



T-SPOT[®] COVID



Oxford
Immunotec



FOLHETO INFORMATIVO

Para utilização em diagnósticos *in vitro*

Este folheto informativo abrange a utilização

de:

COV.435/300, COV.435/200

Índice

Finalidade	3
Resumo e explicação	3
Reagentes e armazenamento	5
Armazenamento e estabilidade	6
Avisos e precauções	7
Colheita e manuseamento de amostras	7
Instruções de utilização	8
Limitações	14
Características de desempenho	15
Valores esperados	19
Resolução de problemas	20
Abreviaturas e Glossário de símbolos	21
Bibliografia	21
Informações de contacto	23

1. FINALIDADE

O teste T-SPOT.COVID é uma técnica padronizada baseada em ELISPOT (Immunospot ligado a enzimas), destinada à deteção qualitativa de uma resposta imunitária mediada por células (linfócitos T) ao SARS-CoV-2 em sangue total humano (heparina de sódio ou lítio). O teste T-SPOT.COVID destina-se a ser utilizado como auxiliar na identificação de indivíduos com uma resposta imunitária adaptativa ao SARS-CoV-2, especificamente a resposta dos linfócitos T. Este teste pode ser usado em conjunto com testes de serologia para apoiar a avaliação clínica de indivíduos que, por exemplo, apresentem suspeitas de COVID-19, mas se encontrem negativos no PCR ao SARS-CoV-2 e é complementar à serologia.

Os resultados destinam-se à deteção de uma resposta imunitária mediada por células (linfócitos T) ao SARS-CoV-2. A resposta dos linfócitos T ao SARS-CoV-2 é geralmente detetável no sangue vários dias após a infeção inicial e, atualmente, a duração do período para uma resposta detetável pós-infeção não está bem caracterizada.

Os resultados reativos do teste T-SPOT.COVID podem ocorrer devido à infeção de outros vírus semelhantes e à vacinação anterior contra o SARS-CoV-2.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

O SARS-CoV-2 é uma estirpe do Coronavírus descoberta na província de Wuhan, na China, em 2019. O vírus disseminou-se rapidamente por todo o mundo durante os primeiros meses de 2020, levando à declaração de uma pandemia pela OMS, a 11 de março de 2020¹. Foram desenvolvidos rapidamente vários testes de base molecular, que estão agora amplamente disponíveis em todo o mundo². Estes testes foram e continuam a ser amplamente utilizados para a confirmação de uma infeção atual por SARS-CoV-2. Inicialmente, foram descritos como altamente sensíveis e específicos, no entanto, as revisões sistemáticas de estudos do mundo real sugerem que uma estimativa razoável para a sensibilidade dos testes moleculares é de aproximadamente 70%^{3,4}. Zhao *et al.* relataram que de 173 pacientes hospitalizados com sintomas respiratórios agudos e uma tomografia computadorizada torácica característica da doença COVID-19, apenas 67% receberam resultados positivos do teste RT-PCR de uma amostra respiratória durante os dias 1-7 de hospitalização⁵. Estes dados sugerem que os falsos negativos são comuns na doença COVID-19 aguda, se o diagnóstico se basear apenas em testes moleculares. Além disso, os testes moleculares são incapazes de identificar os indivíduos que foram infetados mas que, desde então, eliminaram o vírus⁶. Como tal, foram desenvolvidos vários testes serológicos para detetar anticorpos no sangue ou em produtos sanguíneos de indivíduos previamente infetados com o SARS-CoV-2. Estes testes fornecem informações valiosas sobre a prevalência da exposição ao vírus na população geral^{2,7}, mas também podem ser usados como complemento aos testes moleculares ao fazer um diagnóstico clínico da doença COVID-19 aguda⁸.

Alguns estudos demonstraram que, geralmente, a resposta imunitária adaptativa é gerada no espaço de 2 semanas após a infeção por SARS-CoV-2; no entanto, vários estudos demonstraram que nem sempre se verifica uma resposta de anticorpos ou que esta pode retardar-se^{9,10}. A literatura atual sugere que alguns indivíduos com teste positivo para infeção por SARS-CoV-2 com recurso ao PCR podem não gerar uma resposta de anticorpos detetável⁹. Foram observados, com frequência, níveis baixos de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 em indivíduos com doença COVID-19 leve ou assintomática^{11,12}. Também há evidências que sugerem que, em determinados indivíduos, os anticorpos diminuem significativamente após a infeção e a um ritmo ainda mais rápido do que o observado na infeção por MERS e SARS-CoV-1^{13,14}.

Em contraste, várias publicações mostraram que as respostas dos linfócitos T aos coronavírus humanos, incluindo o SARS-CoV-1 e o SARS-CoV-2, podem ser robustas e duradouras¹⁵, com alguns indivíduos infetados com o SARS-CoV-1 há 17 anos que ainda apresentam respostas dos linfócitos T na atualidade¹⁶. Vários estudos demonstraram que a imunidade dos linfócitos T específicos para o SARS-CoV-2 se mantém 6-9 meses após a primeira infeção, indicando que as respostas dos linfócitos T podem durar mais do que as respostas transitórias dos anticorpos à infeção por SARS-CoV-2^{15,17}. Estas descobertas, juntamente com estudos que demonstraram o papel crucial dos linfócitos T na eliminação viral e recuperação do SARS-CoV-2¹⁸, sugerem que a imunidade mediada por células pode ser um aspeto importante da resposta imunitária à infeção por SARS-CoV-2¹⁹. Além disso, embora a dinâmica da resposta dos linfócitos T específicos para o SARS-CoV-2 ainda não tenha sido totalmente compreendida, as evidências sugerem que a maioria dos indivíduos infetados com o SARS-CoV-2 geram linfócitos T SARS-CoV-2 funcionais com produção de IFN-gama (IFN- γ) que podem ser detetados no sangue periférico 2-4 dias após o início dos sintomas¹⁹. Tan *et al.* analisaram a cinética da resposta dos linfócitos T específicos do SARS-CoV-2 durante a fase aguda com RT-PCR positiva da infeção e descobriram que foram detetados linfócitos T específicos pela primeira vez por volta dos dias 5-7 após o início dos sintomas, com um aumento gradual das frequências até cerca do dia 15¹⁸. Observaram também uma correlação positiva entre a deteção precoce de linfócitos T específicos do SARS-CoV-2 e o controlo precoce da infeção, levando a resultados mais leves da doença e à rápida eliminação viral. De modo semelhante, Weiskopf *et al.* demonstraram que os linfócitos T CD4 e CD8 específicos do SARS-CoV-2 podem ser detetados no sangue de doentes COVID-19 graves nas primeiras duas semanas após o início dos sintomas²⁰. Isto indica que, embora o SARS-CoV-2

grave tenha sido anunciado como causador de linfopenia²¹, continuam a ser gerados linfócitos T específicos do SARS-CoV-2 durante a resposta inicial à infeção. Além disso, um estudo recente de Rydzynski Moderbacher *et al.* verificou que podiam ser detetados linfócitos T CD4 específicos do SARS-CoV-2, 4 dias após o início dos sintomas²². Em concordância com Tan *et al.*, este estudo também mostrou que o surgimento precoce de linfócitos T CD4 e CD8 específicos do SARS-CoV-2 estava associado a melhores desfechos da doença. Juntas, estas descobertas não realçam apenas a importância dos linfócitos T na orquestração da resposta imunitária contra o SARS-CoV-2 na fase aguda da infeção, mas sugerem também que a deteção de linfócitos T durante a infeção aguda por SARS-CoV-2 poderá fornecer informações mais detalhadas sobre a resposta imunitária de um indivíduo.

Um estudo de coorte prospetivo realizado pela Public Health England durante as fases iniciais da pandemia de COVID-19 reiterou a importância da monitorização dos linfócitos T na infeção por SARS-CoV-2. Neste estudo, 2.826 indivíduos identificados como trabalhadores essenciais foram testados aquando da inscrição para linfócitos T reativos a anti-spike IgG (EuroImmuno AG) e SARS-CoV-2 usando uma versão de uso exclusivo em investigação (RUO) do teste T-SPOT.COVID (Oxford Immunotec)²³ a partir do qual este teste foi desenvolvido. Desta coorte de trabalhadores essenciais, 154 foram recrutados com base num teste RT-PCR positivo anterior confirmando a infeção por SARS-CoV-2. 5,8% desta população previamente positiva para PCR era seronegativa, mas 88,9% destes indivíduos demonstraram respostas robustas dos linfócitos T que foram detetados com recurso à versão de pesquisa do teste T-SPOT.COVID. Esta descoberta indica que alguns indivíduos infetados podem gerar respostas imunitárias mediadas por células (linfócitos T) na ausência de uma resposta de anticorpos. Isto corresponde a estudos realizados em contactos domiciliários de indivíduos infetados com SARS-CoV-2, que descobriram que os contactos tinham uma probabilidade cerca de 50% superior de desenvolver linfócitos T específicos do SARS-CoV-2 do que anticorpos, após a exposição^{24,25}. Em conjunto, estes resultados sugerem que os linfócitos T podem ser um indicador mais sensível de exposição prévia ao SARS-CoV-2 do que as respostas de anticorpos.

No mesmo estudo da Public Health England, os 2.672 participantes do estudo restantes foram monitorizados quanto ao desenvolvimento subsequente de infeção por SARS-CoV-2 confirmada por PCR²³. Este acompanhamento forneceu a primeira indicação de que os linfócitos T específicos do SARS-CoV-2 podem estar associados à proteção contra reinfeções, uma vez que os indivíduos com um elevado número de linfócitos T reativos detetados através da versão RUO do teste T-SPOT.COVID apresentavam uma probabilidade significativamente inferior de desenvolver uma infeção por SARS-CoV-2 confirmada por PCR durante o período de acompanhamento. Estas descobertas preliminares correlacionam-se com estudos de primatas que demonstraram que a depleção de linfócitos T em símios que tinham recuperado do SARS-CoV-2, resultou numa reinfeção após a reexposição ao vírus, ainda que as respostas dos anticorpos específicos do SARS-CoV-2 permanecessem intactas. Em contraste, os símios que retiveram os linfócitos T específicos do SARS-CoV-2 foram capazes de combater a reinfeção com êxito²⁶. Em linha com estudos anteriores, este estudo em animais também observou um declínio nas respostas de anticorpos após a infeção, levando os autores a concluir que os linfócitos T podem ser necessários para uma proteção a longo prazo contra o vírus. Estas descobertas indicam que os linfócitos T desempenham um papel fundamental nas respostas imunitárias contra a infeção natural por SARS-CoV-2 e, como tal, é importante induzir uma resposta robusta dos linfócitos T em resposta às vacinas contra o SARS-CoV-2²⁷. Foram detetados linfócitos T específicos do SARS-CoV-2 em resposta a muitas das atuais vacinas candidatas^{28,29,30} e a importância de detetar e monitorizar estas respostas está a tornar-se cada vez mais reconhecida²⁷. A versão de investigação do teste T-SPOT.COVID foi usada para demonstrar uma resposta específica dos linfócitos T após a vacinação. Os dados preliminares mostram uma diferença significativa entre as contagens de manchas de linfócitos T pré e pós-vacinação (dados internos).

