

T-SPOT[®] COVID



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 | 5 |
| Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen | 6 |
| Probenentnahme und -handhabung | 7 |
| Gebrauchsanweisung..... | 8 |
| Einschränkungen | 14 |
| Leistungsmerkmale | 15 |
| Erwartete Werte | 18 |
| Fehlerbehebung | 19 |
| Abkürzungen und Erläuterung der Symbole | 20 |
| Literaturnachweise | 20 |
| Meldung Ernster Zwischenfälle..... | 23 |
| Kontaktdaten..... | 23 |
| Geistige Eigentumsrechte und Änderungshistorie der Packungsbeilage..... | 24 |

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 oder Natriumcitrat). Der T-SPOT.COVID-Test dient zur Identifizierung und Überwachung von Personen mit einer 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 oder Impfung im Blut nachweisbar. Die Dauer der nachweisbaren Antwort nach einer Infektion oder Impfung ist derzeit nicht ausreichend bekannt.

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 Die präzise Ermittlung und Isolierung aller mit dem SARS-CoV-2-Virus infizierten Personen kombiniert mit der weltweiten Einführung zugelassener COVID-19-Impfstoffe spielt eine entscheidende Rolle für die Eindämmung der Ausbreitung des Virus. Allerdings ist trotz umfangreicher COVID-19-Tests und allgemein akzeptierter Impfstoffe klar, dass sich das SARS-CoV-2-Virus weiter ausbreitet und zu einer signifikanten Morbidität und Mortalität führt.² Zudem ist weiterhin unbekannt, wie lange die Schutzwirkung der COVID-19-Impfstoffe anhält, und es gibt Bedenken, ob eine abnehmende Immunantwort in den Monaten nach der Impfung dazu führen könnte, dass Personen wieder dem Risiko einer schweren COVID-19-Erkrankung ausgesetzt sind.^{3,4} Diese Bedenken gelten vor allem vulnerablen Populationen, wie z. B. unter Immunsuppression leidende Personen und die ältere Bevölkerung, denen in einigen Ländern bereits eine dritte Impfung („Booster“) angeboten wird, um die durch den Impfstoff hervorgerufene Immunantwort zu verstärken.⁵ Da eine zunehmende Anzahl an Personen vollständig geimpft ist und das Angebot zum Boostern erhält, kommt dem Verständnis der Immunantwort auf die natürliche Infektion und die Impfung eine immer größere Bedeutung zu.

Zu Beginn der Pandemie wurden schnell serologische Tests entwickelt, die immer noch breite Anwendung finden, um Informationen über die Fähigkeit von Einzelpersonen zu liefern, nach einer natürlichen Infektion mit SARS-CoV-2 oder einer Impfung eine Antikörper-vermittelte Immunantwort aufzubauen.⁶ Serologische Tests geben jedoch nur Auskunft über einen Arm des adaptiven Immunsystems, weshalb ein solcher Antikörpertest allein das Ausmaß der Immunantwort, die eine Person erzeugt hat, eventuell unterschätzen kann.^{7,8} Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass die Antikörperreaktion bei einer natürlichen Infektion höchst variabel ist,^{9,10} wobei häufig bei Personen, die eine milde oder asymptomatische COVID-19-Erkrankung erlebt hatten, niedrige Antikörpertiter beobachtet wurden.^{11,12} Einige Personen produzieren nie eine nachweisbare Antikörperreaktion.⁹ Die COVID-19-Impfstoffe sorgen nachweislich bei der Mehrheit der geimpften Personen für robuste Antikörperreaktionen¹³, allerdings gibt es Erkenntnisse, dass diese Reaktionen in den Monaten nach der zweiten Dosis langsam abnehmen.^{3,4,14} Außerdem gibt es Personen, wie beispielsweise jene mit einer primären Immundefizienz, die keine Antikörper produzieren können und daher keine messbare Immunreaktion auf die Impfung hervorbringen, wenn nur der Antikörpertest isoliert verwendet wird.¹⁵

Die T-Zell-Antwort, oder zellvermittelte Immunität, ist der andere Arm der adaptiven Immunantwort. Daher wurden während der COVID-19-Pandemie T-Zell-Tests sowohl in der Forschung als auch im klinischen Umfeld verwendet, um weitere Erkenntnisse über die Immunantworten auf SARS-CoV-2-Infektionen und -Impfungen zu erhalten.¹⁶ Aus mehreren Veröffentlichungen geht hervor, dass T-Zell-Antworten auf menschliche Coronaviren, darunter SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2, robust und langanhaltend sein könnten.¹⁷ So ist bei einigen Personen mit einer 17 Jahre zurückliegenden SARS-CoV-1-Infektion noch heute eine T-Zell-Antwort nachweisbar.¹⁸ 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.^{17,19} Studien zeigen jetzt ähnliche Zeitverläufe nach einer Impfung.²⁰ 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,²¹ darauf hin, dass die zellvermittelte Immunität ein wichtiger Aspekt einer schützenden Immunität gegenüber einer SARS-CoV-2-Infektion sein könnte.²² 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.²² SARS-CoV-2-spezifische T-Zellen wurden auch zwischen Tag 7 und 14 nach der Impfung nachgewiesen.²³

