

FOLHETO INFORMATIVO

Para utilização em diagnósticos *in vitro*

Este folheto informativo abrange a utilização

de:

COV.435/300, COV.435/200

Índice

Finalidade	3
Resumo e explicação	3
Reagentes e armazenamento	5
Avisos e precauções	6
Colheita e manuseamento de amostras	7
Instruções de utilização	8
Limitações	14
Características de desempenho	14
Valores esperados	17
Resolução de problemas.....	18
Abreviaturas e Glossário de símbolos	19
Bibliografia	19
Comunicação de incidentes graves.....	21
Informações de contacto	22

1. FINALIDADE

O teste T-SPOT.COVID é uma técnica padronizada baseada em ELISPOT (Immunospot ligado a enzimas) destinada à detecção qualitativa de uma resposta imunitária mediada por células (linfócitos T) ao SARS-CoV-2 em sangue total humano (heparina de sódio ou lítio ou citrato de sódio). O teste T-SPOT.COVID destina-se a ser utilizado como auxiliar na identificação e monitorização de indivíduos com uma resposta imunitária de linfócitos T ao SARS-CoV-2.

A resposta dos linfócitos T ao SARS-CoV-2 é geralmente detectável no sangue vários dias após a infecção inicial ou a vacinação, e, atualmente, a duração do período para uma resposta detectável pós-infecção ou vacinação ainda não está bem caracterizada.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

O SARS-CoV-2 é uma estirpe do Coronavírus descoberta na província de Wuhan, na China, em 2019. O vírus disseminou-se rapidamente por todo o mundo durante os primeiros meses de 2020, levando a OMS a declará-lo uma pandemia em 11 de março¹ de 2020. A detecção precisa e o isolamento dos infectados com o vírus do SARS-CoV-2, combinados com a disponibilização global de vacinas contra a COVID-19 aprovadas, foram fundamentais para controlar a propagação do vírus. Apesar da testagem exaustiva da COVID-19 e da aceitação generalizada das vacinas, porém, torna-se evidente que o vírus do SARS-CoV-2 continua a espalhar-se e a provocar taxas significativas de morbidade e mortalidade². Além disso, ainda não se sabe quanto tempo dura a proteção que as vacinas contra a COVID-19 proporcionam, e há receios de que as respostas imunitárias se vão reduzindo ao longo dos meses que se seguem à vacinação e possam deixar as pessoas novamente em risco de contrair COVID-19 grave de novo^{3,4}. Esses receios aumentam em relação às populações vulneráveis, como os imunodeprimidos e os idosos, que já estão a receber a terceira dose das vacinas para «estimular» a resposta imunitária vacinal em alguns países⁵. Quanto mais pessoas têm a vacinação completa e recebem a vacinação de reforço, mais amplamente se reconhece a importância de compreender a resposta imunitária tanto à infecção natural como à vacinação.

No início da pandemia, rapidamente se desenvolveram testes serológicos, que ainda hoje são muito utilizados para fornecer informação sobre a capacidade do indivíduo de montar uma resposta imunitária de anticorpos no rescaldo de uma infeção natural com o SARS-CoV-2 ou da vacinação⁶. Os testes serológicos, contudo, apenas proporcionam informação sobre um braço do sistema imunitário adaptativo e, como tal, a testagem dos anticorpos, por si só, talvez subestime a extensão da resposta imunitária que o indivíduo gerou^{7,8}. Vários estudos demonstram que a resposta de anticorpos à infeção natural é altamente variável^{9,10}, observando-se, amiúde, títulos de anticorpos baixos em indivíduos que sofrem de casos leves ou assintomáticos da doença COVID-19^{11,12}. Alguns indivíduos nunca produzem uma resposta de anticorpos detectável⁹. As vacinas contra a COVID-19 já demonstraram induzir respostas de anticorpos robustas na maioria dos indivíduos vacinados¹³; no entanto, há evidências de que essas respostas começam a declinar nos meses que se seguem à segunda dose^{3,4,14}. Alguns indivíduos, todavia, como é o caso de quem sofre de imunodeficiência primária, não têm a capacidade de produzir anticorpos, pelo que não produzirão uma resposta imunitária à vacinação caso a testagem de anticorpos for utilizada isoladamente¹⁵.

A resposta dos linfócitos T, ou a imunidade celular, é o outro braço da resposta imunitária adaptativa, e a testagem dos linfócitos T foi utilizada tanto na investigação como em contexto clínico durante a pandemia da COVID-19 para fornecer mais informações sobre as respostas imunitárias da infeção pelo SARS-CoV-2 e a vacinação¹⁶. Várias publicações evidenciam que as respostas dos linfócitos T aos coronavírus humanos, incluindo o SARS-CoV-1 e o SARS-CoV-2, podem ser robustas e duradouras¹⁷, observando-se a sua persistência em alguns indivíduos que foram infectados com o SARS-CoV-1 há 17 anos¹⁸. Vários estudos assinalam que a imunidade mediada por linfócitos T específica do SARS-CoV-2 mantém-se por seis a nove meses após a infeção primária, o que indica que as respostas celulares poderão sobrepor-se às respostas transitórias mediadas por anticorpos à infeção pelo SARS-CoV-2^{17,19}. Os estudos estão agora a demonstrar cronologias pós-vacinação idênticas²⁰. Aliadas a outros estudos, essas conclusões acerca do papel vital dos linfócitos T no controle viral e na recuperação do SARS-CoV-2²¹ sugerem que a imunidade celular poderá ser um aspecto importante de qualquer imunidade de proteção desenvolvida contra o SARS-CoV-2²². Além disso, apesar de ainda não se compreender plenamente a dinâmica da resposta mediada por linfócitos T específica do SARS-CoV-2, as evidências sugerem que a maioria dos indivíduos infectados com o SARS-CoV-2 gera linfócitos T específicos do SARS-CoV-2 funcionais que produzem interferão-Gamma (IFN- γ) já detectável no sangue periférico, dois a quatro dias a partir do início dos sintomas²². Também se detectarão linfócitos T específicos do SARS-CoV-2 entre sete e catorze dias após a vacinação²³.