O ensaio T-SPOT.COVID é uma variante simplificada e padronizada da técnica de ensaio ELISPOT. Os ensaios ELISPOT detetam e medem as respostas dos linfócitos T enumerando o número de linfócitos T que segregam citocinas em resposta à estimulação com antigénios. Os ensaios ELISPOT são excepcionalmente sensíveis uma vez que a citocina alvo é capturada diretamente em redor da célula secretora, antes de ser diluída no sobrenadante, ligada por recetores de células adjacentes ou degradada. Isto torna os ensaios ELISPOT muito mais sensíveis do que os ensaios ELISA convencionais^{31,32,33,34}. A sensibilidade é importante ao detetar as respostas de linfócitos T ao SARS-CoV-2, uma vez que a frequência de linfócitos T pode ser menor do que para outros vírus que induzem respostas dos linfócitos T³⁵ e uma variedade de fatores, incluindo idade²², gravidade da doença²⁴ e imunossupressão³⁶ foram associados à variabilidade na magnitude das respostas dos linfócitos T específicos do SARS-CoV-2.

O teste enumera linfócitos T efetores que respondem à estimulação usando dois conjuntos separados de peptídeos derivados das proteínas Spike e do Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2. A resposta dos linfócitos T a cada proteína é medida em paralelo em poços individuais. Os painéis de antigénio T-SPOT.COVID são concebidos como péptidos sobrepostos que abrangem sequências das proteínas Spike (COV-A) e do Nucleocapsídeo (COV-B). Este design de péptido oferece uma cobertura máxima de epítomos para a deteção aprimorada de reatividade dos linfócitos T e sem restrições de HLA. As formulações antigénicas de 253 péptidos cobrindo as regiões mais imunogénicas do genoma do vírus permitem a medição da amplitude da imunidade e garantem a minimização do impacto das mutações pontuais. A especificidade para o SARS-CoV-2 foi aumentada pela remoção de sequências de péptidos com potencial de reatividade cruzada com alta homologia com outros coronavírus.

PRINCÍPIO DO TESTE

A resposta imunitária à infecção por SARS-CoV-2 é mediada pela ativação das células B e T. Como parte da resposta dos linfócitos T, os linfócitos T são sensibilizados para os antígenos do SARS-CoV-2, desenhados para ativar os linfócitos T efetores CD4 e CD8, que produzem então a citocina interferon gama (IFN- γ) quando estimulados por esses antígenos^{37,38}. O teste T-SPOT.COVID usa a metodologia imunoenzimática (ELISPOT) para enumerar os linfócitos T sensibilizados para o SARS-CoV-2 capturando interferon-gama (IFN- γ) na vizinhança dos linfócitos T dos quais foi segregado³⁹.

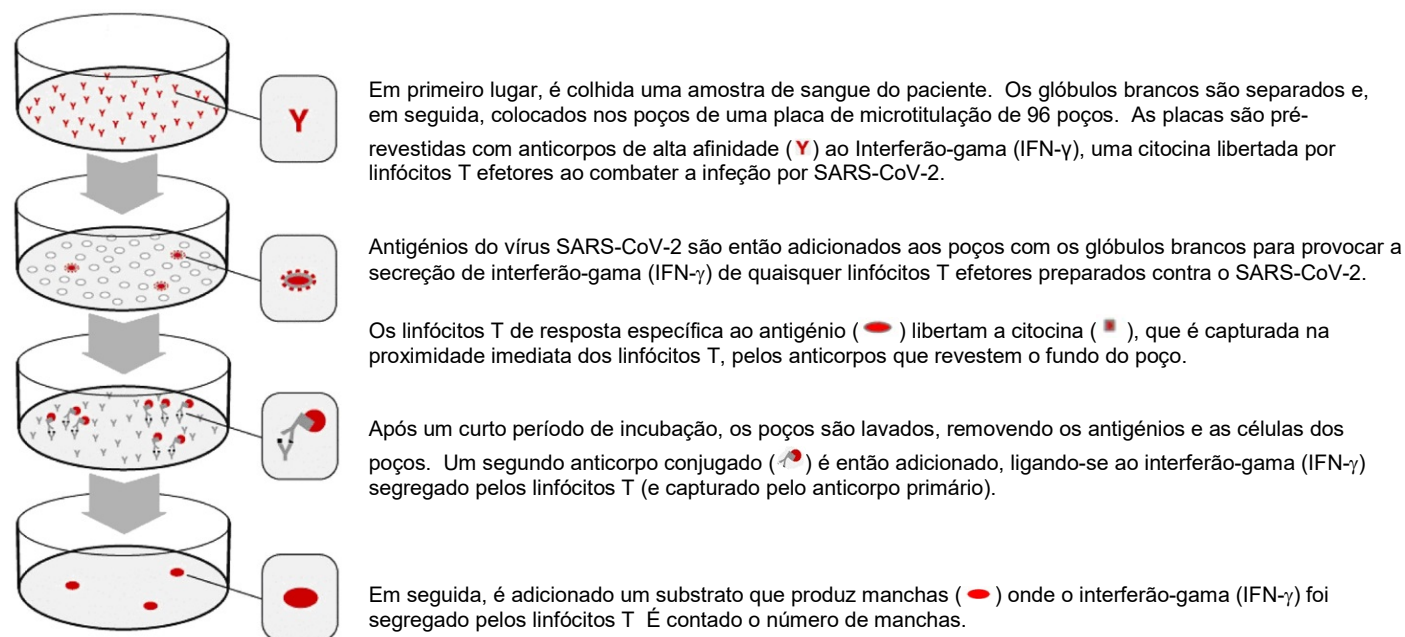
Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) são separadas de uma amostra de sangue total, lavadas e contadas antes de serem adicionadas ao ensaio.

As PBMC isoladas (glóbulos brancos) são colocadas em poços de microtitulação onde são expostas a um controle de fitohemaglutinina (PHA) (um estimulador mitogénico que indica a funcionalidade da célula), controlo nulo ou dois painéis separados de antígenos SARS-CoV-2 derivados de proteínas Spike e do nucleocapsídeo, respetivamente. As PBMCs são incubadas com os antígenos para permitir a estimulação de quaisquer linfócitos T sensibilizados presentes.

A citocina segregada é capturada por anticorpos específicos na superfície da membrana, que constitui a base do poço, e as células e outros materiais indesejados são removidos por lavagem. Um segundo anticorpo, conjugado com fosfatase alcalina e dirigido para um epítipo diferente na molécula da citocina, é adicionado e liga-se à citocina capturada na superfície da membrana. Qualquer conjugado não ligado é removido por lavagem. A cada poço é adicionado um substrato solúvel, que é clivado pela enzima ligada para formar uma mancha (azul escura) de precipitado insolúvel no local da reação.

A avaliação do número de manchas obtidas fornece uma medida da abundância de linfócitos T efetores no sangue periférico preparados contra o SARS-CoV-2. Estes princípios na base da plataforma de testes T-SPOT estão descritos na Figura 1 abaixo.

Figura 1: Princípios do sistema de ensaios T-SPOT. Apenas para ilustração, consulte a Secção 6, Instruções de utilização, para obter instruções de procedimento detalhadas.



3. REAGENTES E ARMAZENAMENTO

MATERIAIS FORNECIDOS

O T-SPOT.COVID COV.435/300 (versão de 12 x tiras de 8 poços multiusos) e o COV.435/200 contêm:

1. 1 placa de microtitulação: 96 poços, fornecidos como 12 tiras x 8 poços num suporte separado (COV.435/300), ou 12 x 8 poços numa única placa (COV.435/200), revestidos com anticorpo monoclonal de rato contra interferon gama de citocina (IFN- γ).
2. 2 frascos (0,8 mL cada) de Painel A (COV-A): contém antígenos de Spike, albumina sérica bovina e agentes antimicrobianos.

- 2 frascos (0,8 mL cada) de Painel B (COV-B): contém antígenos do Nucleocapsídeo, albumina sérica bovina e agentes antimicrobianos.
- 2 frascos (0,8 mL cada) de Controlo Positivo: contém fitohemaglutinina (PHA), para uso como controlo da funcionalidade celular, albumina sérica bovina e agentes antimicrobianos.
- 1 frasco (50 µL) 200x de Reagente do Conjugado concentrado: anticorpo monoclonal do ratinho contra a citocina interferão-gama (IFN- γ) conjugada a fosfatase alcalina.
- 1 garrafa (25 mL) de Solução de Substrato: solução BCIP/NBT^{plus} pronta a usar.
- Folheto informativo

Nota: As placas sólidas de microtitulação de 96 poços usadas no T-SPOT.COVID COV.435/200 e as tiras de 8 poços usadas no kit COV.435/300 são itens de utilização única e devem ser usados imediatamente após abertos e não reutilizados. Não misture componentes entre kits diferentes.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Armazene o kit fechado a 2-8 °C. Os componentes do kit são estáveis até a data de validade impressa na caixa do kit, quando armazenados e manuseados nas condições recomendadas. O kit não deve ser usado após a data de validade no rótulo do kit. Se um componente tiver uma data de validade posterior à da caixa (externa) do kit, não guarde e não use esse componente com outro kit; não utilize nenhum componente do kit após o prazo de validade impresso na caixa externa do kit.

Armazene os componentes do kit aberto a 2-8 °C. Os componentes abertos para o T-SPOT.COVID (COV.435/300) devem ser usados no espaço de 8 semanas após a abertura e para o T-SPOT.COVID (COV.435/200) no período de 4 semanas após a abertura, tal período terminando o mais tardar na data de validade presente no rótulo do kit. **Evite a exposição prolongada da solução de substrato à luz.**

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Suporte de placas de tiras de 8 poços (disponível através da Oxford Immunotec).
- Câmara BLII (recomendado).
- Tubos de colheita de sangue, como o Vacutainer® CPT™ ou tubos heparinizados.
- Reagente T-Cell *Xtend*® - as amostras de sangue total armazenadas à temperatura ambiente (18 – 25 °C) entre 0 e 32 horas após a punção venosa, podem ser processadas com recurso ao reagente T-Cell *Xtend*.
- Ficoll® (se não estiver a usar tubos CPT).
- Uma centrífuga para preparação das PBMCs com capacidade para, pelo menos 1800 RCF (g) e capaz de manter as amostras à temperatura ambiente (18-25 °C) se utilizar métodos de centrifugação de densidade para separar as PBMCs.
- Equipamento e reagentes para permitir a contagem de PBMCs; manualmente, usando azul de tripano (ou outro corante apropriado) e um hemocítmetro num microscópio, ou automaticamente, usando um analisador de hematologia adequado.
- Um incubador humidificado com capacidade para 37 ± 1 °C com o fornecimento de CO₂ a 5%.
- Uma unidade de lavagem automática de placas de microtitulação ou uma pipeta de 8 canais ou repetidora para lavar as placas manualmente.
- Pipetas ajustáveis para cobrir um intervalo de volumes de 1-1000 µL (como quatro pipetas com capacidade para administrar volumes de 1-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL e 100-1000 µL) e pontas de pipeta estéreis.
- Solução PBS estéril: como GIBCO® 1x D-PBS (Life Technologies; número de catálogo 14040-133).
- Água destilada ou desionizada.
- Um meio de visualização dos poços, ou de captura de uma imagem digital do poço, como um estereomicroscópio, uma lupa ou um visualizador de placas para permitir a contagem de manchas.
- Meio de cultura de células estéril, como o GIBCO AIM V® (Life Technologies; número de catálogo 31035-025, grau de investigação). (Nota: O meio AIM V está disponível através da Oxford Immunotec). **A utilização deste meio isento de soro para o passo de incubação é vivamente recomendada.** RPMI 1640 (Invitrogen; número de catálogo 11875-093) poderá ser utilizado apenas nos passos iniciais de preparação da amostra. Recomenda-se que os meios de cultura de células sejam conservados em alíquotas apropriadas e que o material excedente seja eliminado após a utilização. **Os meios de cultura de células deverão ser previamente aquecidos até 37 °C antes da utilização do teste T-SPOT.COVID.** Para evitar problemas com os meios contaminados, pode ser útil dispensar garrafas de AIM-V ou RPMI 1640 em alíquotas menores.

