



T-SPOT[®] COVID

 **Oxford**
Immunotec



PROSPECTO

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Este prospecto abarca el uso de:

COV.435/300, COV.435/200

Índice

Uso previsto	3
Resumen y explicación	3
Reactivos y conservación.....	5
Conservación y estabilidad.....	5
Advertencias y precauciones.....	6
Obtención y manipulación de muestras.....	7
Instrucciones de uso	8
Limitaciones	13
Características de rendimiento	14
Valores esperados	16
Resolución de problemas.....	18
Abreviaturas y glosario de símbolos.....	19
Bibliografía	19
Información de contacto.....	21
Derechos de propiedad intelectual e historial de revisión del prospecto.....	22

1. USO PREVISTO

La prueba T-SPOT.COVID es una técnica normalizada basada en ELISPOT (ImmunoSpot ligado a enzimas) diseñada para la detección cualitativa de la respuesta inmunitaria mediada por células (células T) frente a SARS-CoV-2 en sangre completa humana (heparina de litio o de sodio o citrato de sodio). La prueba T-SPOT.COVID está diseñada para utilizarla como ayuda en la identificación y vigilancia de personas con respuesta inmunitaria de las células T al SARS-CoV-2.

Una respuesta de células T al SARS-CoV-2 por lo general se puede detectar en la sangre varios días después de la infección inicial o la vacuna, y la duración temporal de la respuesta detectable posterior a la infección o la vacuna actualmente no está bien caracterizada.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

SARS-CoV-2 es una cepa de coronavirus descubierta en la provincia de Wuhan en China en 2019. El virus se propagó rápidamente por todo el mundo durante los primeros meses de 2020, lo que llevó a la declaración de una pandemia por parte de la OMS el 11 de marzo de 2020¹. La detección exacta y el aislamiento de los infectados con el virus SARS-CoV-2, junto con la introducción a nivel mundial de las vacunas aprobadas contra la COVID-19, han sido fundamentales para controlar la propagación del virus. No obstante, a pesar de que se ha realizado gran cantidad de pruebas de la COVID-19 y de que la aceptación de la vacuna es amplia, resulta evidente que el virus SARS-CoV-2 sigue propagándose y dando lugar a una morbilidad y mortalidad significativas². Todavía se desconoce cuánto tiempo dura la protección que confieren las vacunas contra la COVID-19, y existe cierta inquietud ante el hecho de que la atenuación de las respuestas inmunitarias en los meses siguientes a la vacunación pueda exponer a las personas al riesgo de sufrir COVID-19 grave de nuevo^{3,4}. Estas inquietudes resultan especialmente evidentes en las poblaciones vulnerables, como las afectadas de inmunosupresión y de la tercera edad, poblaciones a las que se está ofreciendo en algunos países una tercera dosis de vacunación con el fin de «reforzar» la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna⁵. A medida que más personas se vacunan por completo y se ofrecen vacunas de refuerzo a más personas, cada vez se reconoce en mayor grado la importancia de entender la respuesta inmunitaria tanto a la infección natural como a la vacunación.

Las pruebas serológicas se desarrollaron con celeridad a comienzos de la pandemia, y su uso aún está muy extendido para obtener información sobre la capacidad natural de una persona de crear una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos tras la infección natural del SARS-CoV-2 o la vacunación⁶. No obstante, las pruebas serológicas solamente ofrecen información sobre una rama del sistema inmunitario adaptativo, y es posible que dichas pruebas de anticuerpos, por sí solas, subestimen el alcance de la respuesta inmunitaria que ha generado una persona^{7,8}. Varios estudios han puesto de manifiesto que la respuesta de anticuerpos a la infección natural presenta una gran variabilidad^{9,10}, puesto que en personas que han sufrido una COVID-19 leve o asintomática se han observado titulaciones bajas de anticuerpos^{11,12}. Algunas personas no generan nunca una respuesta de anticuerpos detectable⁹. Se ha demostrado que las vacunas contra la COVID-19 inducen respuestas fuertes de anticuerpos en la mayor parte de las personas vacunadas¹³; no obstante, existen indicios de que dichas respuestas comienzan a decaer en los meses siguientes a la segunda dosis^{3,4,14}. También existen personas, como es el caso de las afectadas por una inmunodeficiencia primaria, que no son capaces de generar anticuerpos, y que por lo tanto, no generarán una respuesta inmunitaria cuantificable a la vacunación si se utilizan únicamente pruebas de anticuerpos¹⁵.

La respuesta de las células T, o inmunidad mediada por células, es la otra rama de la respuesta inmunitaria adaptativa, y se han utilizado pruebas de células T, tanto en entornos de investigación como clínicos durante la pandemia de la COVID-19, para obtener más información sobre la respuesta inmunitaria frente a la infección del SARS-CoV-2 o la vacunación¹⁶. Varias publicaciones han demostrado que las respuestas de células T a los coronavirus humanos, incluidos el SARS-CoV-1 y el SARS-CoV-2, podrían ser fuertes y duraderas¹⁷; algunas personas que se infectaron con SARS-CoV-1 hace 17 años aún demuestran respuestas de células T hoy en día¹⁸. Varios estudios han demostrado que la inmunidad de células T específicas del SARS-CoV-2 se mantiene hasta los 6-9 meses después de la infección primaria, lo que indica que las respuestas de células T podrían durar más que las respuestas transitorias de anticuerpos a la infección por SARS-CoV-2^{17,19}. Ciertos estudios muestran ahora tiempos similares tras la vacunación²⁰. Estos hallazgos, junto con estudios que han demostrado una función decisiva de las células T en la eliminación viral y la recuperación del SARS-CoV-2¹⁸, sugieren que la inmunidad celular podría ser un factor importante de toda inmunidad protectora desarrollada frente a la infección por SARS-CoV-2²². Además de esto, aunque la dinámica de la respuesta de células T específicas del SARS-CoV-2 aún no se ha esclarecido por completo, las pruebas sugieren que la mayoría de las personas infectadas con SARS-CoV-2 generan células T contra el SARS-CoV-2 que producen interferón gamma (IFN- γ) y que se pueden detectar en la sangre periférica ya a los 2-4 días desde la aparición de los síntomas²². También se han detectado células T específicas frente al SARS-CoV-2 entre 7 y 14 días después de la vacunación²³.

Se han detectado células T específicas del SARS-CoV-2 en respuesta a muchas de las vacunas actuales^{24,25,26}, y la importancia de detectar y monitorizar estas respuestas cada vez es más reconocida²⁷. Se ha utilizado la prueba T-SPOT.COVID para demostrar una respuesta de células T específica después de la vacunación en varios

estudios^{28,29,30}. Es importante destacar que muchos de estos estudios han demostrado que la prueba T-SPOT.COVID es capaz de detectar respuestas de las células T en personas inmunodeprimidas, incluidos pacientes que reciben tratamientos supresores de las células B y que quizás no puedan generar respuestas fuertes de anticuerpos²⁸.

La prueba T-SPOT.COVID es una variante simplificada normalizada de la técnica de ensayo ELISPOT. Los ensayos ELISPOT detectan y miden las respuestas de células T enumerando el número de células T que están secretando citocina en respuesta a la estimulación con antígenos. Los ensayos ELISPOT son excepcionalmente sensibles, ya que la citocina objetivo se captura directamente alrededor de la célula secretora antes de que se diluya en el sobrenadante, la capturen receptores de células adyacentes o se degrade. Esto hace que los ensayos ELISPOT sean mucho más sensibles que los ensayos ELISA convencionales^{31,32,33,34}. La sensibilidad es importante a la hora de detectar la respuesta de las células T al SARS-CoV-2, ya que la frecuencia de las células T puede ser inferior que con otros virus que inducen respuestas de células T³⁵. Además, diversos factores entre los que se encuentran la edad³⁶, la gravedad de la enfermedad⁷ y la inmunosupresión³⁷, se han relacionado con la variabilidad en la magnitud de la respuesta de células T específicas del SARS-CoV-2. Se ha demostrado que la elevada sensibilidad que ofrecen las pruebas ELISPOT es beneficiosa en distintos estudios en los que se ha utilizado la prueba T-SPOT.COVID para detectar respuestas de las células T a la vacunación en personas inmunodeprimidas^{28,29,30}.

La prueba enumera las células T efectoras que responden a la estimulación mediante el uso de dos mezclas de péptidos separadas, derivadas de proteínas de nucleocápside y espícula de SARS-CoV-2. La respuesta de células T a cada una de las proteínas se mide en paralelo en pocillos individuales. Los paneles de antígenos de T-SPOT.COVID están diseñados como péptidos que se solapan abarcando secuencias de las proteínas de espícula (COV-A) y nucleocápside (COV-B). Este diseño de los péptidos ofrece una cobertura máxima de epítomos para una detección mejorada de la reactividad de las células T y sin limitaciones por HLA. Fórmulas antigénicas de 253 péptidos que cubren las regiones más inmunogénicas del genoma del virus permiten medir la amplitud de la inmunidad y garantizan que el efecto de las mutaciones puntuales se reduzca al mínimo. Se ha mejorado la especificidad para el SARS-CoV-2 eliminando secuencias de péptidos con posible reacción cruzada y alta homología con otros coronavirus.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La respuesta inmunitaria a la infección con SARS-CoV-2 está mediada por la activación de células B y células T. Como parte de la respuesta de células T, las células T se vuelven sensibles a antígenos del SARS-CoV-2 diseñados para activar las células T efectoras CD4 y CD8, las cuales producen la citocina IFN- γ cuando son estimuladas por estos antígenos^{38,39}. La prueba T-SPOT.COVID utiliza la metodología de inmunoensayo por manchas ligado a enzimas (ELISPOT) para enumerar las células T sensibles al SARS-CoV-2 capturando el IFN- γ en las proximidades de las células T de las que se ha secretado⁴⁰.

