

T-SPOT[®]. COVID

 **Oxford
Immunotec**
a PerkinElmer company

FOGLIO ILLUSTRATIVO

Per uso diagnostico *in vitro*

Il presente foglio illustrativo si riferisce

all'utilizzo di:

COV.435/300, COV.435/200

Indice

Destinazione d'uso	3
Panoramica e spiegazione	3
Reagenti e conservazione	5
Conservazione e stabilità	5
Avvertenze e precauzioni	6
Prelievo e trattamento dei campioni	7
Istruzioni per l'uso	8
Limitazioni	13
Caratteristiche prestazionali	14
Valori attesi	16
Risoluzione dei problemi	18
Abbreviazioni e glossario dei simboli	19
Bibliografia	19
Segnalazione di incidenti seri	21
Informazioni di contatto.....	21
Diritti di proprietà intellettuale e cronologia delle revisioni del foglietto illustrativo.....	22

1. DESTINAZIONE D'USO

Il test T-SPOT.COVID rappresenta una tecnica standardizzata basata su ELISPOT (Enzyme Linked ImmunoSpot) e intesa per l'analisi qualitativa di una risposta immunitaria mediata dalle cellule (cellule T) al SARS-CoV-2 nel sangue umano intero (sodio, litio eparina o citrato di sodio). Il test T-SPOT.COVID è inteso come misura di identificazione e monitoraggio degli individui con una risposta immunitaria delle cellule T al SARS-CoV-2.

In genere, la risposta delle cellule T al SARS-CoV-2 è rilevabile nel sangue diversi giorni dopo l'infezione iniziale o la vaccinazione e, attualmente, il periodo di tempo necessario affinché la risposta post-infezione o vaccinazione sia rilevabile non è ben specificato.

2. PANORAMICA E SPIEGAZIONE

Il SARS-CoV-2 è un ceppo di Coronavirus scoperto nella provincia cinese di Wuhan nel 2019. Il virus si è diffuso rapidamente in tutto il mondo nei primi mesi del 2020 portando alla dichiarazione di stato di pandemia da parte dell'OMS datata 11 marzo 2020¹. La rilevazione accurata e l'isolamento delle persone infettate dal virus SARS-CoV-2, combinati con l'introduzione in tutto il mondo di vaccinazioni approvate contro il COVID-19, sono stati fondamentali per controllare la diffusione del virus. Tuttavia, nonostante l'esecuzione su vasta scala di tamponi per rilevare il COVID-19 e l'ampia accettazione dei vaccini, è chiaro che il virus SARS-CoV-2 continua a diffondersi e a causare morbilità e mortalità significative². Inoltre, non è ancora noto per quanto tempo si protrarrà la protezione conferita dai vaccini contro il COVID-19 e vi sono preoccupazioni relative al fatto che la diminuzione delle risposte immunitarie nei mesi successivi alla vaccinazione possa esporre nuovamente le persone al rischio di COVID-19 severo^{3,4}. Queste preoccupazioni sono particolarmente evidenti nelle popolazioni vulnerabili, come i soggetti immunocompromessi e gli anziani, per i quali in alcuni Paesi è già stata prevista una terza dose per "rafforzare" la risposta immunitaria indotta dal vaccino⁵. Poiché un numero sempre crescente di individui ha completato il ciclo vaccinale primario e può sottoporsi al richiamo, è sempre più ampiamente riconosciuta l'importanza di comprendere la risposta immunitaria sia all'infezione naturale che alla vaccinazione.

I test sierologici sono stati sviluppati rapidamente all'inizio della pandemia e sono ancora ampiamente utilizzati per fornire informazioni sulla capacità di un individuo di attivare una risposta immunitaria mediata da anticorpi a seguito di un'infezione naturale con SARS-CoV-2 o della vaccinazione⁶. Tuttavia, i test sierologici forniscono informazioni solo su un braccio del sistema immunitario adattativo e, pertanto, i test per gli anticorpi da soli potrebbero sottostimare l'entità della risposta immunitaria generata da un individuo^{7,8}. Numerosi studi hanno dimostrato che la risposta anticorpale all'infezione naturale è molto variabile^{9,10}, con bassi titoli anticorpali spesso osservati in soggetti con COVID-19 di grado lieve o asintomatici^{11,12}. Alcuni individui non producono mai una risposta anticorpale rilevabile⁹. È stato dimostrato che i vaccini contro il COVID-19 inducono risposte anticorpali robuste nella maggior parte dei soggetti vaccinati¹³; tuttavia, alcune evidenze mostrano che queste risposte iniziano a diminuire nei mesi successivi alla seconda dose^{3,4,14}. Ci sono anche individui, come coloro con immunodeficienza primaria, che non sono in grado di produrre anticorpi e che, pertanto, non produrranno una risposta immunitaria misurabile alla vaccinazione se il test anticorpale viene utilizzato da solo¹⁵.

La risposta delle cellule T, o immunità cellulo-mediata, è l'altro braccio della risposta immunitaria adattativa e il test delle cellule T è stato utilizzato sia nella ricerca che in contesti clinici durante la pandemia di COVID-19 per fornire ulteriori informazioni sulle risposte immunitarie all'infezione da SARS-CoV-2 e alla vaccinazione¹⁶. Diverse pubblicazioni hanno dimostrato che le risposte delle cellule T ai coronavirus umani, inclusi SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2, potrebbero essere importanti e durature¹⁷, inoltre, alcuni individui infettati da SARS-CoV-1 17 anni fa hanno mostrato oggi risposte delle cellule T¹⁸. Diversi studi hanno dimostrato che l'immunità delle cellule T specifica per SARS-CoV-2 viene mantenuta nei 6-9 mesi successivi alla prima infezione, il che suggerisce che le risposte delle cellule T potrebbero durare più a lungo delle risposte anticorpali all'infezione da SARS-CoV-2^{17,19}. Alcuni studi stanno mostrando ora tempistiche simili dopo la vaccinazione²⁰. Questi risultati, insieme agli studi che hanno provato l'importanza critica delle cellule T nella scomparsa del virus e nella ripresa da SARS-CoV-2²¹, suggeriscono che l'immunità mediata da cellule potrebbe rappresentare un aspetto importante di qualsiasi immunità protettiva sviluppata contro SARS-CoV-2²². Inoltre, mentre le dinamiche della risposta delle cellule T specifica per SARS-CoV-2 non sono ancora state chiarite del tutto, le prove suggeriscono che la maggior parte degli individui infettati da SARS-CoV-2 genera cellule funzionali, IFN-gamma (IFN- γ) che producono cellule T specifiche per SARS-CoV-2 rilevabili nel sangue periferico già 2-4 giorni dalla comparsa dei sintomi²². Cellule T specifiche per SARS-CoV-2 sono state rilevate anche 7-14 giorni dopo la vaccinazione²³.

Le cellule T specifiche per SARS-CoV-2 sono state rilevate in risposta a molti degli attuali vaccini^{24,25,26} e l'importanza di individuare e monitorare tali risposte è sempre più riconosciuta²⁷. Il test T-SPOT.COVID è stato utilizzato per dimostrare una risposta delle cellule T specifica a seguito della vaccinazione in diversi studi^{28,29,30,31,32,33}. È importante sottolineare che molti di questi studi hanno dimostrato che il test T-SPOT.COVID è in grado di rilevare le risposte delle cellule T in individui immunocompromessi^{29,31,32,33}, compresi i pazienti che assumono terapie di deplezione delle cellule B che potrebbero non essere in grado di sviluppare risposte anticorpali robuste²⁸.

Il test T-SPOT.COVID è una variante semplificata e standardizzata della tecnica di test ELISPOT. I test ELISPOT individuano e misurano le risposte delle cellule T elencando il numero di cellule T che stanno secernendo citochina in risposta alla stimolazione con antigeni. I test ELISPOT sono eccezionalmente sensibili dal momento che la citochina target viene catturata direttamente dalla cellula secernente, prima che venga diluita nel surnatante, legata dai recettori delle cellule adiacenti o degradata. Ciò rende i test ELISPOT molto più sensibili rispetto ai test ELISA convenzionali^{34,35,36,37}. La sensibilità è un fattore importante nell'individuazione della risposta delle cellule T al SARS-CoV-2, poiché la frequenza di cellule T potrebbe essere inferiore rispetto a quella mostrata per altri virus³⁸; inoltre, una grande varietà di fattori tra cui età³⁹, gravità della patologia⁷ e immunosoppressione⁴⁰ sono stati correlati alla variabilità dell'entità di risposte delle cellule T specifiche per SARS-CoV-2. L'elevata sensibilità offerta dal test ELISPOT ha già dimostrato di essere utile in diversi studi che hanno utilizzato il test T-SPOT.COVID per rilevare le risposte delle cellule T alla vaccinazione in individui immunocompromessi^{28,29,30,31,32,33}.

Il test elenca le cellule T effettrici che rispondono alla stimolazione utilizzando due pool di peptidi separati derivati dalle proteine spike e nucleocapside di SARS-CoV-2. La risposta delle cellule T per ciascuna proteina viene misurata in parallelo in singoli pozzetti. I pannelli di antigeni di T-SPOT.COVID sono studiati come peptidi sovrapposti che abbracciano sequenze delle proteine spike (COV-A) e nucleocapside (COV-B). Il modello peptide offre una copertura dell'epitopo massima per una migliore individuazione della reattività delle cellule T e nessuna restrizione HLA. Le formulazioni antigeniche di 253 peptidi che coprono la maggior parte delle regioni immunogeniche del genoma del virus consentono di misurare la portata dell'immunità e assicurano che l'impatto delle mutazioni puntuali sia ridotto al minimo. È stata migliorata la specificità al SARS-CoV-2 tramite la rimozione di potenziali sequenze di peptide cross-reattive con elevata omologia ad altri coronavirus.

PRINCIPIO DEL TEST

La risposta immunitaria all'infezione di SARS-CoV-2 è mediata tramite l'attivazione di entrambe le cellule B e T. Come parte della risposta delle cellule T, queste ultime sono sensibilizzate agli antigeni di SARS-CoV-2 progettati per attivare entrambe le cellule T effettrici CD4 e CD8, le quali producono successivamente la citochina interferone gamma (IFN- γ) quando sono stimolate da questi antigeni^{41,41}. Il test T-SPOT.COVID sfrutta la metodologia (ELISPOT, Saggio immunospot legato a un enzima) per elencare le cellule T sensibilizzate al SARS-CoV-2 catturando l'interferone gamma (IFN- γ) in prossimità delle cellule T dalle quali era stata secreta⁴³.