SARS-CoV-2-spezifische T-Zellen wurden als Reaktion auf viele der derzeitigen Impfstoffe nachgewiesen^{24,25,26} und die Bedeutung von Nachweis und Überwachung dieser Reaktionen wird immer mehr anerkannt.²⁷ Mit dem T-SPOT.COVID-Test wurde in einer Reihe von Studien eine spezifische T-Zell-Antwort infolge einer Impfung nachgewiesen.^{28,29,30,31,32,33}

Es ist wichtig, dass viele dieser Studien belegen, dass der T-SPOT.COVID-Test T-Zell-Antworten von immunsupprimierten Personen nachweisen kann^{29,31,32,33}, einschließlich bei Patienten in B-Zellen abbauender Behandlung, die möglicherweise keine robuste Antikörperreaktion aufbauen können.²⁸

Der T-SPOT.COVID-Test 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.^{34,35,36,37} 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.³⁸ Weiterhin wurden eine Vielzahl von Faktoren, darunter Alter³⁹, Schwere der Erkrankung⁷ und Immunsuppression⁴⁰, mit der Variabilität des Ausmaßes von SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antworten in Verbindung gebracht. Die hohe Empfindlichkeit des ELISPOT-Tests hat sich bereits in einigen Studien, die den T-SPOT.COVID-Test zum Nachweis der T-Zell-Antwort auf die Impfung von immunsupprimierten Personen verwendeten, als vorteilhaft erwiesen.^{28,29,30,31,32,33}

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.^{41,42} 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.⁴³

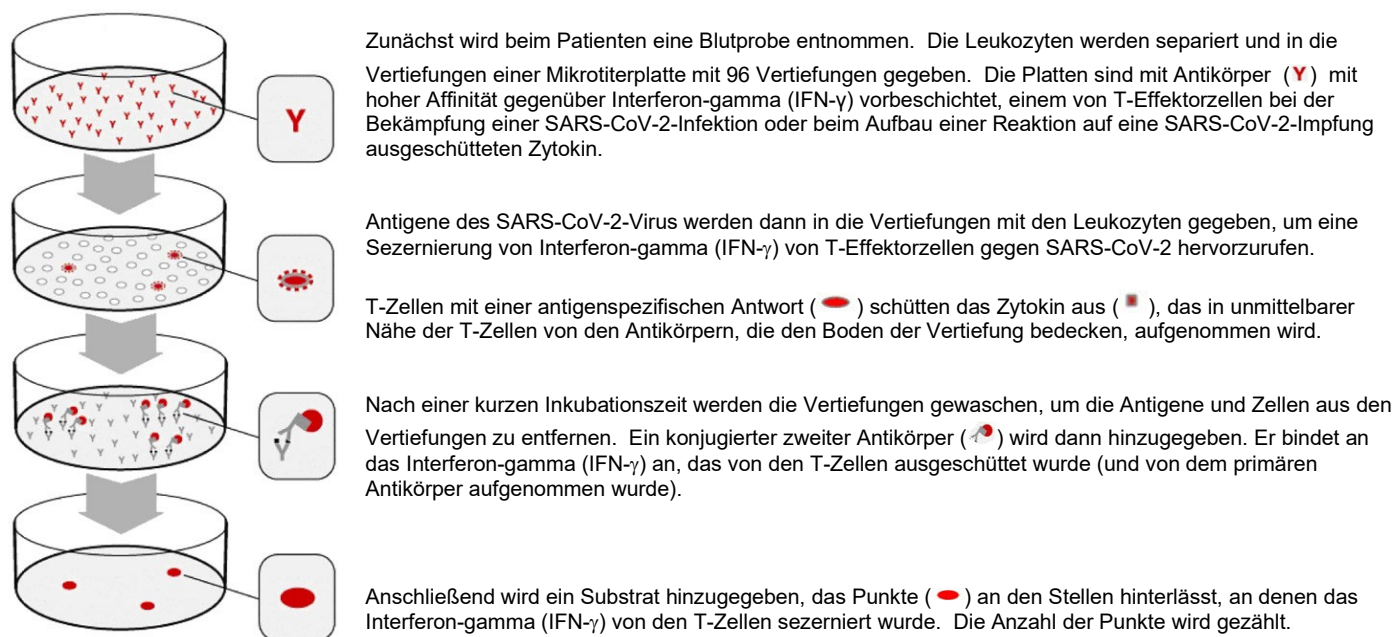
Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC-Zellen) werden aus der Blutprobe gewonnen, gewaschen, ausgezählt und zum Test gegeben.