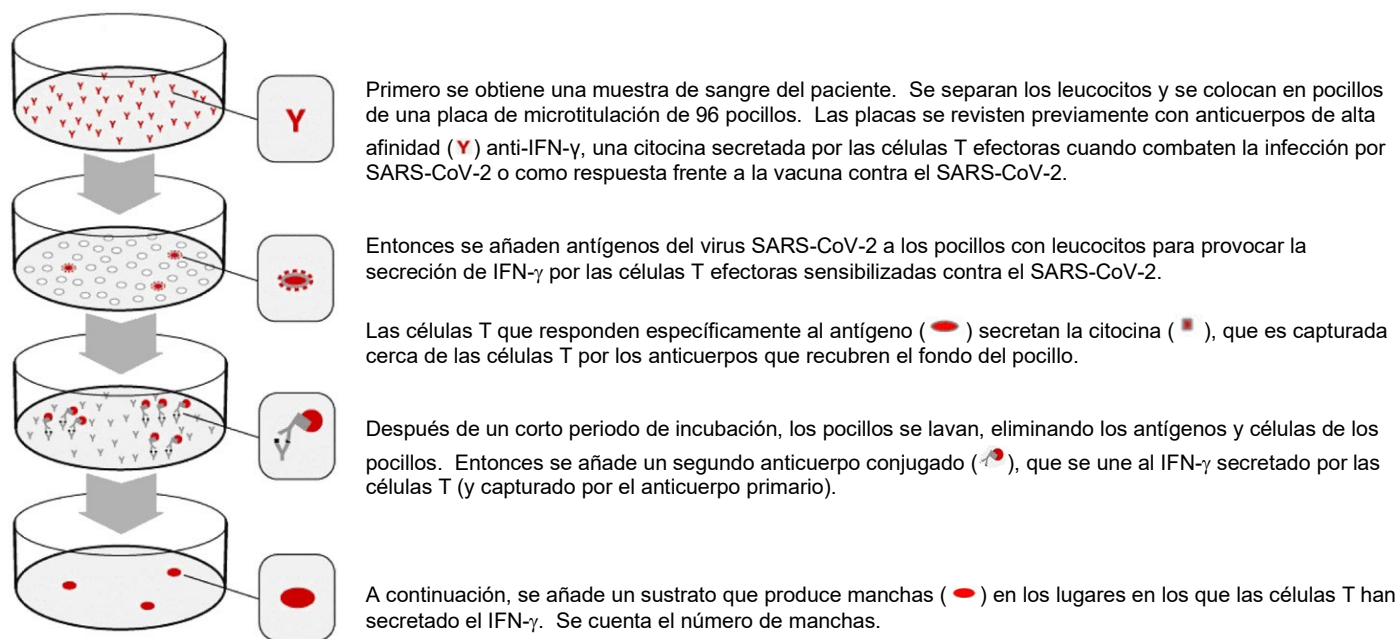
Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separan de una muestra de sangre completa, se lavan, y se cuentan antes de añadirles a la prueba.

Las PBMC aisladas (leucocitos) se colocan en pocillos de microtitulación, donde se exponen a un control de fitohemaglutinina (PHA) (un estimulador mitogénico que indica la funcionalidad celular), un control nulo o dos paneles separados de antígenos de SARS-CoV-2 derivados de las proteínas de espícula y nucleocápside, respectivamente. Las PBMC se incuban con los antígenos para permitir la estimulación de las células T sensibilizadas presentes.

La citocina secretada es capturada por anticuerpos específicos de la superficie de la membrana que forma la base del pocillo, las células y otros materiales no deseados se eliminan mediante el lavado. Se añade un segundo anticuerpo, conjugado a fosfatasa alcalina y dirigido a un epítipo diferente de la molécula de citocina, el cual se une a la citocina capturada en la superficie de la membrana. Cualquier conjugado libre se elimina con el lavado. A cada pocillo se le añade un sustrato soluble, que se escinde mediante la acción de la enzima unida para formar una mancha (de color azul oscuro) de precipitado insoluble en el lugar de la reacción.

La evaluación del número de manchas obtenidas proporciona una medida de la abundancia de células T efectoras en la sangre periférica sensibilizadas contra el SARS-CoV-2. Estos principios detrás de la base de las pruebas T-SPOT se describen en la figura 1 más abajo.

Figura 1: Principio del sistema de pruebas T-SPOT. Solo para fines ilustrativos; consulte el apartado 6, Instrucciones de uso, para ver las instrucciones detalladas del procedimiento.



3. REACTIVOS Y CONSERVACIÓN

MATERIALES QUE SE INCLUYEN

T-SPOT.COVID COV.435/300 (versión de tira multiuso de 12 x 8 pocillos) y COV.435/200 contienen:

1. 1 placa de microtitulación: 96 pocillos, suministrada en 12 tiras individuales de 8 pocillos en un soporte separado (COV.435/300) o 12 x 8 pocillos en una sola placa (COV.435/200), cubierta con un anticuerpo monoclonal murino anticitocina interferón gamma (IFN- γ).
2. 2 viales (0,8 mL cada uno) de panel A (COV-A): contiene antígenos de espícula, albúmina de suero bovino y agentes antimicrobianos.
3. 2 viales (0,8 mL cada uno) de panel B (COV-B): contiene antígenos de nucleocápside, albúmina de suero bovino y agentes antimicrobianos.
4. 2 viales (0,8 mL cada uno) de control positivo: contiene fitohemaglutinina (PHA) para usar como control de la funcionalidad celular, albúmina de suero bovino y agentes antimicrobianos.
5. 1 vial (50 μ L) de reactivo conjugado concentrado 200 veces: anticuerpo monoclonal murino anticitocina interferón gamma (IFN- γ) conjugado a fosfatasa alcalina.
6. 1 frasco (25 mL) de solución de sustrato: solución BCIP/NBT^{plus} lista para usar.
7. Prospecto.

Nota: Las placas de microtitulación sólidas de 96 pocillos utilizadas en el kit T-SPOT.COVID COV.435/200 y las tiras de 8 pocillos utilizadas en el kit COV.435/300 son artículos de un solo uso, y deben utilizarse inmediatamente una vez abiertos y no reutilizarse. No mezclar componentes entre diferentes kits.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar el kit sin abrir entre 2 y 8 °C. Los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la caja del kit cuando se los conserva y manipula en las condiciones recomendadas. El kit no debe utilizarse una vez pasada la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Si un componente tiene una fecha de caducidad posterior a la que figura en la caja (exterior) del kit, no se debe guardar ni utilizar ese componente con otro kit. No utilizar ningún componente del kit después de la fecha de caducidad de la caja exterior del kit.

Conservar los componentes abiertos del kit a una temperatura de 2-8 °C. Los componentes abiertos de T-SPOT.COVID (COV.435/300) se deben utilizar en un plazo de 8 semanas desde su apertura, y los de T-SPOT.COVID (COV.435/200) en un plazo de 4 semanas desde su apertura, no pudiendo terminar dicho periodo después de la fecha de caducidad que figura en la etiqueta del kit. **Evitar la exposición prolongada de la solución de sustrato a la luz.**

EQUIPOS Y MATERIALES NECESARIOS, PERO NO INCLUIDOS

1. Soporte de placa para tiras de 8 pocillos (disponible en Oxford Immunotec).
2. Cabina BLII (recomendada).
3. Tubos para obtención de sangre, como Vacutainer® CPT™, tubos heparinizados o tubos que contengan citrato.
4. Reactivo T-Cell *Xtend*®: las muestras de sangre completa almacenadas a temperatura ambiente (18-25 °C) entre 0 y 32 horas después de la venopunción se pueden procesar con el uso del reactivo T-Cell *Xtend*.
5. Ficoll® (si no se usan tubos CPT).
6. Una centrífuga para preparar las PBMC (capaz de al menos 1800 RCF [g] y que pueda mantener las muestras a temperatura ambiente [18-25 °C]) si se utilizan métodos de centrifugación por densidad para separar las PBMC.
7. Equipos y reactivos para permitir el recuento de las PBMC, ya sea manualmente utilizando azul de tripano (u otro colorante adecuado) y un hemocitómetro en un microscopio, o automáticamente con un analizador hematológico adecuado.
8. Una incubadora humidificada que pueda alcanzar 37 ± 1 °C con un suministro de CO₂ al 5 %.
9. Una lavadora automática de placas de microtitulación o una pipeta de 8 canales o de pasos para lavar las placas manualmente.
10. Pipetas ajustables para cubrir un rango de volúmenes de 1-1000 µL (como cuatro pipetas capaces de administrar volúmenes de 1-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL) y puntas de pipeta estériles.
11. Solución PBS estéril: como GIBCO® 1x D-PBS (Life Technologies; número de catálogo 14040-133).
12. Agua destilada o desionizada.
13. Un medio para visualizar los pocillos o para capturar una imagen digital del pocillo, como un estereomicroscopio, lupa o sistema de imagen de placas que permita contar las manchas.
14. Medio de cultivo celular estéril como GIBCO AIM V® (Life Technologies; número de catálogo 31035-025 con calidad para investigación). (Nota: el medio AIM V está disponible en Oxford Immunotec). **Se recomienda el uso de este medio sin suero para el paso de incubación.** Puede usarse RPMI 1640 (Invitrogen; número de catálogo 11875-093) en los pasos iniciales de preparación de las muestras únicamente. Se recomienda conservar los medios de cultivo celular en alícuotas adecuadas y desechar el material excedente después del uso. **Los medios de cultivo celular deben precalentarse a 37 °C antes de usarlos con la prueba T-SPOT.COVID.** Para evitar problemas con medios contaminados, puede ser útil dispensar frascos de medios de cultivo en alícuotas más pequeñas.

4. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso en diagnóstico *in vitro* únicamente.
- Para uso profesional únicamente.
- Los usuarios deben tener formación en el procedimiento de la prueba y estar seguros de haber comprendido las instrucciones de uso antes de realizar la prueba.
- Leer atentamente las instrucciones de la prueba antes de usarla. Desviarse de las instrucciones de uso de este prospecto puede dar lugar a resultados erróneos.
- Se debe tener cuidado al manipular material de origen humano. Todas las muestras de sangre deben ser consideradas potencialmente infecciosas. La manipulación de muestras de sangre y componentes de la prueba, así como su utilización, almacenamiento y eliminación, debe realizarse de conformidad con los procedimientos definidos en las pautas o los reglamentos nacionales, autonómicos o locales correspondientes sobre seguridad y riesgo biológico.
- Se debe tener cuidado al trabajar con sustancias químicas. Todas las sustancias químicas deben ser consideradas potencialmente infecciosas. Se puede obtener una ficha de datos de seguridad para este kit de Oxford Immunotec.
- Descartar los reactivos y muestras biológicas sin utilizar según los reglamentos locales.
- Se debe añadir la cantidad correcta de PBMC a cada pocillo. De lo contrario, el resultado podría interpretarse de forma incorrecta.
- No mezclar componentes de diferentes lotes de kits.
- Cumplir con técnicas asépticas para evitar contaminar los reactivos, los pocillos de la prueba, las suspensiones celulares y los medios de cultivo celular.
- Debe evitarse toda variación de las técnicas indicadas de pipeteo y lavado, de los tiempos de incubación y/o de las temperaturas dado que puede afectar a los resultados reales obtenidos.
- La sangre debe obtenerse y procesarse lo antes posible.
- Se deben conservar y transportar al laboratorio las muestras de sangre a temperatura ambiente (18-25 °C). No refrigerar ni congelar las muestras de sangre completa.
- El incumplimiento de los tiempos y temperaturas de incubación recomendados puede llevar a una interpretación errónea de los resultados.
- Las muescas en la membrana causadas por puntas de pipeta o de la lavadora de pocillos pueden revelarse como artefactos en los pocillos, lo cual podría complicar el recuento de las manchas.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES ESPECÍFICAS PARA EL USO DEL REACTIVO T-CELL XTEND

- El reactivo T-Cell *Xtend* no se ha evaluado para otros usos que no sean las basadas en las pruebas T-SPOT.
- Para uso en diagnóstico *in vitro* únicamente.

- Para uso profesional únicamente.
- No utilizar el reactivo una vez pasada la fecha de caducidad.
- Efectuar una técnica aséptica cuando se utilice este producto para evitar la contaminación del reactivo.
- No utilizar tubos de preparación de células (CPT, Becton Dickinson) ni tubos de obtención de sangre que contengan el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) con el reactivo T-Cell *Xtend*.
- Añadir el reactivo T-Cell *Xtend* a la sangre completa antes de procesar la muestra.
- No diluir ni añadir otros componentes directamente al reactivo T-Cell *Xtend*.
- Utilizar solo recipientes de un solo uso para la obtención de muestras de sangre venosa.
- No mezclar diferentes lotes de reactivo.

5. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Los diferentes laboratorios deben validar sus procedimientos para la obtención y separación de PBMC con el fin de obtener números suficientes. Seguir las siguientes recomendaciones:

1. Las muestras de sangre completa se deben mantener a una temperatura de entre 18 °C y 25 °C hasta que se procesen.
2. Tomar una muestra de sangre de acuerdo con las instrucciones que vienen con el dispositivo recolector. El contenido del tubo se debe invertir (8-10 veces) para garantizar que la sangre completa se mezcle bien con el anticoagulante. Almacenar la sangre obtenida a temperatura ambiente (18-25 °C). **No refrigerar ni congelar.**
3. Típicamente, en un paciente inmunocompetente es posible obtener PBMC suficientes para procesar la prueba a partir de muestras de sangre venosa de acuerdo con estas pautas:

Un tubo de 8 mL o dos tubos de 4 mL (CPT), o un tubo de 6 mL con heparina de sodio o de litio o con citrato de sodio.

Las PBMC de un paciente se pueden mezclar, si es necesario, para obtener PBMC suficientes de varios tubos de sangre que se hayan obtenido y procesado simultáneamente.

4. Cuando se utiliza la prueba T-SPOT.COVID **sin el uso del reactivo T-Cell *Xtend***, las muestras de sangre deben procesarse en un plazo de 8 horas desde la obtención. Las muestras se pueden obtener en tubos Vacutainer CPT (Becton Dickinson) con citrato de sodio o heparina de sodio, con las PBMC separadas en el tubo según las instrucciones del fabricante. Otra opción es obtener las muestras de sangre en tubos de heparina de sodio o de litio o con citrato de sodio, separando las PBMC posteriormente mediante técnicas de separación estándar como Ficoll-Paque® o métodos alternativos para purificar la fracción de PBMC. No se deben utilizar tubos de obtención de sangre que contengan el anticoagulante EDTA.
 - a. Con tubos de obtención de sangre CPT, centrifugar tubos CPT de 8 mL a 1600 RCF (g) durante 28 minutos o tubos CPT de 4 mL a 1800 RCF (g) durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
 - b. Si se utiliza Ficoll-Paque Plus, diluir la sangre con un volumen igual de medio RPMI 1640 (1 parte de sangre por 1 parte de RPMI). Depositar cuidadosamente en capas la sangre diluida sobre Ficoll-Paque Plus (2-3 partes de sangre diluida por 1 parte de Ficoll-Paque) y centrifugar a 1000 RCF (g) durante 22 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).

Nota: Revisar las instrucciones del fabricante antes de utilizar tubos CPT o Ficoll-Paque. Asegurarse de que los tubos se centrifuguen a la velocidad correcta. Las velocidades indicadas anteriormente son en g o fuerza centrífuga relativa (RCF). Esto no es lo mismo que revoluciones por minuto (RPM). Si la centrífuga solo mide la velocidad en RPM, debe convertirse al valor de RCF recomendado midiendo el radio del rotor y utilizando una tabla de conversión. Los tubos Leucosep (Greiner Bio-One) ofrecen un método que ahorra tiempo para la separación por gradiente de densidad. Los tubos contienen una barrera porosa que permite verter la muestra de sangre sobre el medio de separación por gradiente de densidad, de modo que no es necesario depositar la muestra cuidadosamente en capas.

5. Cuando se utiliza la prueba T-SPOT.COVID **con el reactivo T-Cell *Xtend***, las muestras de sangre deben obtenerse en tubos con heparina de sodio o de litio o con citrato de sodio. No se deben utilizar tubos Vacutainer CPT ni tubos de obtención de sangre que contengan el anticoagulante EDTA. El reactivo T-Cell *Xtend* debe añadirse antes de la separación de PBMC mediante técnicas de separación estándar. Las muestras de sangre completa se deben almacenar a temperatura ambiente (18-25 °C) entre 0 y 32 horas después de la venopunción con el uso del reactivo T-Cell *Xtend*.

Si se va a utilizar el reactivo T-Cell *Xtend*, inmediatamente antes de la separación celular, retirar el tapón del tubo de obtención de sangre y añadir 25 µl de la solución de reactivo T-Cell *Xtend* por cada mL de muestra de sangre. Volver a colocar el tapón e invertir el tubo de obtención de sangre suavemente de 8 a 10 veces para mezclarlo. Incubar durante 20 ± 5 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C) y después proceder a aislar la capa de PBMC mediante la centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll como se indica en los apartados 4b y 6-9. Consultar el prospecto del reactivo T-Cell *Xtend* para conocer más detalles.

- Recoger la banda blanca turbia de PBMC con una pipeta y transferirla a un tubo de centrifuga cónico de 15 mL. Aumentar el volumen hasta los 10 mL con medio de cultivo celular. **Los medios de cultivo celular para los pasos de lavado se deben precalentar a 37 °C antes del contacto con las PBMC.**

Se sabe que los factores circulantes en las muestras de sangre completa interfieren con las pruebas de interferón gamma en sangre completa; por ejemplo, el factor reumatoide, anticuerpos heterófilos y cantidades preexistentes de interferón gamma. La separación y lavado de las PBMC permite eliminar estas sustancias potencialmente interferentes antes de realizar la prueba.

Nota: Después de la centrifugación, las PBMC se deben extraer con una punta de pipeta de calibre grande (por ejemplo, 1 mL), sumergiendo la punta de la pipeta en la capa de PBMC. Esta capa turbia debe aspirarse con cuidado y transferirse a un tubo cónico estéril para los pasos de lavado. Asegurarse de recoger toda la capa turbia de PBMC. Es mejor coger más de la capa de plasma que dejar algunas PBMC en el tubo de obtención de sangre. No obstante, si se utilizan CPT, evitar transferir el gel de separación, ya que puede obstruir la punta. Si esto ocurre, transferir las células que ya están en la punta a un tubo de centrifuga y después utilizar una punta nueva para transferir las PBMC restantes. Se pueden utilizar diversos medios para lavar las células durante estos pasos 3-5; se ha utilizado tanto AIM V como RPMI 1640 con buenos resultados, y se recomiendan ambos.