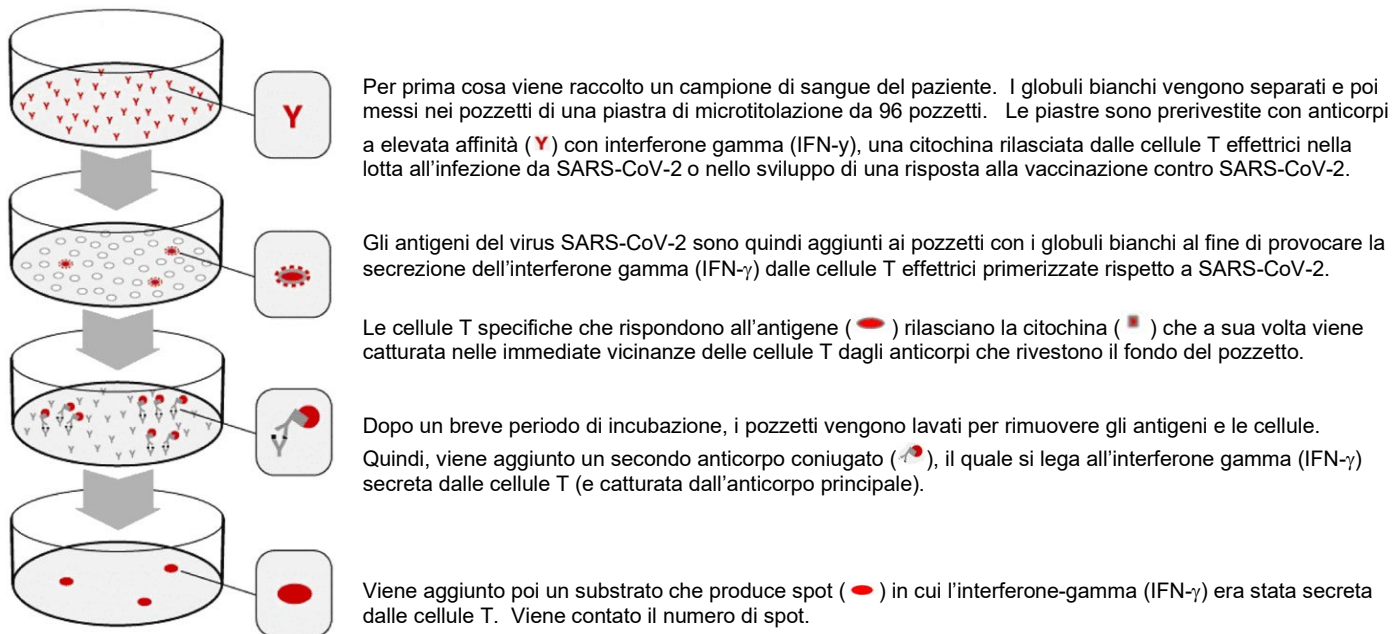
Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono estratte da un campione di sangue intero, lavate e poi conteggiate prima di essere aggiunte al test.

Le PBMC isolate (globuli bianchi) vengono poste in pozzetti per la microtitolazione, nei quali sono esposte a controllo della fitoemoagglutinina (PHA) (uno stimolatore mitogenico indicante la funzionalità cellulare), controllo nullo, o a due pannelli separati di antigeni SARS-CoV-2 derivati rispettivamente da proteine spike e nucleocapside. Le PBMC sono incubate con gli antigeni per consentire la stimolazione di eventuali cellule T sensibilizzate presenti.

La citochina secreta viene catturata dagli anticorpi specifici sulla superficie della membrana, che costituisce la base del pozzetto mentre le cellule e gli altri materiali indesiderati vengono rimossi con un lavaggio. Un secondo anticorpo, coniugato con fosfatasi alcalina e diretto a un epitopo diverso sulla molecola delle citochine, viene aggiunto e si lega alla citochina catturata sulla superficie della membrana. Tutto il coniugato non fissato viene rimosso mediante lavaggio. Un substrato solubile viene aggiunto a ciascun pozzetto; questo viene separato dall'enzima legato e forma uno spot (blu scuro) di precipitato insolubile nel sito di reazione.

La valutazione del numero di spot ottenuti offre la misura di abbondanza delle cellule T effettrici nel sangue periferico primerizzate rispetto a SARS-CoV-2. Tali principi su cui si basa la piattaforma di test T-SPOT sono descritti di seguito nella Figura 1.

Figura 1: principi del sistema di test T-SPOT. Per soli scopi illustrativi, fare riferimento alla Sezione 6 "Istruzioni per l'uso" per indicazioni dettagliate sulla procedura.



3. REAGENTI E CONSERVAZIONE

MATERIALI IN DOTAZIONE

T-SPOT.COVID COV.435/300 (versione multi-uso con strisce da 12 x 8 pozzetti) e COV.435/200 contiene:

1. 1 piastra per microtitolazione: 96 pozzetti, forniti come 12 singole strisce da 8 pozzetti ciascuna in un telaio separato (COV.435/300) o 12x8 pozzetti in una singola piastra (COV.435/200), rivestiti con anticorpo monoclonale murino verso la citochina interferone gamma (IFN- γ).
2. 2 fiale (0,8 mL ciascuna) Pannello A (COV-A): contiene antigeni spike, albumina di siero bovino e agenti antimicrobici.
3. 2 fiale (0,8 mL ciascuna) Pannello B (COV-B): contiene antigeni nucleocapside, albumina di siero bovino e agenti antimicrobici.
4. 2 fiale (0,8 mL ciascuna) Controllo positivo: contiene fitoemoagglutinina (PHA), da utilizzare come controllo della funzionalità cellulare, albumina di siero bovino e agenti antimicrobici.
5. 1 fiala (50 μ l) 200x di Reagente coniugato: anticorpo monoclonale murino verso la citochina interferone gamma (IFN- γ) coniugato con fosfatasi alcalina.
6. 1 flacone (25 mL) di Soluzione substrato: soluzione BCIP/NBT^{plus} pronta all'uso.
7. Foglio illustrativo

Nota: le piastre di microtitolazione da 96 pozzetti utilizzate nel T-SPOT.COVID COV.435/200 e le strisce da 8 pozzetti utilizzate nel kit COV.435/300 sono articoli monouso e devono essere utilizzati immediatamente una volta aperti e mai riutilizzati. Non mischiare componenti di kit diversi.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare il kit non aperto a 2-8 °C. I componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza stampata sulla confezione del kit, se conservati e manipolati nelle condizioni raccomandate. Il kit non deve essere utilizzato oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta. Se un componente presenta una data di scadenza successiva a quella riportata sulla scatola (esterna) del kit, non adoperarlo e non utilizzare tale componente con un altro kit; non utilizzare alcun componente del kit successivamente alla data di scadenza riportata sulla scatola esterna del kit.

Una volta aperto, conservare il kit a 2-8 °C. I componenti aperti di T-SPOT.COVID (COV.435/300) devono essere utilizzati entro 8 settimane dell'apertura, mentre quelli di T-SPOT.COVID (COV.435/200) entro 4 settimane dall'apertura e comunque non oltre la data di scadenza riportata sull'etichetta del kit **Evitare l'esposizione prolungata della soluzione del substrato alla luce.**

ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

1. Telaio per piastra a strisce da 8 pozzetti (disponibile presso Oxford Immunotec).
2. Cappa di sicurezza biologica di classe 2 (BLII) (consigliata).
3. Provette per prelievo di sangue, come Vacutainer® CPT™, provette eparinizzate o contenenti citrato.

4. Reagente T-Cell *Xtend*[®] - i campioni di sangue intero conservati a temperatura ambiente (18-25 °C) tra 0 e 32 ore dopo la venipuntura, possono essere elaborati con l'uso del reagente T-Cell *Xtend*.
5. Ficoll[®] (se non si utilizzano provette CPT).
6. Una centrifuga per la preparazione delle PBMC (con capacità di almeno 1800 RCF (g) e in grado di mantenere i campioni a temperatura ambiente (18-25 °C) se si adoperano metodi di centrifugazione per densità al fine di separare le PBMC.
7. Attrezzature e reagenti per abilitare la conta delle PBMC; o manualmente utilizzando Trypan Blue (o altro colorante appropriato) e un emocitometro su microscopio, oppure automaticamente utilizzando un analizzatore ematologico adatto.
8. Un incubatore umidificato in grado di raggiungere 37 ± 1 °C con concentrazione di CO₂ nell'aria pari al 5%.
9. Un lavatore per piastre di microtitolazione automatico o una pipetta a 8 canali o a erogazione graduale per lavare manualmente le piastre.
10. Pipette regolabili per coprire più volumi a partire da 1-1000 µL (ad esempio, quattro pipette in grado di fornire volumi di 1-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL e 100-1000 µL) e punte di pipette sterili.
11. Soluzione PBS sterile: come GIBCO[®] 1x D-PBS (Life Technologies; numero di catalogo 14040-133).
12. Acqua distillata o deionizzata.
13. Un mezzo per visualizzare i pozzetti, o acquisire l'immagine digitale del pozzetto, ad esempio uno stereomicroscopio, una lente di ingrandimento o un sensore di piastre per consentire la conta degli spot.
14. Un mezzo di coltura cellulare sterile, ad esempio GIBCO AIM V[®] (Life Technologies; numero di catalogo 31035-025 per uso di ricerca). (Nota: il mezzo AIM V è disponibile presso Oxford Immunotec). **L'uso del presente mezzo privo di siero nel passaggio di incubazione è consigliato.** L'RPMI 1640 (Invitrogen, numero di catalogo 11875-093) può essere utilizzato solo nelle fasi iniziali di preparazione del campione. Si raccomanda di conservare il mezzo di coltura in aliquote appropriate e di eliminare il materiale in eccesso dopo l'uso. **Il mezzo di coltura cellulare deve essere preriscaldato a 37 °C prima dell'uso con il test T-SPOT.COVID.** Per evitare problemi con i mezzi contaminati, può essere utile conservare flaconi di mezzo di coltura in aliquote più piccole.

