



T-SPOT[®] COVID



Oxford
Immunotec



PŘÍBALOVÁ INFORMACE

Pro účely diagnostiky *in vitro*

Tato příbalová informace pokrývá použití:

COV.435/300, COV.435/200

Obsah

Zamýšlené použití	3
Souhrn a princip	3
Činidla a uchovávání	5
Uchovávání a stabilita	5
Varování a bezpečnostní opatření	6
Odběr vzorků a manipulace s nimi	6
Návod k použití	7
Omezení	13
Funkční charakteristiky	14
Očekávané hodnoty	16
Řešení problémů	18
Zkratky a vysvětlivky značek	19
Literatura	19
Kontaktní údaje	21
Práva duševního vlastnictví a historie revizí příbalového letáku	22

1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Test T-SPOT.COVID je standardizovaná technika na bázi ELISPOT (Enzyme Linked ImmunoSpot) určená ke kvalitativní detekci buňkami (T-lymfocyty) zprostředkované imunitní odpovědi na SARS-CoV-2 v lidské plné krvi (s heparinem sodným či lithným nebo citrátem sodným). Test T-SPOT.COVID je určen k použití jako pomůcka při identifikaci a monitorování osob s adaptivní imunitní odpovědí T-lymfocytů na SARS-CoV-2.

Odpověď T-lymfocytů na SARS-CoV-2 je obecně detekovatelná v krvi několik dní po prvotní infekci nebo očkování, a doba trvání detekovatelné odpovědi po infekci nebo očkování v současné době není dobře charakterizována.

2. SOUHRN A PRINCIP

SARS-CoV-2 je kmen koronaviru objevený v čínské provincii Wu-Chan v roce 2019. Virus se během prvních několika měsíců roku 2020 rychle rozšířil po celém světě, což vedlo k tomu, že WHO dne 11. března 2020 vyhlásila pandemii¹. Přesná detekce a izolace osob nakažených virem SARS-CoV-2 v kombinaci s celosvětovým zavedením schválených očkování proti COVID-19 byla pro kontrolu šíření viru zásadní. Navzdory rozsáhlému testování na COVID-19 a širokému přijetí vakcín je však jasné, že virus SARS-CoV-2 se nadále šíří a způsobuje významnou nemocnost a úmrtnost². Také stále není známo, jak dlouho bude trvat ochrana poskytovaná vakcínami proti COVID-19, a existují určité obavy, že slábnoucí imunitní reakce v měsících následujících po očkování by mohly jedince znovu vystavit riziku závažného onemocnění COVID-19^{3,4}. Tyto obavy jsou patrně zejména u zranitelných populací, jako jsou osoby trpící imunosupresí a starší osoby, kterým jsou již v některých zemích⁵ nabízeny třetí dávky očkování s cílem „posílit“ imunitní odpověď vyvolanou vakcínou. Vzhledem k tomu, že stále větší počet osob je plně očkováno a nabízí se jim přeočkování, je stále více uznávána důležitost porozumění imunitní odpovědi jak na přirozenou infekci, tak na očkování.

Na začátku pandemie byly rychle vyvinuty sérologické testy a jsou nadále široce využívány k poskytování informací o schopnosti jednotlivce vyvolat imunitní reakci zprostředkovanou protilátkami po přirozené infekci SARS-CoV-2 nebo po očkování⁶. Sérologické testy však poskytují informace pouze o jednom rameni adaptivního imunitního systému a jako takové testování na protilátky samotné může podceňovat rozsah imunitní odpovědi, kterou jedinec vyvolal^{7,8}. Řada studií ukázala, že protilátková odpověď na přirozenou infekci je vysoce variabilní^{9,10}, přičemž u jedinců, kteří trpěli mírným nebo asymptomatickým onemocněním COVID-19, jsou často pozorovány nízké titry protilátek^{11,12}. Někteří jedinci nikdy nevyvolají detekovatelnou protilátkovou odpověď⁹. Bylo prokázáno, že vakcíny COVID-19 vyvolávají u většiny očkováných jedinců¹³ silné protilátkové reakce, nicméně existují důkazy, že tyto reakce začínají v měsících následujících po druhé dávce^{3,4,14} klesat. Existují také jedinci, kteří trpí primární imunodeficiencí, kteří nejsou schopni produkovat protilátky, a jako takoví nevyvolají měřitelnou imunitní odpověď na očkování, pokud je testování protilátek používáno izolovaně¹⁵.

Odpověď T-lymfocytů nebo buněčně zprostředkovaná imunita je druhým ramenem adaptivní imunitní odpovědi a testování T-lymfocytů bylo během pandemie COVID-19 použito jak ve výzkumu, tak v klinickém prostředí, aby poskytlo další pohled na imunitní odpovědi na infekce a očkování proti SARS-CoV-2¹⁶. Několik publikací ukázalo, že reakce T-lymfocytů na lidské koronaviry, včetně SARS-CoV-1 a SARS-CoV-2, mohou být silné a dlouhodobé¹⁷, přičemž někteří jedinci, kteří byli infikováni SARS-CoV-1 před 17 lety, dnes stále vykazují odpovědi T-lymfocytů¹⁸. Několik studií ukázalo, že imunita T-lymfocytů specifická pro SARS-CoV-2 je udržována 6–9 měsíců po primární infekci, což naznačuje, že reakce T-lymfocytů mohou přetrvávat přechodné protilátkové reakce na infekci SARS-CoV-2^{17,19}. Studie nyní ukazují podobné časové osy po očkování²⁰. Tato zjištění spolu se studiemi, které prokázaly kritickou roli T-lymfocytů při odstraňování viru a zotavení ze SARS-CoV-2²¹, naznačují, že buňkami zprostředkovaná imunita může být důležitým aspektem veškeré ochranné imunity vyvinuté proti SARS-CoV-2²². Kromě toho, zatímco dynamika reakce T-lymfocytů specifické pro SARS-CoV-2 dosud nebyla plně objasněna, důkazy naznačují, že většina jedinců infikovaných SARS-CoV-2 vytváří funkční IFN-gama (IFN- γ) produkující T-lymfocyty SARS-CoV-2, které lze detekovat v periferní krvi již 2–4 dny od nástupu příznaků²². T-lymfocyty specifické pro SARS-CoV-2 byly také detekovány mezi 7. a 14. dnem po očkování²³.

T-lymfocyty, specifické pro SARS-CoV-2, byly detekovány v reakci na mnoho současných vakcín^{24,25,26} a důležitost detekce a monitorování těchto reakcí je stále více uznávána²⁷. Test T-SPOT.COVID byl použit k prokázání specifické reakce T-lymfocytů po očkování v řadě studií^{28,29,30,31,32,33}. Důležité je, že mnohé z těchto studií prokázaly, že test T-SPOT.COVID je schopen detekovat reakce T-lymfocytů u imunosuprimovaných jedinců, včetně pacientů užívajících terapie deplecí B-lymfocytů^{29,31,32,33}, u nichž je možné, že nebudou schopni vyvinout silné protilátkové reakce²⁸.

Test T-SPOT.COVID je zjednodušená, standardizovaná varianta techniky testu ELISPOT. Testy ELISPOT detekují a měří odpovědi T-lymfocytů vyčíslením počtu T-lymfocytů, které produkují cytokin v odpovědi na stimulaci antigeny. Testy ELISPOT jsou významně citlivé, protože cílový cytokin je zachycen přímo v okolí sekretující buňky, než dojde k jeho zředění v supernatantu, navázání na receptory sousedních buněk nebo degradaci. Díky tomu jsou testy ELISPOT mnohem citlivější než konvenční testy ELISA^{31,35,36,37}. Citlivost je důležitá při detekci odpovědi T-lymfocytů na SARS-CoV-2, protože četnost výskytu T-lymfocytů může být nižší než u jiných virů, které navozují odpovědi

T-lymfocytů³⁸, a mnoho různých faktorů, včetně věku³⁹, závažnosti onemocnění⁷ a imunosuprese⁴⁰, souvisí s variabilitou magnitudy odpovědi T-lymfocytů specifických pro SARS-CoV-2. Vysoká citlivost, kterou nabízí test ELISPOT, se již ukázala jako prospěšná v několika studiích, které využívaly test T-SPOT.COVID k detekci reakcí T-lymfocytů na očkování u imunosuprimovaných jedinců^{28,29,30,31,32,33}.

Tento test zjišťuje počet efektorových T-lymfocytů odpovídajících na stimulaci pomocí dvou samostatných peptidových směsí odvozených od spike a nukleokapsidových proteinů SARS-CoV-2. Odpověď T-lymfocytů na každý protein se měří paralelně v jednotlivých jamkách. Antigenní panely testu T-SPOT.COVID jsou navrženy jako spanningové sekvence překryvných peptidů spike (COV-A) a nukleokapsidových (COV-B) proteinů. Toto uspořádání peptidů poskytuje maximální pokrytí epitopů zajišťující lepší detekci reaktivity T-lymfocytů a žádná omezení HLA. Antigenní složení z 253 peptidů pokrývající většinu imunogenních oblastí genomu viru umožňuje měření šíře imunity a zajišťuje minimalizaci dopadu bodových mutací. Specifita k SARS-CoV-2 byla posílena odstraněním potenciálně zkříženě reagujících peptidových sekvencí s vysokou homologií k ostatním koronavirům.

PRINCIP TESTU

Imunitní odpověď na infekci SARS-CoV-2 je zprostředkovaná aktivací B-lymfocytů i T-lymfocytů. Jako součást odpovědi T-lymfocytů se T-lymfocyty senzitivují na antigeny SARS-CoV-2 určené k aktivaci CD4 i CD8 efektorových T-lymfocytů, které následně při stimulaci těmito antigeny produkují cytokin IFN- γ ^{41,42}. Test T-SPOT.COVID používá metodu ELISPOT (Enzyme Linked ImmunoSpot) ke zjištění počtu T-lymfocytů senzitivovaných SARS-CoV-2 zachycením IFN- γ v blízkosti T-lymfocytů, kterými byl vylučován⁴³.