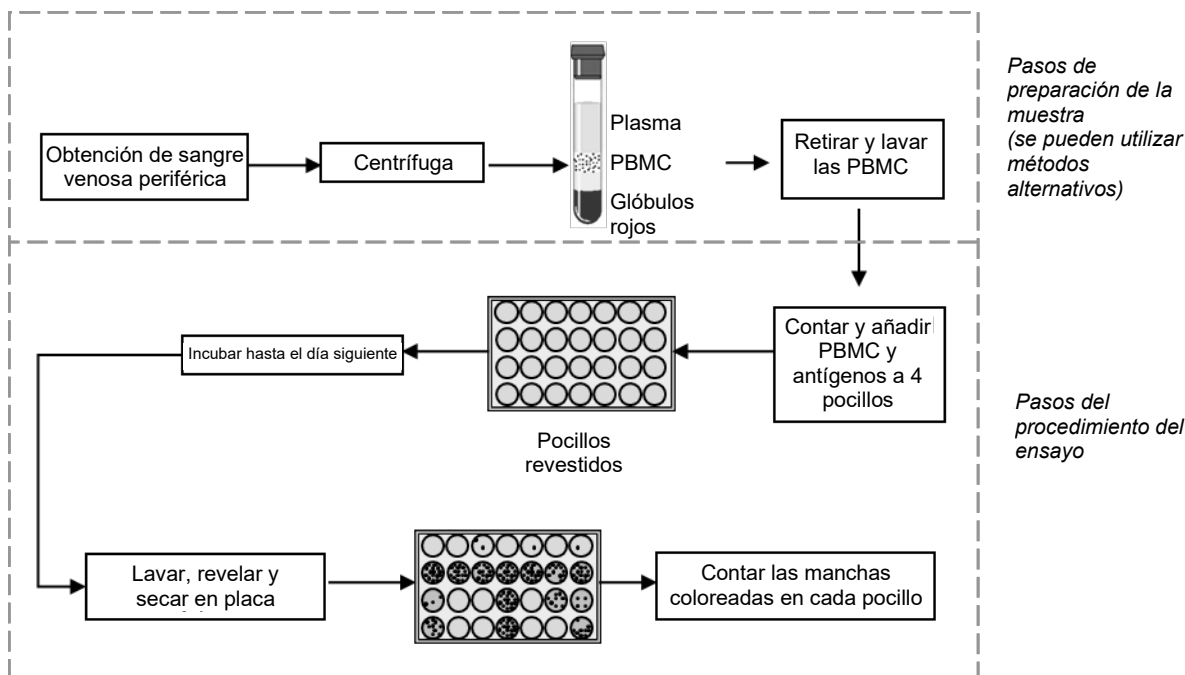
- Centrifugar a 600 RCF (g) durante 7 minutos. Verter el sobrenadante y resuspender el gránulo en 1 mL de medio.
- Enrasar el volumen hasta los 10 mL con medio nuevo y centrifugar a 350 RCF (g) durante 7 minutos.
- Verter el sobrenadante y resuspender el pellet en 0,7 mL de medio de cultivo celular. **Se ha utilizado el medio sin suero AIM V con buenos resultados y se recomienda.**

Nota: Los pasos 2-7 se deben realizar en una cabina BLII para proteger al usuario y evitar la contaminación de las muestras.

6. INSTRUCCIONES DE USO

Una placa completa de la prueba T-SPOT.COVID procesará 24 muestras de paciente. Por lo general, la prueba se realiza por la tarde de un día y la mañana del día siguiente, para permitir que el paso de incubación de 16-20 horas tenga lugar durante la noche. Si se utiliza esta planificación temporal, entonces se procesan las muestras de sangre en la tarde del 1.º día para preparar las PBMC para la prueba, y la prueba se inicia añadiendo las PBMC y los antígenos a la placa de la prueba y colocando la placa en la incubadora. El 2.º día, la placa se retira de la incubadora, se realizan los pasos de revelado y se lee la placa. El tiempo para procesar una placa completa es de aproximadamente 3 horas de tiempo transcurrido (el tiempo real de trabajo activo será menor debido a los pasos de centrifugación) el 1.º día y 30 minutos de tiempo de trabajo (que no incluyen la incubación de 1 hora del anticuerpo secundario ni el tiempo de secado de la placa) el 2.º día. El procedimiento para realizar la prueba se resume en la figura 2 y se describe con mayor detalle a continuación:

Figura 2: Diagrama que ilustra los pasos principales necesarios para realizar la prueba T-SPOT.COVID. Tener en cuenta que no se muestran los 96 pocillos de las placas en la ilustración.



PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Los viales de antígenos de espícula de SARS-CoV-2 (COV A), los antígenos de nucleocápside de SARS-CoV-2 (COV B) y el control positivo se suministran listos para usar.
2. Preparar una solución de reactivo conjugado de trabajo en una dilución 1:200. Calcular el volumen necesario de solución de reactivo conjugado de trabajo. El reactivo conjugado puede prepararse a la concentración de trabajo y conservarse a 2-8 °C hasta seis semanas antes de utilizarlo en la prueba.

Nota: Cada muestra de paciente utiliza 4 pocillos. Se añadirán 50 µL de reactivo conjugado diluido en cada pocillo. Por tanto, para una tira (2 muestras, 8 pocillos), preparar 500 µL de solución a la concentración de trabajo añadiendo 2,5 µL de reactivo conjugado concentrado a 497,5 µL de PBS. Para una placa de 96 pocillos (24 muestras), preparar 5 mL de solución a la concentración de trabajo añadiendo 25 µL de reactivo conjugado concentrado a 4.975 µL de PBS.

3. La solución de sustrato se suministra lista para usar. Antes de sacar la placa de la incubadora (2.º día), retirar la solución de sustrato de las condiciones de conservación y dejar que se equilibre a temperatura ambiente.

RECUESTO Y DILUCIÓN CELULAR

La prueba T-SPOT.COVID necesita 250.000 ± 50.000 PBMC por pocillo. Se necesita un total de cuatro pocillos para cada muestra de paciente; por tanto, se necesitan 1×10^6 PBMC por cada paciente. El número de células T de SARS-CoV-2 de la muestra se normaliza según un número fijo de PBMC.

1. Realizar un recuento de PBMC. Las células pueden contarse con diversos métodos, incluido el recuento manual con azul de tripano (u otro colorante adecuado) y un hemocitómetro, o con analizador hematológico automatizado.
2. En resumen, para el recuento manual con un hemocitómetro Neubauer y azul de tripano, añadir 10 µL de la suspensión celular final a 40 µL de solución de azul de tripano al 0,4 % (w/v). Colocar una alícuota adecuada en el hemocitómetro y contar las células en la cuadrícula. Para otros tipos de hemocitómetro y para dispositivos automatizados, seguir las instrucciones del fabricante.

Nota: Se debe tener cuidado para asegurarse de que la suspensión celular esté bien mezclada inmediatamente antes de extraer las alícuotas para contar. Las células pueden sedimentar al fondo del tubo y causar una interpretación errónea de la cantidad real de células. El mezclado se debe realizar girando suavemente el tubo a mano o agitando suavemente pipeteando la suspensión arriba y abajo varias veces.

3. Calcular la concentración de PBMC presentes en la suspensión celular madre.

Nota: Asegurarse de que el cálculo sea correcto para el sistema de recuento celular utilizado ya que si se utiliza una cantidad insuficiente o excesiva de células la interpretación del resultado puede ser incorrecta.

4. Preparar 500 µL de la suspensión celular final a una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/100 µL (obteniendo $1,25 \times 10^6$ PBMC en total).

Nota: Asegurarse de que las células estén bien mezcladas, agitando suavemente pipeteando la suspensión arriba y abajo varias veces antes de extraer una alícuota para su dilución. Se ha demostrado que los números de PBMC entre 200.000 y 300.000 por pocillo dan resultados coherentes de la prueba T-SPOT.

DISPOSICIÓN E INCUBACIÓN DE LA PLACA

La prueba T-SPOT.COVID requiere del uso de cuatro pocillos para cada muestra de paciente. Con cada muestra individual deben procesarse un control nulo y un control positivo. Se recomienda disponer las muestras verticalmente en la placa como se ilustra a continuación.

- Control nulo
- Panel A (COV-A) (espícula)
- Panel B (COV-B) (nucleocápside)
- Control

Cada placa de 96 pocillos puede procesar hasta 24 muestras de paciente. Utilizar el número de placas necesario para el número de muestras que se desean procesar. Con COV.435/300, cada tira procesará 2 muestras. Utilizar solo el número de tiras necesario. Precintar las tiras restantes en la bolsa de aluminio junto con el sobre de gel de sílice. Las tiras restantes se deben utilizar en un plazo de ocho semanas desde la apertura inicial de la bolsa, siempre que las tiras se conserven a 2-8 °C durante este periodo.