4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per uso professionale.
- Gli operatori dovrebbero essere addestrati alla procedura del test ed essere certi di aver compreso le istruzioni per l'uso prima di procedere all'esecuzione del test.
- Leggere attentamente le istruzioni del test prima dell'uso. La mancata osservanza delle istruzioni per l'uso riportate nel foglio illustrativo può portare a risultati errati.
- Prestare attenzione durante la manipolazione di prodotti di origine umana. Tutti i campioni ematici devono essere considerati potenzialmente infetti. La manipolazione dei campioni ematici e dei componenti del test, il loro uso, conservazione e smaltimento devono essere eseguiti in conformità alle procedure stipulate dalle direttive o dai regolamenti nazionali, regionali o locali appropriati per la protezione contro i rischi biologici.
- Fare attenzione quando si opera con sostanze chimiche. Tutti i campioni chimici devono essere considerati potenzialmente pericolosi. Oxford Immunotec mette a disposizione una scheda informativa sulla sicurezza dei materiali del kit.
- Scartare i reagenti non utilizzati e i campioni biologici in conformità con i regolamenti locali.
- Il quantitativo di PBMC introdotto in ciascun pozzetto deve essere corretto. In caso contrario si può avere una lettura inesatta del risultato.
- Non miscelare i componenti dei kit di lotti differenti.
- Osservare una tecnica asettica per evitare la contaminazione dei reagenti, dei pozzetti, delle sospensioni cellulari e dei mezzi di coltura delle cellule.
- Ogni variazione alle tecniche di pipettatura e di lavaggio indicate, e ai tempi e/o alle temperature di incubazione può influenzare i risultati ottenuti e quindi è da evitare.
- Prelevare ed esaminare il sangue il prima possibile.
- Conservare e trasportare campioni di sangue nel laboratorio a temperatura ambiente (18-25 °C). Non refrigerare né congelare i campioni di sangue intero.
- Il mancato rispetto dei tempi e delle temperature di incubazione può portare a un'interpretazione errata dei risultati.
- Impronte sulla membrana causate dalla punta delle pipette o del sistema di lavaggio dei pozzetti possono tradursi in artefatti nei pozzetti che possono confondere la conta degli spot.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI SPECIFICHE PER L'USO DEL REAGENTE T-CELL XTEND

- Il reagente T-Cell *Xtend* non è stato valutato per usi diversi da quelli previsti per la piattaforma di test T-SPOT.
- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per uso professionale.
- Non utilizzare il reagente dopo la data di scadenza.
- Osservare una tecnica asettica durante l'utilizzo del prodotto per evitare la contaminazione del reagente.

- Non utilizzare Cell Preparation Tubes (CPT, Becton Dickinson) o provette per il prelievo di sangue contenenti acido etilendiamminotetracetico (EDTA) come anticoagulante con il reagente T-Cell Xtend.
- Aggiungere il reagente T-Cell Xtend al sangue intero prima dell'elaborazione del campione.
- Non diluire né aggiungere altri componenti direttamente al reagente T-Cell Xtend.
- Utilizzare solo contenitori monouso per il prelievo di campioni di sangue venoso.
- Non miscelare componenti di lotti di reagente diversi.

5. PRELIEVO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I singoli laboratori devono convalidare le procedure per il prelievo e la separazione delle PBMC al fine di ottenere numeri sufficienti. Si consiglia di:

1. Mantenere i campioni di sangue intero a una temperatura compresa tra 18 °C e 25 °C fino al momento dell'elaborazione.
2. Prelevare un campione di sangue secondo le istruzioni fornite con il dispositivo di prelievo. I contenuti delle provette devono essere invertiti (8-10 volte) per assicurarsi che il sangue intero sia adeguatamente mescolato all'anticoagulante. Conservare il sangue prelevato a temperatura ambiente (18-25 °C). **Non refrigerare né congelare.**
3. Normalmente, per un paziente immunocompetente, è possibile ottenere una quantità sufficiente di PBMC proveniente da campioni di sangue venoso per svolgere il test secondo le direttive seguenti:

Una provetta da 8 mL o due provette da 4 mL (CPT) o una provetta da 6 mL di sodio o litio eparina o citrato di sodio.

Le PBMC di un paziente possono essere raggruppate se è necessario ottenere PBMC a sufficienza da più provette di sangue che sono state prelevate ed elaborate contemporaneamente.

4. Quando si utilizza il test T-SPOT.COVID **senza il reagente T-Cell Xtend** i campioni di sangue devono essere elaborati entro 8 ore dal prelievo. I campioni possono essere prelevati in provette CPT Vacutainer con citrato di sodio o sodio eparina (Becton Dickinson) con PBMC separate all'interno della provetta seguendo le istruzioni del produttore. In alternativa, i campioni di sangue devono essere prelevati in provette con sodio o litio eparina o citrato di sodio e le PBMC devono essere separate successivamente tramite tecniche di separazione standard, ad esempio il Ficoll-Paque® o metodi alternativi per purificare la frazione delle PBMC. Le provette per il prelievo di sangue contenenti l'anticoagulante EDTA non devono essere utilizzate.
 - a. Per le provette di prelievo del sangue CPT, centrifugare le provette CPT da 8 mL a 1600 RCF (g) per 28 minuti o le provette CPT da 4 mL a 1800 RCF (g) per 30 minuti a temperatura ambiente (18-25 °C).
 - b. Se si utilizza il Ficoll-Paque Plus, diluire il sangue con un volume equivalente del mezzo RPMI 1640 (1 parte di sangue, 1 parte di RPMI). Trasferire delicatamente il sangue diluito sul Ficoll-Paque Plus (2-3 parti di sangue diluito per 1 parte di Ficoll-Paque) e centrifugare a 1000 RCF (g) per 22 minuti a temperatura ambiente (18-25 °C).

Nota: consultare le istruzioni del produttore prima di utilizzare le provette CPT o Ficoll-Paque. Assicurarsi che le provette siano centrifugate alla velocità corretta. Le velocità indicate sopra sono espresse in g o RCF (Relative Centrifugal Force, forza centrifuga relativa). Tale unità non equivale agli RPM (Revolutions Per Minute, giri al minuto). Se la centrifuga misura la velocità solo in RPM, convertire il valore RCF consigliato misurando il raggio del rotore e utilizzando una tabella di conversione. Le provette Leucosep (Greiner Bio-One) offrono un approccio che consente di risparmiare tempo nella separazione del gradiente per densità. Le provette contengono una barriera porosa che permette di versare il campione di sangue sul mezzo di separazione del gradiente per densità, eliminando così la necessità di effettuare il trasferimento delicatamente sul campione.

5. Quando si utilizza il test T-SPOT.COVID **con il reagente T-Cell Xtend**, i campioni di sangue devono essere prelevati all'interno di provette con sodio o litio eparina o citrato di sodio. Le provette CPT Vacutainer e quelle per il prelievo di sangue contenenti l'anticoagulante EDTA non devono essere utilizzate. Il reagente T-Cell Xtend deve essere aggiunto prima della separazione delle PBMC tramite tecniche di separazione standard. I campioni di sangue intero devono essere conservati a temperatura ambiente (18-25 °C) tra 0 e 32 ore dopo la venipuntura quando si utilizza il reagente T-Cell Xtend.

Se si deve utilizzare il reagente T-Cell Xtend, rimuovere il tappo della provetta contenente il prelievo di sangue immediatamente prima della separazione cellulare e aggiungere 25 µL di soluzione del reagente T-Cell Xtend per mL di campione di sangue. Riposizionare il tappo e capovolgere delicatamente la provetta con il prelievo di sangue 8-10 volte per mescolare. Incubare per 20 ± 5 minuti a temperatura ambiente (18-25 °C), quindi procedere con l'isolamento dello strato delle PBMC tramite centrifugazione del gradiente per densità Ficoll, come indicato nelle sezioni 4b e 6-9. Consultare il foglio illustrativo del reagente T-Cell Xtend per maggiori dettagli.

6. Raccogliere lo strato bianco opaco delle PBMC con una pipetta e trasferire in una provetta conica da 15 mL per centrifuga. Portare il volume a 10 mL tramite il mezzo di coltura cellulare. **Il mezzo di coltura cellulare per le fasi di lavaggio deve essere preriscaldato a 37 °C prima di entrare in contatto con le PBMC.**

È noto che i fattori circolanti nei campioni di sangue intero interferiscono con i test di interferone gamma sul sangue intero, ad es. fattore reumatoide, anticorpi eterofili e quantità preesistenti di interferone gamma. La separazione e il lavaggio delle PBMC consente la rimozione delle sostanze che potrebbero interferire, prima di procedere al test.

Nota: a seguito della centrifugazione, le PBMC devono essere estratte tramite una punta di pipetta di grosso calibro (ad es. 1 mL), immergendo la punta della pipetta nello strato di PBMC. Questo strato torbido deve essere accuratamente aspirato e trasferito in una provetta conica sterile per essere sottoposto alle fasi di lavaggio. Assicurarsi che l'intero strato torbido di PBMC sia stato prelevato. È meglio aspirare una quantità maggiore dello strato di plasma piuttosto che lasciare eventuali PBMC nella provetta del prelievo di sangue. Tuttavia, se si utilizzano provette CPT, evitare di trasferire parte del gel di separazione in quanto potrebbe ostruire la punta. Se ciò si verifica, trasferire le cellule già pronte nella punta in una provetta per centrifuga e utilizzare una nuova punta per trasferire le restanti PBMC. È possibile utilizzare diversi mezzi per il lavaggio delle cellule nelle fasi 3-5; sia AIM V sia RPMI 1640 sono stati utilizzati con successo e sono consigliati.

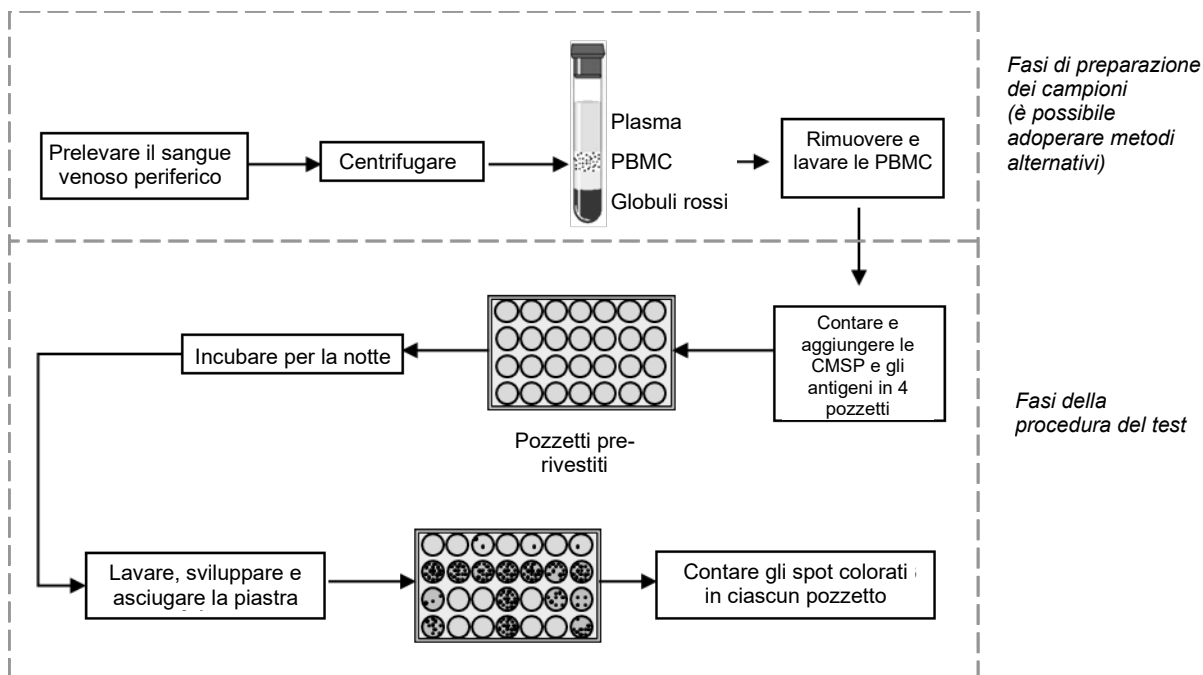
7. Centrifugare a 600 RCF (g) per 7 minuti. Rimuovere il surnatante e risospesione il pellet in 1 mL di mezzo.
8. Portare il volume a 10 mL con l'aggiunta di altro mezzo e centrifugare a 350 RCF (g) per 7 minuti.
9. Rimuovere il surnatante e risospesione il pellet in 0,7 mL di mezzo di coltura. **Il mezzo privo di siero AIM V è stato utilizzato con successo ed è consigliato.**