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-Testsystems. Nur zu Illustrationszwecken. Ausführliche Informationen zum Verfahren sind in Abschnitt 6 „Gebrauchsanweisung“ enthalten.



3. REAGENZEN 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 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 Fläschchen (à 0,8 mL) Panel A (COV-A): enthält Spike-Antigene, Rinderserumalbumin und antimikrobielle Wirkstoffe.
- 2 Fläschchen (à 0,8 mL) Panel B (COV-B): enthält Nukleokapsid-Antigene, Rinderserumalbumin und antimikrobielle Wirkstoffe.
- 2 Fläschchen (à 0,8 mL) Positivkontrolle: enthält Phytohämagglutinin (PHA) zur Kontrolle der Zellfunktionalität, Rinderserumalbumin und antimikrobielle Wirkstoffe.
- 1 Fläschchen (50 μ L) 200-fach konzentriertes Konjugatreagens: mit alkalischer Phosphatase konjugierter, muriner monoklonaler Antikörper gegen das Zytokin Interferon-gamma (IFN- γ).
- 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™.
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 ± 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 µL (beispielsweise vier Pipetten mit Volumenbereichen von 1–10 µL, 2–20 µL, 20–200 µL und 100–1000 µL) 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 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 Kulturmedien unter Umständen in kleinere Aliquote umgefüllt werden.

4. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.
- Nur zur Verwendung durch Fachkräfte.
- Die Anwender sollten in der Durchführung des Tests geschult werden und sichergehen, dass sie die Gebrauchsanweisung verstehen, bevor sie den Test anwenden.
- Vor dem Gebrauch die Gebrauchsanweisung des Tests 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 Testbestandteilen 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 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, Testvertiefungen, 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.

WARNHINWEISE 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 Antikoagulanzen 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 Entnahmegesäß nehmen. Das Röhrchen invertieren (8–10 Mal), um das Vollblut gründlich mit dem Antikoagulanzen zu vermischen. Das Blut bei Raumtemperatur (18–25 °C) lagern. **Nicht kühlen oder einfrieren.**
3. Bei immunkompetenten Patienten kann die für den Test 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-Natrium- oder -Lithiumheparin- oder -Natriumcitrat-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 Natrium- oder Lithiumheparin- oder Natriumcitrat-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 Antikoagulanzen EDTA sollten nicht verwendet werden.

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.

- a. 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 Natrium- oder Lithiumheparin- oder Natriumcitrat-Röhrchen entnommen werden. Vacutainer-CPT-Röhrchen und Blutentnahmeröhrchen mit dem Antikoagulanzen 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.

- 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 Tests 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.

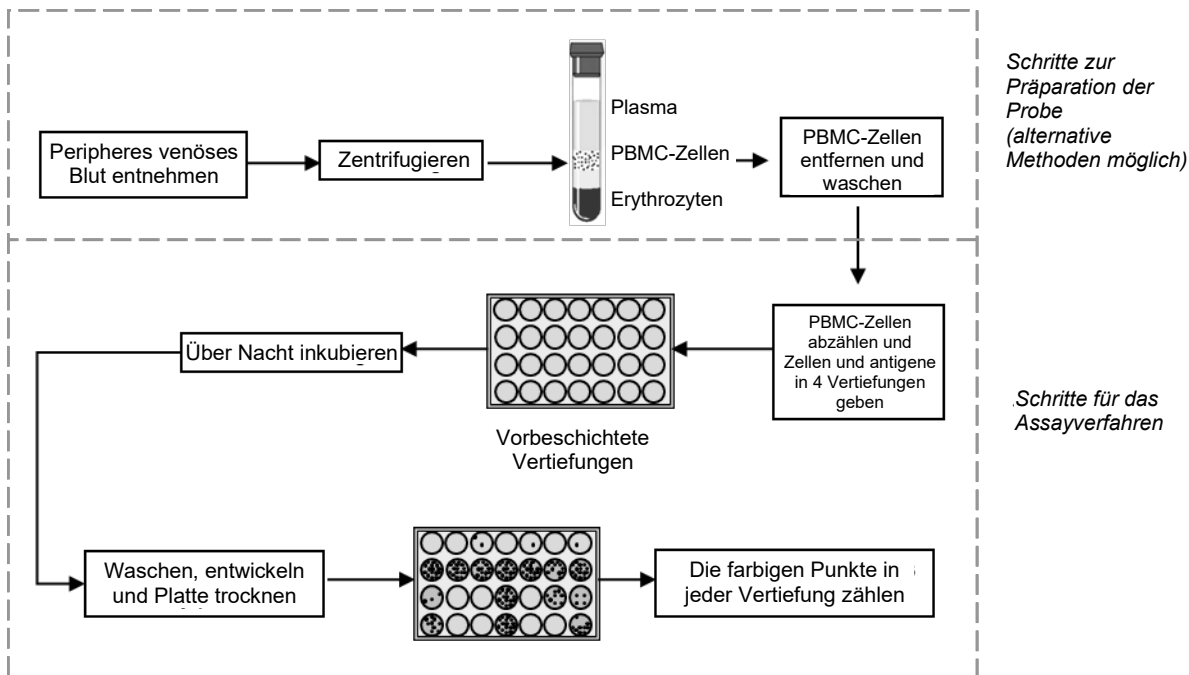
- 7 Minuten lang mit 600 RZB (g) zentrifugieren. Den Überstand abgießen und das Pellet in 1 mL Medium resuspendieren.
- Das Röhrchen mit frischem Medium auf 10 mL auffüllen und 7 Minuten lang mit 350 RZB (g) zentrifugieren.
- Den Überstand abgießen und das Pellet in 0,7 mL Zellkulturmedium resuspendieren.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