4. AVISOS E PRECAUÇÕES

- Apenas para diagnósticos *in vitro*.
- Apenas para uso profissional.

- Os operadores devem receber formação sobre o procedimento do ensaio e estarem certos de que compreendem as instruções de utilização antes de realizar o ensaio.
- Ler as instruções do ensaio cuidadosamente antes de usar. Os desvios das instruções de utilização neste folheto informativo podem gerar resultados incorretos.
- Devem ser tomadas precauções ao manusear materiais de origem humana. Todas as amostras sanguíneas devem ser consideradas potencialmente infecciosas. O manuseamento de amostras de sangue e de componentes do teste e a sua utilização, conservação e eliminação devem estar de acordo com os procedimentos definidos nas orientações ou nos regulamentos nacionais ou locais apropriados relativos à segurança de materiais com risco biológico.
- Devem ser tomadas precauções ao trabalhar com produtos químicos. Todos os produtos químicos devem ser considerados potencialmente perigosos. Uma ficha de dados de segurança do material para o kit está disponível através da Oxford Immunotec.
- Elimine os reagentes não utilizados e as amostras biológicas de acordo com os regulamentos locais, estatais e federais.
- É necessário adicionar o número correto de PBMCs a cada poço. Se tal não for feito, poderá originar uma interpretação incorreta do resultado.
- Não misture componentes de lotes de kits diferentes.
- Utilizar uma técnica asséptica para evitar a contaminação dos reagentes, dos poços de teste, das suspensões de células e dos meios de cultura de células.
- A variação em relação às técnicas de pipetagem e de lavagem, aos tempos e/ou às temperaturas de incubação indicadas pode influenciar os resultados reais obtidos e deverá ser evitada.
- O sangue deve ser colhido e processado o mais rápido possível.
- Armazene e transporte as amostras de sangue para o laboratório à temperatura ambiente (18-25 °C). Não refrigerar nem congelar amostras de sangue total.
- O não cumprimento das temperaturas e tempos de incubação recomendados pode conduzir a uma interpretação incorreta dos resultados.
- Os entalhes na membrana feitos pelas pontas das pipetas ou da unidade de lavagem dos poços podem criar artefactos nos poços, o que pode interferir na contagem de manchas.

AVISOS E PRECAUÇÕES ESPECÍFICAS PARA A UTILIZAÇÃO DO REAGENTE T-CELL XTEND

- O reagente T-Cell *Xtend* não foi avaliado para utilizações diferentes da plataforma de teste T-SPOT.
- Apenas para diagnósticos *in vitro*.
- Apenas para uso profissional.
- Não use reagentes após a data de validade.
- Utilizar uma técnica asséptica ao utilizar este produto para evitar a contaminação do reagente.
- Não use tubos de preparação de células (CPT, Becton Dickinson) ou tubos de colheita de sangue que contenham o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) anticoagulante com o reagente T-Cell *Xtend*.
- Adicione o reagente T-Cell *Xtend* ao sangue total antes do processamento da amostra.
- Não dilua ou adicione outros componentes diretamente ao reagente T-Cell *Xtend*.
- Para a colheita de amostras de sangue venoso, utilize apenas recipientes de utilização única.
- Não misture lotes de reagentes diferentes.

5. COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Os laboratórios individuais devem validar os seus procedimentos de colheita e separação de PBMCs para obter números suficientes. Recomenda-se que:

1. As amostras de sangue total sejam mantidas entre 18 °C e 25 °C até serem processadas.
2. Colher uma amostra de sangue de acordo com as instruções fornecidas com o dispositivo de colheita. O conteúdo do tubo deve ser invertido (8 a 10 vezes) para garantir que o sangue total é bem misturado com o anticoagulante. Armazene o sangue colhido à temperatura ambiente (18-25 °C). **Não refrigerar ou congelar.**
3. Geralmente, para um doente imunocompetente, podem obter-se PBMCs suficientes para fazer o teste a partir de amostras de sangue venoso de acordo com as seguintes diretrizes:

Um tubo de 8 mL ou dois tubos de 4 mL (CPT) ou um tubo de heparina de lítio de 6 mL.

Se tal for necessário para se obter um número suficiente de PBMCs, as PBMCs de um doente podem ser reunidas a partir de múltiplos tubos de sangue que tenham sido colhidos e processados em simultâneo

4. Ao usar o teste T-SPOT.COVID **sem utilizar o reagente T-Cell *Xtend***, as amostras sanguíneas devem ser processadas num período de 8 horas após a colheita. As amostras podem ser colhidas em tubos Vacutainer CPT de citrato de sódio ou heparina de sódio (Becton Dickinson) com PBMCs separadas no tubo de acordo com as instruções do fabricante. Alternativamente, as amostras de sangue podem ser colhidas em tubos de heparina de lítio, sendo as PBMCs separadas posteriormente usando técnicas de separação padrão, como Ficoll-Paque® ou métodos alternativos de purificação da fração de BMC. Não devem ser utilizados tubos de colheita de sangue que contenham o anticoagulante EDTA.

- a. Para tubos de colheita de sangue CPT, centrifugar os tubos CPT de 8 mL a 1600 RCF(g) durante 28 minutos ou os tubos CPT de 4 mL a 1800 RCF (g) durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C).
- b. Se estiver a usar o Ficoll-Paque Plus, dilua o sangue com um volume igual de meio RPMI 1640 (1 parte de sangue para 1 parte de RPMI). Colocar cuidadosamente o sangue diluído sobre o Ficoll-Paque Plus (2-3 partes de sangue diluído para 1 parte de Ficoll-Paque) e centrifugar a 1000 RCF (g) durante 22 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C).

Nota: Reveja as instruções do fabricante antes de usar tubos CPT ou Ficoll-Paque. Certifique-se de que os tubos são centrifugados à velocidade correta. As velocidades fornecidas acima são apresentadas em g ou Força Centrifuga Relativa (RCF). Isto não significa o mesmo que rotações por minuto (RPM). Se a centrifuga medir a velocidade apenas em RPM, efetue a conversão para o valor RCF recomendado medindo o raio do rotor e usando uma tabela de conversão. Os tubos Leucosep (Greiner Bio-One) oferecem uma abordagem economizadora de tempo para a separação por gradiente de densidade. Os tubos contêm uma barreira porosa que permite que a amostra de sangue seja vertida no meio de separação por gradiente de densidade, eliminando assim a necessidade de colocar delicadamente a amostra.

5. Ao usar o teste T-SPOT.COVID com o reagente T-Cell Xtend, as amostras de sangue devem ser colhidas em tubos de heparina de lítio. Não devem ser usados tubos Vacutainer CPT e os tubos de colheita de sangue que contenham o anticoagulante EDTA. O reagente T-Cell Xtend deve ser adicionado antes da separação das PBMC através de técnicas de separação padrão. As amostras de sangue total devem ser armazenadas à temperatura ambiente (18-25 °C) entre 0 e 32 horas após a punção venosa com a utilização do reagente T-Cell Xtend.

Se o reagente T-Cell Xtend for usado, imediatamente antes da separação das células, remova a tampa do tubo de colheita de sangue e adicione 25 µL da solução do reagente T-Cell Xtend por mL de amostra de sangue. Volte a colocar a tampa e inverta o tubo de colheita de sangue delicadamente 8 a 10 vezes para misturar. Incubar durante 20 ± 5 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C) e, em seguida, isolar a camada de PBMC usando centrifugação por gradiente de densidade Ficoll, conforme apresentado nas secções 4b e 6 - 9. Consulte o folheto informativo do reagente T-Cell Xtend para obter mais detalhes

6. Colher a camada branca e turva de PBMC com uma pipeta e transferi-la para um tubo de centrifugação cónico de 15 mL. Perfazer o volume de 10 mL com meio de cultura de células. **O meio de cultura de células para as etapas de lavagem deve ser pré-aquecido a 37 °C antes do contacto com as PBMC.**

Os fatores circulantes em amostras de sangue total são conhecidos por interferir em testes de interferão-gama no sangue total, por exemplo, fator reumatóide, anticorpos heterofílicos e quantidades pré-existentes de interferão-gama. A separação e lavagem das PBMC permite a remoção dessas substâncias potencialmente interferentes antes da realização do ensaio.

Nota: Após a centrifugação, as PBMC devem ser extraídas usando uma ponta de pipeta de grande diâmetro (por exemplo, 1 mL), submergindo a ponta da pipeta na camada de PBMC. Esta camada turva deve ser cuidadosamente aspirada e transferida para um tubo cónico estéril para as etapas de lavagem. Certifique-se de que toda a camada turva de PBMC é recolhida. É melhor retirar mais da camada de plasma do que deixar quaisquer PBMC no tubo de colheita de sangue. No entanto, se estiver a usar CPTs, evite a transferência do gel de separação, que pode bloquear a ponta. Se tal acontecer, transfira as células que já estão na ponta para um tubo de centrifugação e use uma nova ponta para transferir as PBMC restantes. Podem utilizar-se vários meios para a lavagem das células durante estas etapas 3-5; o AIM V e o RPMI 1640 foram usados com êxito e são recomendados.