Nota: le fasi 2-7 devono essere eseguite in una cappa di sicurezza BLII per proteggere l'utente e prevenire la contaminazione dei campioni

6. ISTRUZIONI PER L'USO

Una piastra completa del test T-SPOT.COVID può elaborare i campioni di 24 pazienti. Il test viene svolto solitamente il pomeriggio di un giorno e la mattina del giorno successivo, per far passare le 16-20 ore della fase di incubazione nel corso della notte. Se si seguono tali tempistiche, il pomeriggio del giorno 1 i campioni di sangue vengono elaborati per preparare le PBMC al test che viene avviato aggiungendo le PBMC e gli antigeni alla piastra del test e posizionando la piastra nell'incubatore. Il giorno 2 si rimuove la piastra dall'incubatore e vengono eseguite le fasi di sviluppo per poi consultare la piastra. Per elaborare una piastra completa è necessario un lasso di tempo di circa 3 ore (il tempo di lavoro effettivo sarà inferiore per via delle fasi di centrifugazione) il giorno 1 e un tempo di lavoro di 30 minuti (senza considerare 1 ora di incubazione dell'anticorpo secondario e il tempo per l'asciugatura della piastra) il giorno 2. La procedura per condurre il test è riassunta nella Figura 2 e descritta ulteriormente sotto:

Figura 2: diagramma che riporta le principali fasi necessarie per eseguire il test T-SPOT.COVID. Si prega di notare che non tutti i 96 pozzetti della piastra sono mostrati nell'illustrazione.



PREPARAZIONE DEL REAGENTE

1. Le fiale di antigeni spike di SARS-CoV-2 (COV A), antigeni nucleocapside di SARS-CoV-2 (COV B) e il Controllo positivo vengono forniti pronti all'uso.

2. Preparare una soluzione di reagente coniugato con diluizione 1:200. Calcolare il volume della soluzione di reagente coniugato necessario per il test. Il reagente coniugato può essere realizzato alla concentrazione di lavoro e conservato a 2-8 °C fino a sei settimane prima dell'uso nel test.

Nota: ciascun campione dei pazienti è suddiviso in 4 pozzetti. In ciascun pozzetto verranno aggiunti 50 µl di reagente coniugato diluito. Pertanto, per una striscia (2 campioni, 8 pozzetti), preparare 500 µl di soluzione alla concentrazione di lavoro aggiungendo 2,5 µl di reagente coniugato concentrato a 497,5 µl di PBS. Per una piastra da 96 pozzetti (24 campioni), preparare 5 mL di soluzione alla concentrazione di lavoro aggiungendo 25 µl di reagente coniugato concentrato a 497,5 µl di PBS.

3. La soluzione di substrato è pronta per l'uso. Prima di estrarre la piastra dall'incubatore (giorno 2), rimuovere la soluzione di substrato dal contenitore e consentire il ritorno alla temperatura ambiente.

CONTA DELLE CELLULE E DILUIZIONE

Il test T-SPOT.COVID richiede una quantità di 250.000 ± 50.000 PBMC per pozzetto. È necessario un totale di quattro pozzetti per ciascun campione dei pazienti; pertanto, sono necessarie 1×10^6 PBMC per paziente. Il numero di cellule T per SARS-CoV-2 nel campione è normalizzato a un numero fisso di PBMC.

1. Eseguire la conta delle PBMC. Le cellule possono essere contate con diversi metodi, fra cui una conta manuale utilizzando Trypan Blue (o un altro colorante appropriato) e un emocitometro, oppure un analizzatore ematologico automatizzato.
2. In breve, per la conta manuale con un emocitometro Neubauer utilizzando il Trypan Blue, aggiungere 10 µL della sospensione cellulare finale a 40 µL di soluzione di Trypan Blue allo 0,4% (p/v). Trasferire un'aliquota appropriata nell'emocitometro e contare le cellule nella griglia. Per altri tipi di emocitometro e per i dispositivi automatizzati, seguire le istruzioni del produttore.

Nota: prestare attenzione ad assicurarsi che la sospensione con le cellule sia ben miscelata prima del prelievo delle aliquote per la conta. Le cellule possono depositarsi sul fondo della provetta causando un'interpretazione errata del loro numero reale. La miscelazione deve essere eseguita ruotando lievemente la provetta manualmente o agitando delicatamente la sospensione pipettandola su e giù diverse volte.

3. Calcolare la concentrazione delle PBMC presenti nella sospensione di cellule madre.

Nota: assicurarsi che il calcolo sia corretto per il sistema di conta utilizzato poiché l'uso di un numero insufficiente o eccessivo di cellule può portare ad un'interpretazione errata del risultato.

4. Preparare 500 µL di sospensione cellulare finale a una concentrazione di $2,5 \times 10^5$ cellule/100 µL (inserendo un totale di PBMC pari a $1,25 \times 10^6$).

Nota: assicurarsi che le cellule siano mescolate accuratamente agitando delicatamente la sospensione pipettandola su e giù diverse volte prima di rimuoverne un'aliquota per la diluizione. Si è osservato che un numero di PBMC compreso tra 200.000 e 300.000 per pozzetto fornisce risultati del test T-SPOT coerenti.

PREPARAZIONE DELLA PIASTRA E INCUBAZIONE

Il test T-SPOT.COVID necessita di quattro pozzetti per ciascun campione di un paziente. Per ciascun campione singolo deve essere eseguito un Controllo nullo e un Controllo positivo. Si raccomanda di disporre i campioni verticalmente sulla piastra come illustrato di seguito.

- Controllo nullo
- Pannello A (COV-A) (spike)
- Pannello B (COV-B) (nucleocapside)
- Controllo

Ciascuna piastra da 96 pozzetti può elaborare fino a 24 campioni dei pazienti. Usare il numero di piastre necessarie per i campioni che si desidera elaborare. Per COV.435/300; ciascuna striscia elabora 2 campioni. Utilizzare solo il numero di strisce necessarie. Sigillare le strisce rimanenti nel sacchetto di alluminio con la bustina di gel di silice. Le strisce rimanenti devono essere utilizzate entro otto settimane dalla prima apertura del sacchetto a patto che, in quell'arco di tempo, vengano conservate a 2-8 °C.

T-SPOT.COVID è un test che misura la funzione delle cellule T; non sono necessarie curve standard. Pertanto, ciascun paziente richiederà solo l'uso di 4 pozzetti per campione. La disposizione della piastra consigliata per 24 campioni è mostrata di seguito.

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 = Controllo nullo, A = Pannello A, B = Pannello B, M = Controllo positivo mitogeno

- Per COV.435/300 rimuovere le strisce a 8 pozzetti priverstite necessarie dalla confezione, fissarle con una clip su un telaio e portare a temperatura ambiente. Rimuovere solo il numero di strisce richiesto, sigillare nuovamente le strisce non utilizzate e la bustina di essiccante nel sacchetto di alluminio esterno e riportare alla conservazione a 2-8 °C.

Nota: fissare le strisce da utilizzare in una piastra vuota dotata di coperchio e base. Telai, coperchi e basi devono essere conservati e riutilizzati.

- Aggiungere i Pannelli e i Controlli;

- Aggiungere 50 µL di mezzo di coltura cellulare AIM-V in ciascun pozzetto di Controllo nullo.
- Aggiungere 50 µL di soluzione del COV A in ciascuno dei pozzetti necessari.
- Aggiungere 50 µL di soluzione del COV B in ciascuno dei pozzetti necessari.
- Aggiungere 50 µL di soluzione di Controllo positivo in ciascun pozzetto di controllo della funzionalità delle cellule.

Non toccare la membrana con la punta della pipetta. Le impronte sulla membrana causate dalla punta delle pipette possono produrre artefatti nei pozzetti.

- In ciascuno dei 4 pozzetti che sarà utilizzato per il campione di un paziente, aggiungere 100 µL di sospensione finale del paziente (contenente 250.000 PBMC). Utilizzare una nuova punta per l'aggiunta delle cellule di ciascun paziente per evitare la possibilità di contaminazione crociata tra i pozzetti. Assicurarsi di non contaminare i pozzetti adiacenti trasferendo liquido da un pozzetto all'altro nel caso in cui le punte delle pipette vengano riutilizzate per più pozzetti.

Nota: assicurarsi di mescolare (come indicato nelle fasi della sezione "Conta delle cellule e diluizione") prima di rimuovere ciascuna aliquota da 100 µL.

- Incubare la piastra con coperchio in un incubatore umidificato a 37 °C con CO₂ al 5 % per 16-20 ore. Evitare di agitare la piastra una volta che questa si trova nell'incubatore. Non impilare le piastre in quanto ciò porterebbe a una distribuzione di temperatura e una ventilazione non omogenea.

Nota: l'incubatore di CO₂ deve essere umidificato. Verificare che il piattino con l'acqua contenga abbastanza liquido per garantire il raggiungimento di un'atmosfera umida.

SVILUPPO E CONTA DEGLI SPOT

- Estrarre la piastra dall'incubatore e rimuovere il mezzo di coltura cellulare svuotando i contenuti in un contenitore appropriato.

Nota: a questo punto, rimuovere la soluzione di substrato dal kit e lasciare stabilizzare a temperatura ambiente.