T-SPOT.COVID es una prueba que mide la función de las células T; no se necesitan curvas estándar. Por tanto, cada paciente solo necesitará utilizar 4 pocillos para cada muestra. La disposición recomendada de la placa para 24 muestras se muestra a continuación:

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

Leyenda: N=control nulo, A=panel A, B=panel B, M=control positivo de mitógeno

- Con COV.435/300, extraer del envase las tiras de 8 pocillos revestidos que se necesiten, sujetar a un soporte de placa y dejar equilibrar a temperatura ambiente. Extraer solo el número necesario de tiras, volver a precintar las tiras restantes sin utilizar y el sobre de desecante en el envase de aluminio, y volver a almacenarlo a 2-8 °C.

Nota: Sujetar las tiras que se usarán en un soporte de placas vacío que tenga cubierta inferior y tapa. Los soportes, las cubiertas y las tapas deben conservarse y reutilizarse.

- Añadir los paneles y los controles:
 - Añadir 50 µL de medio de cultivo celular AIM-V a cada pocillo de control nulo.
 - Añadir 50 µL de solución COV A a cada pocillo donde se requiera.
 - Añadir 50 µL de solución COV B a cada pocillo donde se requiera.
 - Añadir 50 µL de solución del control positivo a cada pocillo de control de funcionalidad celular.

No dejar que la punta de la pipeta toque la membrana. Las muescas en la membrana causadas por puntas de pipeta pueden causar artefactos en los pocillos.

- A cada uno de los 4 pocillos que se utilizarán para la muestra de un paciente, añadir 100 µL de la suspensión celular final del paciente (que contenga 250.000 PBMC). Utilizar una punta nueva para añadir células de cada paciente individual para evitar la contaminación cruzada entre pocillos. Tener cuidado de no contaminar los pocillos adyacentes al pasar líquido de un pocillo a otro si las puntas de pipeta se reutilizan para varios pocillos.

Nota: Asegurarse de que se ha mezclado (como en los pasos de Recuento y dilución celular) antes de retirar cada alícuota de 100 µL.

- Incubar la placa con la tapa puesta en una incubadora humidificada a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 16-20 horas. Evitar perturbar la placa una vez en la incubadora. No apilar las placas ya que esto puede causar una distribución de temperatura y ventilación no uniformes.

Nota: La incubadora de CO₂ debe estar humidificada. Comprobar que la bandeja de agua tenga agua suficiente como para garantizar que se consiga un ambiente húmedo.

REVELADO Y RECuento DE LAS MANCHAS

- Retirar la placa de la incubadora y desechar el medio de cultivo celular sacudiendo el contenido en un recipiente adecuado.

Nota: En este momento, retirar la solución de sustrato del kit y dejar equilibrar a temperatura ambiente.

- Añadir 200 µL de solución PBS a cada pocillo. **No utilizar PBS que contenga Tween® u otros detergentes, ya que esto genera recuentos altos de fondo.**

Nota: Usar PBS recién preparada o estéril.

- Desechar la solución de PBS. Repetir el lavado de pocillos 3 veces más con solución reciente de PBS en cada lavado. Se puede usar una lavadora automatizada para los pasos de lavado.

Nota: Para el lavado, puede utilizarse una pipeta multicanal o una lavadora de placas. Desechar la PBS en un recipiente adecuado después de cada lavado. No utilizar pipetas para eliminar la PBS, ya que hay riesgo de dañar la membrana. Si se utiliza una lavadora de placas, asegurarse de que el colector esté ajustado de forma que las puntas no toquen la membrana. Después del lavado final, golpee la placa suavemente sobre una toalla que no suelte pelusa para asegurarse de que se ha eliminado toda la PBS; cualquier exceso que quede diluirá más el reactivo conjugado.

- Si no se ha preparado ya durante el paso de preparación de los reactivos, diluir reactivo conjugado concentrado 200 veces en PBS para generar la solución a la concentración de trabajo.
- Añadir 50 µL de solución de reactivo conjugado a la concentración de trabajo a cada pocillo e incubar a 2-8 °C durante 1 hora.

Nota: Se recomienda utilizar una pipeta multicanal o una pipeta de pasos. Se debe tener cuidado para asegurarse de que el reactivo conjugado se añada a cada pocillo mientras la solución sea transparente e incolora; por tanto, puede ser difícil ver en qué pocillos se ha añadido.

6. Desechar el conjugado y realizar cuatro lavados con PBS como se describe en los pasos 2 y 3 de arriba.
7. Añadir 50 µL de solución de sustrato a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 7 minutos.
8. Lavar bien la placa con agua destilada o desionizada para detener la reacción de detección.
9. Dejar secar la placa colocándola en una zona bien ventilada o en un horno a una temperatura de hasta 37 °C.

Nota: Las manchas se hacen más visibles a medida que la placa se seca; por tanto, asegurarse de que la placa esté completamente seca antes de la lectura. Dejar secar 4 horas a 37 °C o al menos 16 horas a temperatura ambiente.

10. Contar y registrar la cantidad de manchas de color azul oscuro bien diferenciadas que están sobre la membrana de cada pocillo. Aplicar la interpretación de resultados y criterios de la prueba (ver a continuación) para determinar si la muestra de un paciente es “reactiva” o “no reactiva”. **Las manchas producidas como resultado de una estimulación de antígenos deben ser grandes, redondas y oscuras. A menudo se puede observar un efecto de degradado con un centro más oscuro y una periferia más difusa. Los artefactos no específicos que pueden producirse son más pequeños, menos intensos y de forma irregular.**

Nota: Las manchas se pueden contar directamente en el pocillo con una lupa o estereomicroscopio, o desde una imagen digital capturada desde un microscopio o sistema de imagen de placas.

Una vez reveladas, las placas de la prueba finalizadas permanecen estables y, por tanto, no es necesario leerlas inmediatamente. Las placas se pueden archivar para un control de calidad retrospectivo o para volver a examinarlas hasta 12 meses después si se mantienen en un lugar seco y oscuro a temperatura ambiente.

CONTROL DE CALIDAD

Es de esperar que un resultado típico tenga pocas o ninguna mancha en el control nulo y 20 o más manchas en el control positivo (ver las figuras 4a y b con los resultados típicos del estudio clínico de EE. UU.).

Un recuento de manchas en el control nulo que supere las 10 manchas debe considerarse “no válido”.

Típicamente, el recuento de manchas del control positivo de funcionalidad celular debe ser mayor o igual a 20 o mostrar saturación (demasiadas manchas para contarlas). Una pequeña proporción de pacientes puede tener células T que muestren solo una respuesta limitada a PHA¹. En casos en los que el recuento de manchas del control positivo sea menor que 20 manchas, debe considerarse “no válido”, a menos que el panel A o el panel B sea “reactivo” o “límite (equivoco)” según lo descrito en Interpretación de resultados y criterios de la prueba (ver a continuación), en cuyo caso el resultado es válido.

Si se producen resultados no válidos, estos deben consignarse como “No válido” y se recomienda obtener otra muestra y volver a hacer una prueba al sujeto.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y CRITERIOS DE LA PRUEBA

Consultar el apartado Control de calidad antes de aplicar los criterios siguientes.

Los resultados de la prueba T-SPOT.COVID se interpretan restando el recuento de manchas del pocillo del control nulo del recuento de manchas de cada uno de los paneles, de acuerdo con el siguiente algoritmo:

- El resultado de la prueba es Reactivo si (panel A-nulo) y/o (panel B-nulo) ≥ 8 manchas.
- El resultado de la prueba es No reactivo si tanto (panel A-nulo) como (panel B-nulo) ≤ 4 manchas. Esto incluye valores inferiores a cero.
- Los resultados en los que el recuento más alto de manchas del panel A o del panel B sea tal que el recuento de manchas de (panel menos nulo) sea de 5, 6 o 7 manchas debe considerarse Límite (equivoco), y se recomienda volver a hacer la prueba obteniendo otra muestra del paciente.
- Si el resultado sigue siendo Límite (equivoco) en la segunda prueba con otra muestra, deberán utilizarse otras pruebas diagnósticas y/o información epidemiológica para ayudar a determinar la respuesta inmunitaria adaptativa o celular a una infección con SARS-CoV-2 o una vacuna contra el SARS-CoV-2, ya sean estas recientes o anteriores.
- **Un resultado “Reactivo” indica que la muestra contiene células T efectoras sensibles a SARS-CoV-2. La presencia de células T sensibles podría derivarse de la vacuna o la infección con SARS-CoV-2.**
- **Un resultado “No reactivo” indica que no se detectaron células T efectoras sensibles a SARS-CoV-2.**

El algoritmo de interpretación se describe en el siguiente diagrama de flujo (figura 3) y en las tablas 1-3. Este algoritmo incluye también criterios de control de calidad.