Hinweis: Die Schritte 2–7 sollten in einem BLII-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 Test 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 Test zu präparieren. Anschließend wird der Test eingeleitet, indem die PBMC-Zellen und Antigene zur Testplatte 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 (COV A), SARS-CoV-2-Nukleokapsidantigenen (COV 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 Test 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 Hämocytometers oder durch automatisches Zählen mit einem automatisierten Hämatologie-Analysegerät.
2. Bei manueller Zählung mit einem Neubauer-Hämocytometer unter Verwendung von Trypanblau 10 µL der endgültigen Zellsuspension zu 40 µL 0,4 % (m/V) Trypanblau-Lösung geben. Ein geeignetes Aliquot auf das Hämocytometer 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.

3. 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.

4. 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.
 - In jede erforderliche Vertiefung 50 µL COV-A-Lösung geben.
 - In jede erforderliche Vertiefung 50 µL COV-B-Lösung geben.
 - 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.

- 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“).

- 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 Waschgerät 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 Trocknungsoven 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 Testkriterien (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 Testplatten 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 Testkriterien“ (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 TESTKRITERIEN

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 entweder kürzlich aufgetretene oder vorangegangene Infektion mit SARS-CoV-2 oder einer Impfung gegen SARS-CoV-2 herangezogen werden.
- **Ein „reaktives“ Ergebnis deutet darauf hin, dass die Probe T-Effektorzellen enthält, die sensibilisiert gegenüber SARS-CoV-2 sind. Das Vorhandensein von sensibilisierten T-Zellen könnte das Ergebnis einer Impfung oder einer Infektion mit SARS-CoV-2 sein.**
- **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