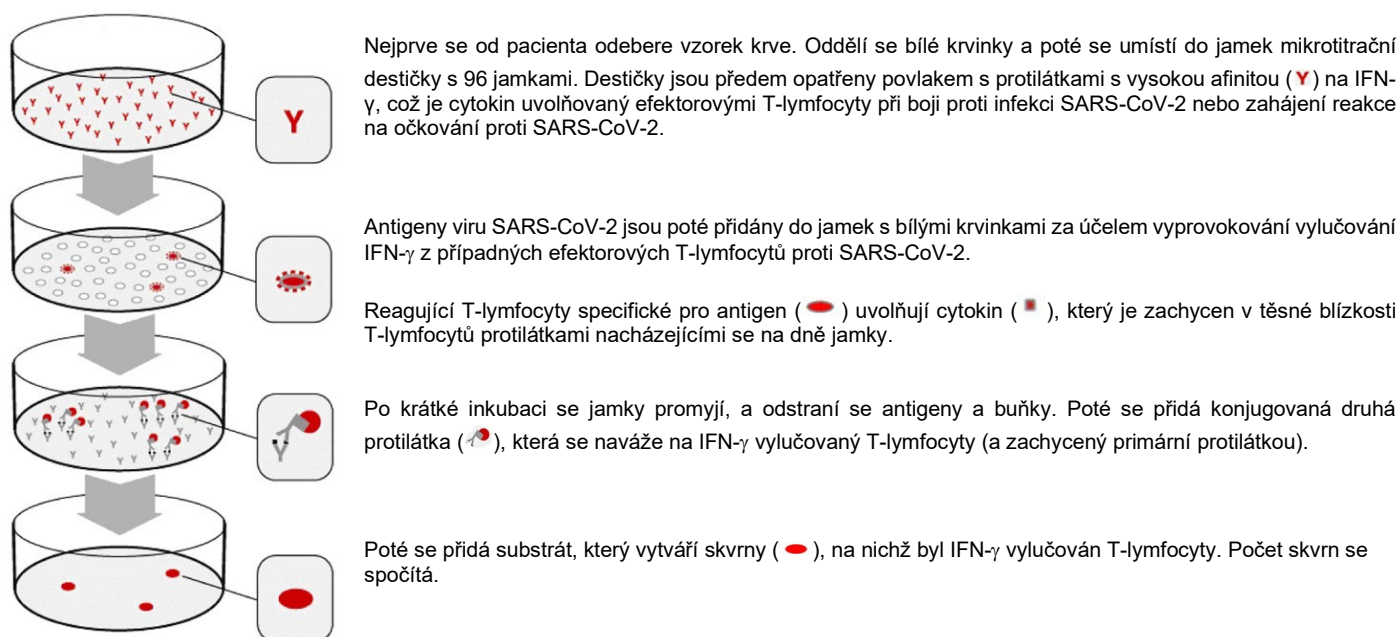
Jednojaderné buňky z periferní krve (PBMC) se separují ze vzorku plné krve, promyjí a poté spočítají, než se přidají k rozboru.

Izolované PBMC (leukocyty) se umístí do mikrotitračních jamek, kde jsou vystaveny kontrole v podobě fytohemaglutininu (PHA) (mitogenní stimulátor indikující funkci buněk), kontrole NIL, nebo dvěma samostatným panelům antigenů SARS-CoV-2 získaných ze spike proteinů, respektive nukleokapsidových proteinů. PBMC jsou inkubovány s antigeny, aby se umožnila stimulace veškerých přítomných senzitivovaných T-lymfocytů.

Vylučovaný cytokin je zachycen specifickými protilátkami na povrchu membrány, což vytvoří základnu jamky a buňky a další nežádoucí materiál se odstraní promytím. Druhá protilátka, konjugovaná s alkalickou fosfatázou a nasměrovaná na odlišný epitop na molekule cytokinu, je přidána a naváže se na cytokin zachycený na povrchu membrány. Veškerý nenavázaný konjugát je odstraněn promytím. Do každé jamky se přidá rozpustný substrát; ten se rozštěpí vázaným enzymem a vytvoří (tmavě modrou) skvrnu nerozpustného precipitátu v místě reakce.

Vyhodnocení počtu získaných skvrn poskytne měření početnosti efektorových T-lymfocytů v periferní krvi s imunitní odpovědí proti SARS-CoV-2. Tyto principy platformy testu T-SPOT jsou popsány na obrázku 1 níže.

Obrázek 1. Principy systému rozboru T-SPOT. Pouze pro ilustrační účely, podrobné pokyny postupu viz část 6, Návod k použití.



3. ČINIDLA A UCHOVÁVÁNÍ

DODANÉ MATERIÁLY

T-SPOT.COVID COV.435/300 (verze s 12 proužky/stripy × 8 jamkami pro více použití) a COV.435/200 obsahuje:

1. 1 mikrotitrační destičku: 96 jamek, dodané jako 12 × 8jamkové jednotlivé proužky v samostatném rámečku (COV.435/300) nebo 12 × 8 jamek na samostatné destičce (COV.435/200), s povlakem monoklonální protilátkou z myši proti cytokinu IFN- γ .
2. 2 zkumavky (každá 0,8 mL) Panel A (COV-A): obsahuje spike antigeny, hovězí sérový albumin a antimikrobiální látky.
3. 2 zkumavky (každá 0,8 mL) Panel B (COV-B): obsahuje nukleokapsidové antigeny, hovězí sérový albumin a antimikrobiální látky.
4. 2 zkumavky (každá 0,8 mL) pozitivní kontrola: obsahuje fytohemaglutinin (PHA), k použití jako kontrola funkce buněk, hovězí sérový albumin a antimikrobiální látky.
5. 1 zkumavka (50 μ L) s 200× koncentrovaným konjugačním činidlem: myši monoklonální protilátka na cytokin IFN- γ konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ALP).
6. 1 lahvička (25 mL) roztoku substrátu: roztok BCIP/NBT^{plus} připravený k použití.
7. Příbalová informace.

Poznámka: Pevné 96jamkové mikrotitrační destičky použitelné v soupravě T-SPOT.COVID COV.435/200 a 8jamkové proužky použitelné v soupravě COV.435/300 jsou určeny k jednorázovému použití. Měly by se použít bezprostředně po otevření a nesmí se používat opakovaně. Nesměšujte komponenty z různých souprav.

UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

Neotevřenou soupravu uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Komponenty soupravy jsou stabilní až do data expirace vytištěného na krabici soupravy, pokud jsou uchovávány a je s nimi manipulováno v doporučených podmínkách. Souprava se nesmí používat po vypršení data expirace uvedeného na štítku soupravy. Pokud má komponenta datum expirace pozdější než je vyznačeno na (vnější) krabici soupravy, neuchovávejte ji a nepoužívejte s jinou soupravou; nepoužívejte jakoukoli komponentu v soupravě po vypršení data expirace vyznačeného na vnější krabici soupravy.

Komponenty otevřené soupravy uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Otevřené komponenty pro test T-SPOT.COVID (COV.435/300) musí být použity do 8 týdnů od otevření a pro T-SPOT.COVID (COV.435/200) do 4 týdnů od otevření, přičemž toto období nesmí končit později, než je datum expirace uvedené na štítku soupravy. **Vyhnete se delšímu vystavení roztoku substrátu světlu.**

POTŘEBNÉ VYBAVENÍ A MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Rámeček destičky s 8jamkovým proužkem (k dispozici od společnosti Oxford Immunotec).
- Mikrobiologický bezpečnostní box třídy II (doporučeno).
- Zkumavky na odběr krve, např. Vacutainer® CPT™ nebo heparinizované zkumavky nebo zkumavky obsahující citrát.
- Činidlo T-Cell *Xtend*® – vzorky plné krve uchovávané při pokojové teplotě (18–25 °C) 0 až 32 hodin po venepunkci, je možné zpracovat pomocí činidla T-Cell *Xtend*.
- Ficoll® (pokud se nepoužívají zkumavky CPT).
- Centrifuga k přípravě PBMC (schopna dosahovat alespoň 1800 RCF (g) a udržovat vzorky při pokojové teplotě (18–25 °C) pokud se k oddělení PBMC používají metody odstředění na základě rozdílných hustot.
- Vybavení a činidla k umožnění počítání PBMC; buď manuálně pomocí trypanové modři (nebo jiného vhodného barviva) a hemocytometru na mikroskopu nebo automaticky pomocí vhodného hematologického analyzátoru.
- Inkubátor se zvlhčováním schopný dosáhnout teploty 37 ± 1 °C s přívodem 5 % CO₂.
- Automatická promývačka mikrotitračních destiček nebo 8kanálová či kroková dávkovací pipeta k manuálnímu promytí destiček.
- Nastavitelné pipety k pokrytí různých objemů 1–1000 μ L (např. čtyři pipety schopné dodat objemy 1–10 μ L, 2–20 μ L, 20–200 μ L a 100–1000 μ L) a sterilní pipetovací špičky.
- Sterilní roztok PBS: např. GIBCO® 1× D-PBS (Life Technologies; katalogové číslo 14040-133).
- Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- Prostředky pro vizualizaci jamek nebo zachycení digitálního snímku jamky, např. stereomikroskop, lupa nebo zobrazovač destiček pro počítání skvrn.
- Sterilní buněčné kultivační médium, např. GIBCO AIM V® (Life Technologies; katalogové číslo 31035-025 v kvalitě pro výzkum). (Poznámka: Médium AIM V je k dispozici od společnosti Oxford Immunotec). **Doporučuje se použití tohoto média bez séra pro inkubační krok.** RPMI 1640 (Invitrogen; katalogové číslo 11875-093) se může použít pouze při prvotních krocích přípravy vzorku. Doporučuje se, aby buněčné kultivační médium bylo uchováváno v náležitých alikvotních podílech a nadbytečný materiál se po použití zlikvidoval. **Buněčné kultivační médium by**

se mělo před použitím s testem T-SPOT.COVID předeřhřát na teplotu 37 °C. Aby se zabránilo problémům s kontaminovaným médiem, může být užitečné rozdělit obsah lahvíček s kultivačním médiem na menší alikvotní podíly.

4. VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Pouze pro profesionální použití.
- Obsluhující pracovníci by měli být před prováděním testu proškoleni ohledně postupu testu a musí chápat návod k použití.
- Před použitím si pečlivě přečtěte pokyny k testu. Odchyly od návodu k použití uvedeného v této příbalové informaci mohou mít za následek chybné výsledky.
- Při manipulaci s materiálem lidského původu je třeba dbát opatrnosti. Veškeré vzorky krve je nutné považovat za potenciální zdroj infekce. Manipulace se vzorky krve a komponenty testu, jejich použití, uchovávání a likvidace musí být v souladu s postupy definovanými v příslušných národních, státních či místních pokynech či předpisech pro ochranu před biologickým nebezpečím.
- Při práci s chemikáliemi je nutné dbát opatrnosti. Veškeré chemikálie je nutné považovat za potenciálně nebezpečné. Materiálový bezpečnostní list pro tuto soupravu je k dispozici u společnosti Oxford Immunotec.
- Nepoužitá činidla a biologické vzorky zlikvidujte v souladu s místními předpisy.
- Do každé jamky musí být přidán správný počet PBMC. V opačném případě může dojít k nesprávné interpretaci výsledku.
- Nesměšujte dohromady komponenty z různých šarží souprav.
- Dodržujte aseptickou techniku, aby se zabránilo kontaminaci činidel, jamek testu, buněčných suspenzí a buněčného kultivačního média.
- Odchyly od uvedených technik pipetování a promývání, dob inkubace a/nebo teplot může ovlivnit skutečné získané výsledky a je nutné se jim vyhnout.
- Krev je nutné odebrat a zpracovat co nejdříve.
- Vzorky krve uchovávejte a přepravujte do laboratoře při pokojové teplotě (18–25 °C). Vzorky plné krve nechladte ani nezmrazujte.
- Nedodržení doporučených inkubačních dob a teplot může vést k nesprávné interpretaci výsledků.
- Prohlubně v membráně způsobené špičkami pipety či promývačky jamek se mohou vyvinout jako artefakty v jamkách, což může způsobit chybné počítání skvrn.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI POUŽITÍ ČINIDLA T-CELL XTEND

- Činidlo T-Cell *Xtend* nebylo vyhodnoceno k jinému použití než s platformou testu T-SPOT.
- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Pouze pro profesionální použití.
- Nepoužívejte činidlo po uplynutí data expirace.
- Při používání tohoto výrobku dodržujte aseptické techniky, aby se zabránilo kontaminaci činidla.
- S činidlem T-Cell *Xtend* nepoužívejte zkumavky CPT (Cell Preparation Tubes, Becton Dickinson) ani zkumavky na odběr krve obsahující jako antikoagulant ethylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA).
- Činidlo T-Cell *Xtend* přidejte k plné krvi před zpracováním vzorku.
- Činidlo T-Cell *Xtend* neředte ani přímo do něj nepřidávejte další komponenty.
- Pro odběr vzorku žilní krve používejte pouze jednorázové nádoby.
- Nesměšujte dohromady různé šarže činidel.

5. ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE S NIMI

Jednotlivé laboratoře musí validovat své postupy pro odběr a separaci PBMC, aby získali dostatečné množství. Doporučuje se následující:

1. Vzorky plné krve by se měly až do okamžiku zpracování uchovávat při teplotě 18–25 °C.
2. Odeberte vzorek krve v souladu s pokyny dodanými s odběrovým prostředkem. Obsah zkumavky je nutné převrátit (8–10krát), aby se zajistilo důkladné promíchání plné krve s antikoagulantem. Odebranou krev uchovávejte při pokojové teplotě (18–25 °C). **Nechladte ani nezmrazujte.**
3. U imunokompetentního pacienta lze obvykle dostatečné množství PBMC pro provedení testu získat ze vzorků žilní krve dle následujících pokynů:

Jedna 8 mL nebo dvě 4 mL zkumavky (CPT) nebo jedna 6 mL zkumavka s heparinem sodným nebo lithným nebo citrátem sodným.

PBMC lze v případě potřeby spojit, aby se získalo dostatečné množství PBMC z více zkumavek krve, které byly

odebrané a zpracované současně.

4. Při používání testu T-SPOT.COVID **bez použití činidla T-Cell Xtend** je nutné vzorky krve zpracovat do 8 hodin od odběru. Vzorky je možné odebrat do zkumavek Vacutainer CPT (Becton Dickinson) s citrátem sodným nebo heparinem sodným s oddělenými PBMC ve zkumavce s použitím pokynů výrobce. Alternativně lze vzorky krve odebrat do zkumavek s heparinem sodným nebo lithným nebo citrátem sodným s tím, že PBMC budou následně odděleny pomocí standardních separačních technik, např. Ficoll-Paque® nebo alternativních metod k vyčištění frakce PBMC. Zkumavky pro odběr vzorků s obsahem EDTA antikoagulantu nesmí být použity.
- a. U zkumavek CPT pro odběr vzorků odstředíte 8 mL zkumavky CPT při 1600 RCF(g) po dobu 28 minut nebo 4 mL zkumavky CPT při 1800 RCF (g) po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18–25 °C).
- b. Pokud používáte médium Ficoll-Paque Plus, zředte krev stejným objemem média RPMI 1640 (1 díl krve na 1 díl RPMI). Zředěnou krev opatrně uložte ve vrstvě do Ficoll-Paque Plus (2–3 díly zředěné krve na 1 díl Ficoll-Paque) a odstředíte při 1000 RCF (g) po dobu 22 minut při pokojové teplotě (18–25 °C).

Poznámka: Před použitím zkumavek CPT nebo média Ficoll-Paque si přečtěte pokyny výrobce. Ujistěte se, že jsou zkumavky odstředovány při správných otáčkách. Otáčky uvedené výše jsou udávány v g nebo relativní odstředivé síle (RCF). Nejde o stejnou veličinu jako otáčky za minutu (RPM). Pokud centrifuga umožňuje měření pouze v otáčkách za minutu (RPM), převedte doporučenou hodnotu RCF změřením poloměru rotoru a použitím převodní tabulky. Zkumavky Leucosep (Greiner Bio-One) šetří čas díky separaci na základě hustoty. Zkumavky obsahují porézní bariéru, která umožňuje přenést vzorek krve do separačního média na základě hustoty, čímž se odstraní nutnost opatrného vytvoření vrstev vzorku.

5. Při používání testu T-SPOT.COVID **s použitím činidla T-Cell Xtend** lze vzorky krve odebrat do zkumavek s heparinem sodným nebo lithným nebo citrátem sodným. Zkumavky Vacutainer CPT a zkumavky pro odběr vzorků s obsahem antikoagulantu EDTA nesmí být použity. Činidlo T-Cell Xtend je nutné přidat před separací PBMC s použitím standardních separačních technik. Vzorky plné krve by se měly uchovávat při pokojové teplotě (18–25 °C) po dobu 0 až 32 hodin po venepunkci s použitím činidla T-Cell Xtend.

V případě použití činidla T-Cell Xtend bezprostředně před separací buněk odstraňte víčko ze zkumavky pro odběr krve a přidejte 25 µL roztoku činidla T-Cell Xtend na jeden mL vzorku krve. Opět nasadte víčko a opatrně zkumavku pro odběr krve 8 až 10krát převratte, aby se obsah promíchal. Inkubujte po dobu 20 ± 5 minut při pokojové teplotě (18–25 °C) a poté zpracujte za účelem izolace vrstvy PBMC pomocí centrifugace Ficoll dle hustoty, jak je uvedeno v částech 4b, a 6–9. Další podrobnosti naleznete v příbalové informaci činidla T-Cell Xtend.

6. Pomocí pipety odeberte bílou zakalenou vrstvu PBMC a přeneste do 15 mL centrifugační zkumavky s kónickým dnem. Doplněte objem na 10 mL pomocí buněčného kultivačního média. **Buněčné kultivační médium pro promývací kroky by mělo být před kontaktem s PBMC předeřháto na teplotu 37 °C.**

Je známo, že cirkulační faktory ve vzorcích plné krve narušují testy interferonu gamma z plné krve, např. na revmatoidní faktor, heterofilní protilátky a preexistující množství interferonu gamma. Separace a promytí PBMC umožňuje odstranit tyto potenciálně interferující látky před provedením testu.

Poznámka: Po centrifugaci by se PBMC měly extrahovat pomocí pipetovací špičky s velkým otvorem (např. 1 mL), ponořením špičky pipety do vrstvy PBMC. Tuto kalnou vrstvu je nutné opatrně nasát a přenést do sterilní kónické zkumavky k provedení kroků promytí. Ujistěte se, že odeberete celou zakalenou vrstvu PBMC. Je lepší odebrat i trochu vrstvy plazmy než ponechat zbývající PBMC ve zkumavce na odběr krve. V případě použití CPT se však vyhněte přenosu separačního gelu, který by mohl ucpat špičku. Pokud k tomu dojde, přeneste buňky, které jsou již odebrány ve špičce, do centrifugační zkumavky a poté použijte novou špičku k přenosu zbývajících PBMC. K promytí buněk během kroků 3–5 lze použít různá média; úspěšně bylo používáno jak AIM V, tak RPMI 1640 a tato média jsou doporučena.

7. Odstředíte 7 minut při 600 RCF (g). Odlijte supernatant a resuspendujte peletu v 1 mL média.
8. Doplněte objem na 10 mL čerstvým médiem a odstředíte 7 minut při 350 RCF (g).
9. Odlijte supernatant a resuspendujte peletu v 0,7 mL buněčného kultivačního média. **Médium AIM V bez séra bylo úspěšně používáno a doporučujeme jej.**

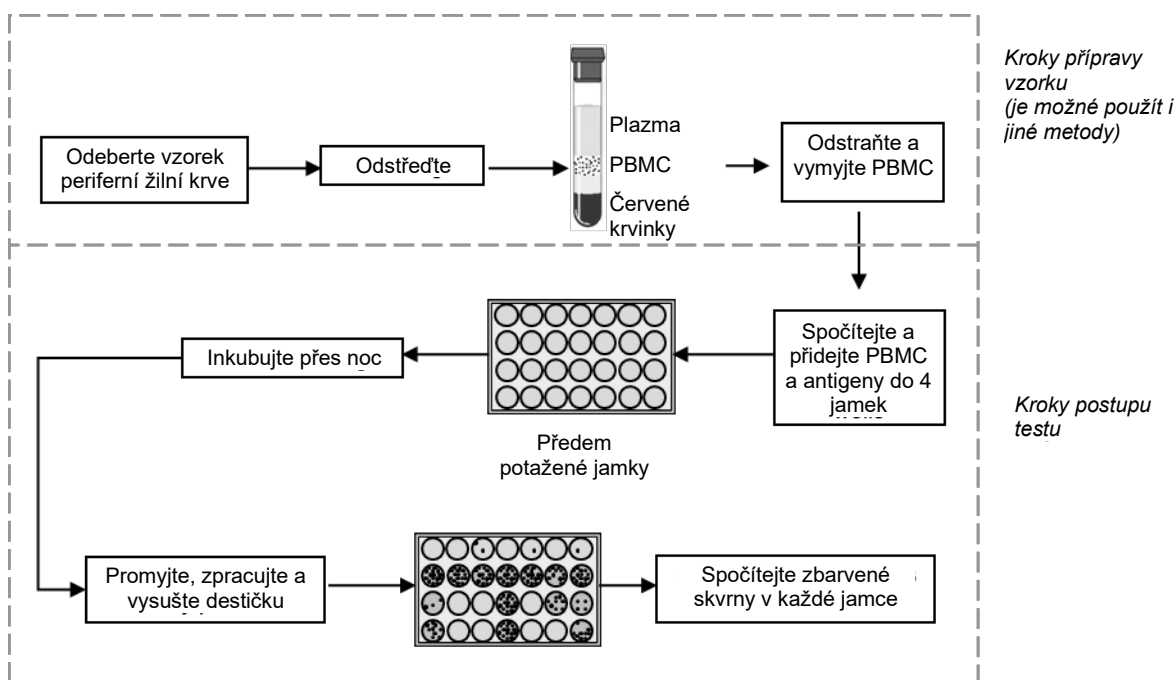
Poznámka: Kroky 2–7 by se měly provádět v mikrobiologickém bezpečnostním boxu třídy II za účelem ochrany uživatele a zabránění kontaminace vzorků.