Figura 3: Diagrama de flujo del algoritmo

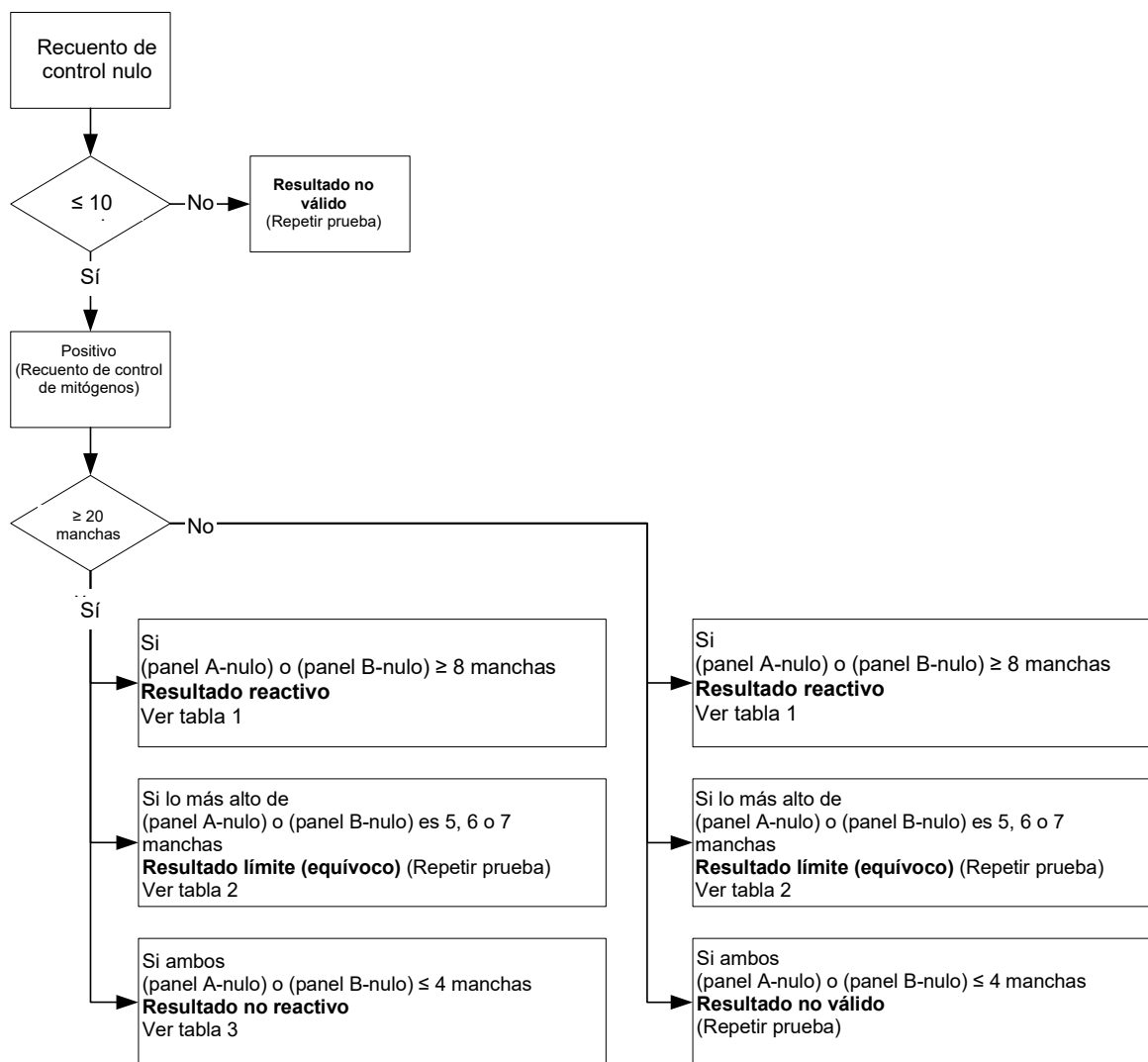


Tabla 1: Interpretación de Reactivo: O (panel A menos nulo) o (panel B menos nulo) ≥8 manchas

Control nulo Recuento de pocillos	O el panel A o el panel B tienen el número de manchas siguiente [†]	Interpretación de resultados
0	≥8	Reactivo
1	≥9	Reactivo
2	≥10	Reactivo
3	≥11	Reactivo
4	≥12	Reactivo
5	≥13	Reactivo
6	≥14	Reactivo
7	≥15	Reactivo
8	≥16	Reactivo
9	≥17	Reactivo
10	≥18	Reactivo
>10 manchas	n/p	No válido**

[†]Nota: Debe utilizarse el recuento de manchas de panel-nulo más alto para determinar el resultado de la prueba.

Tabla 2: Interpretación de Límite (equivoco): El más alto de (panel A menos nulo) o (panel B menos nulo) es 5, 6 o 7 manchas

Control nulo Recuento de pocillos	El más alto del panel A o panel B tiene el número de manchas siguiente	Interpretación de resultados
0	5, 6 o 7	Límite (equivoco)*
1	6, 7 u 8	Límite (equivoco)*
2	7, 8 o 9	Límite (equivoco)*
3	8, 9 o 10	Límite (equivoco)*
4	9, 10 u 11	Límite (equivoco)*
5	10, 11 o 12	Límite (equivoco)*
6	11, 12 o 13	Límite (equivoco)*
7	12, 13 o 14	Límite (equivoco)*
8	13, 14 o 15	Límite (equivoco)*
9	14, 15 o 16	Límite (equivoco)*
10	15, 16 o 17	Límite (equivoco)*
>10 manchas	n/p	No válido**

Tabla 3: Interpretación de Negativo: Tanto (panel A menos nulo) como (panel B menos nulo) ≤ 4 manchas

Control nulo Recuento de pocillos	Tanto el panel A como el panel B tienen el número de manchas siguiente	Interpretación de resultados
0	≤ 4	No reactivo
1	≤ 5	No reactivo
2	≤ 6	No reactivo
3	≤ 7	No reactivo
4	≤ 8	No reactivo
5	≤ 9	No reactivo
6	≤ 10	No reactivo
7	≤ 11	No reactivo
8	≤ 12	No reactivo
9	≤ 13	No reactivo
10	≤ 14	No reactivo
>10 manchas	n/p	No válido**

* Los resultados en los que el recuento más alto de manchas del panel A o del panel B sea tal que el recuento de manchas de (panel menos nulo) sea de 5, 6 o 7 manchas debe considerarse Límite (equivoco), y se recomienda volver a hacer la prueba obteniendo otra muestra del paciente.

** Si se producen resultados no válidos, estos deben consignarse como "No válido" y se recomienda obtener otra muestra y volver a hacer una prueba al sujeto.

7. LIMITACIONES

- Desviarse de las instrucciones de uso de este prospecto puede arrojar resultados erróneos.
- Una realización incorrecta de la prueba puede provocar respuestas de falso reactivo o falso no reactivo.
- Un resultado reactivo puede deberse a una infección activa o una infección anterior con SARS-CoV-2, o a la vacuna contra el SARS-CoV-2.
- La causa de un resultado falso no reactivo puede ser la obtención incorrecta de la muestra de sangre o una manipulación inadecuada de la muestra, que afecta a la función de los linfocitos.
- Un resultado no reactivo tanto en COV-A como en COV-B no excluye la posibilidad de que una persona haya montado una respuesta inmunitaria adaptativa tras la infección o la vacuna.
- El rendimiento de la prueba T-SPOT.COVID, con o sin el uso del reactivo T-Cell Xtend, no se ha evaluado adecuadamente con muestras de personas menores de 18 años, en mujeres embarazadas ni en pacientes con hemofilia.
- Puede obtenerse un resultado de falso reactivo para la prueba T-SPOT.COVID cuando esta se realiza en sujetos anteriormente expuestos a SARS-CoV-1 y otros coronavirus similares. Si se sospechara de estas infecciones, sería necesario hacer pruebas alternativas. Este kit se ha probado usando muestras disponibles en ese momento. No se ha evaluado aún el rendimiento con nuevas mutaciones de SARS-CoV-2.
- Los resultados de la prueba T-SPOT.COVID deben usarse en combinación con el historial epidemiológico, estado médico actual y resultados de otras valoraciones diagnósticas de cada persona.

- Un resultado no reactivo de la prueba no excluye la posibilidad de exposición, infección con SARS-CoV-2 o vacuna efectiva contra el SARS-CoV-2. Se debe considerar la repetición de la prueba en pacientes vacunados recientemente o con exposición reciente a personas infectadas con SARS-CoV-2 con un resultado no reactivo a la prueba T-SPOT.COVID en un periodo de 2 semanas, o si otros síntomas clínicos relevantes indican una posible infección.
- No se recomienda utilizar muestras refrigeradas y congeladas con la prueba T-SPOT.COVID.

LIMITACIONES ESPECÍFICAS PARA EL USO DEL REACTIVO T-CELL XTEND

1. El reactivo T-Cell *Xtend* no se ha evaluado para otro uso que no sean las pruebas T-SPOT.
2. No refrigerar ni congelar las muestras de sangre completa. Se deben conservar y transportar al laboratorio las muestras de sangre a una temperatura entre 18 y 25 °C.
3. Cualquier variación con respecto a los procedimientos de pipeteo, técnicas de lavado, temperaturas y/o tiempos de incubación recomendados puede afectar a los resultados de la prueba.

8. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El valor de corte de la prueba T-SPOT.COVID se determinó previamente durante el desarrollo utilizando análisis de curva ROC (característica operativa del receptor). Se determinó que la discriminación máxima entre personas con PCR positiva confirmada y aquellas con bajo riesgo de infección era de 6 manchas. Además, se estableció una zona límite de 5-7 para resolver la variación e incertidumbre de la prueba alrededor del punto de corte. Varios datos probatorios recientes señalan que con el mismo valor de corte se puede distinguir entre las personas vacunadas y las no vacunadas⁴¹.

Características de rendimiento analítico

La interferencia de anticuerpos heterófilos o IFN- γ intrínseco en la muestra de sangre se minimiza con la separación y lavado de la fracción de PBMC de la sangre completa. Esto elimina las cantidades de fondo de IFN- γ , así como otras fracciones de plasma, hemoglobina y anticuerpos heterófilos que interfieren.