Foram detectados linfócitos T específicos do SARS-CoV-2 em resposta a muitas das atuais vacinas^{24,25,26}, e cada vez mais se reconhece a importância de detectar e monitorizar essas respostas²⁷. O teste T-SPOT.COVID foi utilizado para demonstrar uma resposta celular específica após a vacinação em vários estudos^{28,29,30,31,32,33}. É importante notar que muitos desses estudos demonstram que o teste T-SPOT.COVID pode detectar as respostas dos linfócitos T em indivíduos imunodeprimidos^{29,31,32,33}, incluindo paciente submetidos a terapias de depleção de linfócitos B, que

poderão não ter a capacidade de desenvolver respostas de anticorpos robustas²⁸.

O teste T-SPOT.COVID O teste T-SPOT.COVID é uma variante simplificada e padronizada da técnica de ensaio ELISPOT. Os ensaios ELISPOT detectam e medem as respostas dos linfócitos T enumerando o número de linfócitos T que secretam citocinas em resposta à estimulação com antígenos. Os ensaios ELISPOT são excepcionalmente sensíveis uma vez que a citocina alvo é capturada diretamente em redor da célula secretora, antes de ser diluída no sobrenadante, ligada por receptores de células adjacentes ou degradada. Isto torna os ensaios ELISPOT muito mais sensíveis do que os ensaios ELISA convencionais^{34,35,36,37}. A sensibilidade é importante ao detectar as respostas de linfócitos T ao SARS-CoV-2, uma vez que a frequência de linfócitos T pode ser menor do que para outros vírus que induzem respostas dos linfócitos T³⁸ e uma variedade de fatores, como a idade³⁹, a gravidade da doença⁷ e a imunossupressão⁴⁰, foram associados à variabilidade na magnitude das respostas dos linfócitos T específicas do SARS-CoV-2. Vários estudos que utilizaram o teste T-SPOT.COVID para detectar as respostas dos linfócitos T à vacinação em indivíduos imunodeprimidos^{28,29,30,31,32,33} atestam os benefícios da alta sensibilidade que a testagem com o ELISPOT oferece.

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

PRINCÍPIO DO TESTE

A resposta imunitária à infecção por SARS-CoV-2 é mediada pela ativação das células B e T. Como parte da resposta dos linfócitos T, os linfócitos T são sensibilizados para os do SARS-CoV-2, desenhados para ativar os linfócitos T efetores CD4 e CD8, que produzem então a citocina interferão gama (IFN- γ) quando estimulados por esses antígenos^{41,42}. O teste T-SPOT.COVID usa a metodologia imunoenzimática (ELISPOT) para enumerar os linfócitos T sensibilizados para o SARS-CoV-2 capturando interferão-gama (IFN- γ) na vizinhança dos linfócitos T dos quais foi segregado⁴³.

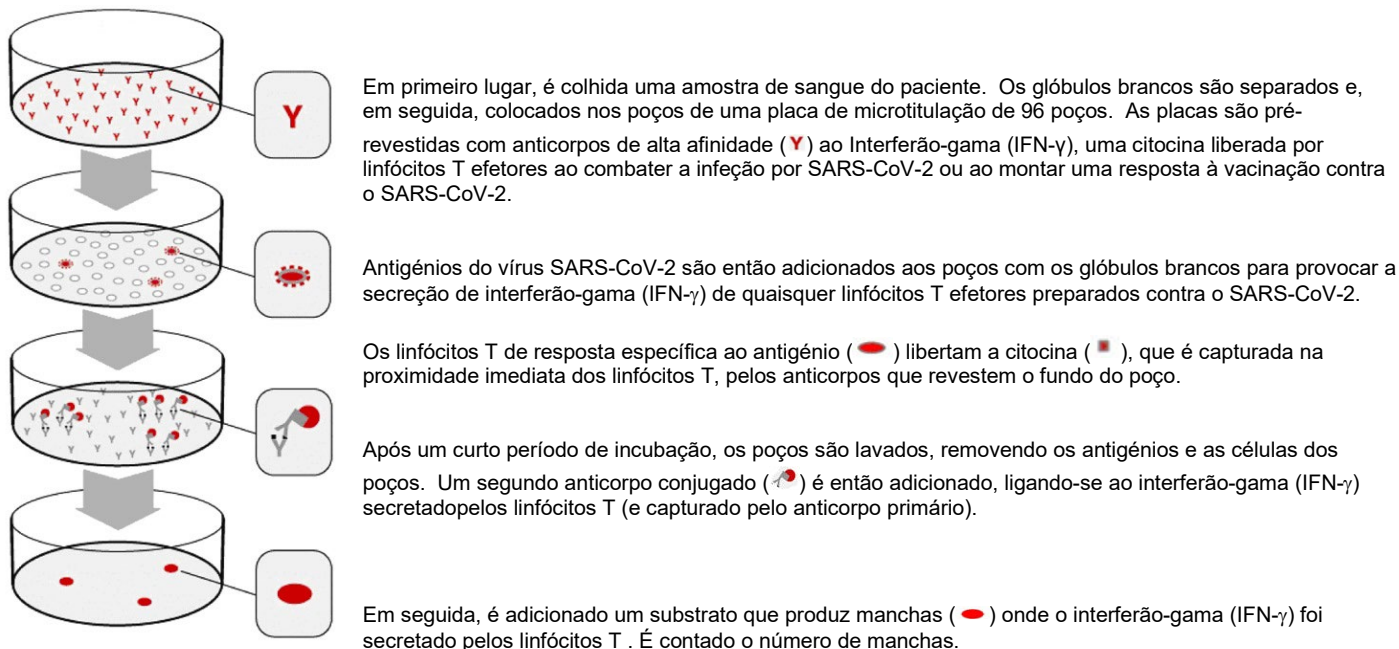
Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) são separadas de uma amostra de sangue total, lavadas e contadas antes de serem adicionadas ao teste.