6. NÁVOD K POUŽITÍ

Při plně naplněné destičce testu T-SPOT.COVID lze zpracovat 24 vzorků od pacientů. Test se obvykle provádí odpoledne jeden den a ráno následujícího dne, aby bylo možné provést inkubační krok po dobu 16–20 hodin přes noc. V případě, že je použit tento harmonogram, pak se odpoledne 1. dne se zpracují vzorky krve k přípravě PBMC pro test a zahájí se test přidáním PBMC a antigenů na testovací destičku, která se umístí do inkubátoru. 2. dne se destička vyjme z inkubátoru a provedou se vývojové kroky a interpretace výsledků destičky. Doba ke zpracování plné destičky je 1. den přibližně 3 hodiny (skutečná manuální práce bude kratší vzhledem k odstředovacím krokům) a 30 minut práce

(bez zahrnutí 1 hodiny inkubace sekundárních protilátek a doby na schnutí destičky) 2. den. Postup provedení testu je shrnut na obrázku 2 a dále popsán níže:

Obrázek 2. Schéma zobrazující hlavní kroky potřebné k provedení testu T-SPOT.COVID. Mějte na paměti, že na obrázku není zobrazeno všech 96 jamek na destičkách.



PŘÍPRAVA ČINIDEL

1. Zkumavky se spike antigeny SARS-CoV-2 (COV A), nukleokapsidovými antigeny SARS-CoV-2 (COV B) a pozitivní kontrolou se dodávají připravené k použití.
2. Připravte ředění 1:200 pracovního roztoku konjugačního činidla. Vypočítejte objem potřebného pracovního roztoku konjugačního činidla. Konjugační činidlo lze připravit na potřebnou pracovní koncentraci a uchovat při teplotě 2–8 °C až po dobu šesti týdnů před použitím testu.

Poznámka: Pro každý vzorek pacienta se použijí 4 jamky. Do každé jamky bude přidáno 50 µL zředěného konjugačního činidla. Pro jeden pásek (2 vzorky, 8 jamek) tedy připravte 500 µL roztoku pracovní koncentrace přidáním 2,5 µL koncentrovaného konjugačního činidla do 497,5 µL PBS. Pro jednu 96jamkovou destičku (24 vzorků) připravte 5 mL roztoku pracovní koncentrace přidáním 25 µL koncentrovaného konjugačního činidla do 497,5 µL PBS.

3. Substrátový roztok se dodává připravený k použití. Před vyjmutím destičky z inkubátoru (2. den) vytáhněte substrátový roztok z místa jeho uchování a ponechte jej ohřát na pokojovou teplotu.

POČÍTÁNÍ BUNĚK A ŘEDĚNÍ

Test T-SPOT.COVID vyžaduje $250\,000 \pm 50\,000$ PBMC na jamku. Pro každý vzorek pacienta jsou zapotřebí celkem čtyři jamky; na každého pacienta je tedy zapotřebí 1×10^6 PBMC. Počet T-lymfocytů proti SARS-CoV-2 ve vzorku je normalizován na fixní počet PBMC.

1. Proveďte počítání PBMC. Buňky lze spočítat několika různými metodami, včetně manuálního počítání pomocí trypanové modři (nebo jiného vhodného barviva) a hemocytometru, nebo pomocí automatizovaného hematologického analyzátoru.
2. Ve stručnosti, pro manuální počítání pomocí Neubauerova hemocytometru s použitím trypanové modři, přidejte 10 µL konečné buněčné suspenze do 40 µL 0,4 % (obj.) roztoku trypanové modři. Umístěte příslušný alikvotní podíl do hemocytometru a spočítejte buňky na mřížce. U dalších typů hemocytometrů a automatických zařízení se řiďte pokyny výrobce.

Poznámka: Je nutné dbát na to, aby byla buněčná suspenze dobře promíchána bezprostředně před rozdělením na alikvotní podíly pro účely počítání. Buňky by se mohly usadit na dně zkumavky, a to by mohlo vést k nesprávné interpretaci skutečného počtu buněk. Promíchání lze provést buď jemným zatočením zkumavkou v ruce, nebo opatrným promícháním suspenze několikerým nasátím a vypuštěním pipetou.

3. Vypočítejte koncentraci PBMC přítomných v zásobní buněčné suspenzi.

Poznámka: Ujistěte se, že je výpočet správný pro použitý systém počítání buněk, protože použití nedostatečného či nadměrného množství buněk může vést k nesprávné interpretaci výsledku.

4. Připravte 500 µl konečné buněčné suspenze v koncentraci $2,5 \times 10^5$ buněk/100 µL (což dává celkem $1,25 \times 10^6$ PBMC).

Poznámka: Před odebráním alikvotního podílu k ředění se ujistěte, že jsou buňky dobře promíchány tak, že suspenzi opatrně několikrát nasajete a vypustíte pipetou. Počty PBMC mezi 200 000 a 300 000 na jamku dávaly konzistentní výsledky testu T-SPOT.

PŘÍPRAVA DESTIČKY A INKUBACE

Test T-SPOT.COVID vyžaduje použití čtyř jamek pro každý vzorek pacienta. S každým jednotlivým vzorkem je nutné zpracovat kontrolu Nil a pozitivní kontrolu. Doporučuje se, aby byly vzorky uspořádány na destičce svísele dle obrázku níže.

- Kontrola Nil
- Panel A (COV-A) (spike)
- Panel B (COV-B) (nukleokapsid)
- Pozitivní

Na každé 96jamkové destičce lze zpracovat až 24 vzorků pacientů. Použijte potřebné množství destiček pro množství vzorků, které chcete zpracovat. U soupravy COV.435/300; lze na každém pásku zpracovat 2 vzorky. Použijte pouze potřebný počet pásků. Zbývající pásky uzavřete do fóliového sáčku spolu se silikagelem. Zbývající pásky se musí použít do osmi týdnů od prvního otevření sáčku za předpokladu, že jsou během této doby uchovávány při teplotě 2–8 °C.

T-SPOT.COVID je test k měření funkce T-lymfocytů; žádné standardní křivky nejsou zapotřebí. Pro každého pacienta budou tedy zapotřebí pouze 4 jamky, které se použijí pro každý vzorek. Doporučené uspořádání destičky pro 24 vzorků je znázorněno níže:

Řada	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

Klíč: N = kontrola Nil, A = Panel A, B = Panel B, M = mitogenová pozitivní kontrola

1. U soupravy COV.435/300 vyjměte potřebné předem potažené 8jamkové proužky z obalu, nasadte je na rámeček destičky a ponechte ohřát na pokojovou teplotu. Vyjměte pouze požadovaný počet proužků, znovu uzavřete případné zbývající nepoužité pásky a sáček s vysoušedlem vložte do vnějšího fóliového obalu a vraťte do místa uchovávání při teplotě 2–8 °C.

Poznámka: Proužky, které budete používat, zacvakněte do prázdného rámečku destičky vybaveného spodním krytem a víčkem. Rámečky, kryty a víčka je zapotřebí uchovat a znovu použít.

2. Přidejte panely a kontroly;

- Přidejte 50 µL buněčného kultivačního média AIM-V do každé jamky s kontrolou Nil.
- Přidejte 50 µL roztoku COV A do každé požadované jamky.
- Přidejte 50 µL roztoku COV B do každé požadované jamky.
- Přidejte 50 µL roztoku pozitivní kontroly do každé jamky ke kontrole funkce buněk.

Špička pipety se nesmí dotknout membrány. Prohlubně v membráně způsobené špičkami pipety mohou způsobit artefakty v jamkách.

3. Do každé ze 4 jamek použitých pro vzorek pacienta přidejte 100 µL konečné suspenze buněk pacienta (obsahující 250 000 PBMC). Pro přidání buněk každého jednotlivého pacienta použijte novou špičku, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci mezi jamkami. Pokud jsou pipetovací špičky použity pro více jamek, dbejte, abyste nekontaminovali sousední jamky při přenášení tekutiny z jedné jamky do druhé.

Poznámka: Před odebráním každého 100 µL alikvotního podílu zajistěte náležitě promíchání (jako při krocích pro Počítání buněk a ředění).

4. Inkubujte destičku s nasazeným víčkem v inkubátoru se zvlhčovačem při teplotě 37 °C s přívodem 5 % CO₂ po dobu 16–20 hodin. Jakmile je destička v inkubátoru, nenarušujte průběh inkubace. Neumísťujte destičky na sebe, protože to může vést k nerovnoměrné distribuci teploty a větrání.

Poznámka: Inkubátor s přívodem CO₂ musí být vybaven zvlhčováním. Zkontrolujte, zda je v nádobce na vodu dostatečné množství vody k zajištění zvlhčeného ovzduší.

VÝVOJ SKVRN A POČÍTÁNÍ

1. Vyjměte destičku z inkubátoru a zlikvidujte buněčné kultivační médium setřesením obsahu do příslušné nádoby.

Poznámka: V tuto chvíli vyjměte substrátový roztok ze soupravy a ponechte ohřát na pokojovou teplotu.

2. Do každé jamky přidejte 200 µL roztoku PBS. **Nepoužívejte PBS obsahující Tween® nebo jiné detergenty. Mohlo by to způsobit vysoký počet buněk na pozadí.**

Poznámka: Použijte čerstvě připravený sterilní PBS.

3. Roztok PBS zlikvidujte. Zopakujte promývání jamky ještě 3krát pomocí čerstvého roztoku PBS pro každé promytí. Pro promývací kroky lze použít automatickou promývačku.

Poznámka: Pro promývání je možné použít vícekanálovou pipetu nebo promývačku destiček. Po každém promytí zlikvidujte PBS do vhodné nádoby. Pro odstranění PBS nepoužívejte pipety, protože hrozí nebezpečí poškození membrány. Pokud použijete promývačku destiček, ujistěte se, že je rozdělovač nastaven tak, aby se špičky nedotýkaly membrány. Po konečném promytí vyklepněte destičku na utěrku nepouštějící vlas, aby se zajistilo odstranění veškerého PBS – jeho případné zbytky by dále naředily konjugační činidlo.