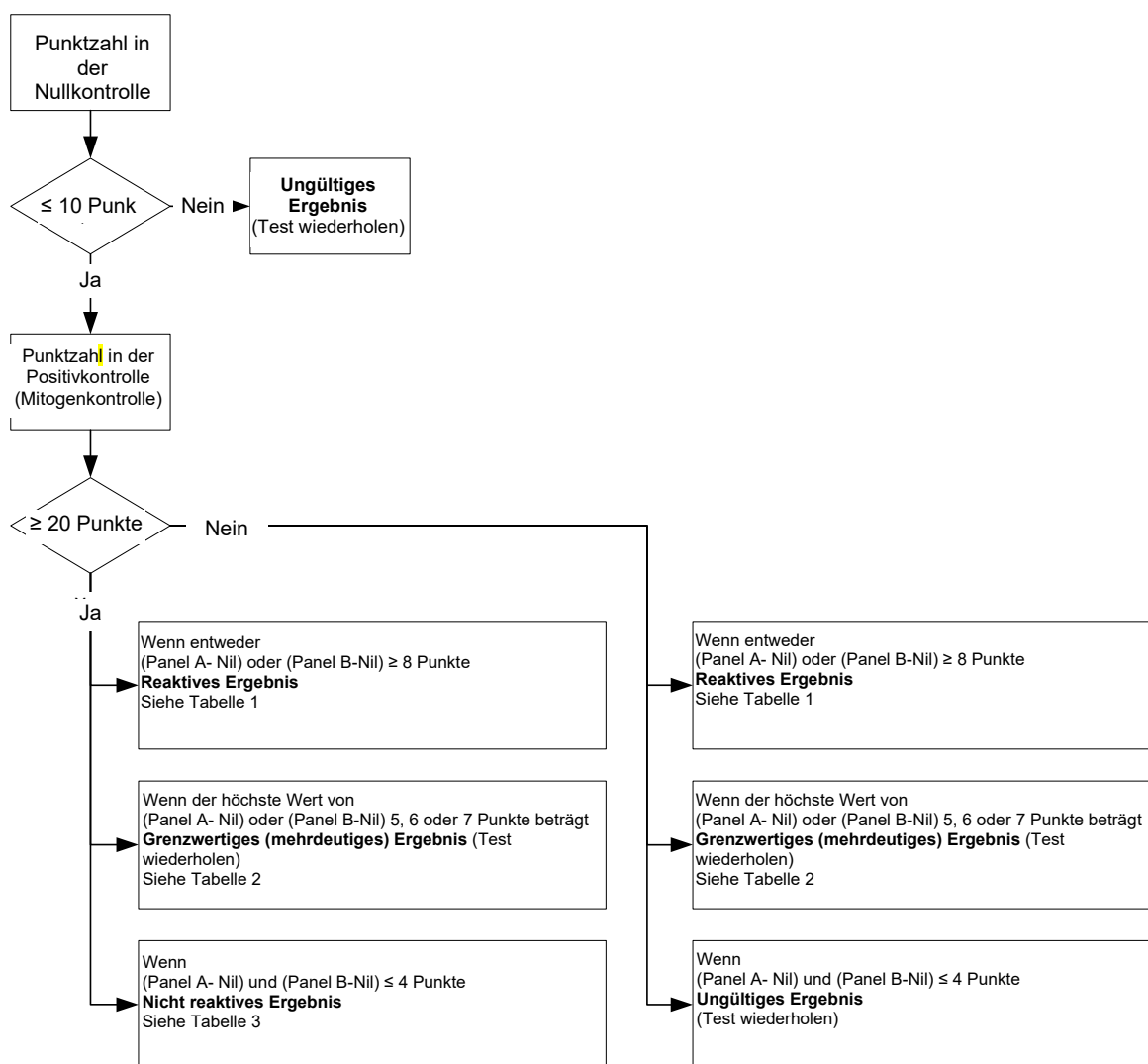


Tabelle 1: Reaktive Auswertung: Entweder (Panel A minus null) oder (Panel B minus null) ≥ 8 Punkte

| 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.

Tabelle 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** |

Tabelle 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 Tests kann zu fälschlicherweise reaktiven oder fälschlicherweise nicht reaktiven Ergebnissen führen.
- Ein reaktives Ergebnis kann von einer Infektion oder vorangegangenen Infektion mit SARS-CoV-2 oder von einer Impfung gegen SARS-CoV-2 herrühren.
- Ein fälschlicherweise nicht reaktives Ergebnis kann durch eine unsachgemäße Blutprobenentnahme oder eine falsche Handhabung der Probe mit Auswirkung auf die Lymphozytenfunktion verursacht werden.
- Ein nicht reaktives Ergebnis bei COV-A und COV-B schließt nicht aus, dass eine Person eine zunehmend adaptive Immunreaktion nach einer Infektion oder Impfung entwickelt haben kann.
- 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 zu diesem Zeitpunkt 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, einer Infektion mit oder einer erfolgreichen Impfung gegen SARS-CoV-2 nicht aus. Patienten mit einer kürzlich durchgeführten Impfung oder 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.
- 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 eine andere Anwendung 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-Tests 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. Jüngste Hinweise legen nahe, dass derselbe Cutoff-Wert geeignet ist, um zwischen geimpften und ungeimpften Personen zu unterscheiden.⁴⁴

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

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 ≤ 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) | - |
| Gesamt > 60 | 83,3 % (40/48) | 69,8–92,5 % | 41,7 % (20/48) | 27,6–56,8 % |

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 %.

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).

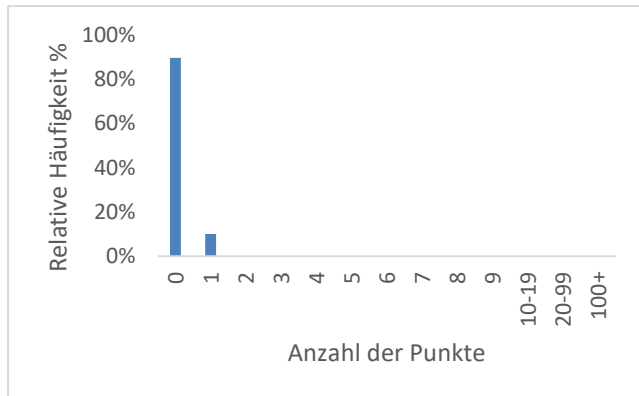
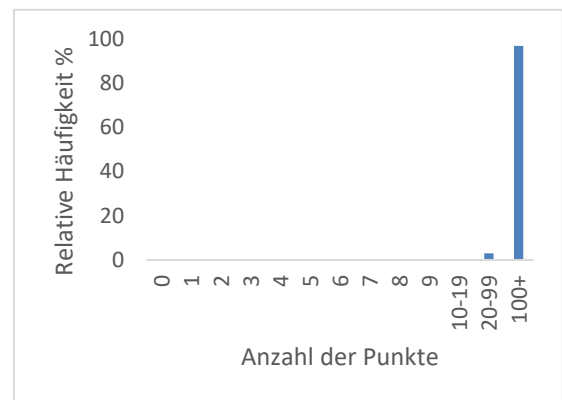