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

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

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

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



3. REAGENTES E ARMAZENAMENTO

MATERIAIS FORNECIDOS

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

- 1 placa de microtitulação: 96 poços, fornecidos como 12 tiras x 8 poços num suporte separado (COV.435/300), ou 12 x 8 poços numa única placa (COV.435/200), revestidos com anticorpo monoclonal de camundongo contra citocina de interferão gama (IFN- γ).
- 2 frascos (0,8 mL cada) de Painel A (COV-A): contém antígenos de Spike, albumina sérica bovina e agentes antimicrobianos.
- 2 frascos (0,8 mL cada) de Painel B (COV-B): contém antígenos do Nucleocapsídeo, albumina sérica bovina e agentes antimicrobianos.
- 2 frascos (0,8 mL cada) de Controle Positivo: contém fitohemaglutinina (PHA), para uso como controle da funcionalidade celular, albumina sérica bovina e agentes antimicrobianos.
- 1 frasco (50 μ L) 200x de Reagente do Conjugado concentrado: anticorpo monoclonal de camundongo contra a citocina interferão-gama (IFN- γ) conjugada a fosfatase alcalina.
- 1 garrafa (25 mL) de Solução de Substrato: solução BCIP/NBT^{plus} pronta a usar.
7. Folheto informativo

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

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

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

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

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

1. Suporte de placas de tiras de 8 poços (disponível através da Oxford Immunotec).
2. Câmara BLII (recomendado).

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

4. AVISOS E PRECAUÇÕES

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

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

- O reagente T-Cell Xtend não foi avaliado para utilizações diferentes da plataforma de teste T-SPOT.
- Apenas para diagnósticos *in vitro*.
- Apenas para uso profissional.

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

5. COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

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

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

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

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

4. Ao usar o teste T-SPOT.COVID **sem utilizar o reagente T-Cell *Xtend***, as amostras sanguíneas devem ser processadas num período de 8 horas após a colheita. As amostras podem ser colhidas em tubos Vacutainer CPT de citrato de sódio ou heparina de sódio (Becton Dickinson) com PBMCs separadas no tubo de acordo com as instruções do fabricante. Alternativamente, as amostras de sangue podem ser colhidas em tubos de sódio, ou heparina de lítio ou citrato de sódio, sendo as PBMCs separadas posteriormente usando técnicas de separação padrão, como Ficoll-Paque® ou métodos alternativos de purificação da fração de PBMC. Não devem ser utilizados tubos de colheita de sangue que contenham o anticoagulante EDTA.
 - a. Para tubos de colheita de sangue CPT, centrifugar os tubos CPT de 8 mL a 1600 RCF(g) durante 28 minutos ou os tubos CPT de 4 mL a 1800 RCF (g) durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C).
 - b. Se estiver a usar o Ficoll-Paque Plus, dilua o sangue com um volume igual de meio RPMI 1640 (1 parte de sangue para 1 parte de RPMI). Colocar cuidadosamente o sangue diluído sobre o Ficoll-Paque Plus (2-3 partes de sangue diluído para 1 parte de Ficoll-Paque) e centrifugar a 1000 RCF (g) durante 22 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C).