4. Pokud již není připraveno během kroku přípravy činidel; zředte koncentrované konjugační činidlo 200× v PBS, abyste získali roztok o pracovní koncentraci.

5. Přidejte 50 µL roztoku konjugačního činidla v pracovní koncentraci do každé jamky a inkubujte při teplotě 2–8 °C po dobu 1 hodiny.

Poznámka: Doporučuje se použít vícekanálovou pipetu nebo krokovací pipetu. Je nutné dbát na to, že bude konjugační činidlo přidáno do každé jamky, protože roztok je čirý a bezbarvý – může být proto obtížné zjistit pohledem, do kterých jamek již byl přidán.

6. Konjugát zlikvidujte a proveďte čtyři promytí PBS dle popisu v krocích 2 a 3 výše.

7. Přidejte 50 µL substrátového roztoku do každé jamky a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 7 minut.

8. Destičku důkladně promyjte destilovanou nebo deionizovanou vodou, aby se zastavila detekční reakce.

9. Ponechte destičku vyschnout postavením na dobře větrané místo nebo do pece o teplotě do 37 °C.

Poznámka: Skvrny mohou být lépe viditelné po vyschnutí destičky; proto se před zjištěním výsledků ujistěte, že je destička dobře vysušena. Ponechte ji schnout 4 hodiny při teplotě 37 °C nebo alespoň 16 hodin při pokojové teplotě.

10. Spočítejte a zaznamenejte počet výrazných tmavě modrých skvrn na membráně každé jamky. Ke stanovení, zda je vzorek pacienta „Reaktivní“ nebo „Nereaktivní“ použijte Interpretaci výsledků a kritéria testu (viz níže). **skvrny vytvořené v důsledku stimulace antigenů by měly vypadat jako velké, okrouhlé a tmavé skvrny (skvrny). Často lze pozorovat efekt postupného zvýraznění s tmavším středem a nevýraznějšími okraji. Nespecifické artefakty, které se mohou objevit, jsou menší, méně výrazné a nepravidelného tvaru.**

Poznámka: Skvrny lze spočítat přímo na jamce pomocí lupy nebo stereomikroskopu či na digitálním snímku zachyceném na mikroskopu nebo zobrazovači destiček.

Po vyvinutí zůstávají dokončené destičky testu stabilní a není je nutné interpretovat okamžitě. Destičky je možné archivovat pro zpětnou kontrolu kvality nebo opětovné vyšetření po dobu až 12 měsíců, pokud jsou uchovávány v suchém a tmavém prostředí při pokojové teplotě.

KONTROLA KVALITY

U typického výsledku se očekává, že bude mít je několik skvrn nebo žádné skvrny u kontroly Nil a 20 nebo více skvrn u pozitivní kontroly (typické výsledky z americké klinické studie jsou znázorněny na obrázcích 4a a 4b).

Pokud počet skvrn u kontroly Nil překročí hodnotu 10, měla by být považována za „Neplatnou“.

Počet skvrn pozitivní kontroly funkce buněk měl typicky být ≥ 20 nebo ukazovat saturaci (příliš velké množství skvrn ke spočítání). Malý podíl pacientů může mít T-lymfocyty, které vykazují pouze omezenou odpověď na PHA¹. Pokud je počet skvrn pozitivní kontroly < 20 , měla by být považována za „Neplatnou“, pokud buď Panel A nebo Panel B nejsou „reaktivní“ či „hraniční“ (nejednoznačné), jak je popsáno v části Interpretace výsledků a kritéria testu (viz níže); v takovém případě bude výsledek platný.

V případě, že jsou výsledky neplatné, měly by se uvádět jako „Neplatný“ a doporučuje se odebrat další vzorek a u dané osoby test zopakovat.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ A KRITÉRIA TESTU

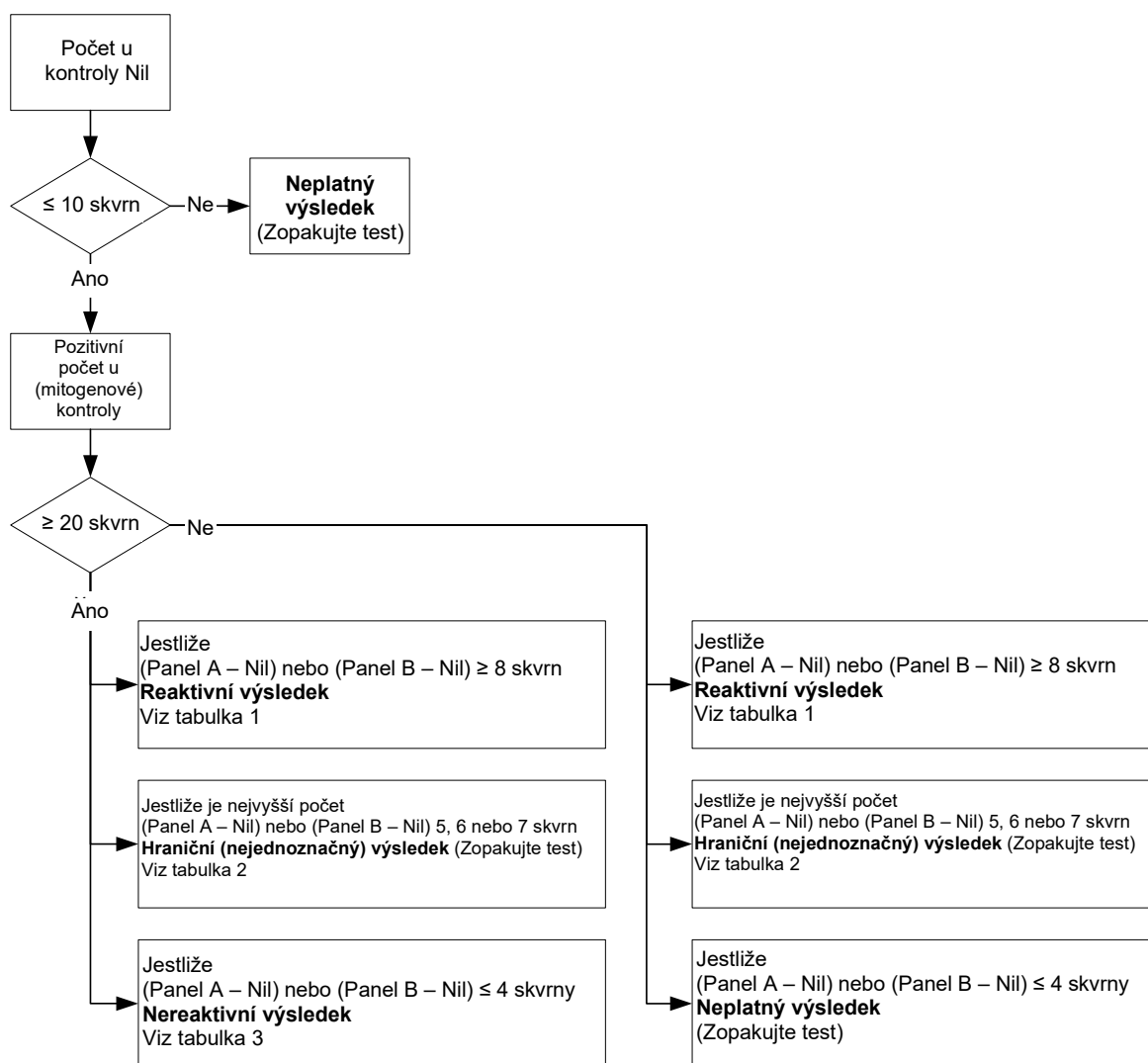
Před použitím následujících kritérií si přečtete část Kontrola kvality.

Výsledky testu T-SPOT.COVID se interpretují odečtením počtu skvrn v jamce s kontrolou Nil od počtu skvrn v každém z panelů podle následujícího algoritmu:

- Výsledek testu je reaktivní v případě, že (Panel A – Nil) a/nebo (Panel B – Nil) ≥ 8 skvrn.
 - Výsledek testu je nereaktivní v případě, že (Panel A – Nil) a (Panel B – Nil) ≤ 4 skvrny. To zahrnuje i hodnoty menší než nula.
 - Výsledky, u nichž je nejvyšší počet skvrn pro Panel A nebo Panel B takový, že počet skvrn (Panel minus Nil) je 5, 6 nebo 7 skvrn, by měl být považován za hraniční (nejednoznačný) a doporučuje se opakované testování odběrem dalšího vzorku od pacienta.
 - Pokud je výsledek nadále hraniční (nejednoznačný) i při opakovaném testování s dalším vzorkem, měly by se použít další diagnostické testy a/nebo epidemiologické informace, které by pomohly stanovit adaptivní nebo buňkami zprostředkovanou imunitní odpověď buď na současnou či předchozí infekci nebo očkování proti SARS-CoV-2.
 - **„Reaktivní“ výsledek označuje, že vzorek obsahuje efektorové T-lymfocyty senzitizedované na SARS-CoV-2. Přítomnost senzibilizovaných T-lymfocytů může být důsledkem vakcinace nebo infekce SARS-CoV-2.**
- „Nereaktivní“ výsledek označuje, že nebyly detekovány žádné efektorové T-lymfocyty senzitizedované na SARS-CoV-2.**

Interpretační algoritmus je popsán v následujícím vývojovém diagramu (obrázek 3) a tabulkách 1–3. Tento algoritmus také zahrnuje kritéria kontroly kvality.

Obrázek 3. Vývojový diagram algoritmu.



Tabulka 1. Reaktivní interpretace: (Panel A mínus Nil) nebo (Panel B mínus Nil) ≥ 8 skvrn.

Kontrola Nil - počet v jamce	Buď Panel A nebo Panel B má následující počet skvrn [†]	Interpretace výsledku
0	≥ 8	Reaktivní
1	≥ 9	Reaktivní
2	≥ 10	Reaktivní
3	≥ 11	Reaktivní
4	≥ 12	Reaktivní
5	≥ 13	Reaktivní
6	≥ 14	Reaktivní
7	≥ 15	Reaktivní
8	≥ 16	Reaktivní
9	≥ 17	Reaktivní
10	≥ 18	Reaktivní
>10 skvrn	nevztahuje se	Neplatný**

[†]Poznámka: Ke stanovení výsledku testu je nutné použít nejvyšší počet skvrn Panel - Nil.

Tabulka 2. Hraniční (nejednoznačná) interpretace: Nejvyšší (Panel A mínus Nil) nebo (Panel B mínus Nil) je 5, 6 nebo 7 skvrn.