- Aggiungere 200 µL di soluzione di PBS in ciascuno dei pozzetti. **Non utilizzare PBS contenente Tween® o altri tipi di detergente, in quanto ciò provoca un elevato background di fondo.**

Nota: utilizzare PBS appena preparato o sterile.

- Eliminare la soluzione PBS. Ripetere il lavaggio dei pozzetti per altre 3 volte con soluzione PBS nuova a ogni lavaggio. È possibile utilizzare un sistema di lavaggio automatizzato per le fasi di lavaggio.

Nota: per il lavaggio, è possibile utilizzare una pipetta multicannale o un sistema di lavaggio a piastre. Svuotare il PBS all'interno di un contenitore adeguato dopo ogni lavaggio. Non utilizzare pipette per rimuovere il PBS in quanto ciò potrebbe danneggiare la membrana. Se si utilizza un sistema di lavaggio a piastre, assicurarsi che il collettore sia regolato in modo tale che le punte non tocchino la membrana. Dopo il lavaggio finale, toccare la piastra su un panno privo di lanugine per assicurarsi che tutto il PBS venga rimosso. L'eventuale eccesso restante diluirà ulteriormente il reagente coniugato.

- Se non si è già fatto durante la fase di preparazione del reagente, diluire il reagente coniugato concentrato 200x in PBS per creare la soluzione alla concentrazione di lavoro.
- Aggiungere 50 µL di soluzione di reagente coniugato alla concentrazione di lavoro in ogni pozzetto e incubare a 2-8 °C per 1 ora.

Nota: è consigliato l'utilizzo di una pipetta multicanale o a erogazione graduale. Bisogna prestare attenzione e assicurarsi che il reagente coniugato venga aggiunto in ogni pozzetto poiché la soluzione è trasparente e incolore. Pertanto, potrebbe essere difficile stabilire in quali pozzetti è già stata aggiunta.

6. Eliminare il coniugato ed effettuare i quattro lavaggi con PBS come descritto in precedenza nelle fasi 2 e 3.
7. Aggiungere 50 µL di soluzione di substrato in ciascun pozzetto e incubare a temperatura ambiente per 7 minuti.
8. Lavare la piastra a fondo con acqua distillata o deionizzata per bloccare la reazione di rivelazione.
9. Lasciare asciugare la piastra ponendola in un'area ben ventilata oppure in un forno a una temperatura massima di 37 °C.

Nota: gli spot diventano più visibili man mano che la piastra si asciuga; pertanto, assicurarsi che la piastra sia ben asciutta prima di consultarla. Lasciare asciugare per 4 ore a 37 °C o almeno 16 ore a temperatura ambiente.

10. Contare e annotare il numero di spot distinti di colore blu scuro presenti sulla membrana di ciascun pozzetto. Applicare l'Interpretazione dei risultati e criteri del test (vedere di seguito) per determinare se il campione del paziente è "Reattivo" o "Non reattivo". **Gli spot prodotti come risultato della stimolazione antigenica devono essere grandi, rotondi e scuri. Spesso è possibile osservare un effetto gradiente, più scuro al centro e più sfumato nelle zone periferiche. Gli artefatti non specifici che potrebbero verificarsi sono più piccoli, meno intensi e di forma irregolare.**

Nota: gli spot possono essere contati direttamente dal pozzetto tramite una lente di ingrandimento o uno stereomicroscopio, oppure da un'immagine digitale acquisita tramite microscopio o un sensore di piastre.

Una volta sviluppate, le piastre del test completate rimangono stabili e non devono essere consultate immediatamente. Le piastre possono essere archiviate per un controllo qualità retrospettivo o per una nuova consultazione fino ai successivi 12 mesi, se conservate in un luogo buio, asciutto e a temperatura ambiente.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il risultato tipico atteso presenta pochi spot o nessuno spot nel Controllo nullo e 20 o più spot nel Controllo positivo (vedere le Figure 4a e b per i risultati tipici di uno studio clinico statunitense).

Un Controllo nullo sarà considerato come "Non valido" se il numero degli spot contati è superiore a 10.

Normalmente, il numero di spot per il Controllo positivo di funzionalità delle cellule dovrebbe essere ≥ 20 o mostrare una saturazione (spot troppo numerosi da contare). È possibile che le cellule T di una piccola parte dei pazienti mostrino soltanto una risposta limitata alla PHA¹. Nel caso in cui il numero di spot del Controllo positivo sia < 20 spot, dovrebbe essere considerato come "Non valido", a meno che il Pannello A o il Pannello B sia "Reattivo o Borderline (equivoco)" come descritto alle sezioni "Interpretazione dei risultati e criteri del test" (vedere di seguito), nel qual caso il risultato è valido.

Nel caso in cui i risultati siano Non validi, questi dovranno essere segnalati come "Non validi" e si consiglia, inoltre, di prelevare un ulteriore campione e testare nuovamente l'individuo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E CRITERI DEL TEST

Fare riferimento alla sezione Controllo di qualità prima di applicare i seguenti criteri.

I risultati del test *T-SPOT.COVID* si interpretano sottraendo il numero di spot nel pozzetto del Controllo nullo dal numero di spot presenti in ciascun pannello, applicando il seguente algoritmo:

- Il risultato del test è Reattivo se (Pannello A-Nullo) e/o (Pannello B-Nullo) ≥ 8 spot.
- Il risultato del test è Non reattivo se (Pannello A-Nullo) e/o (Pannello B-Nullo) ≤ 4 spot. Rientrano in questa categoria anche i valori minori di zero.
- I risultati in cui la conta più elevata di spot del Pannello A o Pannello B è tale che la conta degli spot (Pannello meno Nullo) sia 5, 6 o 7 spot devono essere considerati Borderline (equivoci) e si consiglia di ripetere il test prelevando un altro campione del paziente.
- Se il risultato continua a essere Borderline (equivoco) alla ripetizione del test con un altro campione, procedere con altri test diagnostici e/o informazioni epidemiologiche per determinare la risposta immunitaria adattativa o mediata da cellule a una recente o precedente infezione da SARS-CoV-2 o alla vaccinazione contro SARS-CoV-2.
- **Un risultato "Reattivo" indica che il campione contiene cellule T effettrici sensibilizzate al SARS-CoV-2. La presenza di cellule T sensibilizzate potrebbe essere il risultato della vaccinazione o dell'infezione da SARS-CoV-2.**
- **Un risultato "Non reattivo" indica che non è stata rilevata alcuna cellula T effettrice sensibilizzata al SARS-CoV-2.**

Il seguente diagramma di flusso (Figura 3) e le Tabelle 1-3 descrivono l’algoritmo di interpretazione. Tale algoritmo include anche i criteri del controllo di qualità.

Figura 3 - Diagramma di flusso dell’algoritmo

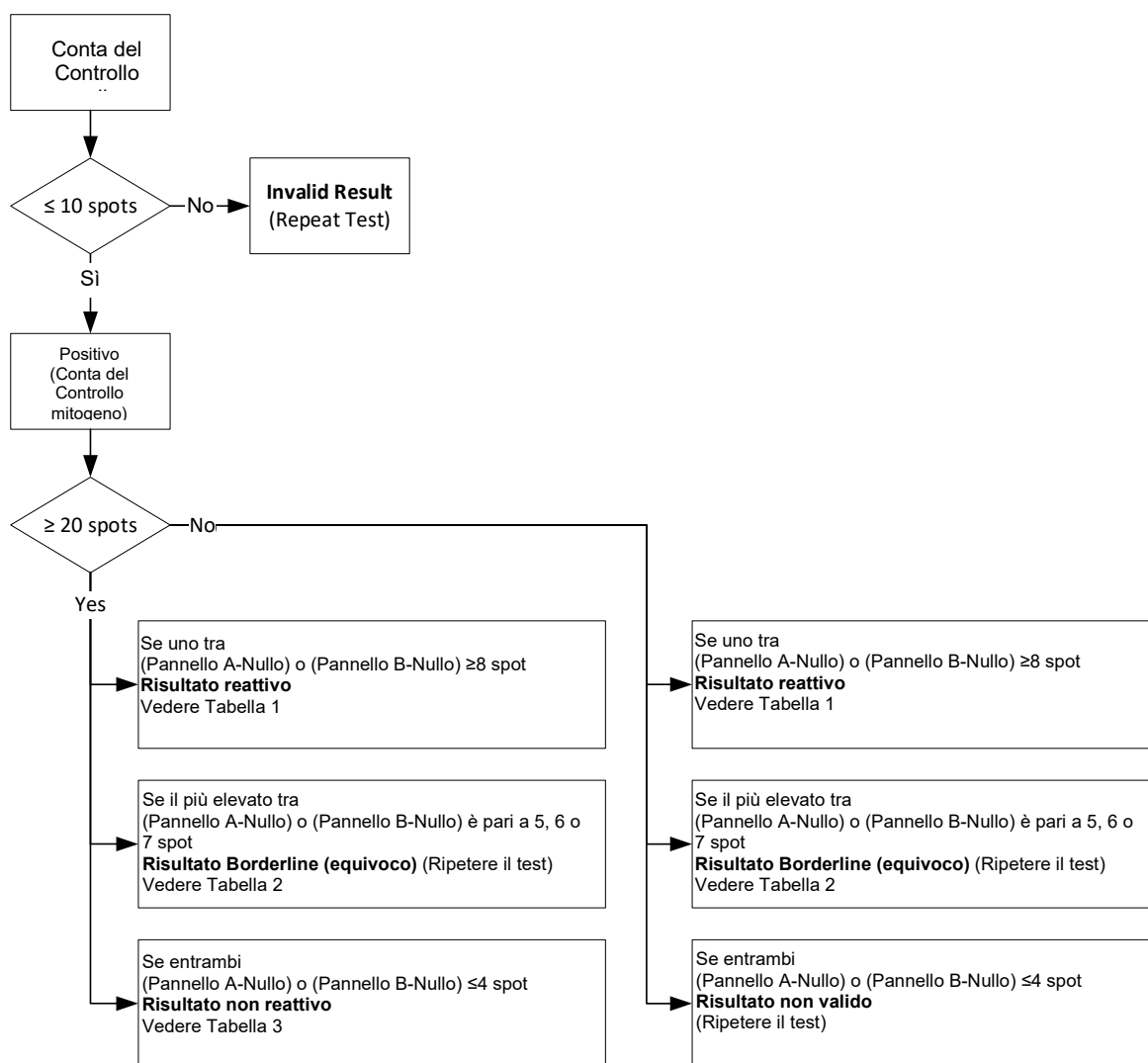


Tabella 1: Interpretazione di Reattivo: (Pannello A meno Nulla) o (Pannello B meno Nulla) ≥8 spot

Controllo nullo Conta pozzetto	Il Pannello A o il Pannello B presentano il seguente numero di spot [†]	Interpretazione del risultato
0	≥8	Reattivo
1	≥9	Reattivo
2	≥10	Reattivo
3	≥11	Reattivo
4	≥12	Reattivo
5	≥13	Reattivo
6	≥14	Reattivo
7	≥15	Reattivo
8	≥16	Reattivo
9	≥17	Reattivo
10	≥18	Reattivo
>10 spot	n/a	Non valido**

[†]Nota: il valore della conta di spot di Pannello-Nulla più elevato deve essere utilizzato per determinare l’esito del test.