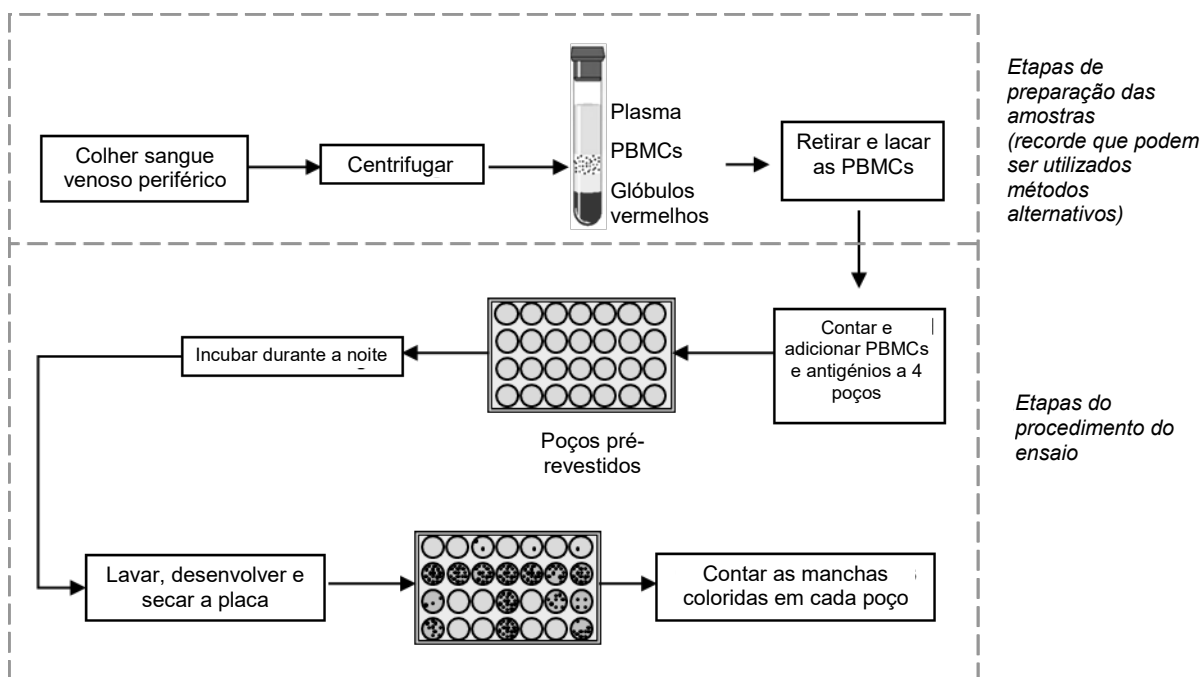
7. Centrifugar a 600 RCF (g) durante 7 minutos. Retirar o sobrenadante e ressuspender o “pellet” em 1 mL de meio.
8. Perfazer o volume de 10 mL com meio fresco e centrifugar a 350 RCF (g) durante 7 minutos.
9. Retirar o sobrenadante e ressuspender o “pellet” em 0,7 mL de meio de cultura de células. **O meio sem soro AIM V tem sido utilizado com êxito e é vivamente recomendado.**

Nota: As etapas 2-7 devem ser executadas numa câmara BLII para proteger o utilizador e evitar a contaminação das amostras.

6. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Uma placa de testes T-SPOT.COVID completa processa 24 amostras de pacientes. Geralmente, o ensaio é realizado na tarde de um dia e na manhã do dia seguinte, para permitir que a fase de incubação de 16-20 horas ocorra durante a noite. Se este horário for usado, na tarde do dia 1 as amostras sanguíneas são processadas para preparar as PBMC para o ensaio e o ensaio é iniciado adicionando as PBMC e os antigénios à placa de ensaio e colocando a placa na incubadora. No dia 2, a placa é retirada da incubadora, realizam-se as etapas de desenvolvimento e a placa é lida. O tempo para processar uma placa completa é de aproximadamente 3 horas do tempo decorrido (o tempo real de trabalho será menor devido às etapas de centrifugação) no dia 1 e 30 minutos de tempo de trabalho (não incluindo a incubação de 1 hora do anticorpo secundário e o tempo de secagem da placa) no dia 2. O procedimento para a realização do teste é resumido na Figura 2 e descrito a seguir:

Figura 2: Diagrama que ilustra as principais etapas necessárias para realizar o teste T-SPOT.COVID. Recorde que nem todos os 96 poços das placas são mostrados na ilustração.



PREPARAÇÃO DO REAGENTE

- Os frascos de antígenos Spike do SARS-CoV-2 (Painel A), antígenos do Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 (Painel B) e o Controlo Positivo são fornecidos prontos a usar.
- Preparar uma diluição de 1:200 de solução de trabalho do Reagente do Conjugado. Calcular o volume necessário de solução de trabalho do Reagente do Conjugado. O reagente do conjugado pode ser preparado com a concentração de trabalho e armazenado entre 2-8 °C até seis semanas antes de ser usado no ensaio.

Nota: Cada amostra de um doente requer 4 poços. São adicionados 50 µL de reagente do conjugado diluído a cada poço. Assim, para uma tira (2 amostras, 8 poços), preparar 500 µL de solução com a concentração de trabalho adicionando 2,5 µL de Reagente do Conjugado concentrado a 497,5 µL de PBS. Para uma placa de 96 poços (24 amostras), prepare 5 mL de solução com a concentração de trabalho adicionando 25 µL de Reagente do Conjugado concentrado a 497,5 µL de PBS.

- A solução de substrato é fornecida a ser utilizada. Antes de remover a placa da incubadora (dia 2), retire a solução de substrato do armazenamento e deixe-a atingir a temperatura ambiente.

CONTAGEM E DILUIÇÃO DE CÉLULAS

O teste T-SPOT.COVID requer 250.000 ± 50.000 PBMCs por poço. É necessário um total de quatro poços para cada amostra de um paciente; por conseguinte, são necessários 1×10^6 PBMCs por paciente. O número de linfócitos T SARS-CoV-2 na amostra é normalizado para um número fixo de PBMCs.

- Efetue uma contagem de PBMCs. As células podem ser contadas através de uma variedade de métodos, incluindo a contagem manual usando azul de tripano (ou outro corante apropriado) e um hemocítmetro, ou usando um analisador de hematologia automatizado.
- Resumidamente, para a contagem manual com um hemocítmetro Neubauer, adicionar 10 µl da suspensão de células final a 40 µl da solução de azul de tripano a 0,4 % (p/v). Colocar uma alíquota apropriada no hemocítmetro e contar as células na grelha. Para outros tipos de hemocítmetro e para dispositivos automatizados, siga as instruções do fabricante.

Nota: Devem tomar-se precauções para garantir que a suspensão de células fique bem misturada imediatamente antes da remoção das alíquotas para contagem. As células podem assentar no fundo do tubo levando a uma interpretação errada do verdadeiro número de células. A mistura deve ser feita girando o tubo delicadamente com as mãos ou agitando suavemente a suspensão, através da pipetagem da suspensão para cima e para baixo várias vezes.

- Calcule a concentração de PBMCs presentes na suspensão de células de reserva.

Nota: Certifique-se de que o cálculo está correto para o sistema de contagem de células utilizado, uma vez que a utilização de um número insuficiente ou excessivo de células pode conduzir a uma interpretação errada do resultado.

4. Prepare 500 µL da suspensão de células final a uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células/100 µL (dando $1,25 \times 10^6$ PBMCs no total).

Nota: Certifique-se de que as células estão bem misturadas, agitando suavemente a suspensão através da pipetagem da mesma para cima e para baixo várias vezes, antes de remover uma alíquota para diluição. Os números de PBMCs entre 200.000 e 300.000 por poço demonstraram fornecer resultados consistentes do teste T-SPOT.

PREPARAÇÃO DAS PLACAS E INCUBAÇÃO

O teste T-SPOT.COVID requer a utilização de quatro poços para cada amostra de um doente. Com cada amostra individual deverá ser processado um Controlo Nulo e um Controlo Positivo. Recomenda-se que as amostras sejam dispostas verticalmente sobre a placa, como ilustrado a seguir.

- Controlo Nulo
- Painel A (COV-A) (Spike)
- Painel B (COV-B) (Nucleocapsídeo)
- Controlo

Cada placa de 96 poços pode processar até 24 amostras de pacientes. Utilize o número de placas necessário para o número de amostras que pretende processar. Com o COV.435/300; cada tira processará 2 amostras. Utilize apenas o número de tiras de que necessita. Sele as tiras restantes na bolsa de alumínio juntamente com a bolsa de gel de sílica. As restantes tiras devem ser utilizadas no prazo de oito semanas após a primeira abertura da bolsa, desde que sejam armazenadas a 2-8 °C durante esse período.

O T-SPOT.COVID é um teste que mede a função dos linfócitos T; não são necessárias curvas padrão. Por conseguinte, cada paciente necessitará de apenas 4 poços para serem usados para cada amostra. O layout recomendado da placa para 24 amostras é mostrado abaixo:

Fila	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

Legenda: N=Controlo Nulo, A=Painel A, B=Painel B, M=Mitogénio Controlo Positivo

1. Para o COV.435/300, retirar o número necessário de tiras de 8 poços pré-revestidas da embalagem, prender num suporte de placas e deixar que atinjam a temperatura ambiente. Retirar apenas o número de tiras pretendido, voltar a selar as restantes tiras não utilizadas e a bolsa de dessecante na embalagem externa de folha metálica e voltar a armazenar a 2-8 °C.

Nota: Prender as tiras a usar num suporte de placas vazio equipado com uma cobertura inferior e uma tampa. Os suportes, coberturas e tampas devem ser retidas e reutilizadas.

2. Adicionar os Painéis e os Controlos;
- Adicionar 50 µL de meio de cultura de células AIM-V a cada poço de Controlo Nulo
 - Adicionar 50 µL da solução do Painel A a cada poço pretendido.
 - Adicionar 50 µL da solução do Painel B a cada poço pretendido.
 - Adicionar 50 µL de Controlo positivo a cada poço de controlo da funcionalidade celular.

Não permita que a ponta da pipeta toque na membrana. Os entalhes na membrana causados pelas pontas das pipetas podem criar artefactos nos poços.

3. Adicionar 100 µL da suspensão de células final do doente (contendo 250.000 PBMCs) a cada um dos 4 poços a utilizar para uma amostra do doente, Usar uma nova ponta para a adição das células de cada paciente individual para evitar a contaminação cruzada entre os poços. Tenha cuidado para não contaminar os poços adjacentes, passando o líquido de um poço para outro se as pontas da pipeta forem reutilizadas em vários poços.

Nota: Certifique-se de misturar (como nos passos de Contagem e Diluição de Células) antes de remover cada

alíquota de 100 µL.

4. Incubar a placa com tampa num incubador humidificado a 37 °C com CO₂ a 5 % durante 16-20 horas. Evitar perturbar a placa depois de colocada no incubador. Não empilhar as placas, uma vez que isso pode provocar uma distribuição irregular da temperatura e da ventilação.

Nota: A incubadora de CO₂ deve ser humidificada. Verifique se existe água suficiente no respetivo recipiente para garantir uma atmosfera húmida.

DESENVOLVIMENTO E CONTAGEM DE MANCHAS

1. Retirar a placa da incubadora e eliminar o meio de cultura de células colocando o conteúdo num recipiente apropriado.

Nota: Nesta altura, retirar a Solução de Substrato do kit e deixar que atinja a temperatura ambiente.

2. Adicionar 200 µL de solução PBS a cada poço. **Não utilizar solução PBS que contenha Tween® ou outros detergentes, uma vez que isso causa elevadas contagens de fundo.**

Nota: Utilizar PBS recém-preparado ou estéril.