Kontrola Nil - počet v jamce	Nejvyšší počet pro Panel A nebo Panel B má následující počet skvrn	Interpretace výsledku
0	5, 6 nebo 7	Hraniční (nejednoznačný)*
1	6, 7 nebo 8	Hraniční (nejednoznačný)*
2	7, 8 nebo 9	Hraniční (nejednoznačný)*
3	8, 9 nebo 10	Hraniční (nejednoznačný)*
4	9, 10 nebo 11	Hraniční (nejednoznačný)*
5	10, 11 nebo 12	Hraniční (nejednoznačný)*
6	11, 12 nebo 13	Hraniční (nejednoznačný)*
7	12, 13 nebo 14	Hraniční (nejednoznačný)*
8	13, 14 nebo 15	Hraniční (nejednoznačný)*
9	14, 15 nebo 16	Hraniční (nejednoznačný)*
10	15, 16 nebo 17	Hraniční (nejednoznačný)*
>10 skvrn	nevztahuje se	Neplatný**

Tabulka 3. Negativní interpretace: (Panel A mínus Nil) i (Panel B mínus Nil) ≤ 4 skvrny.

Kontrola Nil - počet v jamce	Panel A i Panel B má následující počet skvrn	Interpretace výsledku
0	≤ 4	Nereaktivní
1	≤ 5	Nereaktivní
2	≤ 6	Nereaktivní
3	≤ 7	Nereaktivní
4	≤ 8	Nereaktivní
5	≤ 9	Nereaktivní
6	≤ 10	Nereaktivní
7	≤ 11	Nereaktivní
8	≤ 12	Nereaktivní
9	≤ 13	Nereaktivní
10	≤ 14	Nereaktivní
>10 skvrn	nevztahuje se	Neplatný**

* Výsledky, u nichž je nejvyšší počet skvrn pro Panel A nebo Panel B takový, že počet skvrn (Panel mínus Nil) je 5, 6 nebo 7 skvrn, by měl být považován za hraniční (nejednoznačný) a doporučuje se opakované testování odběrem dalšího vzorku od pacienta.

** V případě, že jsou výsledky neplatné, měly by se uvádět jako „Neplatný“ a doporučuje se odebrat další vzorek a u dané osoby test zopakovat.

7. OMEZENÍ

- Odchytky od návodu k použití uvedeného v této příbalové informaci mohou mít za následek chybné výsledky.
- Nesprávná funkčnost testu může být příčinou falešně reaktivních nebo falešně nereaktivních odpovědí.
- Reaktivní výsledek může být způsoben infekcí nebo předchozí infekcí SARS-CoV-2 nebo očkováním proti SARS-CoV-2.
- Falešný nereaktivní výsledek může být způsoben nesprávným odběrem vzorků krve nebo nesprávným zacházením se vzorkem, což má vliv na funkci lymfocytů.
- Nereaktivní výsledek u COV-A i COV-B nevylučuje možnost, že se u jedince po infekci nebo očkování vyvinula adaptivní imunitní odpověď.
- Funkčnost testu T-SPOT.COVID, s použitím nebo bez použití činidla T-Cell Xtend, nebyla dostatečně vyhodnocena se vzorky od osob mladších 18 let, u těhotných žen a u pacientů s hemofilii.
- Falešně reaktivní výsledek může být získán u testu T-SPOT.COVID v případě testování u subjektů dříve vystavených SARS-CoV-1 a dalších podobných koronavirů. Pokud existuje podezření na tyto infekce, je zapotřebí použít alternativní testy. Tato souprava byla testována pomocí v té době dostupných vzorků. Funkčnost s novými mutacemi SARS-CoV-2 dosud nebyla vyhodnocena.

- Výsledky zjištěné pomocí testu T-SPOT.COVID musí být použity společně s posouzením epidemiologické anamnézy každé osoby, aktuálního zdravotního stavu a výsledků dalších diagnostických vyhodnocení.
- Nereaktivní výsledek testu nevyklučuje možnost expozice či infekce virem SARS-CoV-2 nebo úspěšného očkování proti němu. U pacientů, kteří byli nedávno očkováni nebo v kontaktu s osobami infikovanými SARS-CoV-2, vykazujících nereaktivní výsledek testu T-SPOT.COVID, by mělo být zvaženo opakované testování během 2 týdnů, pokud další relevantní klinické příznaky ukazují na možnou infekci.
- Použití chlazených a zmrazených vzorků se u testu T-SPOT.COVID nedoporučuje.

OMEZENÍ TÝKAJÍCÍ SE POUŽITÍ ČINIDLA T-CELL XTEND

1. Činidlo T-Cell *Xtend* nebylo vyhodnoceno k jinému použití než s testy T-SPOT.
2. Vzorky plné krve nechlaďte ani nezmrazujte. Vzorky krve uchovávejte a přepravujte do laboratoře při teplotě 18–25 °C.
3. Jakékoli odchylky od doporučených postupů pro pipetování, promývací techniky, doby a/nebo teploty inkubace mohou ovlivnit výsledky testu.

8. FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Prahová hodnota testu T-SPOT.COVID byla předem stanovena během vývoje s použitím analýzy křivky ROC (Receiver Operating Characteristic). Bylo zjištěno, že maximální rozlišení mezi osobami s pozitivním výsledkem potvrzeným PCR a osobami s nízkým rizikem infekce, činí 6 skvrn. Kromě toho byla stanovena hraniční oblast 5–7 skvrn, aby se pokryly odchylky testu a neurčitost v okolí prahové hodnoty. Nedávné důkazy naznačují, že stejná hranice je vhodná k rozlišení mezi očkovánými a neočkovánými jedinci⁴⁴.

ANALYTICKÉ FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Interference heterofilními protilátkami nebo vlastním IFN- γ ve vzorku krve je minimalizována oddělením a promytím frakce PBMC z plné krve. Tím se odstraní množství IFN- γ na pozadí, dalších interferujících součástí plazmy, hemoglobinu a případných heterofilních protilátek.

Očekává se, že leukocyty budou produkovat kromě IFN- γ i další cytokiny, včetně IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF α , IFN- α a IFN- β . U těchto byla prozkoumána zkřížená reaktivita s dvojicí protilátek použitých v testu T-SPOT. Výsledky prokázaly, že dvojice protilátek použitých v testu T-SPOT nevykazovala zkříženou reaktivitu s dalšími cytokiny.

Variabilita mezi testy byla analyzována porovnáním cyklu testu T-SPOT na stejné destičce se stejným pracovníkem. Tři pracovníci provedli experimenty na devíti destičkách, jejichž výsledky byly v reprezentativním rozmezí procent variačního koeficientu (CV) inherentní odchylky v testu. Rozmezí získané pro vysoké počty skvrn ($210,4 \pm 11,6$) bylo mezi 2,2 % až 7,7 % CV (průměrné % CV = 4,4), střední počty skvrn ($71,2 \pm 8,5$) daly rozmezí 6,6 % až 16,5 % CV (průměrné % CV = 11,0 %), zatímco počet skvrn blízký se prahové hodnotě (průměrný počet skvrn = $5,7 \pm 1,3$) poskytl průměrné % CV = 22,0 %.

Byly shromážděny údaje o přesnosti v rámci testu, kdy byly použity tři šarže souprav třemi různými pracovníky, kteří provedli šestkrát testy se třemi stejnými vzorky. Variační koeficient změřený u těchto tří vzorků, tří pracovníků a tří šarží činil 3,7 % u vzorků dávajících průměrný počet skvrn 210,4. U počtu skvrn blízkých se prahové hodnotě testu T-SPOT.COVID činila odchylka mezi testy 25,0 %. U středních úrovní počtu skvrn byla průměrná hodnota % CV 13,9 %. Výsledky % CV byly konzistentní pro každou testovanou šarži.

Reprodukovatelnost mezi pracovníky byla vyhodnocena s použitím tří pracovníků a jedné destičky z každé ze tří šarží testu. Pozorovaná odchylka mezi pracovníky byla 3,6–5,8 % CV.

CHARAKTERISTIKY KLINICKÉ FUNKČNOSTI

Byla provedena studie s použitím předem stanovené prahové hodnoty 6 skvrn (data jsou evidována), k vyhodnocení klinické funkčnosti testu T-SPOT.COVID u infekce SARS-CoV-2 potvrzené pomocí PCR (s využitím asymptomatických i symptomatických subjektů) za účelem posouzení funkčnosti testu u osob s akutní infekcí nebo konvalescentních subjektů. Dále byla funkčnost testu vyhodnocena u subjektů účastnících se studie, u nichž bylo relativní riziko infekce považováno za nízké. Všechny vzorky byly testovány pomocí sérologického testu anti-N IgG (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG)) jako komparátoru pro test T-SPOT.COVID.

Do studie bylo zařazeno celkem 281 subjektů, kteří splnili kritéria pro zařazení. Z těchto bylo 169 subjektů zařazeno do skupiny s infekcí SARS-CoV-2 potvrzenou PCR testem (pozitivní kohorta). Z těchto byl jeden subjekt vyloučen v důsledku nízkého buněčného zotavení, a 17 v důsledku chybějících výsledků sérologie, což znamenalo, že zbylo 151 subjektů k analýze.

Celkem 112 subjektů bylo zařazeno do kohorty s nízkým rizikem, přičemž z 4 nebyly k dispozici potvrzovací sérologické výsledky a 6 dalších subjektů bylo vyloučeno po pozitivním potvrzovacím sérologickém testu. Zbylo tedy 102 subjektů, z nichž jeden vzorek byl vyloučen z důvodu nízkého buněčného zotavení, a jeden z důvodů technických problémů

s testem T-SPOT.COVID. Do analýzy tak bylo zahrnuto 100 subjektů s nízkým rizikem.

Demografické údaje subjektů v kohortě s PCR potvrzenou infekcí a v kohortě s nízkým rizikem jsou shrnuty níže:

Kohorta	PCR potvrzená infekce SARS-CoV-2	Nízké relativní riziko infekce
Počet subjektů	168	100
Průměrný věk (roky) (SD)	50,5 (15,2) v rozmezí 19–83	54,7 (15,7) v rozmezí 18–87
% mužů	38,7 % (65/168)	36,0 % (36/100)
Průměrná doba od prvního pozitivního PCR testu (dny) (rozmezí)	83,4 (0,249)	Nevztahuje se
% symptomatických	95,8 % (161/168)	Nevztahuje se

SHODA POZITIVNÍCH VZORKŮ MEZI OSOBAMI S INFEKCI POTVRZENOU PCR

151 pacientů, identifikovaných předchozími PCR testy jako pozitivní na SARS-CoV-2, bylo vyhodnoceno pomocí testu T-SPOT.COVID a sérologického testu anti-N IgG. Časový bod od prvního záznamu výsledku PCR testu byl od 2 dní do 249 dní. V této kohortě nebyly žádné výsledky testu T-SPOT.COVID neplatné.