Se espera que los leucocitos produzcan otras citocinas aparte de IFN- γ , incluyendo IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF α , IFN- α e IFN- β . Estas se examinaron para reactividad cruzada con el par de anticuerpos utilizados en la prueba T-SPOT. Los resultados demostraron que el par de anticuerpos utilizados en la prueba T-SPOT no revelaron pruebas de reactividad cruzada con otras citocinas.

La variabilidad intraensayo se analizó comparando la realización de la prueba T-SPOT en la misma placa y por el mismo operador. Los experimentos los llevaron a cabo tres operadores sobre nueve placas, con un resultado de un rango de % de CV representativo de la variación inherente de la prueba. El rango que se obtuvo para los recuentos elevados de manchas ($210,4 \pm 11,6$) estuvo entre 2,2 %-7,7 % de CV (media de % de CV = 4,4), los recuentos intermedios de manchas ($71,2 \pm 8,5$) arrojaron un rango de 6,6 %-16,5 % de CV (media de % de CV = 11,0 %), mientras que los recuentos de manchas cerca del punto de corte (media de recuento de manchas = $5,7 \pm 1,3$) dio una media de % de CV = 22,0 %.

Se obtuvieron datos de precisión interensayo, en los que tres operadores diferentes utilizaron tres lotes de kits para procesar las mismas tres muestras en seis ocasiones. El coeficiente de variación medido en las tres muestras, tres operadores y tres lotes fue del 3,7 % para muestras con un recuento promedio de manchas de 210,4. Para recuentos de manchas cercanos al punto de corte de la prueba T-SPOT.COVID, la variación interensayo fue de un 25,0 %. Para niveles moderados de manchas, la media de % de CV fue de 13,9 %. Los resultados para el % de CV fueron coherentes para cada uno de los lotes analizados.

La reproductibilidad entre operadores se evaluó utilizando tres operadores y una placa cada una de tres lotes de kits. La variación observada entre operadores fue del 3,6 %-5,8 % de CV.

Características de rendimiento clínico

Se llevó a cabo un estudio, utilizando el punto de corte predeterminado establecido en 6 manchas (datos en archivo), para evaluar el rendimiento clínico de la prueba T-SPOT.COVID en infección con SARS-CoV-2 confirmada por PCR (utilizando sujetos tanto sintomáticos como asintomáticos) para evaluar el rendimiento de la prueba en sujetos con infección aguda o convalecientes. Además, se valoró el rendimiento de la prueba en sujetos del estudio considerados de riesgo relativo de infección menor. Todas las muestras se analizaron con una prueba serológica anti-N IgG (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG) como comparador con la prueba T-SPOT.COVID.

Se inscribió un total de 281 sujetos en el estudio que cumplían con los criterios de inclusión. De estos, se inscribieron 169 sujetos en el grupo de infección con SARS-CoV-2 confirmada por PCR (la cohorte positiva). De estos, un sujeto se excluyó debido a una recuperación celular baja, y 17 debido a la falta de resultados serológicos, dejando 151 disponibles para el análisis.

Se inscribió un total de 112 sujetos para la cohorte de menor riesgo, de los cuales no se disponía de resultados serológicos confirmatorios en 4 casos, y 6 sujetos más se excluyeron después de devolver una prueba serológica confirmatoria positiva. Eso dejó 102 sujetos, de los cuales se excluyó una muestra por baja recuperación celular, y una por problemas técnicos con la prueba T-SPOT.COVID. Como resultado, se incluyeron en el análisis 100 sujetos de menor riesgo.

Los datos demográficos de las cohortes de PCR confirmada y menor riesgo se resumen a continuación:

Cohorte	Infección con SARS-CoV-2 confirmada por PCR	Riesgo relativo de infección menor
Número de sujetos	168	100
Media de edad (años) (DE)	50,5 (15,2) rango 19-83	54,7 (15,7) rango 18-87
% de hombres	38,7 % (65/168)	36,0 % (36/100)
Media de tiempo desde la primera prueba de PCR positiva (días) (rango)	83,4 (0,249)	No procede
% de sintomáticos	95,8 % (161/168)	No procede

Concordancia positiva entre personas confirmadas por PCR

151 pacientes, identificados como anteriores positivos en la prueba para SARS-CoV-2 por PCR se evaluaron utilizando la prueba T-SPOT.COVID y la prueba serológica anti-N IgG. Se registró el punto de tiempo desde el primer resultado de prueba PCR, que osciló entre 2 días y 249 días. No hubo resultados de T-SPOT.COVID no válidos en esta cohorte.

Tabla 4: Porcentaje de concordancia positiva con PCR a lo largo del tiempo incorporando todos los resultados tanto de T-SPOT.COVID como de prueba serológica anti-N IgG usando un punto de corte de reactividad de 6 manchas e ignorando la zona límite (límites incluidos).

Días desde la primera prueba PCR positiva	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Concordancia positiva	IC del 95 %	Concordancia positiva	IC del 95 %
0-6	100,0% (1/1)	2,5-100,0 %	0,0 % (0/1)	-
7-13	100,0 % (4/4)	39,8-100,0 %	25,0 % (1/4)	6,3-80,6 %
14-30	92,9 % (13/14)	66,1-99,8 %	64,3 % (9/14)	35,1-87,2 %
31-60	92,0 % (69/75)	83,4-97,0 %	80,0 % (60/75)	69,2-88,4 %
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 %

Tabla 5: Porcentaje de concordancia positiva con PCR a lo largo del tiempo incorporando todos los resultados, tanto de T-SPOT.COVID como de la prueba serológica anti-N IgG, usando solo resultados reactivos y no reactivos para la prueba T-SPOT.COVID (es decir, excluyendo los de la zona límite).

Días desde la primera prueba PCR positiva	T-SPOT.COVID		Anti-N IgG	
	Concordancia positiva	IC del 95 %	Concordancia positiva	IC del 95 %
0-6	100,0 % (1/1)	2,5-100,0 %	0,0 % (0/1)	-
7-13	100,0 % (4/4)	39,8-100,0 %	25,0 % (1/4)	6,3-80,6 %
14-30	100,0 % (12/12)	73,5-100,0 %	75,0 % (9/12)	42,8-94,5 %
31-60	95,7 % (67/70)	88,0-99,1 %	82,9 % (58/70)	72,0-90,8 %
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 %

Estos datos muestran un porcentaje de concordancia positiva entre la prueba T-SPOT.COVID y la PCR del 92,6 % (96,6 % excluyendo los resultados límite) hasta 60 días después de un resultado positivo de la prueba PCR. Después de este momento, el porcentaje de concordancia desciende ligeramente. Para momentos posteriores a 60 días desde el resultado de la PCR, la concordancia positiva fue del 80,7 % (83,3 % utilizando solo resultados determinantes).

En general, estos datos muestran un porcentaje de concordancia positiva entre la prueba serológica de anti-N IgG y la PCR de un 74,5 % hasta 60 días después de un resultado positivo de la prueba PCR. Después de este momento, el porcentaje de concordancia desciende. Para momentos posteriores a 60 días desde el resultado de la PCR, la concordancia positiva para serología anti-N IgG fue del 38,6 %.

Concordancia negativa entre los que se encuentran en un riesgo relativo de infección menor

Inscribimos una cohorte de participantes, en un marco endémico, pero en los que se había determinado un riesgo relativo menor de infección por SARS-CoV-2 basándose en: (i) la ausencia de síntomas comunicados por el paciente compatibles con una infección por SARS-CoV-2; (ii) sin historial de una prueba PCR positiva de SARS-CoV-2 anterior; (iii) sin participación en el ensayo de una vacuna y sin haber recibido una vacuna contra la COVID-19; (iv) una prueba serológica negativa de anti-N de flujo lateral (kit de prueba de anticuerpos Biohit SARS-CoV-2 IgM/IgG) usada como filtro primario en el momento de la inscripción; y (v) confirmación de una prueba serológica negativa utilizando una prueba serológica de laboratorio (prueba serológica anti-N IgG [Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG)]).

Tabla 6: Porcentaje de concordancia negativa

	N	Positivo	Negativo	Concordancia negativa (%) (IC del 95 %)
Incluyendo la zona límite	100	3	97	97,0 % (91,5-99,4)
Excluyendo la zona límite	98	2	96	98,0 % (92,8-99,8)

El 97,0 % de los resultados de la prueba T-SPOT.COVID (97/100) estuvieron por debajo del punto de corte de 6 manchas (intervalos de confianza del 95 % de 91,5-99,4 %). Hubo dos resultados límite (5 y 7 manchas). Cuando estos resultados se excluyeron, el 98,0 % (IC del 92,8-99,8 %) de los resultados de la prueba T-SPOT.COVID (96/98) fueron no reactivos. No hubo resultados no válidos.

Aunque tomamos todas las medidas razonables para garantizar que esta cohorte estuviera en un riesgo bajo de infección, no podemos descartar la posibilidad de que una parte de este grupo haya tenido, o tenga todavía, una infección asintomática seronegativa en el momento de la prueba, pero en la que la prueba T-SPOT.COVID fue capaz de detectar una respuesta de células T.

9. VALORES ESPERADOS

El rango de recuento de manchas observado en respuesta a los antígenos de control nulo y positivo y los antígenos de SARS-CoV-2 que se han observado en nuestros estudios clínicos (ver el apartado 8 para conocer más detalles sobre las cohortes del estudio clínico) aparece en las figuras 5a y b.