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

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

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

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

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

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

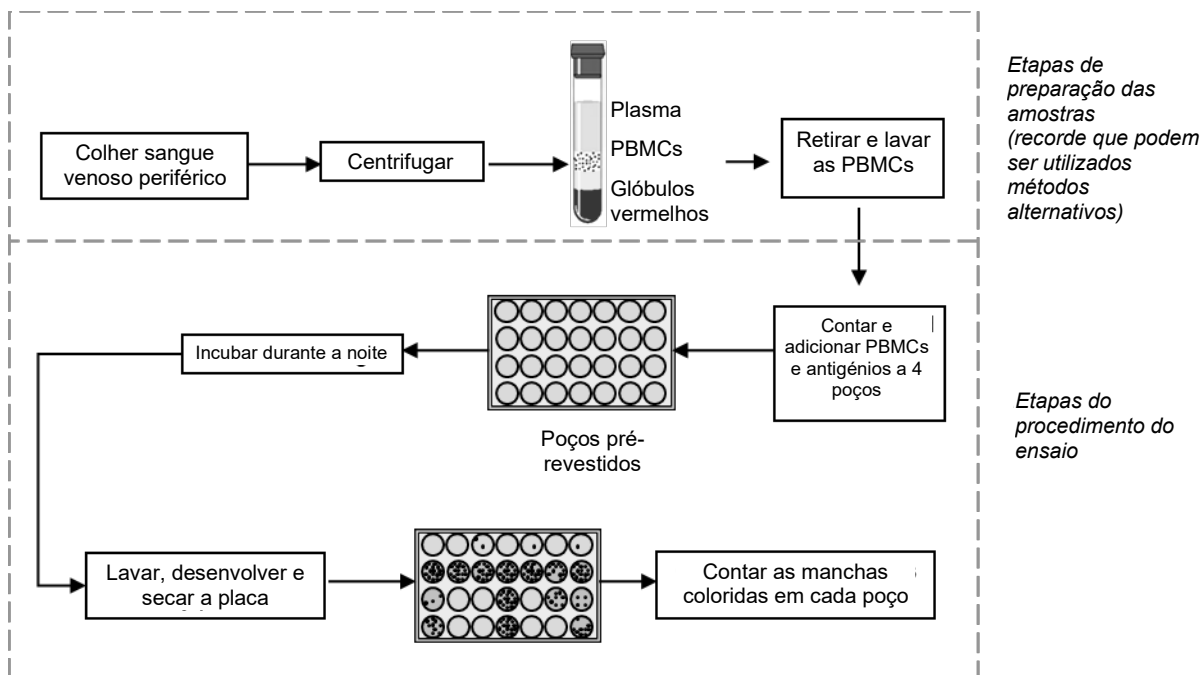
7. Centrifugar a 600 RCF (g) durante 7 minutos. Retirar o sobrenadante e ressuspender o “pellet” em 1 mL de meio.
8. Perfazer o volume de 10 mL com meio fresco e centrifugar a 350 RCF (g) durante 7 minutos.
9. Retirar o sobrenadante e ressuspender o “pellet” em 0,7 mL de meio de cultura de células. **O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

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

6. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

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

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



PREPARAÇÃO DO REAGENTE

1. Os frascos de antígenos Spike do SARS-CoV-2 (COV A), antígenos do Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 (COV B) e o Controle Positivo são fornecidos prontos a usar.

2. Preparar uma diluição de 1:200 de solução de trabalho do Reagente do Conjugado. Calcular o volume necessário de solução de trabalho do Reagente do Conjugado O reagente do conjugado pode ser preparado com a concentração de trabalho e armazenado entre 2-8 °C até seis semanas antes de ser usado no teste.

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

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

CONTAGEM E DILUIÇÃO DE CÉLULAS

O teste T-SPOT.COVID requer 250.000 ± 50.000 PBMCs por poço. É necessário um total de quatro poços para cada amostra de um paciente; por conseguinte, são necessários 1 x 10⁶ PBMCs por paciente. O número de linfócitos T SARS-CoV-2 na amostra é normalizado para um número fixo de PBMCs.

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

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

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

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

4. Prepare 500 µL da suspensão de células final a uma concentração de 2,5 x 10⁵ células/100 µL (dando 1,25 x 10⁶ PBMCs no total).

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

PREPARAÇÃO DAS PLACAS E INCUBAÇÃO

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

- Controle Nulo
- Painel A (COV-A) (Spike)
- Painel B (COV-B) (Nucleocapsídeo)
- Controle Positivo

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

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

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

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

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

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

- Adicionar os Painéis e os Controlos;

- Adicionar 50 µL de meio de cultura de células AIM-V a cada poço de Controlo Nulo
- Adicionar 50 µL da solução do COV A a cada poço pretendido.
- Adicionar 50 µL da solução do COV B a cada poço pretendido.
- Adicionar 50 µL de Controle positivo a cada poço de controle da funcionalidade celular.

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

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

Nota: Certifique-se de misturar (como nos passos de Contagem e Diluição de Células) antes de remover cada alíquota de 100 µL.

- Incubar a placa com tampa em um incubador humidificado a 37 °C com CO₂ a 5 % durante 16-20 horas. Evitar perturbar a placa depois de colocada na incubadora. Não empilhar as placas, uma vez que isso pode provocar uma distribuição irregular da temperatura e da ventilação.

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

DESENVOLVIMENTO E CONTAGEM DE MANCHAS

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

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

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

Nota: Utilizar PBS recém-preparado ou estéril.

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

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

- Caso ainda não tenha sido preparado durante a fase de preparação do reagente; diluir o reagente do conjugado concentrado 200x em PBS para criar a solução com a concentração de trabalho

- Adicionar 50 µL de solução de reagente do conjugado com a concentração de trabalho a cada poço e incubar a 2-8 °C durante 1 hora.

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

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

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

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

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

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

CONTROLE DE QUALIDADE

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

Uma contagem superior a 10 manchas no Controle Nulo deve ser considerada 'inválida'.

Geralmente, a contagem de manchas do Controle Positivo da funcionalidade das células deve ser ≥ 20 ou revelar saturação (demasiadas manchas para contar). Uma pequena percentagem de pacientes pode ter linfócitos T que apresentam apenas uma resposta limitada à PHA¹. Quando a contagem de manchas do Controle Positivo for <20 manchas, deve ser considerada "inválida", a menos que o painel A ou o painel B sejam "reativos" ou "borderline" (ambíguos)", conforme descrito na Interpretação de resultados e nos critérios do Teste (ver abaixo), em cujo caso o resultado é válido.