3. Eliminar a solução PBS. Repetir a lavagem dos poços mais 3 vezes com solução PBS nova para cada lavagem. Pode utilizar-se uma unidade de lavagem automática para as etapas de lavagem.

Nota: Para a lavagem, pode utilizar-se uma pipeta multicanal ou uma unidade de lavagem de placas. Eliminar a solução PBS num recipiente adequado após cada lavagem. Não utilizar pipetas para remover o PBS, pois isso pode danificar a membrana. Se estiver a usar uma unidade de lavagem de placas, certifique-se de que o “manifold” fica ajustado de forma a que as pontas não toquem na membrana. Após a lavagem final, bater levemente na placa com uma toalha sem fiapos para garantir a remoção de todo o PBS - qualquer excesso restante diluirá ainda mais o Reagente do Conjugado.

4. Caso ainda não tenha sido preparado durante a fase de preparação do reagente; diluir o reagente do conjugado concentrado 200x em PBS para criar a solução com a concentração de trabalho
5. Adicionar 50 µL de solução de reagente do conjugado com a concentração de trabalho a cada poço e incubar a 2-8 °C durante 1 hora.

Nota: Recomenda-se a utilização de uma pipeta multicanal ou de uma pipeta repetidora. Devem tomar-se precauções para garantir que o Reagente do Conjugado seja adicionado a todos os poços, uma vez que a solução é transparente e sem cor - portanto, pode ser difícil ver a que poços foi adicionado.

6. Eliminar o conjugado e realizar as quatro lavagens com PBS conforme descrito nos passos 2 e 3 acima.
7. Adicionar 50 µL de solução de substrato a cada poço e incubar à temperatura ambiente durante 7 minutos.
8. Lavar cuidadosamente a placa com água destilada ou desionizada para parar a reação de deteção.
9. Deixar a placa secar, colocando-a numa zona bem ventilada ou num forno até 37 °C.

Nota: As manchas tornam-se mais visíveis à medida que a placa seca; portanto, certifique-se de que a placa está totalmente seca antes da leitura. Deixar secar durante 4 horas a 37 °C ou, pelo menos, 16 horas à temperatura ambiente.

10. Conte e registe o número de manchas azuis escuras distintas na membrana de cada poço. Aplicar a Interpretação de Resultados e os Critérios do Ensaio (ver abaixo) para determinar se a amostra do paciente é ‘Reativa’ ou ‘Não Reativa’. **As manchas produzidas como resultado da estimulação do antigénio devem surgir como manchas grandes, redondas e escuras. É frequente observar-se um efeito de gradiente com um centro mais escuro e uma periferia mais difusa. Os artefactos não específicos que podem ocorrer são mais pequenos, menos intensos e de forma irregular.**

Nota: As manchas podem ser contadas diretamente do poço usando uma lupa ou estereomicroscópio ou a partir de uma imagem digital obtida com um microscópio ou visualizador de placas.

Uma vez processadas, as placas de ensaio completas mantêm-se estáveis e, por conseguinte, não têm de ser lidas imediatamente. As placas podem ser arquivadas por um período de até 12 meses para um controlo de qualidade retrospectivo ou reanálise, se mantidas num ambiente seco e escuro à temperatura ambiente.

CONTROLO DE QUALIDADE

Num resultado típico seria de prever poucas ou nenhuma mancha no Controlo Nulo e 20 ou mais manchas no Controlo Positivo (consulte as Figuras 4a e b para resultados típicos do estudo clínico dos EUA).

Uma contagem superior a 10 manchas no Controlo Nulo deve ser considerada ‘inválida’.

Geralmente, a contagem de manchas do Controlo Positivo da funcionalidade das células deve ser ≥ 20 ou revelar

saturação (demasiadas manchas para contar). Uma pequena percentagem de doentes pode ter linfócitos T que apresentam apenas uma resposta limitada à PHA¹. Quando a contagem de manchas do Controlo Positivo for <20 manchas, deve ser considerada “inválida”, a menos que o painel A ou o painel B sejam “reativos ou “borderline” (ambíguos)”, conforme descrito na Interpretação de resultados e nos critérios do ensaio (ver abaixo), em cujo caso o resultado é válido.

Em caso de resultados inválidos, estes devem ser reportados como “inválidos” e é recomendado colher uma nova amostra e testar novamente o indivíduo.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS E CRITÉRIOS DO ENSAIO

Consulte a secção de Controlo de qualidade antes de aplicar os seguintes critérios.

Os resultados do teste T-SPOT.COVID são interpretados subtraindo a contagem de manchas no poço do controlo Nulo à contagem de manchas em cada um dos Painéis, de acordo com o seguinte algoritmo:

- O resultado do teste é Reativo se (Painel A-Nulo) e/ou (Painel B-Nulo) ≥ 8 manchas.
- O resultado do teste é Não Reativo se ambos (Painel A-Nulo) e (Painel B-Nulo) ≤ 4 manchas. Isto inclui valores menores que zero.
- Os resultados em que a contagem de manchas mais elevada do Painel A ou do Painel B é tal que a contagem de manchas (Painel menos Nulo) é de 5, 6 ou 7 manchas, devem ser considerados “Borderline” (ambíguos) e é recomendado efetuar um novo teste através da colheita de outra amostra do paciente.
- Se o resultado continuar a ser “Borderline” (ambíguo) no novo teste com outra amostra, então deverão ser usados outros testes de diagnóstico e/ou informações epidemiológicas para ajudar a determinar a resposta imunitária adaptativa ou mediada por células à infeção recente ou anterior por SARS-CoV-2.
- **Um resultado “Reativo” indica que a amostra contém linfócitos T efetores sensibilizados para o SARS-CoV-2.**
- **Um resultado “Não Reativo” indica que não foram detetados linfócitos T efetores sensibilizados para o SARS-CoV-2.**

O algoritmo de interpretação está descrito no seguinte Diagrama de fluxo (Figura 3) e Tabelas 1-3. Este algoritmo inclui também critérios de controlo de qualidade.

Figura 3 – Diagrama de fluxo do algoritmo

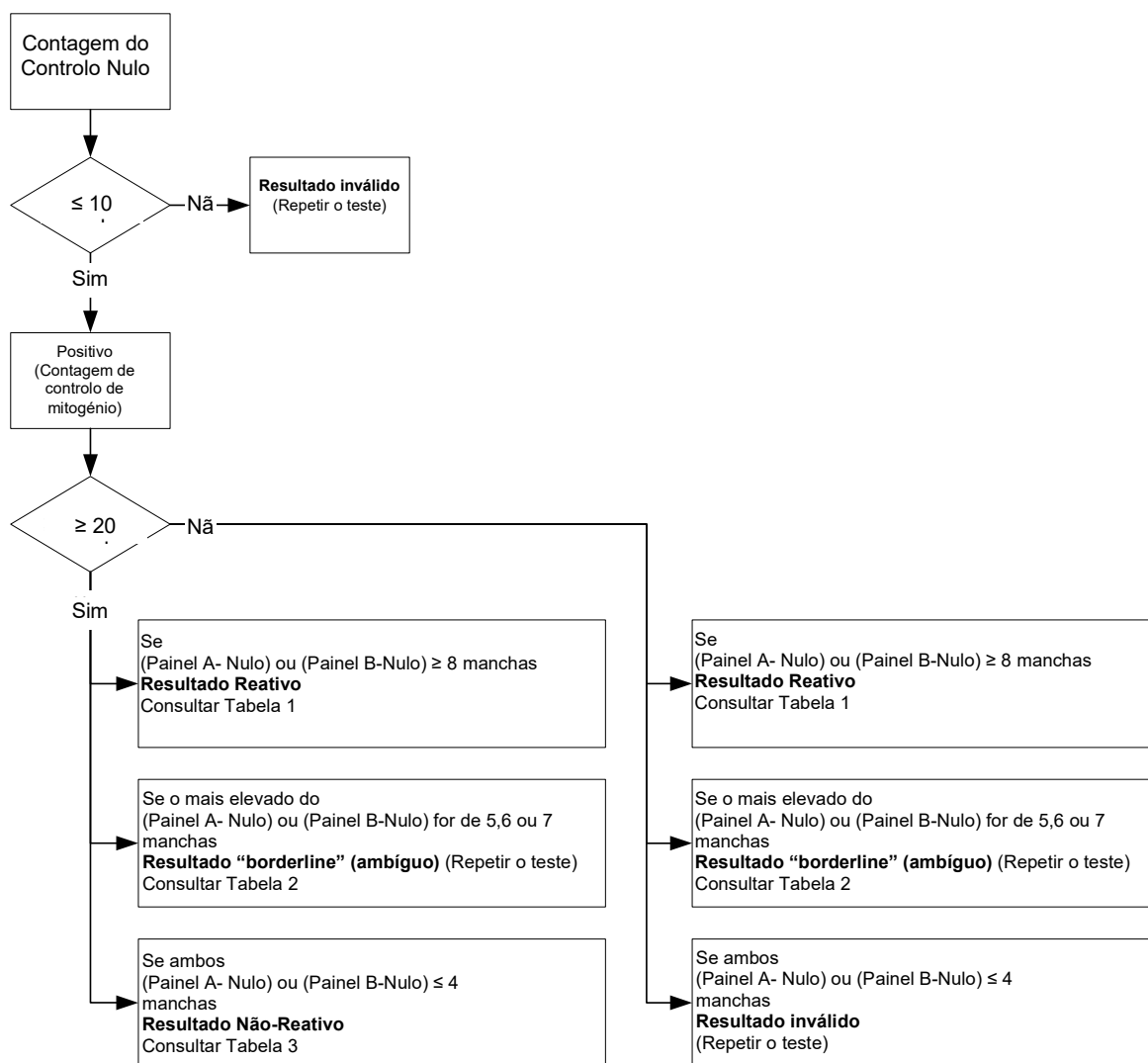


Tabela 1: Interpretação reativa: O (Painel A menos Nulo) ou (Painel B menos Nulo) ≥8 manchas

Controlo Nulo Contagem de poços	O Painel A ou o Painel B apresentam o seguinte número de manchas [†]	Interpretação dos resultados
0	≥8	Reativo
1	≥9	Reativo
2	≥10	Reativo
3	≥11	Reativo
4	≥12	Reativo
5	≥13	Reativo
6	≥14	Reativo
7	≥15	Reativo
8	≥16	Reativo
9	≥17	Reativo
10	≥18	Reativo
>10 manchas	n/a	Inválido**

[†]Nota: A contagem de manchas do Painel-Nulo mais elevada deve ser usada para determinar o resultado do teste.