Tabulka 4. Procentní shoda pozitivních vzorků s PCR v průběhu času zahrnovala všechny výsledky z testu T-SPOT.COVID i sérologického testu anti-N IgG s použitím prahové hodnoty reaktivity 6 skvrn a ignorováním hraniční oblasti (hraniční hodnoty zahrnuty).

Počet dní od prvního pozitivního PCR testu	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Procentní shoda pozitivních vzorků	95 % CI	Procentní shoda pozitivních vzorků	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 %
Celkem ≤ 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)	–
Celkem > 60	80,7 % (46/57)	68,1–90,0 %	38,6 % (22/57)	26,0–52,4 %

Tabulka 5. Procentní shoda pozitivních vzorků s PCR v průběhu času zahrnovala všechny výsledky z testu T-SPOT.COVID i anti-N IgG sérologického testu, s využitím pouze reaktivních a nereaktivních výsledků pro test T-SPOT.COVID (tj. s vyloučením výsledků v hraniční oblasti).

Počet dní od prvního pozitivního PCR testu	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Procentní shoda pozitivních vzorků	95 % CI	Procentní shoda pozitivních vzorků	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 %
Celkem ≤ 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)	–
Celkem > 60	83,3 % (40/48)	69,8–92,5 %	41,7 % (20/48)	27,6–56,8 %

Tyto údaje ukazují procentní shodu pozitivních vzorků mezi testem T-SPOT.COVID a PCR testem 92,6 % (96,6 % s vyloučením hraničních výsledků) až do 60 dní po pozitivním výsledku PCR testu. Po tomto časovém bodě procentní

shoda mírně klesá. Pro časové body nad 60 dní od výsledku PCR testu byla procentní shoda pozitivních vzorků 80,7 % (83,3 % s použitím pouze určitelných výsledků).

Celkově tyto údaje ukazují procentní shodu pozitivních vzorků mezi sérologickým testem anti-N IgG a PCR testem 74,5 % až do 60 dní po pozitivním výsledku PCR testu. Po tomto časovém bodě procentní shoda klesá. Pro časové body nad 60 dní od výsledku PCR testu byla procentní shoda pozitivních vzorků pro sérologii anti-N IgG 38,6 %.

SHODA NEGATIVNÍCH VZORKŮ MEZI ÚČASTNÍKY S NIŽŠÍM RELATIVNÍM RIZIKEM INFEKCE

Do studie jsme zařadili kohortu účastníků, v endemickém prostředí, avšak u kterých bylo stanoveno nižší relativní riziko infekce SARS-CoV-2 na základě: (i) nepřítomnosti příznaků infekce SARS-CoV-2 hlášených samotnými pacienty, (ii) žádný předchozí pozitivní PCR test SARS-CoV-2 (iii) žádné předchozí zapojení se do klinického hodnocení očkování a bez očkování vakcínou proti COVID-19 a (iv) negativní sérologický test anti-N s laterální průtokovou imunochromatografií (souprava Biohit SARS-CoV-2 IgM/IgG Antibody Test Kit) použitý jako primární screeningový test v době zařazení a (iv) potvrzení negativního sérologického testu pomocí laboratorního sérologického testu (sérologický test anti-N IgG (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG))).

Tabulka 6. Procentní shoda negativních vzorků.

	N	Pozitivní	Negativní	Shoda negativních vzorků (%) (95 % CI)
Včetně hraniční oblasti	100	3	97	97,0 % (91,5–99,4)
Bez hraniční oblasti	98	2	96	98,0 % (92,8–99,8)

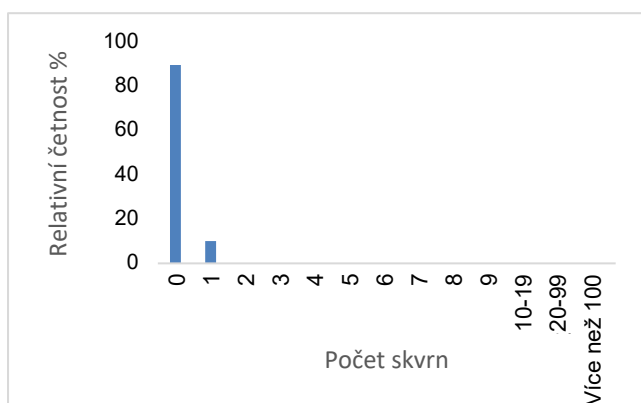
97,0 % výsledků testu T-SPOT.COVID (97/100) mělo nižší hodnotu, než je prahová hodnota 6 skvrn (95 % intervaly spolehlivosti 91,5–99,4 %). Dva výsledky byly hraniční (5 a 7 skvrn). Pokud byly tyto výsledky vyloučeny, 98,0 % (92,8–99,8 % CI) výsledků testu T-SPOT.COVID (96/98) bylo nereaktivních. Nebyly zde žádné neplatné výsledky.

Přestože jsme podnikli veškeré patřičné kroky k zajištění, aby tato kohorta byla složena ze subjektů s nízkým rizikem infekce, nemůžeme vyloučit možnost, že určitá část této skupiny měla nebo stále má asymptomatickou infekci, která byla v okamžiku testování séronegativní, ale u nichž byl test T-SPOT.COVID schopen detekovat odpověď T-lymfocytů.

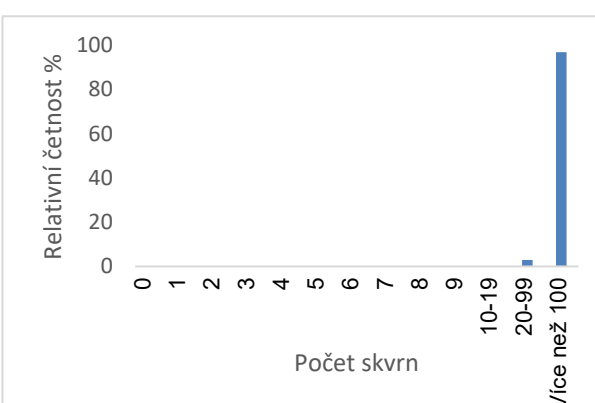
9. OČEKÁVANÉ HODNOTY

Rozmezí počtu skvrn zjištěných v odpovědi na antigeny kontroly Nil a pozitivní kontroly a antigeny SARS-CoV-2, které byly pozorovány v našich klinických studiích (podrobnosti o kohortách klinické studie viz část 8) je znázorněno na obrázcích 5a a 5b.

Obrázek 5a. Histogram odpovědí na kontrolu NIL od všech subjektů ve studii (n = 251).



Obrázek 5b. Histogram odpovědí na pozitivní kontrolu od všech subjektů ve studii (n = 251).

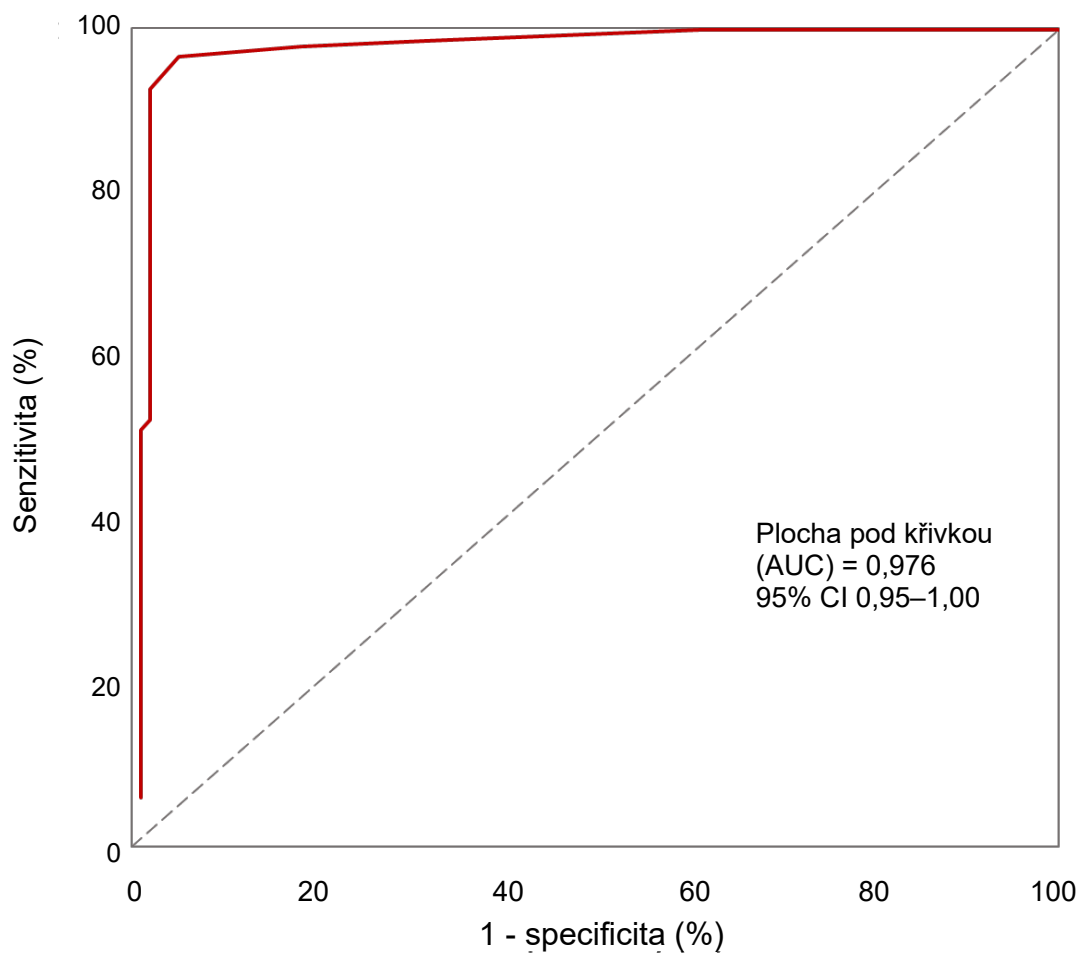


Naprostá většina jamek s kontrolou Nil vykazala nulový počet skvrn a žádný počet skvrn nebyl vyšší než u kontroly Nil. Odpovědi na pozitivní kontrolu byly robustní a žádné výskyty počtu skvrn nižších než 20 nebyly u pozitivní kontroly pozorovány.

Prahová hodnota testu byla potvrzena během klinických studií. Na obrázku 6 je znázorněna křivka ROC vytvořená pomocí údajů získaných během klinických studií. Prahová hodnota 6 skvrn poskytla maximální oddělení těchto dvou kohort, což znamenalo validaci předem zvolené úrovně.