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

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS E CRITÉRIOS DO TESTE

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

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

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

- Um resultado “Reativo” indica que a amostra contém linfócitos T efetores sensibilizados para o SARS-CoV-2. A presença de linfócitos T sensibilizados poderá resultar da vacinação contra o SARS-CoV-2 ou da infecção pelo SARS-CoV-2.
- Um resultado “Não Reativo” indica que não foram detectados linfócitos T efetores sensibilizados para o SARS-CoV-2.

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

Figura 3 – Diagrama de fluxo do algoritmo

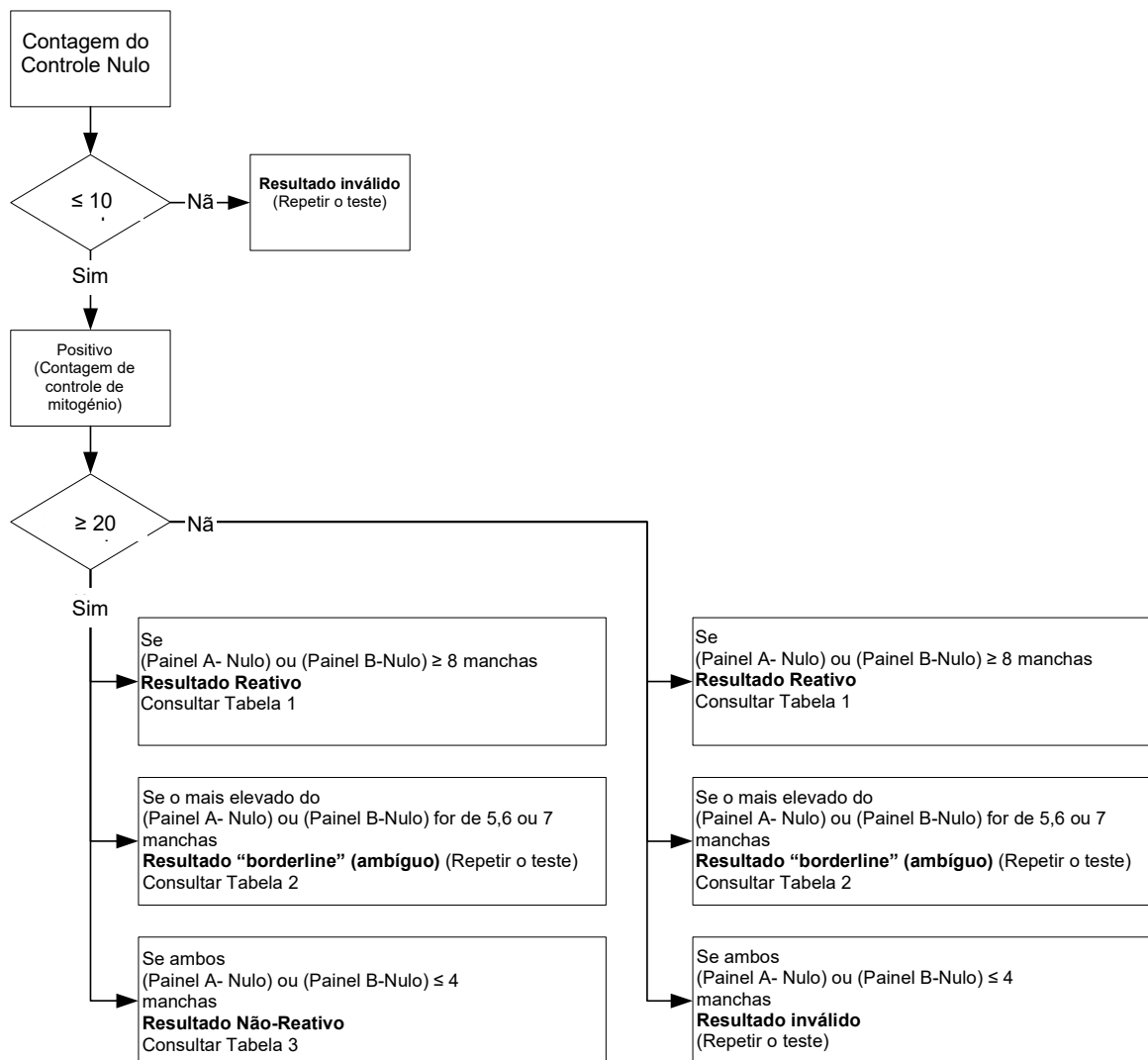


Tabela 1: Interpretação reativa: O (Painel A menos Nulo) ou (Painel B menos Nulo) ≥ 8 manchas