Tabella 2: Interpretazione di Borderline (equivoco) Il valore più elevato tra (Pannello A meno Nullo) o (Pannello B meno Nullo) è pari a 5, 6 o 7 spot

Controllo nullo Conta pozzetto	Il valore più elevato tra Pannello A o Pannello B presenta il seguente numero di spot	Interpretazione del risultato
0	5, 6 o 7	Borderline (equivoco)*
1	6, 7 o 8	Borderline (equivoco)*
2	7, 8 o 9	Borderline (equivoco)*
3	8, 9 o 10	Borderline (equivoco)*
4	9, 10 o 11	Borderline (equivoco)*
5	10, 11 o 12	Borderline (equivoco)*
6	11, 12 o 13	Borderline (equivoco)*
7	12, 13 o 14	Borderline (equivoco)*
8	13, 14 o 15	Borderline (equivoco)*
9	14, 15 o 16	Borderline (equivoco)*
10	15, 16 o 17	Borderline (equivoco)*
>10 spot	n/a	Non valido**

Tabella 3: Interpretazione Negativo: sia (Pannello A meno Nullo) sia (Pannello B meno Nullo) ≤4 spot

Controllo nullo Conta pozzetto	Sia Pannello A sia Pannello B presentano il seguente numero di spot	Interpretazione del risultato
0	≤4	Non reattivo
1	≤5	Non reattivo
2	≤6	Non reattivo
3	≤7	Non reattivo
4	≤8	Non reattivo
5	≤9	Non reattivo
6	≤10	Non reattivo
7	≤11	Non reattivo
8	≤12	Non reattivo
9	≤13	Non reattivo
10	≤14	Non reattivo
>10 spot	n/a	Non valido**

* I risultati in cui il valore più elevato della conta di spot nel Pannello A o nel Pannello B è tale per cui la conta di spot (Pannello meno Nullo) è 5, 6 o 7 spot devono essere considerati Borderline (equivoci) e si consiglia, quindi, di effettuare nuovamente il test prelevando un altro campione del paziente.

**Nel caso in cui i risultati siano Non validi, questi dovranno essere segnalati come "Non validi" e si consiglia di prelevare un altro campione e testare nuovamente l'individuo.

7. LIMITAZIONI

- La mancata osservanza delle istruzioni per l'uso riportate nel foglio illustrativo può portare a risultati errati.
- L'esecuzione scorretta del test potrebbe provocare risposte reattive o non reattive false.
- Un risultato reattivo può essere dovuto a un'infezione attuale o precedente da SARS-CoV-2 o alla vaccinazione contro SARS-CoV-2.
- Un risultato falso non reattivo può causare il prelievo di sangue errato o la gestione non adeguata del campione, influenzando la funzione dei linfociti.
- Un risultato non reattivo sia in COV-A che in COV-B non esclude la possibilità che un individuo abbia sviluppato una risposta immunitaria adattativa dopo l'infezione o la vaccinazione.
- Le prestazioni del test T-SPOT.COVID, con o senza l'utilizzo del reagente T-Cell Xtend, non sono state adeguatamente valutate con campioni di individui di età inferiore a 18 anni, di donne in gravidanza e di pazienti con emofilia.
- Un risultato falso reattivo potrebbe essere ottenuto con il test T-SPOT.COVID se eseguito in soggetti precedentemente esposti al SARS-CoV-1 e altri coronavirus simili. In caso di sospetto di queste infezioni, sarebbero richiesti altri test. Questo kit è stato testato utilizzando i campioni disponibili in quel momento. Le prestazioni con le nuove mutazioni di SARS-CoV-2 non sono ancora state valutate.
- I risultati dei test effettuati con T-SPOT.COVID devono essere adoperati insieme all'anamnesi epidemiologica di ciascun individuo, al suo stato di salute attuale e ai risultati di altre valutazioni diagnostiche.

- Un risultato non reattivo del test non esclude la possibilità di esposizione, infezione da o vaccinazione efficace contro SARS-CoV-2. I pazienti recentemente vaccinati o esposti a individui infettati da SARS-CoV-2 che presentano un risultato del test T-SPOT.COVID non reattivo devono essere presi in considerazione per la ripetizione del test entro 2 settimane o qualora altri sintomi clinici rilevanti indichino una possibile infezione.
- Si sconsiglia l'utilizzo di campioni refrigerati e congelati con il test T-SPOT.COVID.

LIMITAZIONI SPECIFICHE PER L'USO DEL REAGENTE T-CELL XTEND

1. Il reagente T-Cell *Xtend* non è stato valutato per un uso diverso da quello previsto per i test T-SPOT.
2. Non refrigerare né congelare i campioni di sangue intero. Conservare e trasportare campioni di sangue nel laboratorio a una temperatura compresa tra 18 e 25 °C.
3. Ogni variazione alle tecniche di pipettatura e di lavaggio indicate, e ai tempi e/o alle temperature di incubazione può influenzare i risultati dei test.

8. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il valore di cut-off del test T-SPOT.COVID è stato predeterminato in fase di sviluppo tramite l'analisi della curva ROC (Receiver Operating Characteristic). È stata riscontrata una discriminazione massima tra gli individui positivi confermati da PCR e quelli a basso rischio di infezione pari a 6 spot. Inoltre, è stata stabilita una zona borderline pari a 5-7 per rispondere alla variazione e all'incertezza dei test relativamente al cut-off. Evidenze recenti suggeriscono che lo stesso cut-off è adatto a distinguere tra individui vaccinati e non vaccinati⁴⁴.

Caratteristiche delle prestazioni analitiche

L'interferenza causata dagli anticorpi eterofili o dall'interferone gamma (IFN- γ) intrinseca nel campione di sangue è ridotta al minimo grazie alla separazione e al lavaggio della frazione di PBMC dal sangue intero. In questo modo vengono rimosse le quantità sottostanti di interferone gamma (IFN- γ), di altri metaboliti del plasma interferenti, dell'emoglobina e di eventuali anticorpi eterofili.

Si prevede che le altre citochine, diverse da interferone gamma (IFN- γ), vengano prodotte dai leucociti, ad esempio IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF α , IFN- α e IFN- β . Per questo motivo è stata esaminata la reattività crociata con la coppia di anticorpi utilizzata nel test T-SPOT. I risultati hanno dimostrato che la coppia di anticorpi utilizzata nel test T-SPOT non ha evidenziato una reattività crociata con altre citochine.

La variabilità intra-test è stata analizzata confrontando l'esecuzione del test T-SPOT sulla stessa piastra dello stesso operatore. Gli esperimenti sono stati eseguiti da tre operatori su nove piastre e hanno offerto come risultato un intervallo di %CV che rappresenta la variazione intrinseca del test. L'intervallo ottenuto per il valore più elevato di conta degli spot ($210,4 \pm 11,6$) era compreso tra 2,2 % e 7,7 % CV (%CV medio = 4,4), le conte degli spot di fascia media ($71,2 \pm 8,5$) hanno prodotto un intervallo compreso tra 6,6 % e 16,5 % CV (%CV medio = 11,0 %), mentre le conte degli spot vicine al cut-off (conta degli spot media = $5,7 \pm 1,3$) hanno prodotto un %CV = 22,0 %.

I dati di precisione intratest sono stati raccolti e tre lotti di kit sono stati utilizzati da tre diversi operatori per eseguire gli stessi tre campioni in sei occasioni diverse. Il coefficiente di variazione (CV) misurato nei tre campioni, nei tre operatori e nei tre lotti era pari a 3,7 % per i campioni che presentavano una conta degli spot media di 210,4. Per le conte degli spot vicine al cut-off del test T-SPOT.COVID, la variazione intratest era pari al 25,0 %. Per livelli di spot moderati, il %CV medio era pari al 13,9 %. I risultati del %CV erano coerenti per ciascuno dei lotti testati.

La riproducibilità intraoperatore è stata valutata tramite tre operatori con una piastra ciascuno dai tre lotti di kit. La variazione osservata tra gli operatori era pari a 3,6 %-5,8 % CV.

Caratteristiche delle prestazioni cliniche

È stato svolto uno studio utilizzando il set di cut-off predeterminato a 6 spot (dati su file), per analizzare le prestazioni cliniche del test T-SPOT.COVID nelle infezioni da SARS-CoV-2 confermate da PCR (con soggetti sintomatici e asintomatici) al fine di valutare le prestazioni del test negli individui con infezione acuta o convalescenti. In aggiunta, sono state valutate le prestazioni del test nei soggetti in studio considerati a rischio relativo di infezione inferiore. Tutti i campioni sono stati testati tramite test sierologico IgG Anti-N (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG) come confronto con il test T-SPOT.COVID.

Nello studio sono stati arruolati 281 soggetti che soddisfacevano i criteri di inclusione. Tra questi, 169 soggetti sono stati arruolati nel gruppo di infezione da SARS-CoV-2 confermato da PCR (coorte positiva). Un soggetto è stato escluso a causa di un ridotto recupero cellulare, mentre 17 soggetti sono stati esclusi per la mancanza di risultati sierologici, per un totale di 151 soggetti rimanenti disponibili per l'analisi.

Sono stati arruolati 112 soggetti nella coorte a basso rischio, per 4 soggetti tra questi non erano disponibili i risultati sierologici di conferma mentre altri 6 soggetti sono stati esclusi dopo aver ricevuto un test sierologico di conferma positivo. Dei restanti 102 soggetti, il campione di uno è stato escluso a causa del ridotto recupero cellulare e quello di

un altro a causa di problemi tecnici con il test T-SPOT.COVID. Pertanto, sono stati inclusi 100 soggetti a basso rischio nell'analisi.

