlen. Technische Dokumente mit den wichtigsten Punkten zur Fehlerbehebung sind verfügbar. Diese sind auf Anfrage bei Oxford Immunotec erhältlich.











11. ABKÜRZUNGEN UND ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE

Abkürzungen

AUC	Fläche unter der Kurve
BCIP/NBT	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat/Nitroblautetrazoliumchlorid
CDC	Behörde Centers for Disease Control and Prevention des US-amerikanischen Gesundheitsministeriums
KI	Konfidenzintervall
CLIA	Änderungen zur Verbesserung des klinischen Labors
CPT	Zellpräparationsröhrchen
CV	Variationskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunospot Assay
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

PHA	Phytohämagglutinin
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
ROC	Operationscharakteristik eines Beobachters
U/min	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
TNF	Tumornekrosefaktor

Symbolglossar

	In-vitro-Diagnostikum
	Verfallsdatum (Jahr-Monat-Tag)
	Chargennummer
	Katalognummer
	Achtung, siehe Gebrauchsanweisung
	Herstellungsdatum
	Hersteller
	Temperaturbeschränkung/Lagerung bei
	Gebrauchsanweisung beachten
	Autorisierter Vertreter in der EU

BS EN ISO 15223-1:2016

Die für den T-SPOT.COVID-Test verwendeten Symbole entsprechen der internationalen Norm ISO 15223-1:2016 „Medizinprodukte – Bei Aufschriften von Medizinprodukten zu verwendende Symbole, Kennzeichnung und zu liefernde Informationen“.

12. LITERATURNACHWEISE

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> [Abgerufen am 2. Februar 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, Rounghel 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. KONTAKTDATEN

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

Produktsupport, Downloads und weitere technische Informationen finden Sie auf unserer Website:
www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT und T-Cell Xtend sind eingetragene Marken von Oxford Immunotec Ltd.
 Das Oxford Immunotec-Logo ist eine eingetragene Marke von Oxford Immunotec Ltd.
 AIM V und GIBCO sind eingetragene Marken der Life Technologies Corporation.
 CPT und Vacutainer sind Marken von Becton, Dickinson and Company.
 Ficoll und Ficoll-Paque sind eingetragene Marken von Cytiva, einem Tochterunternehmen von Global Life Sciences Solutions USA LLC.
 Tween ist eine eingetragene Marke von Croda Americas LLC.

Die Verwendung des T-Cell *Xtend*-Reagenz ist durch folgende Patente und angemeldeten Patente geschützt:
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Revisionsnummer: 1 Veröffentlichungsdatum: 27. April 2021
© 2021 Oxford Immunotec. Alle Rechte vorbehalten.



Hersteller

Oxford Immunotec Ltd
94C Innovation Drive, Milton Park, Abingdon Oxfordshire,
OX14 4RZ, Großbritannien www.oxfordimmunotec.com

EC REP Autorisierter Vertreter in der EU

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



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