Tabela 2: Interpretação “borderline” (ambígua): O mais elevado do (Painel A menos Nulo) ou (Painel B menos Nulo) é de 5, 6 ou 7 manchas

Controlo Nulo Contagem de poços	O mais elevado do Painel A ou Painel B apresenta o seguinte número de manchas	Interpretação dos resultados
0	5, 6, ou 7	Borderline (ambíguo)*
1	6, 7, ou 8	Borderline (ambíguo)*
2	7, 8, ou 9	Borderline (ambíguo)*
3	8, 9, ou 10	Borderline (ambíguo)*
4	9, 10, ou 11	Borderline (ambíguo)*
5	10, 11, ou 12	Borderline (ambíguo)*
6	11, 12, ou 13	Borderline (ambíguo)*
7	12, 13, ou 14	Borderline (ambíguo)*
8	13, 14, ou 15	Borderline (ambíguo)*
9	14, 15, ou 16	Borderline (ambíguo)*
10	15, 16, ou 17	Borderline (ambíguo)*
>10 manchas	n/a	Inválido**

Tabela 3: Interpretação de negativos: Ambos (Painel A menos Nulo) e (Painel B menos Nulo) ≤ 4 manchas

Controlo Nulo Contagem de poços	O Painel A e o Painel B têm ambos o número de manchas seguinte	Interpretação do resultado
0	≤ 4	Não-Reativo
1	≤ 5	Não-Reativo
2	≤ 6	Não-Reativo
3	≤ 7	Não-Reativo
4	≤ 8	Não-Reativo
5	≤ 9	Não-Reativo
6	≤ 10	Não-Reativo
7	≤ 11	Não-Reativo
8	≤ 12	Não-Reativo
9	≤ 13	Não-Reativo
10	≤ 14	Não-Reativo
>10 manchas	n/a	Inválido**

* Os resultados em que a contagem de manchas mais elevada do Painel A ou Painel B é tal que a contagem de manchas (Painel menos Nulo) é de 5,6 ou 7 manchas, devem ser considerados “Borderline” (ambíguos) e é recomendado efetuar um novo teste através da colheita de outra amostra do paciente

** Em caso de resultados inválidos, estes devem ser reportados como “inválidos” e é recomendado colher uma nova amostra e testar novamente o indivíduo.

7. LIMITAÇÕES

- Os desvios das instruções de utilização neste folheto informativo podem gerar resultados incorretos.
- A realização incorreta do ensaio pode causar respostas reativas ou não reativas falsas.
- Um resultado falso não reativo pode ser causado pela colheita incorreta da amostra sanguínea ou por um manuseamento incorreto da amostra, afetando a função dos linfócitos.
- O desempenho do teste T-SPOT.COVID, com ou sem a utilização do reagente T-Cell Xtend, não foi avaliado adequadamente com amostras de indivíduos com menos de 18 anos, em mulheres grávidas e em pacientes com hemofilia.
- Um falso resultado reativo pode ser obtido para o teste T-SPOT.COVID quando testado em indivíduos previamente expostos ao SARS-CoV-1 e a outros coronavírus semelhantes. Serão necessários testes alternativos se houver suspeita dessas infeções. Este kit foi testado utilizando amostras atualmente disponíveis. O desempenho com novas mutações do SARS-CoV-2 ainda não foi avaliado.

- Os resultados do teste T-SPOT.COVID devem ser utilizados em conjunto com o histórico epidemiológico, o estado médico atual e os resultados de outras avaliações de diagnóstico de cada indivíduo.
- Um resultado de teste não reativo não exclui a possibilidade de exposição ou infecção por SARS-CoV-2. Os pacientes com exposição recente a indivíduos infetados com SARS-CoV-2 que apresentem um resultado do teste T-SPOT.COVID não reativo, devem ser considerados para um novo teste no espaço de 2 semanas ou se outros sintomas clínicos relevantes indicarem uma possível infecção.
- Um resultado de teste reativo não implica uma infecção por SARS-CoV-2 ou doença COVID-19 e pode resultar de vacinação contra o SARS-CoV-2; deverão realizar-se outros testes para confirmar o diagnóstico da doença COVID-19, como o teste PCR ou antígeno. Um teste reativo não indica necessariamente uma imunidade ao SARS-CoV-2.
- As amostras refrigeradas e congeladas não são recomendadas para utilização com o teste T-SPOT.COVID.

LIMITAÇÕES ESPECÍFICAS À UTILIZAÇÃO DO REAGENTE T-CELL XTEND

1. O reagente T-Cell *Xtend* não foi avaliado para utilizações diferentes dos testes T-SPOT.
2. Não refrigerar nem congelar amostras de sangue total. Armazene e transporte as amostras sanguíneas para o laboratório entre 18-25 °C.
3. Quaisquer desvios dos procedimentos recomendados para pipetagem, técnicas de lavagem, tempos de incubação e/ou temperaturas podem influenciar os resultados do teste.

8. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O valor de corte do ensaio T-SPOT.COVID foi pré-determinado durante o desenvolvimento usando a análise da curva Característica de Operação do Recetor (ROC). A discriminação máxima entre indivíduos com PCR positivo confirmado e aqueles com baixo risco de infecção foi determinada em 6 manchas. Além disso, foi definida uma zona limítrofe de 5-7 para lidar com a variação e a incerteza do teste em torno do corte.

Características de desempenho analítico

A interferência de anticorpos heterofílicos ou interferão-gama (IFN- γ) intrínseco na amostra sanguínea é minimizada pela separação e lavagem da fração de PBMC do sangue total. Isto remove as quantidades de fundo de interferão-gama (IFN- γ), outras frações de plasma interferentes, hemoglobina e quaisquer anticorpos heterofílicos.

Espera-se que outras citocinas além do interferão-gama (IFN- γ) sejam produzidas por leucócitos, incluindo IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF α , IFN- α e IFN- β . Estes foram examinados quanto à reatividade cruzada com o par de anticorpos usado no teste T-SPOT.COVID. Os resultados demonstraram que o par de anticorpos utilizado no teste T-SPOT.COVID não mostrou evidências de reatividade cruzada com outras citocinas.

A variabilidade intra-ensaio foi analisada comparando o teste T-SPOT.COVID executado na mesma placa pelo mesmo operador. As experiências foram realizadas por três operadores em nove placas, o que resultou num intervalo de % CV representativo da variação inerente do teste. O intervalo obtido para as contagens de manchas elevadas ($210,4 \pm 11,6$) foi entre 2,2 % - 7,7 % CV (% CV médio = 4,4), as contagens de manchas médias ($71,2 \pm 8,5$) apresentaram um intervalo de 6,6 % - 16,5 % CV (% CV médio = 11,0 %), enquanto as contagens de manchas próximas ao corte (contagem média de manchas = $5,7 \pm 1,3$) apresentaram um % CV médio = 22,0 %.

Foram recolhidos dados de precisão inter-ensaio, onde três lotes de kits foram usados por três operadores diferentes para executar as mesmas três amostras em seis ocasiões. O coeficiente de variação medido nas três amostras, três operadores e três lotes foi de 3,7 % para as amostras com uma contagem média de manchas de 210,4. Para as contagens de manchas próximas ao ponto de corte do teste T-SPOT.COVID, a variação inter-ensaio foi de 25,0 %. Para níveis de manchas moderados, o % CV médio foi de 13,9 %. Os resultados para % CV foram consistentes para cada um dos lotes testados.

A reprodutibilidade interoperador foi avaliada utilizando três operadores e uma placa de cada um de três lotes de kits. A variação observada entre operadores foi de 3,6 % -5,8 % CV.

Características de desempenho clínico

Foi realizado um estudo com recurso ao “cut off” estabelecido de 6 manchas (dados no ficheiro), para avaliar o desempenho clínico do teste T-SPOT.COVID em infeções por SARS-CoV-2 confirmadas por PCR (utilizando indivíduos assintomáticos e sintomáticos) para avaliar o desempenho do teste em indivíduos com infecção aguda ou convalescentes. Além disso, o desempenho do teste foi avaliado em indivíduos do estudo considerados com menor risco relativo de infecção. Todas as amostras foram testadas com um teste de serologia anti-N IgG (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG)) como meio de comparação com o Teste T-SPOT.COVID.

Um total de 281 indivíduos foram recrutados para o estudo, atendendo aos critérios de inclusão. Destes, 169 indivíduos foram recrutados para o grupo de infecção por SARS-CoV-2 confirmada por PCR (a coorte positiva). Destes, foi excluído um indivíduo devido à baixa recuperação celular e 17 devido à falta de resultados de serologia,

restando 151 disponíveis para análise.

Um total de 112 indivíduos foram recrutados para a coorte de Baixo Risco, 4 dos quais não apresentaram resultados da serologia confirmatória e 6 outros indivíduos foram excluídos após a obtenção de um teste serológico confirmatório positivo. Restaram 102 indivíduos, dos quais foi excluída uma amostra por baixa recuperação celular e outra devido a problemas técnicos com o teste T-SPOT.COVID. Como resultado, 100 indivíduos de menor risco foram incluídos na análise.

Os dados demográficos das coortes com confirmação por PCR e de menor risco estão resumidos abaixo:

Coorte	Infeção por SARS-CoV-2 confirmada por PCR	Menor risco relativo de infeção
Número de indivíduos	168	100
Idade média (anos) (sd)	50,5 (15,2) intervalo 19-83	54,7 (15,7) intervalo 18-87
% Masculino	38 7% (65/168)	36 0% (36/100)
Tempo médio desde o primeiro teste PCR positivo (dias) (intervalo)	83,4 (0,249)	Não aplicável
% sintomáticos	95 8% (161/168)	Não aplicável

Concordância positiva entre indivíduos com confirmação por PCR

151 pacientes, identificados com testes PCR positivos prévios para SARS-CoV-2 foram avaliados através do teste T-SPOT.COVID e do teste serológico anti-N IgG. O ponto de amostragem do primeiro resultado do teste PCR foi registado, variando entre 2 dias e 249 dias. Nenhum resultado T-SPOT.COVID foi inválido nesta coorte.