La demografia delle coorti a basso rischio e confermata da PCR è riassunta di seguito:

Coorte	Infezione da SARS-CoV-2 confermata da PCR	Rischio relativo di infezione inferiore
Numero di soggetti	168	100
Età media (anni) (sd)	50,5 (15,2) intervallo 19-83	54,7 (15,7) intervallo 18-87
% Maschi	38,7 % (65/168)	36,0 % (36/100)
Tempo medio dal primo test della PCR positivo (giorni) (intervallo)	83,4 (0,249)	Non applicabile
% sintomatici	95,8 % (161/168)	Non applicabile

Accordo positivo tra gli individui confermati da PCR

Sono stati valutati 151 pazienti, precedentemente risultati positivi al SARS-CoV-2 tramite PCR, utilizzando il test T-SPOT.COVID e il test sierologico anti-N IgG. Il punto temporale dal primo risultato del test della PCR registrato variava tra i 2 e i 249 giorni. Nessun test T-SPOT.COVID in questa coorte è risultato non valido.

Tabella 4: accordo positivo percentuale con PCR nel tempo che include tutti i risultati di entrambi i test T-SPOT.COVID e sierologico IgG anti-N utilizzando un cut-off di reattività di 6 spot e ignorando la zona borderline (linee di confine incluse).

Giorni dal primo test della PCR positivo	T-SPOT.COVID		IgG Anti-N	
	Accordo positivo	CI al 95 %	Accordo positivo	CI al 95 %
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 %
Totale ≤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)	-
Totale >60	80,7 % (46/57)	68,1-90,0 %	38,6 % (22/57)	26,0-52,4 %

Tabella 5: accordo positivo percentuale con PCR nel tempo che include tutti i risultati di entrambi i test T-SPOT.COVID e sierologico IgG anti-N, utilizzando solo i risultati reattivi e non reattivi per il test T-SPOT.COVID (ovvero esclusi quelli nella zona borderline).

Giorni dal primo test della PCR positivo	T-SPOT.COVID		IgG Anti-N	
	Accordo positivo	CI al 95 %	Accordo positivo	CI al 95 %
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 %
Totale ≤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)	-
Totale >60	83,3 % (40/48)	69,8-92,5 %	41,7 % (20/48)	27,6-56,8 %

Questi dati mostrano un accordo positivo percentuale tra il test T-SPOT.COVID e la PCR del 92,6 % (96,6 % se si

escludono i risultati borderline) fino a 60 giorni dopo un risultato di test della PCR positivo. Dopo questo periodo, l'accordo percentuale nel punto temporale diminuisce leggermente. Per i punti temporali oltre 60 giorni dal risultato della PCR, l'accordo positivo era dell'80,7 % (83,3 % considerando solo determinati risultati).

In generale, questi dati mostrano un accordo positivo percentuale tra il test sierologico IgG anti-N e la PCR del 74,5 % fino a 60 giorni dopo un risultato di test della PCR positivo. Dopo questo periodo, l'accordo percentuale nel punto temporale diminuisce. Per i punti temporali oltre 60 giorni dai risultati della PCR, l'accordo positivo per il test sierologico IgG anti-N era del 38,6 %.

Accordo negativo tra gli individui a rischio relativo di infezione inferiore

È stata arruolata una coorte di partecipanti, in un'impostazione endemica, ma per i quali si era determinato un rischio relativo di infezione da SARS-CoV-2 inferiore sulla base di: (i) assenza di sintomi auto-riferiti coerenti con l'infezione da SARS-CoV-2, (ii) nessun test della PCR positivo per SARS-CoV-2 precedente, (iii) nessun coinvolgimento in una sperimentazione vaccinale e nessuna ricezione di vaccino per COVID-19, (iv) un test sierologico anti-N a flusso laterale negativo (kit per il test degli anticorpi IgM/IgG per SARS-CoV-2 di Biohit) utilizzato come screening preliminare al momento dell'arruolamento e (v) conferma di un test sierologico negativo tramite test sierologico di laboratorio (test sierologico IgG anti-N (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG)).

Tabella 6: Accordo negativo percentuale

	N	Positivo	Negativo	Accordo negativo (%) (CI al 95 %)
Zona borderline inclusa	100	3	97	97,0 % (91,5-99,4)
Zona borderline esclusa	98	2	96	98,0 % (92,8-99,8)

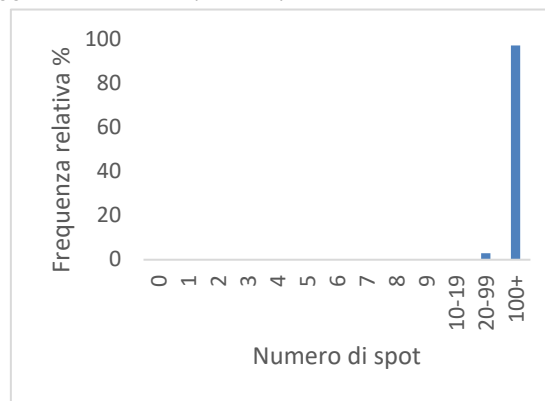
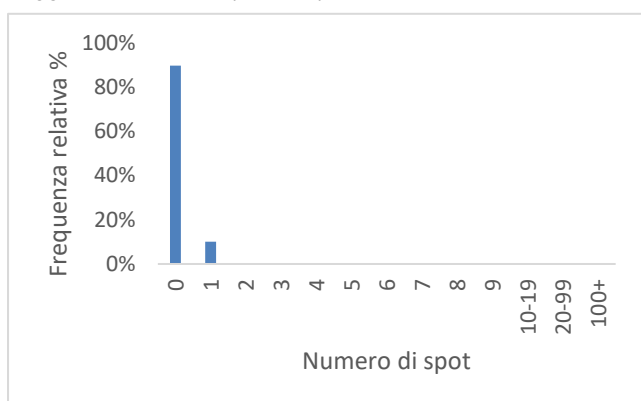
Il 97,0 % dei risultati del test T-SPOT.COVID (97/100) era al di sotto del cut-off di 6 spot (intervalli di confidenza al 95 %, 91,5 %-99,4 %). Due risultati erano borderline (5 e 7 spot). Dopo aver escluso questi risultati, il 98,0 % (CI al 92,8-99,8 %) dei risultati del test T-SPOT.COVID (96/98) non erano reattivi. Non ci sono stati risultati non validi.

Sebbene si siano adottate tutte le modalità ragionevoli per assicurare che la coorte fosse a basso rischio di infezione, non possiamo escludere la possibilità che una parte di questo gruppo presentasse (o presenti ancora) un'infezione asintomatica sieronegativa al momento del test, ma per la quale il test T-SPOT.COVID aveva individuato una risposta delle cellule T.

9. VALORI ATTESI

L'intervallo di conte degli spot osservato in risposta agli antigeni del controllo nullo e positivo e agli antigeni di SARS-CoV-2 che si sono osservati nei nostri studi clinici (vedere la sezione 8 per informazioni dettagliate sulle coorti dello studio clinico) è mostrato nelle Figure 5a e b.

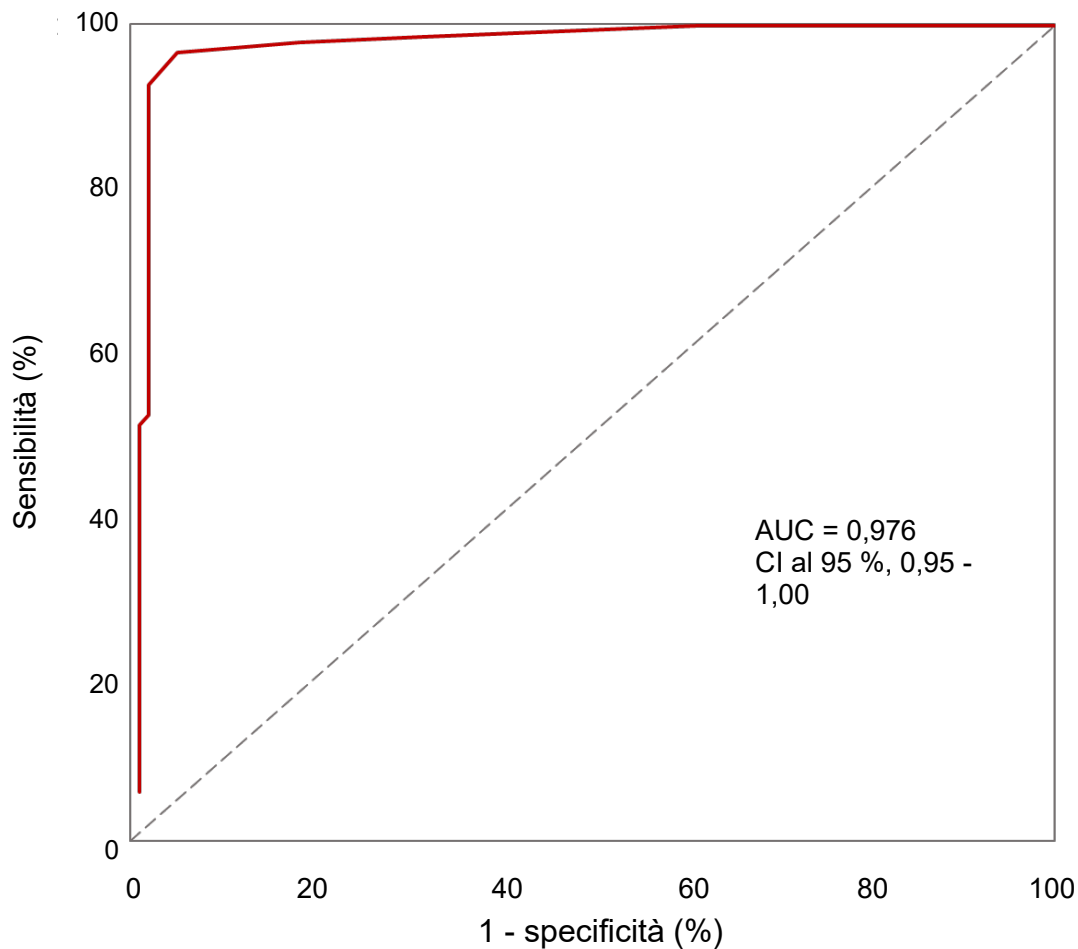
Figura 5a: istogramma delle risposte al controllo nullo da tutti i soggetti dello studio (n = 251). **Figura 5b:** istogramma delle risposte al controllo positivo da tutti i soggetti dello studio (n = 251)



La grandissima maggioranza dei pozzetti a controllo nullo ha fornito zero spot e non si è osservata nessuna conta degli spot superiore a uno nel controllo nullo. La risposta al controllo positivo era solida e non è stato osservato alcun caso di conta degli spot inferiore a 20 nel controllo positivo.