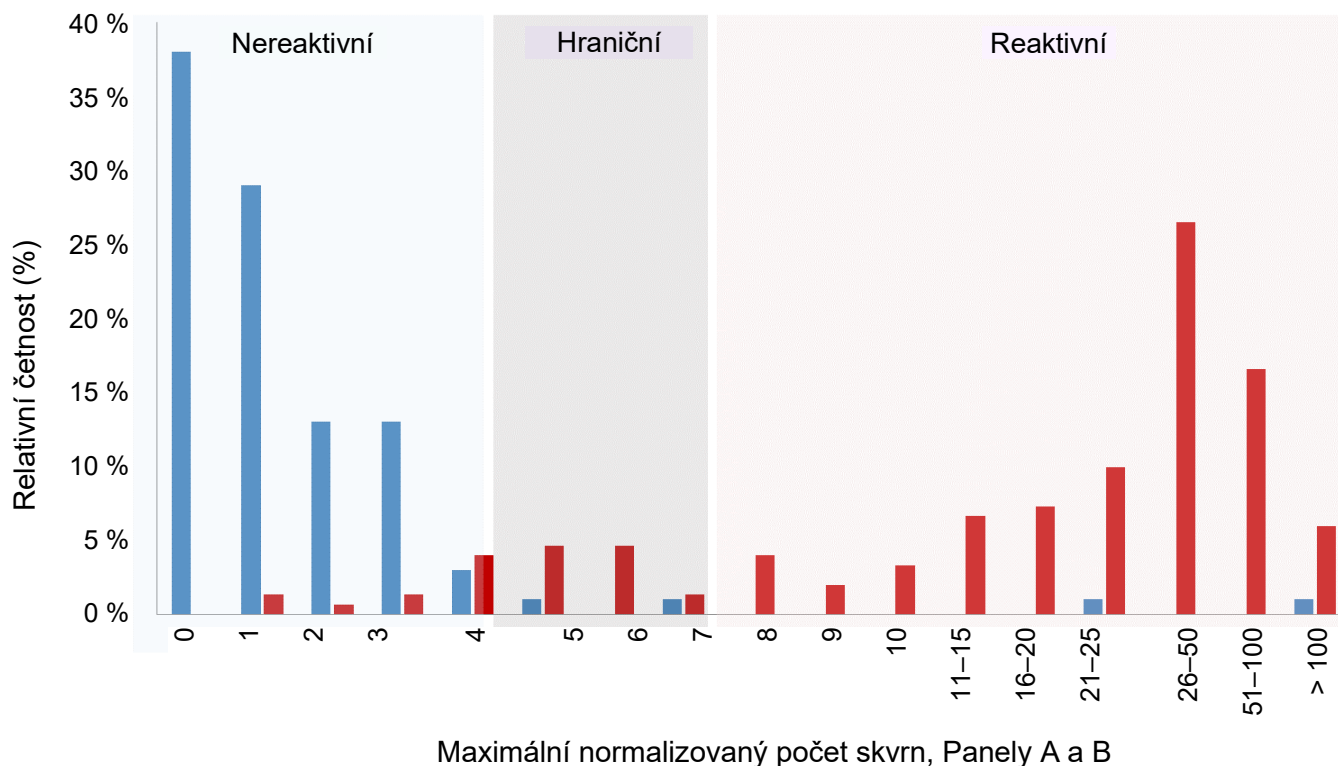
Obrázek 6. Křivka ROC vytvořená s použitím validačních údajů vytvořených od 151 subjektů s potvrzením pomocí

PCR testu (použitých k odhadu citlivosti) a 100 subjektů s nižším relativním rizikem infekce (použitých k odhadu specifity).



Stejné údaje byly také použity k potvrzení přínosu zařazení hraniční oblasti, jak je znázorněno na obrázku 7.

Obrázek 7. Graf znázorňující distribuci počtu skvrn pozorovaných u testu T-SPOT.COVID v klinických studiích prováděných v USA s překryvem instruovaných interpretačních kritérií testu. „Max. normalizovaný počet skvrn“ je maximální počet (panel minus nula) odpovědí u Panelu A nebo Panelu B (n = 251). Relativní četnost různých počtů skvrn je znázorněna pro kohortu s nižším rizikem (modré sloupce) a pro kohortu s potvrzením pomocí PCR testu (červené sloupce).



Většina subjektů v kohortě s nižším rizikem (modré sloupce) vykázala žádnou až nízkou úroveň reaktivity s 96,0 % v rámci rozmezí 0–4 skvrny. Subjekty s PCR potvrzenou infekcí (červené sloupce) vykázala vysoké úrovně reaktivity s 23,2 % v rozmezí 8–20 skvrn a většinovým počtem (58,9 %) > 20 skvrn. Oblast s šedým pozadím představuje nejednoznačnou hraniční oblast (5, 6 nebo 7 skvrn), kde, jak se očekávalo, je pozorován překryv mezi distribucemi počtu skvrn obou kohort studie. Veškeré testy s výsledky v rámci této oblasti by měly být zopakovány.

10. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Tento test by se měl provádět v souladu se zásadami správné laboratorní praxe a za přísného dodržování tohoto návodu k použití.

HRANIČNÍ (NEJEDNOZNAČNÉ) VÝSLEDKY

Hraniční (nejednoznačné) výsledky jsou takové, u nichž maximum ze dvou výsledků (Panel minus Nil) počtů skvrn spadá do množiny ± 1 spotu od prahové hodnoty testu stanovené dle ROC, což je ≥ 6 skvrn. Přestože jsou hraniční (nejednoznačné) výsledky platné, jsou méně spolehlivé než výsledky, u nichž byl počet skvrn více vzdálen od prahové hodnoty. Proto se doporučuje zopakování testu pacienta s použitím nového vzorku. Pokud je výsledek při opakovaném testu stále hraniční (nejednoznačný), je nutné použít další diagnostické testy a/nebo epidemiologické informace, které pomohou stanovit stav imunity pacienta.

NEPLATNÉ VÝSLEDKY

Neplatné výsledky jsou méně časté a mohou souviset se stavem imunity testované osoby. Mohou také souviset s mnoha technickými faktory, potenciálně vedoucími k výsledkům „vysoké pozadí“, „nízký mitogen“ a „vysoký NIL“:

- Použití nevhodných zkumavek na odběr krve.
- Uchovávání krve po delší dobu než 8 hodin před zpracováním bez použití činidla T-Cell Xtend.
- Uchovávání krve mimo doporučený rozsah teplot před zpracováním vzorků krve.
- Kontaminace buněčného kultivačního média.
- Nedokonalé promytí destiček.











U neplatných výsledků se doporučuje zopakovat test s použitím nového vzorku pacienta. Pro nejzásadnější body řešení potíží jsou k dispozici technické dokumenty. Můžete je získat kontaktováním společnosti Oxford Immunotec.

11. ZKRATKY A VYSVĚTLIVKY ZNAČEK

Zkratky

AUC	Oblast pod křivkou
BCIP/NBT	5-brom, 4-chlor, 3-indoylfosfát/nitrotetrazoliová modř
CDC	Centra pro kontrolu a prevenci nemocí
CI	Interval spolehlivosti
CLIA	Dodatky pro zkvalitnění klinické laboratorní techniky
CPT	Zkumavky pro přípravu buněk
CV	Variační koeficient
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme Linked Immunospot Assay
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
PBMC	Jednojaderné buňky z periferní krve
PBS	Fyziologický roztok pufovaný fosfátem
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PHA	Fytohemaglutinin
RCF	Relativní odstředivá síla
RoC	Křivka ROC (Receiver Operating Characteristic)
RPM	Otáčky za minutu
RT-PCR	Reverzní transkripce s následným PCR
TNF	Tumor nekrotizující faktor

Slovník značek

	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>
	Datum použití/exspirace (rok-měsíc-den)
	Číslo šarže
	Katalogové číslo
	Upozornění, konzultujte návod k použití
	Datum výroby
	Výrobce
	Omezení teploty/Teplota uchování
	Čtěte návod k použití
	Oprávněný zástupce pro EU

BS EN ISO 15223-1:2016

Značky použité pro test T-SPOT.COVID splňují mezinárodní normu EN ISO 15223-1:2016; 'Zdravotnické prostředky – Značky pro štítky, označování a informace poskytované se zdravotnickými prostředky'.

12. LITERATURA

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/fimmu.2021.635942
39. Rydyznski 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, Reichtman 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. HLÁŠENÍ ZÁVAŽNÝCH PŘÍHOD

Dojde-li v souvislosti s tímto prostředkem k závažné příhodě, musí být nahlášena zákaznickému servisu. Ve členských státech Evropské unie musí být závažné příhody hlášeny také příslušným orgánům dané země (ministerstvu odpovědnému za zdravotnické prostředky pro diagnostické použití in vitro). Informace o tom, jak se obrátit na příslušný orgán, naleznete na vládních webových stránkách. Příhoda se označuje jako „závažná příhoda“, pokud přímo či nepřímo vedla, mohla vést nebo může vést k:

- úmrtí pacienta, uživatele nebo jiné osoby,
- dočasnému nebo permanentnímu závažnému zhoršení zdravotního stavu pacienta, uživatele nebo jiné osoby,
- závažnému ohrožení veřejného zdraví

14. KONTAKTNÍ ÚDAJE

Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park,
Abingdon, Oxfordshire, OX14 4SE, Spojené
království,
Tel: +44 (0) 1235 442780

Soubory ke stažení produktové podpory a další technické informace naleznete na našich webových stránkách: www.oxfordimmunotec.com

■ Výrobce

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

EC REP Oprávněný zástupce pro EU

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

T-SPOT a T-Cell *Xtend* jsou registrované ochranné známky společnosti Oxford Immunotec Ltd.
Logo Oxford Immunotec logo je registrovaná ochranná známka společnosti Oxford Immunotec Ltd.
AIM V a GIBCO jsou registrované ochranné známky společnosti Life Technologies Corporation.
CPT a Vacutainer jsou ochranné známky společností Becton, Dickinson and Company.
Ficoll a Ficoll-Paque jsou registrované ochranné známky společnosti Cytiva, dceřiné společnosti Global Life Sciences Solutions USA LLC.
Tween je registrovaná ochranná známka společnosti Croda Americas LLC.

Použití činidla T-Cell *Xtend* je chráněno následujícími patenty a probíhajícími patentovými řízeními:
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Číslo revize: 5 Datum vydání: Duben 2023

Číslo verze	Datum vydání	Modifikace
1-4	Dostupné podrobnosti,	na vyžádání u Oxford Immunotec.
5	Duben 2023	Změna adresy výrobce. přidání historie verzí. Přidání pokynů pro hlášení závažných incidentů.



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