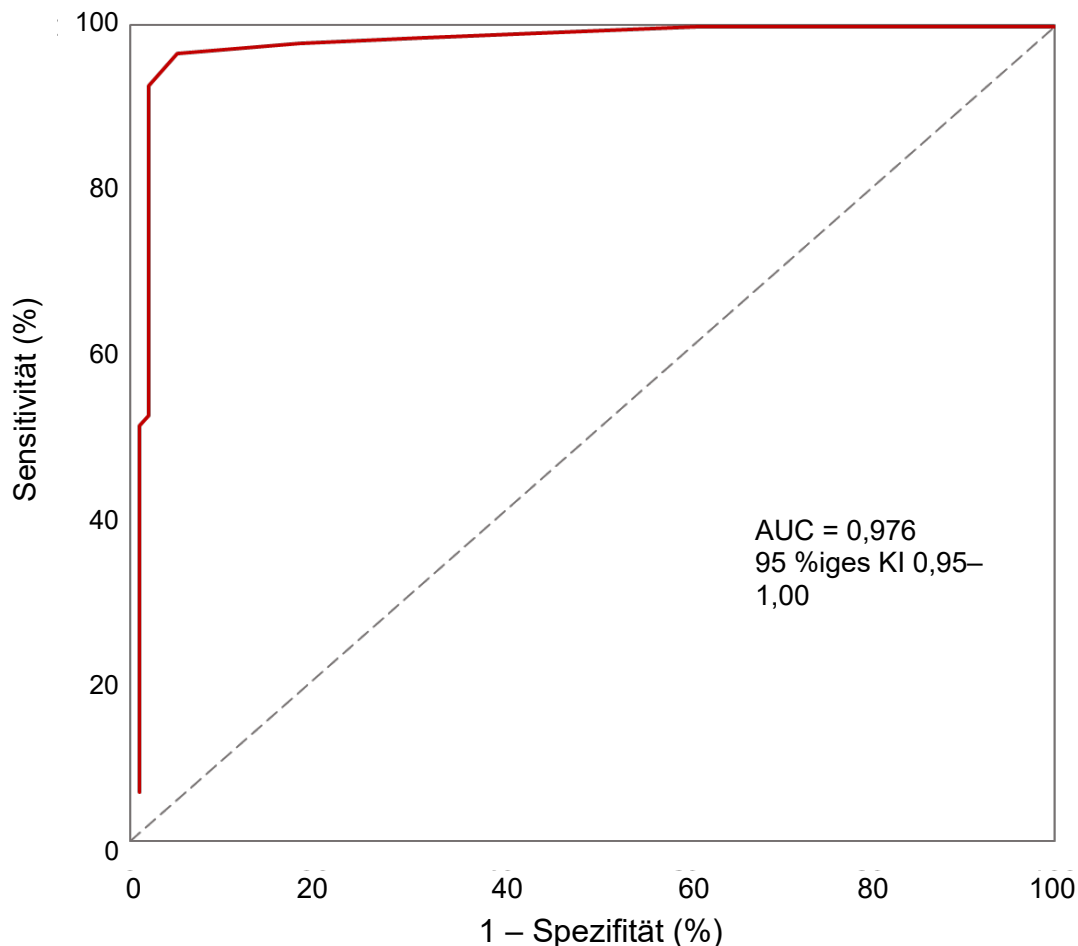
Abbildung 5b: Histogramm der Ergebnisse der Positivkontrolle aller Patienten (n = 251).



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.