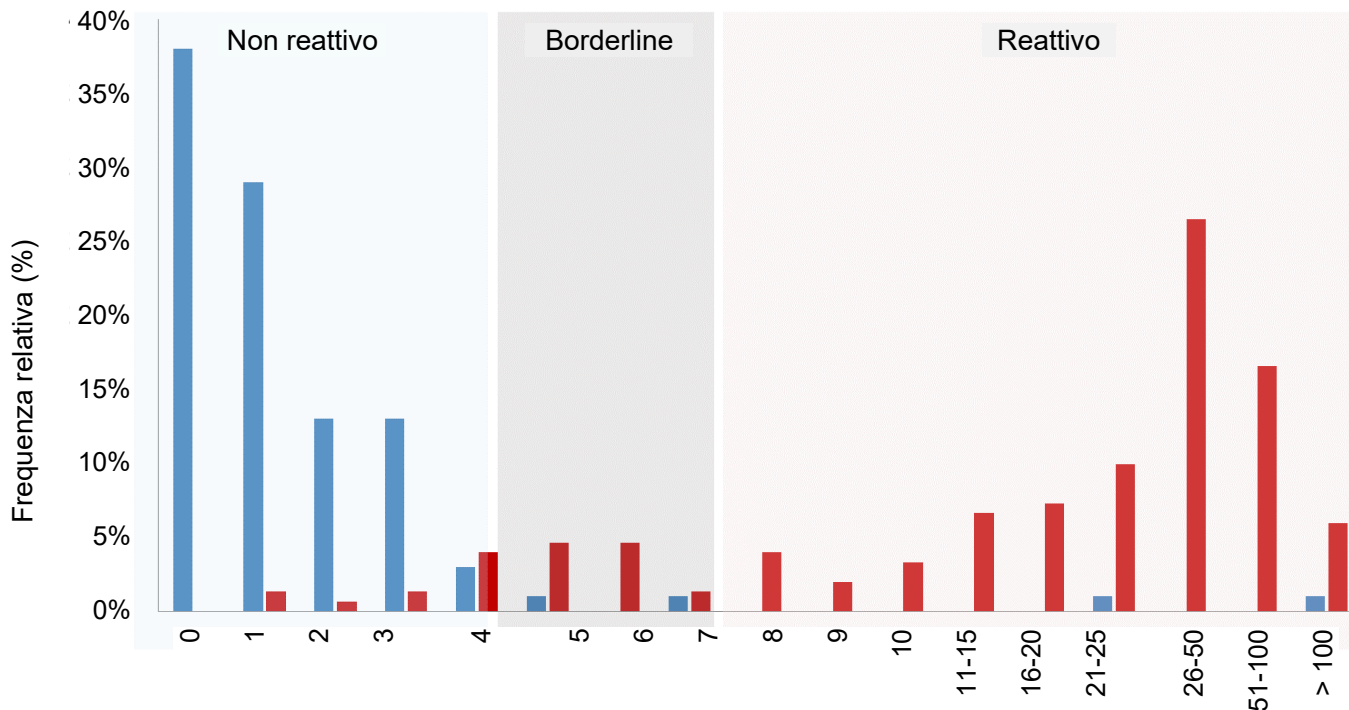
Il cut-off del test è stato confermato nel corso degli studi clinici. La Figura 6 mostra la curva ROC creata utilizzando i dati ottenuti nel corso degli studi clinici. Un cut-off di 6 spot ha rappresentato la separazione massima tra le due coorti, a conferma del livello preselezionato.

Figura 6: curva ROC (Receiver Operating Characteristics) creata utilizzando i dati di convalida generati dai campioni di 151 soggetti confermati mediante PCR (utilizzati per stimare la sensibilità) e dai campioni di 100 soggetti a rischio relativo di infezione inferiore (utilizzati per stimare la specificità).



Gli stessi dati sono stati inoltre utilizzati per confermare il vantaggio dell'inclusione di una zona borderline, come mostrato nella Figura 7.

Figura 7: grafico che mostra la distribuzione della conta di spot osservata tramite i test T-SPOT.COVID in studi clinici statunitensi con una sovrapposizione dei criteri di interpretazione del test forniti. La "Conta degli spot normalizzata massima" è la risposta massima (pannello meno nullo) del Pannello A o del Pannello B (n = 251). La frequenza relativa delle diverse conte degli spot è mostrata per la coorte clinica a basso rischio (barre blu) e per la coorte confermata da PCR (barre rosse)



Conta degli spot normalizzata massima, Pannelli A e B

La maggior parte dei soggetti nella coorte a basso rischio (barre blu) ha mostrato livelli bassi o nulli di reattività, con il 96,0 % all'interno dell'intervallo di 0-4 spot. I soggetti confermati mediante PCR (barre rosse) hanno mostrato livelli elevati di reattività, con il 23,2 % all'interno dell'intervallo di 8-20 spot e una maggioranza (58,9 %) >20 spot. La regione in grigio rappresenta la zona equivoca borderline (5, 6 o 7 spot) in cui, come previsto, si osserva una sovrapposizione tra le distribuzioni della conta degli spot delle due coorti in studio. I test con risultati che ricadono in questa regione dovrebbero essere ripetuti.

10. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Questo test deve essere eseguito utilizzando i principi di buona pratica di laboratorio e seguendo scrupolosamente le presenti Istruzioni per l'uso.

Risultati Borderline (equivoci)

I risultati Borderline (equivoci) sono quelli in cui il massimo tra i due risultati della conta degli spot (Pannello meno Nullo) corrisponde a ± 1 spot dal cut-off del test determinato da ROC pari a ≥ 6 spot. I risultati Borderline (equivoci), sebbene validi, sono meno attendibili dei risultati con un numero di spot più lontano dal cut-off. Si raccomanda perciò di ripetere il test con un nuovo campione prelevato dal paziente. Se il risultato ottenuto con la ripetizione del test è ancora Borderline (equivoco), bisogna utilizzare altri test diagnostici e/o informazioni epidemiologiche per arrivare a stabilire lo stato immunitario del paziente.

Risultati non validi

I risultati non validi sono rari e potrebbero essere correlati allo stato immunitario dell'individuo esaminato, nonché a un certo numero di fattori tecnici che potenzialmente potrebbero offrire risultati di "elevato background di fondo", "mitogeno basso" e "nullo elevato", ad esempio:

- Uso inappropriato delle provette per il prelievo di sangue
- Conservazione del sangue per più di 8 ore prima dell'elaborazione senza l'utilizzo del reagente T-Cell *Xtend*
- Conservazione del sangue al di fuori dell'intervallo di temperatura consigliato prima dell'elaborazione dei campioni
- Contaminazione del mezzo di coltura cellulare
- Lavaggio della piastra incompleto











Si consiglia la ripetizione del test utilizzando un nuovo campione del paziente in caso di risultati non validi. Sono disponibili i documenti tecnici relativi ai punti per la risoluzione dei problemi. Contattare Oxford Immunotec per richiederli.

11. ABBREVIAZIONI E GLOSSARIO DEI SIMBOLI

Abbreviazioni

AUC	Area Under Curve (Area sotto la curva)
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroblue tetrazolio
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie)
CI	Confidence Interval (Intervallo di confidenza)
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments (Emendamenti di miglioramento del laboratorio clinico)
CPT	Cell Preparation Tubes (Provette per la preparazione cellulare)
CV	Coefficient of Variance (Coefficiente di variazione)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Acido etilendiamminotetraacetico)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Saggio immuno-assorbente legato a un enzima)
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunospot Assay (Saggio immunospot legato a un enzima)
IFN- γ	Interferone gamma
IL	Interleuchina
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Cellule mononucleate del sangue periferico)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampone fosfato salino)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reazione a catena della polimerasi)
PHA	Phytohemagglutinin (Fitoemoagglutinina)
RCF	Relative Centrifugal Force (Forza centrifuga relativa)
RoC	Receiver Operating Characteristic
RPM	Revolutions per minute (Giri al minuto)
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR (Reazione a catena della polimerasi inversa)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fattore di necrosi tumorale)

Glossario dei simboli

	Dispositivo medico per la diagnosi <i>in vitro</i>
	Utilizzare entro/Scadenza (Anno-Mese-Giorno)
	Numero di lotto
	Numero di catalogo
	Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso
	Data di produzione
	Produttore
	Limite di temperatura/Conservare entro
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Rappresentante autorizzato per l'UE

BS EN ISO 15223-1:2016

I simboli utilizzati per il test T-SPOT.COVID sono conformi allo standard internazionale ISO 15223-1:2016, "Dispositivi medici - Simboli da utilizzare nelle etichette del dispositivo medico, nell'etichettatura e nelle informazioni che devono essere fornite".

12. BIBLIOGRAFIA

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.*

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/fimmu.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. SEGNALAZIONE DI INCIDENTI SERI

Qualora in relazione a questo dispositivo si produca un incidente serio, dovrà essere segnalato al Servizio clienti. Negli Stati membri dell'Unione europea, gli incidenti seri devono essere segnalati anche alle autorità competenti (ufficio governativo responsabile dei dispositivi medici diagnostici in vitro) nel Paese di appartenenza. Consultare il sito web del Paese di appartenenza per maggiori informazioni su come contattare le autorità competenti. Con "incidente grave" si intende qualsiasi incidente che abbia portato, che avrebbe potuto portare o che potrebbe portare direttamente o indirettamente a:

- decesso del paziente, utente o altra persona;
- seria compromissione temporanea o permanente dello stato di salute del paziente, utente o altra persona;
- seria minaccia per la salute pubblica.

14. INFORMAZIONI DI CONTATTO

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

Per i download relativi all'assistenza prodotti e per ulteriori informazioni tecniche, visitare il nostro sito web:
www.oxfordimmunotec.com

🏢 Produttore

Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Regno Unito

🇪🇺 Rappresentante autorizzato per l'EU

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

T-SPOT, T-Cell *Xtend* ed il logo Oxford Immunotec sono marchi registrati di Oxford Immunotec Ltd.
AIM V e GIBCO sono marchi registrati di Life Technologies Corporation.
CPT e Vacutainer sono marchi registrati di Becton, Dickinson and Company.
Ficoll e Ficoll-Paque sono marchi registrati di Cytiva, un'affiliata di Global Life Sciences Solutions USA LLC.
Tween è un marchio registrato di Croda Americas LLC.

L'utilizzo del reagente T-Cell *Xtend* è protetto dai seguenti brevetti e brevetti in attesa di registrazione:
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205
© 2023 Oxford Immunotec. Tutti i diritti riservati.

Numero revisione	Data di emissione	Modifiche
1 -4	Informazioni disponibili su richiesta da Oxford Immunotec.	
5	Gennaio 2023	Modifica dell'indirizzo del fabbricante. Aggiunta della cronologia delle modifiche. Aggiunta di istruzioni per la segnalazione di incidenti seri.