Tabela 4: Percentagem de concordância positiva com PCR ao longo do tempo incorporando todos os resultados dos testes T-SPOT.COVID e de serologia anti-N IgG, usando um “cut-off” de reatividade de 6 manchas e ignorando a zona “borderline” (limites incluídos)

Dias desde o primeiro teste PCR positivo	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Concordância positiva	95 % CI	Concordância positiva	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 %
Total ≤ 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)	-
Total >60	80,7 % (46/57)	68,1-90,0 %	38,6 % (22/57)	26,0-52,4 %

Tabela 5: Percentagem de concordância positiva com PCR ao longo do tempo incorporando todos os resultados dos testes T-SPOT.COVID e de serologia anti-N IgG, usando apenas os resultados reativos e não reativos do T-SPOT.COVID (ou seja, excluindo aqueles dentro da zona limítrofe)

Dias desde o primeiro teste PCR positivo	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Concordância positiva	95 % CI	Concordância positiva	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 %
Total ≤ 60	96,6 % (84/87)	90,3-99,3 %	78,2 % (68/87)	68,0-86,3 %

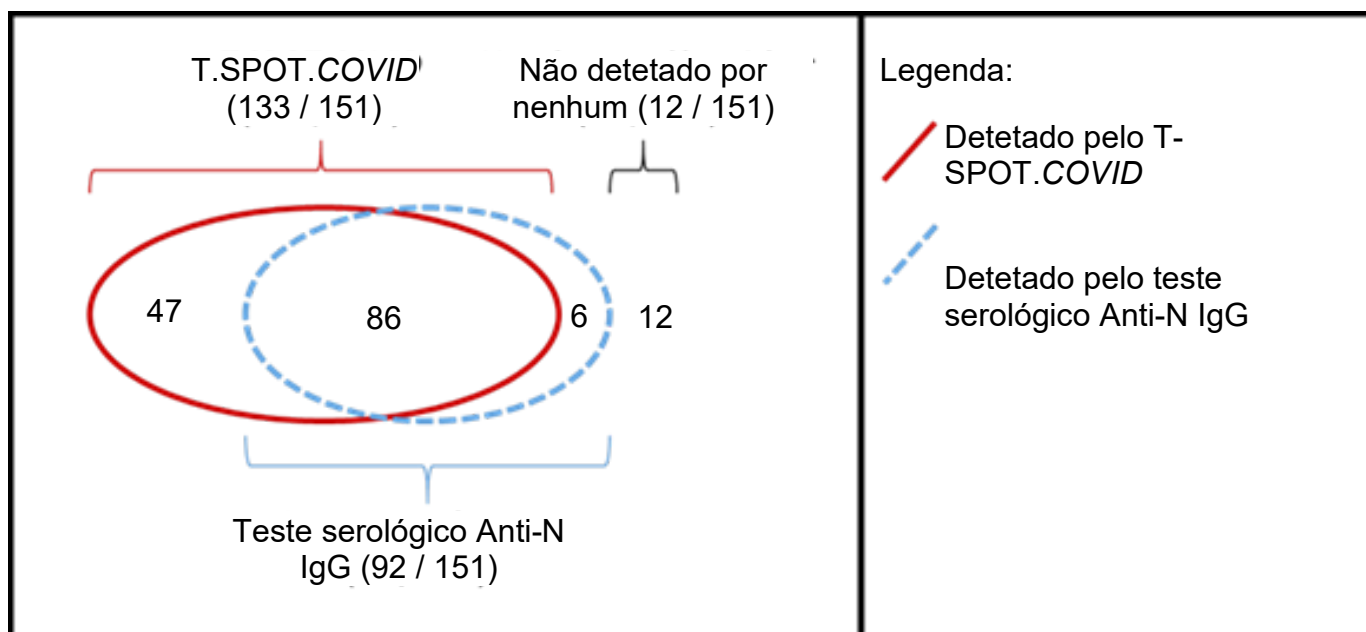
61-120	90,5 % (19/21)	69,6-98,8 %	85,7 % (18/21)	63,7-97,0 %
121-180	83,3 % (10/12)	51,6-97,9 %	16,7 % (2/12)	2,1-48,4 %
181-240	71,4 % (10/14)	41,9-91,6 %	0,0 % (0/14)	-
>240	100,0 % (1/1)	2,5-100,0 %	0,0 % (0/1)	-
Total >60	83,3 % (40/48)	69,8-92,5 %	41,7 % (20/48)	27,6-56,8 %

Estes dados mostram uma percentagem de concordância positiva entre o teste T-SPOT.COVID e o PCR de 92,6 % (96,6 % excluindo os resultados borderline) até 60 dias após um resultado positivo do teste PCR. Após este ponto de amostragem, a concordância percentual cai ligeiramente. Para pontos de amostragem além dos 60 dias após o resultado do PCR, a concordância positiva foi de 80,7 % (83,3 % usando apenas resultados determinados).

Em termos globais, estes dados mostram uma concordância positiva percentual entre o teste de serologia anti-N IgG e PCR de 74,5 % até 60 dias após um resultado positivo do teste PCR. Após este ponto de amostragem, a concordância percentual decresce. Para pontos de amostragem além dos 60 dias após o resultado do PCR, a concordância positiva para a serologia anti-N IgG foi de 38,6 %.

Os mesmos dados foram analisados posteriormente para determinar se algum paciente com teste serológico anti-N IgG negativo apresentou um resultado de teste T-SPOT.COVID reativo e vice-versa. Os dados são representados por um Diagrama de Venn abaixo (Figura 4) para mostrar como os dados relativos aos linfócitos T e serológicos podem complementar-se.

Figura 4: Distribuição de resultados reativos/positivos entre o teste T-SPOT.COVID e o teste serológico anti-N IgG em indivíduos infectados por SARS-CoV-2 com confirmação por PCR (n = 151)



Das 151 amostras com PCR positivo para SARS-CoV-2, o teste T-SPOT.COVID apresentou resultados negativos em 18 amostras, enquanto o teste serológico anti-N IgG apresentou resultados negativos em 59 amostras. O teste T-SPOT.COVID foi positivo em 79,7 % (47/59) das amostras negativas no teste serológico anti-N IgG. O teste serológico anti-N foi positivo em 6 dos 18 casos em que o teste T-SPOT.COVID foi negativo. Estes dados mostram que a combinação de serologia e análise de linfócitos T ELISPOT é útil para determinar o estado da infecção por SARS-CoV-2.

Concordância negativa entre os indivíduos com menor risco relativo de infecção

Inscrevemos uma coorte de participantes, num ambiente endêmico, mas a quem foi determinado um risco relativo menor de infecção por SARS-CoV-2 com base em: (i) ausência de sintomas autorrelatados consistentes com infecção por SARS-CoV-2, (ii) ausência de histórico de um teste PCR positivo para SARS-CoV-2 anterior (iii) nenhum envolvimento em ensaios para vacinas e não vacinados contra a COVID-19 e (iv) um teste serológico anti-N de fluxo lateral negativo (Biohit SARS-CoV-2 IgM/IgG Antibody Test Kit) usado como triagem primária no momento da inscrição e (iv) confirmação de um teste serológico negativo com recurso a um teste serológico laboratorial (teste serológico anti-N IgG (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG)).

Tabela 6: Percentagem de concordância negativa

	N	Positivo	Negativo	Concordância negativa (%) (95%)
--	---	----------	----------	---------------------------------

				CI)
Incluindo a zona "borderline"	100	3	97	97,0 % (91,5-99,4)
Excluindo a zona "borderline"	98	2	96	98,0 % (92,8-99,8)

97,0 % dos resultados do teste T-SPOT.COVID (97/100) estavam abaixo do "cut-off" de 6 manchas (intervalos de confiança de 95 %, 91,5-99,4 %). Dois resultados foram "borderline" (5 e 7 manchas). Após a exclusão destes resultados, 98,0 % (92,8-99,8 % CI) dos resultados do teste T-SPOT.COVID (96/98) foram não reativos. Não se registaram resultados inválidos.

Embora tenhamos tomado todas as medidas razoáveis para garantir que esta coorte apresentasse um baixo risco de infecção, não podemos excluir a possibilidade de que uma porção deste grupo apresentasse, ou ainda apresente, uma infecção assintomática seronegativa no momento do teste, mas em quem o teste T-SPOT.COVID tenha sido capaz de detetar uma resposta dos linfócitos T.

9. VALORES ESPERADOS

O intervalo de contagens de manchas observadas em resposta aos antígenos de controlo positivo e Nulo e aos antígenos SARS-CoV-2 observados nos nossos estudos clínicos (consulte a secção 8 para obter detalhes sobre as coortes dos estudos clínicos) é apresentado nas Figuras 5a e b.

Figura 5a: Histograma de respostas do controlo nulo de todo o estudo (n = 251).

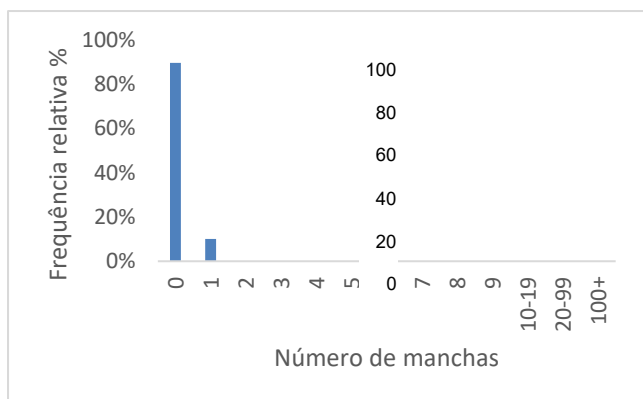
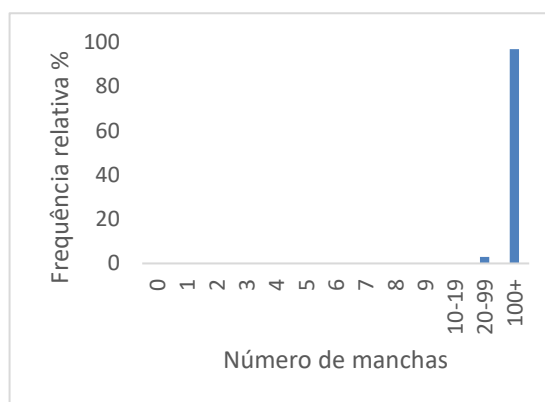


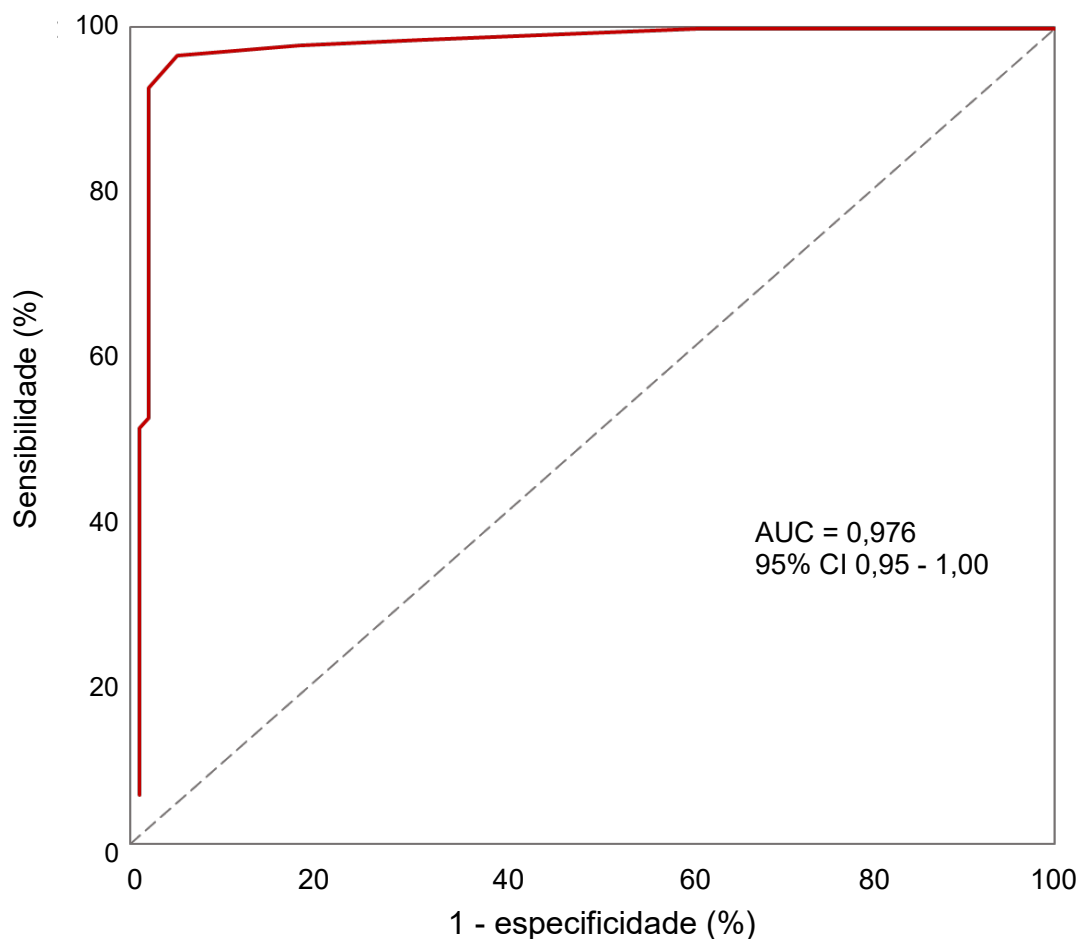
Figura 5b: Histograma do controlo positivo Respostas de todos os indivíduos do estudo (n= 251)



A grande maioria dos poços de controlo Nulo apresentou zero manchas e não foi observada qualquer contagem de manchas superior a um no controlo Nulo. As respostas ao controlo positivo foram robustas e não foi observada qualquer contagem de manchas inferior a 20 no controlo positivo.