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

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

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

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

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

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

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

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

7. LIMITAÇÕES

- Os desvios das instruções de utilização neste folheto informativo podem gerar resultados incorretos.
- A realização incorreta do teste pode causar respostas reativas ou não reativas falsas.
- Um resultado reativo poderá dever-se a infecção ou infecção prévia pelo SARS-CoV-2 ou vacinação contra o SARS-CoV-2.
- Um resultado falso não reativo pode ser causado pela colheita incorreta da amostra sanguínea ou por um manuseamento incorreto da amostra, afetando a função dos linfócitos.
- Um resultado não reativo tanto no COV-A como no COV-B não exclui a possibilidade de um indivíduo ter montado uma resposta imunitária adaptativa após a infecção ou a vacinação.
- O desempenho do teste T-SPOT.COVID, com ou sem a utilização do reagente T-Cell *Xtend*, não foi avaliado adequadamente com amostras de indivíduos com menos de 18 anos, em mulheres grávidas e em pacientes com hemofilia.
- Um falso resultado reativo pode ser obtido para o teste T-SPOT.COVID quando testado em indivíduos previamente expostos ao SARS-CoV-1 e a outros coronavírus semelhantes. Serão necessários testes alternativos se houver suspeita dessas infecções. Este kit foi testado utilizando amostras disponíveis no momento da sua realização. O desempenho com novas mutações do SARS-CoV-2 ainda não foi avaliado.
- Os resultados do teste T-SPOT.COVID devem ser utilizados em conjunto com o histórico epidemiológico, o estado médico atual e os resultados de outras avaliações de diagnóstico de cada indivíduo.
- Um resultado de teste não reativo não exclui a possibilidade de exposição ao, infecção pelo ou vacinação bem-sucedida contra o SARS-CoV-2. Os pacientes recém-vacinados ou com exposição recente a indivíduos infectados com SARS-CoV-2 que apresentem um resultado do teste T-SPOT.COVID não reativo, devem ser considerados para um novo teste no espaço de 2 semanas ou se outros sintomas clínicos relevantes indicarem uma possível infecção.
- As amostras refrigeradas e congeladas não são recomendadas para utilização com o teste T-SPOT.COVID.

LIMITAÇÕES ESPECÍFICAS À UTILIZAÇÃO DO REAGENTE T-CELL XTEND

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

8. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O valor de corte do teste T-SPOT.COVID foi pré-determinado durante o desenvolvimento usando a análise da curva Característica de Operação do Recetor (ROC). A discriminação máxima entre indivíduos com PCR positivo confirmado e aqueles com baixo risco de infecção foi determinada em 6 manchas. Além disso, foi definida uma zona limítrofe de 5-7 para lidar com a variação e a incerteza do teste em torno do corte. As evidências mais recentes sugerem que o mesmo corte se adequa à discriminação entre indivíduos vacinados e não vacinados⁴⁴.

Características de desempenho analítico

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

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

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

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

cada um dos lotes testados.

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

Características de desempenho clínico

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

Um total de 281 indivíduos foram recrutados para o estudo, atendendo aos critérios de inclusão. Destes, 169 indivíduos foram recrutados para o grupo de infeção por SARS-CoV-2 confirmada por PCR (a coorte positiva). Destes, foi excluído um indivíduo devido à baixa recuperação celular e 17 devido à falta de resultados de sorologia, restando 151 disponíveis para análise.

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

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

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

Concordância positiva entre indivíduos com confirmação por PCR

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

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

Dias desde o primeiro teste PCR positivo	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Concordância positiva	95 % CI	Concordância positiva	95 % CI
0-6	100,0 % (1/1)	2,5-100,0 %	0,0 % (0/1)	-
7-13	100,0 % (4/4)	39,8-100,0 %	25,0% (1/4)	6,3-80,6 %
14-30	92,9 % (13/14)	66,1-99,8 %	64,3 % (9/14)	35,1-87,2 %
31-60	92,0 % (69/75)	83,4-97,0 %	80,0 % (60/75)	69,2-88,4 %
Total ≤ 60	92,6 % (87/94)	85,3-97,0 %	74,5 % (70/94)	64,4-82,9 %
61-120	84,0 % (21/25)	63,9-95,5 %	76,0 % (19/25)	54,9-90,6 %
121-180	80,0 % (12/15)	51,9-95,7 %	20,0 % (3/15)	4,3-48,1 %
181-240	75,0 % (12/16)	47,6-92,7 %	0,0 % (0/16)	-
>240	100,0 % (1/1)	2,5-100,0 %	0,0 % (0/1)	-
Total >60	80,7 % (46/57)	68,1-90,0 %	38,6 % (22/57)	26,0-52,4 %

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

Dias desde o primeiro teste PCR positivo	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Concordância positiva	95 % CI	Concordância positiva	95 % CI
0-6	100,0 % (1/1)	2,5-100,0%	0,0 % (0/1)	-
7-13	100,0 % (4/4)	39,8-100,0 %	25,0 % (1/4)	6,3-80,6 %
14-30	100,0 % (12/12)	73,5-100,0 %	75,0 % (9/12)	42,8-94,5 %
31-60	95,7 % (67/70)	88,0-99,1 %	82,9 % (58/70)	72,0-90,8 %
Total ≤ 60	96,6 % (84/87)	90,3-99,3 %	78,2 % (68/87)	68,0-86,3 %
61-120	90,5 % (19/21)	69,6-98,8 %	85,7 % (18/21)	63,7-97,0 %
121-180	83,3 % (10/12)	51,6-97,9 %	16,7 % (2/12)	2,1-48,4 %
181-240	71,4 % (10/14)	41,9-91,6 %	0,0 % (0/14)	-
>240	100,0 % (1./1)	2,5-100,0 %	0,0 % (0/1)	-
Total >60	83,3 % (40/48)	69,8-92,5 %	41,7 % (20/48)	27,6-56,8 %