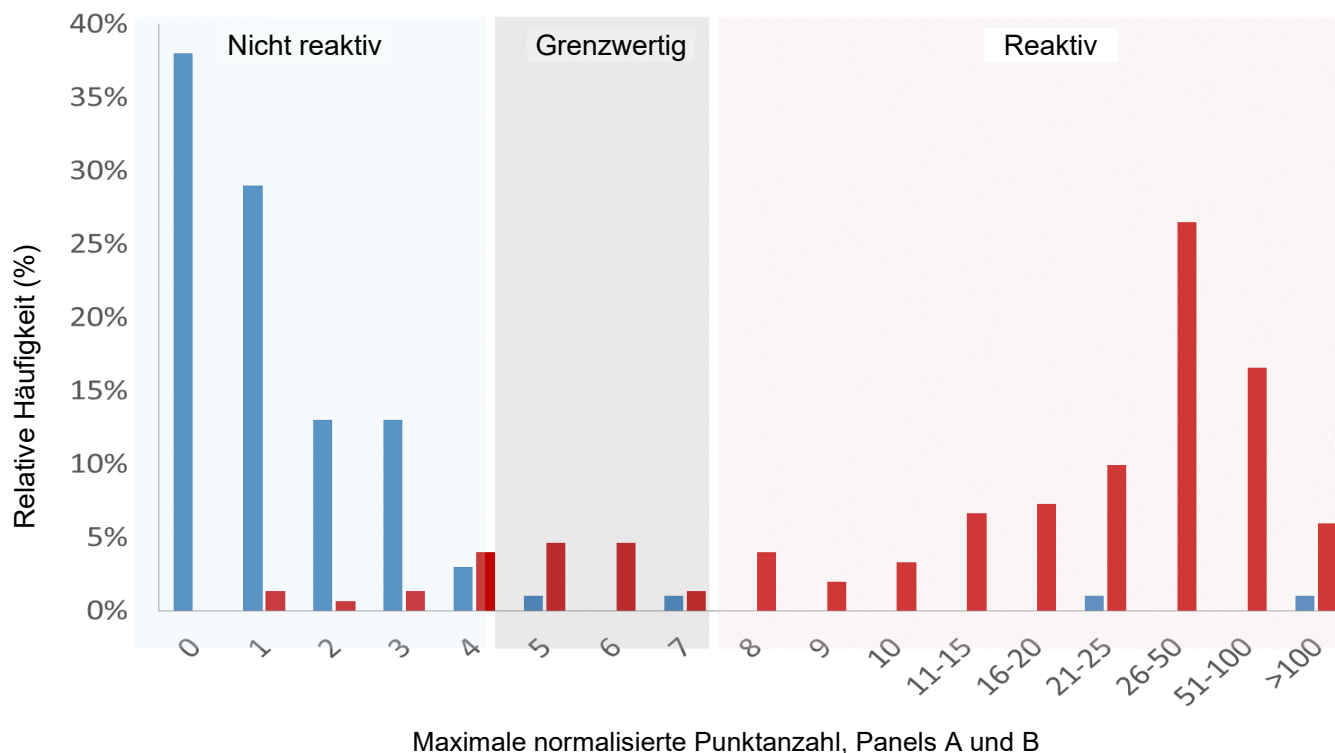
Der Cutoff-Wert des Tests wurde im Rahmen der klinischen Studien bestätigt. In Abbildung 6 ist die ROC-Kurve dargestellt, die anhand der Daten aus den klinischen Studien erstellt wurde. Ein Cutoff-Wert von 6 Punkten ermöglichte die maximale Trennung zwischen den beiden Kohorten und bestätigte damit den 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 Test 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 Test-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. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. www.covid19.who.int. Accessed 22-OCT-2021
3. Naaber P, Tserel L, Kangro K *et al.* Dynamics of antibody response to BNT162b2 vaccine after six months: a longitudinal prospective study. *The Lancet Regional Health – Europe.* 2021; 0: 29
4. Thomas SJ, Moreira ED, Kitchin N *et al.* Safety and efficacy of the BNT162b2 vaccine after 6 months. *New Eng J Med.* 2021; DOI: 10.1056/NEJMoa2110345
5. Krause PR, Fleming TR, Peto R *et al.* Considerations in boosting COVID-19 vaccine immune responses. *The Lancet.* 2021; 398(10308): 1377-1380