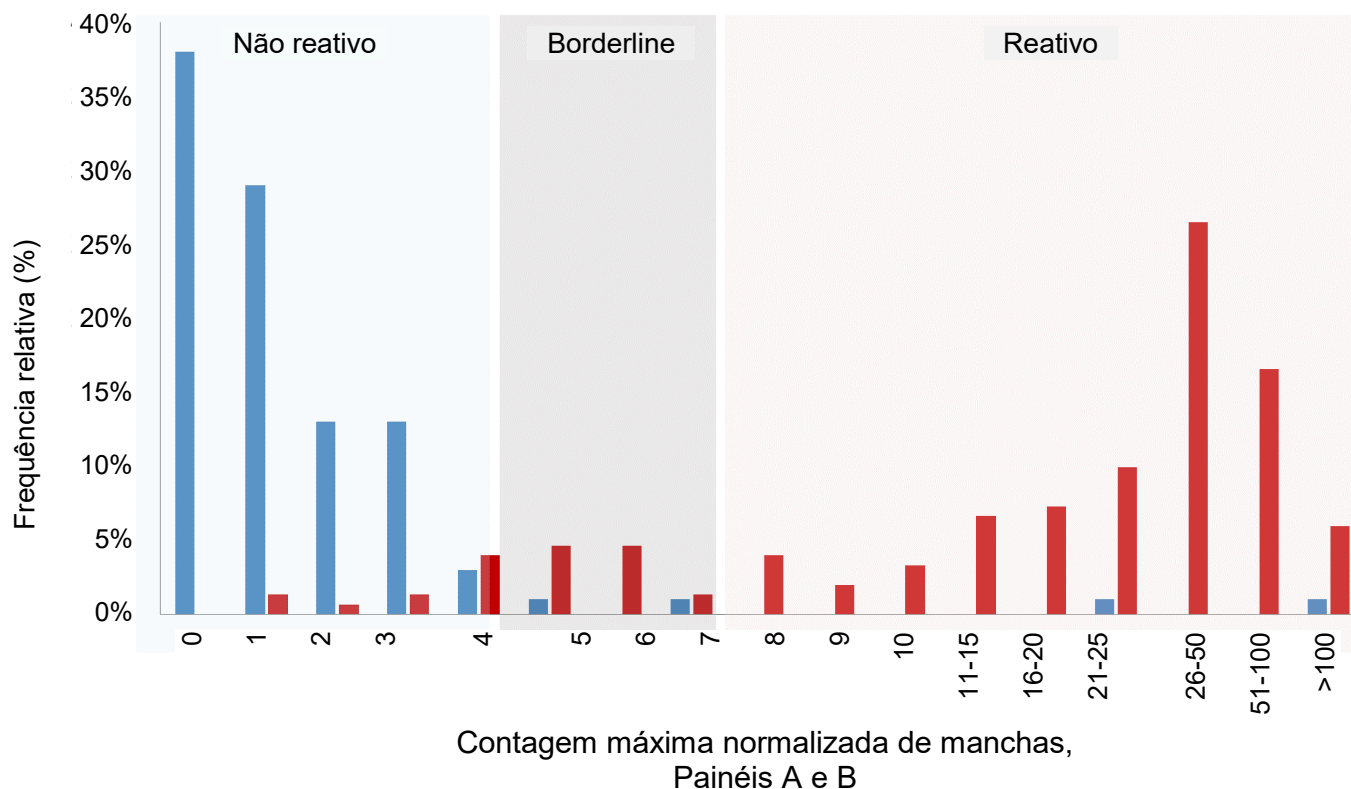
O “cut-off” do ensaio foi confirmado durante os estudos clínicos. A Figura 6 mostra a curva ROC criada através dos dados obtidos durante os estudos clínicos. Um “cut-off” de 6 manchas proporcionou a separação máxima entre as duas coortes, validando o nível pré-selecionado.

Figura 6: Curva característica de operação do receptor criada usando os dados de validação gerados a partir de 151 indivíduos com confirmação por PCR (usado para estimar a sensibilidade) e 100 indivíduos com menor risco relativo de infeção (usado para estimar a especificidade).



Os mesmos dados também foram usados para confirmar os benefícios de incluir uma zona “borderline”, conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7: Gráfico que apresenta a distribuição das contagens de manchas observadas com o teste T-SPOT.COVID em estudos clínicos nos EUA com uma sobreposição dos critérios de interpretação do teste. “Contagem máxima normalizada de manchas” é a resposta máxima (painel menos nulo) do Painel A ou do Painel B (n = 251). A frequência relativa das diferentes contagens de manchas é mostrada para a coorte clínica de menor risco (barras azuis) e para a coorte com confirmação por PCR (barras vermelhas)



A maioria dos indivíduos na coorte de baixo risco (barras azuis) apresentou um nível de reatividade nulo ou baixo, com 96,0 % dentro do intervalo de 0-4 manchas. Os indivíduos com confirmação por PCR (barras vermelhas) apresentaram altos níveis de reatividade com 23,2 % dentro das 8-20 manchas e a maioria (58,9 %) > 20 pontos. A região sombreada a cinzento representa a zona “borderline” ambígua (5, 6 ou 7 manchas) onde, tal como esperado, existe uma sobreposição observada entre as distribuições das contagem de manchas das duas coortes do estudo. Todos os testes com resultados nesta zona devem ser repetidos.

10. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Este ensaio deve ser realizado utilizando os princípios de Boas Práticas Laboratoriais e seguindo estritamente estas Instruções de Utilização.

Resultados “borderline” (ambíguos)

Os resultados “borderline” (ambíguos) são aqueles em que o máximo dos dois resultados de contagem de manchas (Painel menos Nulo) se encontram dentro de ± 1 manchas do “cut-off” do ensaio determinado por ROC de ≥ 6 manchas. Embora válidos, os resultados “borderline” (ambíguos) são menos fiáveis do que os resultados em que a contagem de manchas está mais longe do “cut-off”. Por conseguinte, recomenda-se a repetição do teste do paciente usando uma nova amostra. Se o resultado continuar a ser “borderline” (ambíguo) no novo teste, então deverão ser utilizados outros testes de diagnóstico e/ou informações epidemiológicas para ajudar a determinar o estado imunológico do paciente.

Resultados inválidos

Os resultados inválidos não são comuns e podem estar relacionados com o estado imunitário do indivíduo testado. Também poderão estar relacionados com um conjunto de fatores técnicos, resultando

potencialmente em resultados de “fundo elevados”, “mitogénio baixo” e “nulo elevado”, como:

- Utilização de tubos de colheita de sangue inadequados
- Armazenamento do sangue durante mais de 8 horas antes do processamento sem a utilização do reagente T-Cell *Xtend*.
- Armazenamento do sangue fora do intervalo de temperatura recomendado antes do processamento das amostras sanguíneas
- Contaminação do meio de cultura celular
- Lavagem incompleta da placa











Em caso de resultados inválidos, recomenda-se a repetição do teste com uma nova amostra do paciente. Estão disponíveis documentos técnicos que abordam os principais pontos de resolução de problemas. Estes estão disponíveis através da Oxford Immunotec.

11. ABREVIATURAS E GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS

Abreviaturas

AUC	Área Abaixo da Curva
BCIP/NBT	Fosfato de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl/Tetrazólio Nitroazul
CDC	Centros de Controlo e Prevenção de Doenças
CI	Intervalo de confiança
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments
CPT	Tubos de preparação celular
CV	Coefficiente de variância
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunospot Assay
IFN- γ	Interferão-gama
IL	Interleucina
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Fosfato Salino Tamponado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHA	Fitohemaglutinina
RCF	Força centrífuga relativa
RoC	Característica de Operação do Recetor
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcriptase reversa PCR
TNF	Fator de Necrose Tumoral

Glossário de Símbolos

	Dispositivo Médico de Diagnóstico <i>In vitro</i>
	Utilizar até/Data de validade (Ano-Mês-Dia)
	Número de lote
	Número de catálogo
	Atenção, consultar as instruções de utilização
	Data de fabrico
	Fabricante
	Limites de temperatura/Armazenar entre
	Consultar as instruções de utilização
	Representante Autorizado na UE

BS EN ISO 15223-1:2016

Os símbolos usados no teste T-SPOT.COVID estão em conformidade com a norma internacional ISO 15223-1: 2016; 'Dispositivos médicos - Símbolos a usar em rótulos de dispositivos médicos, rotulagem e informações a fornecer'.

12. BIBLIOGRAFIA

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> (Accessed 2 Feb 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. Ibarondo 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, Roupael 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.

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. INFORMAÇÕES DE CONTACTO

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

Para downloads de suporte aos produtos e mais informações técnicas, visite o nosso site:
www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT e T-Cell Xtend são marcas comerciais registadas da Oxford Immunotec Ltd.
O logótipo Oxford Immunotec é uma marca registada da Oxford Immunotec Ltd.
AIM V e GIBCO são marcas comerciais registadas da Life Technologies Corporation.
CPT e Vacutainer são marcas comerciais registadas da Becton, Dickinson and Company.
Ficoll e Ficoll-Paque são marcas comerciais registadas da Cytiva, uma afiliada da Global Life Sciences Solutions USA LLC.
Tween é uma marca registada da Croda Americas LLC.

A utilização do reagente T-Cell Xtend está protegida pelas patentes e patentes pendentes que se seguem:
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Número de revisão: 1 Data de publicação: 21 de abril de 2021
© 2021 Oxford Immunotec. Todos os direitos reservados.



Fabricante

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

EC REP Representante Autorizado na UE

Oxford Immunotec (Irlanda)
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