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

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

Concordância negativa entre os indivíduos com menor risco relativo de infecção

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

Tabela 6: Porcentagem de concordância negativa

	N	Positivo	Negativo	Concordância negativa (%) (95% CI)
Incluindo a zona "borderline"	100	3	97	97,0 % (91,5-99,4)
Excluindo a zona "borderline"	98	2	96	98,0 % (92,8-99,8)

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

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

9. VALORES ESPERADOS

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

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

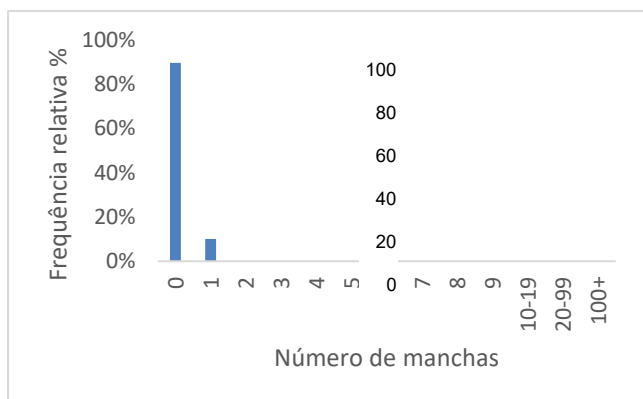


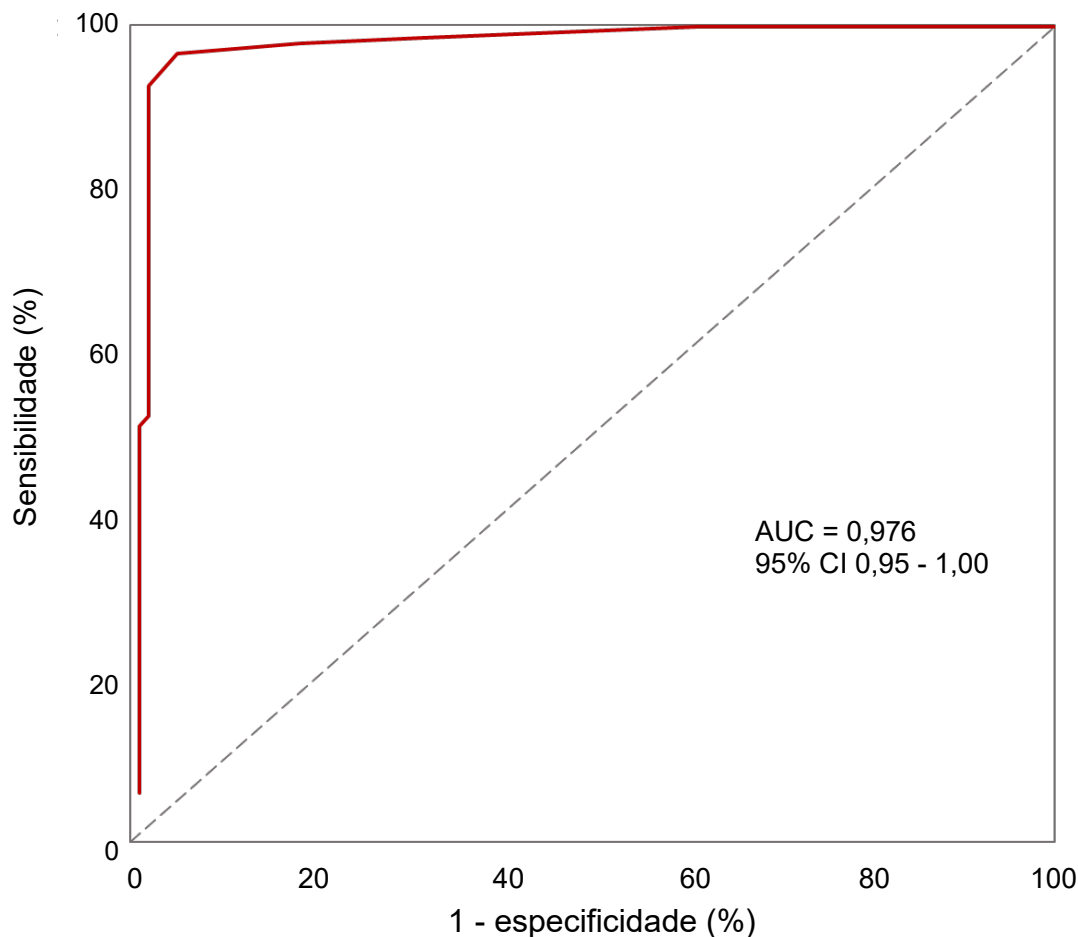
Figura 5b: Histograma do controle positivo Respostas de todos os indivíduos do estudo (n= 251)