6. Watson J, Richter A. Testing for SARS-CoV-2 antibodies. *BMJ*. 2020; 370: m3325
7. 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
8. 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
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. Wei S, Stoesser N, Matthews PC *et al*. Antibody responses to SARS-CoV-2 vaccines in 45,965 adults from the general population of the United Kingdom. *Nature Microbiology*. 2021; 6: 1140-1149
14. Levin EG, Lustig Y, Cohen C *et al*. Waning humoral response to BNT162b2 Covid-19 vaccine over 6 months. *New Eng J Med*. 2021; DOI: 10.1056/NEJMoa2114583
15. Roifman CM, Vong L. COVID-19 vaccination for patients with primary immunodeficiency. *LymphoSign Journal*. 2021; 8(2)
16. Noh JY, Jeong HW, Kim JH, Shin EC. T cell-oriented strategies for controlling the COVID-19 pandemic. *Nature Reviews Immunology*. 2021
17. Zuo J, Doewll AC, Pearce H *et al*. Robust SARS-CoV-2 T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nature Immunology*. 2021; 22: 620-626
18. 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
19. 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)
20. Mateus J, Dan JM, Zhang Z *et al*. Low-dose mRNA-1273 COVID-19 vaccine generates durable memory enhanced by cross-reactive T cells. *Science*. 2021; 374(6566)
21. 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)
22. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021. 184(4): 861-880
23. Ewer KJ, Barrett JR, Belij-Rammerstorfer S *et al*. T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nature Medicine*. 2020; 27: 270-278
24. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E *et al*. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and Th1 responses. *Nature*. 2020; 586: 594-599
25. 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
26. 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
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. Simon D, Tascilar K, Schmidt K *et al*. Brief Report: Humoral and cellular immune responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination in B cell depleted autoimmune patients. *Arthritis & Rheumatology*. 2021; DOI: 10.1002/art.41914
29. Lindemann M, Klisanin V, Thummler L *et al*. Humoral and cellular vaccination responses against SARS-CoV-2 in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Vaccines*. 2021; 9(10): 1075
30. Trougakos IP, Terpos E, Zirou C *et al*. Comparative kinetics of SARS-CoV-2 anti-spike protein RBD IgGs and neutralizing antibodies in convalescent and naïve recipients of the BNT162b2 mRNA vaccine versus COVID-19 patients. *BMC Medicine*. 2021; 19: 208
31. Gounant V, Ferre VM, Soussi G *et al*. Efficacy of SARS-CoV-2 vaccine in thoracic cancer patients: a prospective study supporting a third dose in patients with minimal serologic response after two vaccine doses. *Journal of Thoracic Oncology*. 2022; 17(2): 239-251
32. Ramasamy K, Sadeler R, Jeans S *et al*. Immune response to COVID-19 vaccination is attenuated by poor disease control and antimyeloma therapy with vaccine driven divergent T cell response. *British Journal of Haematology*. 2022; doi: 10.1111/bjh.18066
33. Simon D, Tascilar K, Fagni F *et al*. Efficacy and safety of SARS-CoV-2 revaccination in non-responders with immune-mediated inflammatory disease. *Ann Rheum Dis*. 2021; doi: 10.1136/annrheumdis-2021-221554
34. 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
35. 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

36. 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
37. 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
38. 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. *Frontiers in Immunology.* 2021; doi: 10.3389/fimmun.2021.635942
39. 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
40. 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)
41. 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.
42. 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.
43. NCCLS Approved Guideline. Performance of Single Cell Immune Response Assays, I/LA26-A
44. Brill L, Rechtman A, Zveik O, Haham N, Oiknine-Dijian E, Wolf D, Levin N, Raposo C and Vaknin-Dembinsky A. Humoral and T-Cell Response to SARS-CoV-2 Vaccination in Patients With Multiple Sclerosis Treated with Ocrelizumab. *JAM Neurol.* 2021. Doi:10.1001/Jamaneurol.2021.3599

13. MELDUNG ERNSTER ZWISCHENFÄLLE

Wenn ein ernster Zwischenfall im Zusammenhang mit diesem Produkt aufgetreten ist, sollte er dem Kundendienst gemeldet werden. In den Mitgliedstaaten der Europäischen Union sollten ernste Zwischenfälle auch der zuständigen Behörde Ihres Landes (der für In-vitro-Diagnostika zuständigen Regierungsstelle) gemeldet werden. Auf der Website Ihrer Regierung finden Sie Hinweise darauf, wie Sie sich an Ihre zuständige Behörde wenden können. Als „ernster Zwischenfall“ gilt jeder, der unmittelbar oder mittelbar mit Folgendem in Zusammenhang stand, gestanden haben könnte oder stehen könnte:

- Tod eines Patienten, Bedieners oder einer anderen Person;
- vorübergehende oder dauerhafte ernsthafte Verschlechterung des Gesundheitszustands eines Patienten, Bedieners oder einer anderen Person;
- ernsthafte Gefährdung der öffentlichen Gesundheit.

14. KONTAKTDATEN

Oxford Immunotec Ltd.
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Vereinigtes Königreich
Tel.: +44 (0) 1235 442780
E-Mail: info@oxfordimmunotec.com

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

🏢 Hersteller
Oxford Immunotec Ltd.
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Vereinigtes Königreich

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

T-SPOT ,T-Cell *Xtend* und das Oxford Immunotec-Logo sind eingetragene Marken 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

© 2023 Oxford Immunotec. Alle Rechte vorbehalten.

| Revisionsnummer | Veröffentlichungsdatum | Änderungx |
|-----------------|---|--|
| 1 - 4 | Angaben auf Anfrage von Oxford Immunotec erhältlich | |
| 5 | Januar 2023 | Änderung der Herstelleradresse. Ergänzung der Revisionshistorie. Ergänzung von Anweisungen zur Meldung schwerwiegender Vorfälle. |



Oxford Immunotec Ltd.
 143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
 Oxfordshire, OX14 4SE,
 Vereinigtes Königreich
 Tel.: +44 (0) 1235 442780
www.oxfordimmunotec.com