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

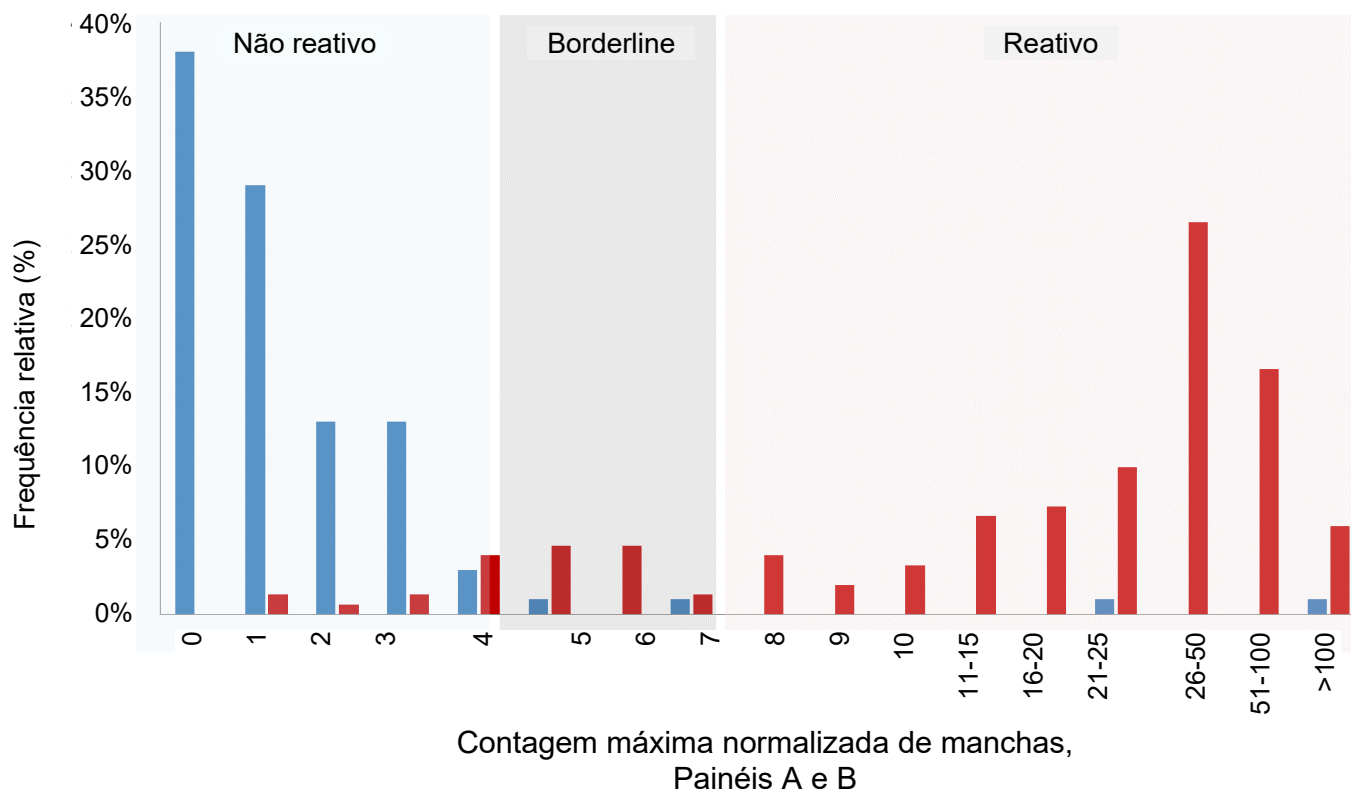
O “cut-off” do teste foi confirmado durante os estudos clínicos. A Figura 6 mostra a curva ROC criada através dos dados obtidos durante os estudos clínicos. Um “cut-off” de 6 manchas proporcionou a separação máxima entre as duas coortes, validando o nível pré-selecionado.

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



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

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



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

10. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

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

Resultados “borderline” (ambíguos)

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

Resultados inválidos

Os resultados inválidos não são comuns e podem estar relacionados com o estado imunitário do indivíduo testado. Também poderão estar relacionados com um conjunto de fatores técnicos, resultando potencialmente em resultados de “fundo elevados”, “mitogénio baixo” e “nulo elevado”, como:

- Utilização de tubos de colheita de sangue inadequados
- Armazenamento do sangue durante mais de 8 horas antes do processamento sem a utilização do reagente T-Cell Xtend.

- Armazenamento do sangue fora do intervalo de temperatura recomendado antes do processamento das amostras sanguíneas
- Contaminação do meio de cultura celular
- Lavagem incompleta da placa











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

11. ABREVIATURAS E GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS

Abreviaturas

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

Glossário de Símbolos

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

BS EN ISO 15223-1:2016

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

12. BIBLIOGRAFIA

1. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed.* 2020; 91(1): 157-160
2. 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. COMUNICAÇÃO DE INCIDENTES GRAVES

Se tiver ocorrido um incidente grave em relação a este dispositivo, este deverá ser comunicado ao Serviço de Atendimento ao Cliente. Nos Estados-Membros da União Europeia, os incidentes graves devem também ser comunicados à autoridade competente (o departamento governamental responsável pelos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*) no seu país. Consulte o website do seu governo para obter detalhes sobre como contactar a sua autoridade competente. Um "incidente grave" significa qualquer incidente que direta ou indiretamente tenha conduzido, possa ter conduzido ou possa conduzir:

- à morte de um paciente, utilizador ou outra pessoa;
- à deterioração grave temporária ou permanente do estado de saúde de um paciente, utilizador ou outra pessoa;
- a uma grave ameaça para a saúde pública.

14. INFORMAÇÕES DE CONTATO

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

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

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

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

© 2023 Oxford Immunotec. Todos os direitos reservados.

Número da revisão	Data de emissão	Alterações
1 - 4	Detalhes disponíveis mediante pedido sobre a Oxford Immunotec.	
5	fevereiro de 2023	Mudança de endereço do fabricante. Adição do histórico de revisões. Adição de instruções para comunicar incidentes graves.

🏭 Fabricante

Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon Oxfordshire, OX14 4SE, UK
www.oxfordimmunotec.com

 Representante Autorizado na UE

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