Figura 5a: Histograma de respuestas de control nulo de todos los sujetos del estudio (n = 251)

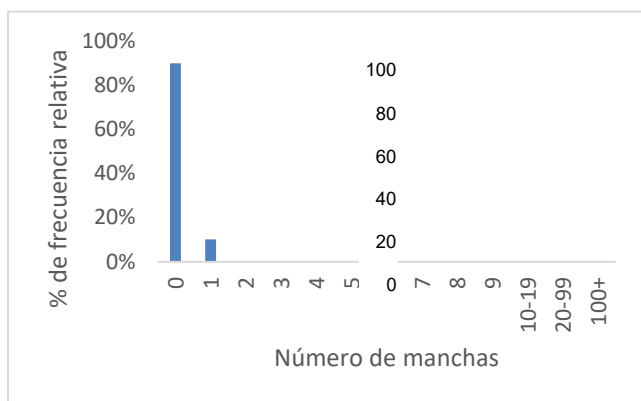


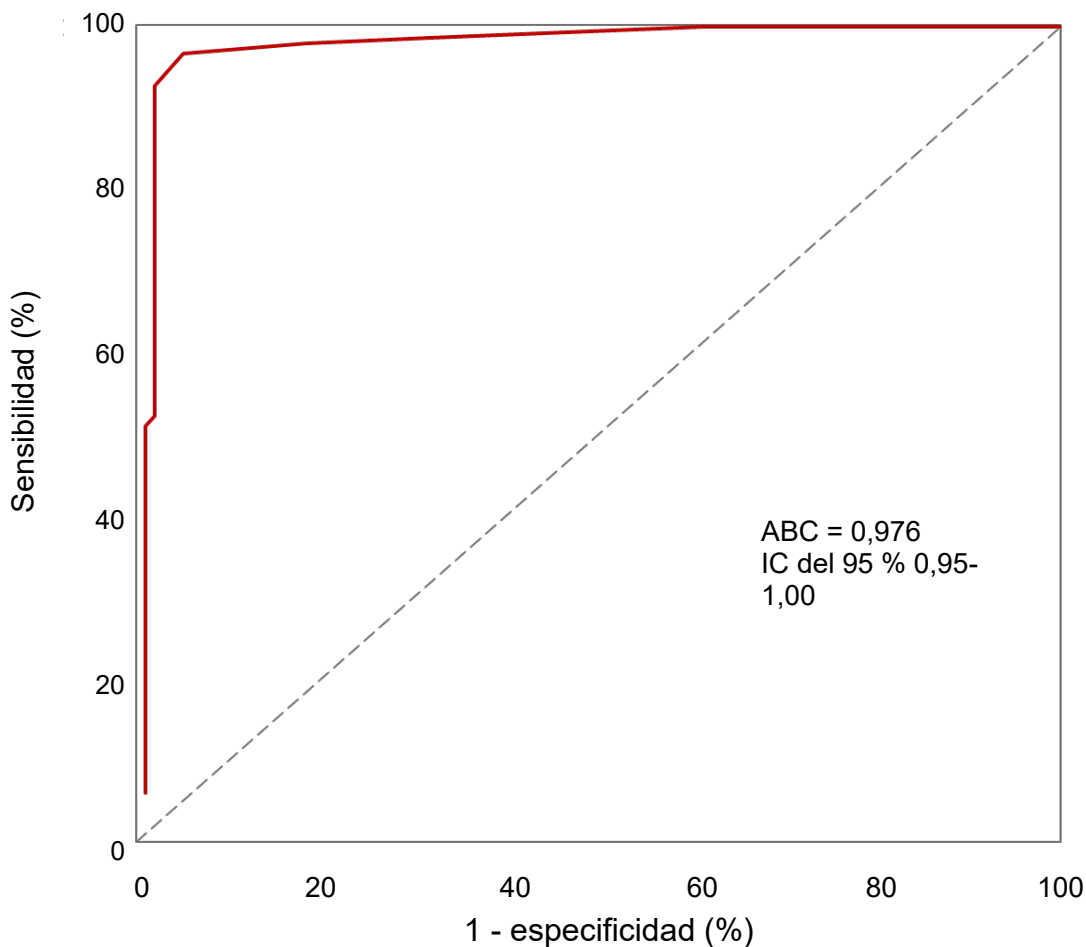
Figura 5b: Histograma de respuestas de control positivo de todos los sujetos del estudio (n= 251)



La inmensa mayoría de los pocillos de control nulo presentaron cero manchas y no se vio en el control nulo ningún recuento de manchas superior a uno. La respuesta al control positivo fue robusta y no se vieron casos de recuentos de manchas inferiores a 20 con el control positivo.

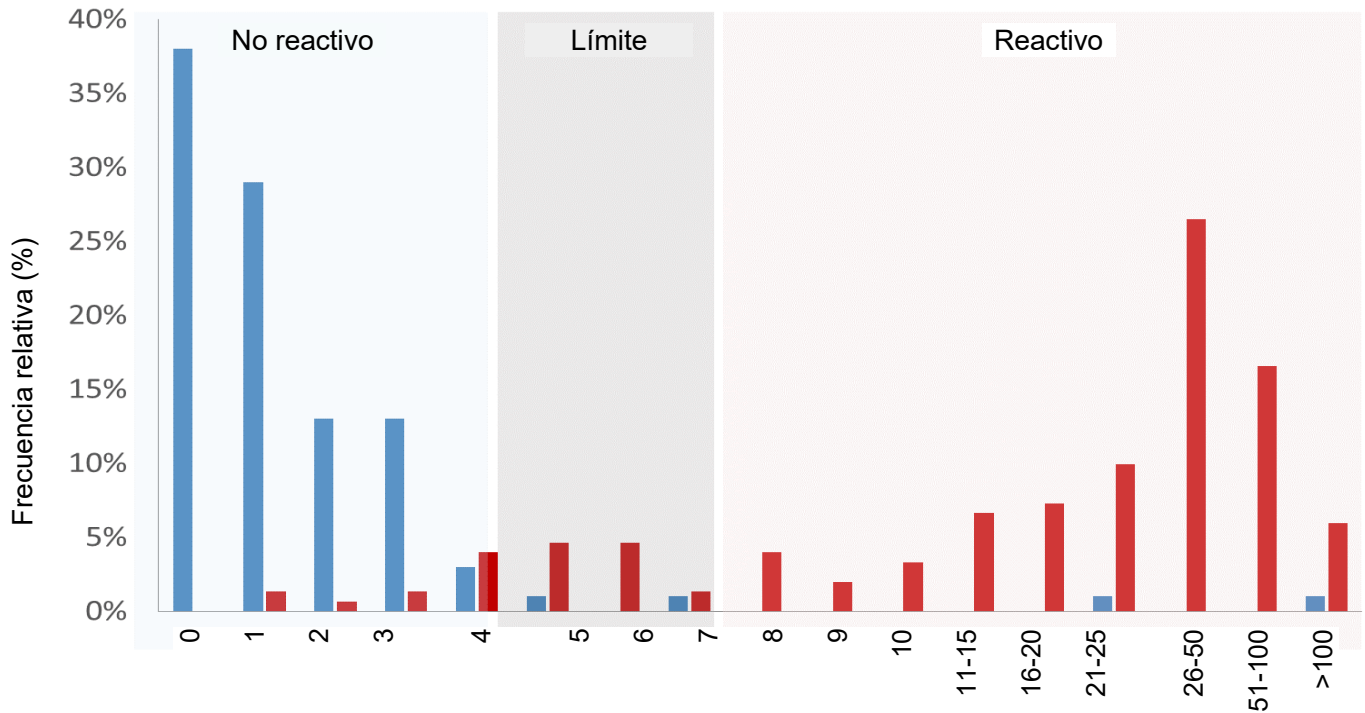
El punto de corte de la prueba se confirmó durante los estudios clínicos. La figura 6 muestra la curva ROC creada usando los datos obtenidos durante los estudios clínicos. Un punto de corte de 6 manchas proporcionó la máxima separación entre las dos cohortes, validando el nivel preseleccionado.

Figura 6: Curva de característica operativa del receptor creada utilizando los datos de validación generados a partir de 151 sujetos confirmados por PCR (usados para calcular la sensibilidad) y 100 sujetos con riesgo relativo de infección menor (usados para calcular la especificidad).



Se utilizaron también los mismos datos para confirmar el beneficio de incluir una zona límite, como se muestra en la figura 7.

Figura 7: Gráfico que muestra la distribución de recuentos de manchas observados con la prueba T-SPOT.COVID en estudios clínicos de los EE. UU. con una superposición de los criterios de interpretación de la prueba indicados. “Máximo recuento de manchas normalizado” es la respuesta máxima (panel menos nulo) del panel A o del panel B (n = 251). La frecuencia relativa de los diferentes recuentos de manchas se muestra para la cohorte clínica de menor riesgo (barras azules) y para la cohorte confirmada por PCR (barras rojas)



Máximo recuento de manchas normalizado, paneles A y B

La mayoría de los sujetos en la cohorte de menor riesgo (barras azules) mostró un nivel de reactividad bajo o nulo, con un 96,0 % en el rango de 0-4 manchas. Los sujetos confirmados por PCR (barras rojas) mostraron altos niveles de reactividad, con un 23,2 % entre 8-20 manchas y una mayoría (58,9 %) >20 manchas. La zona sombreada en gris representa la zona límite equívoca (5, 6 o 7 manchas) en la que, según se esperaba, se observa un solapamiento entre las distribuciones de recuentos de manchas de las dos cohortes del estudio. Cualquier prueba con resultados dentro de esta zona debe repetirse.

10. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Esta prueba debe llevarse a cabo siguiendo los principios de buenas prácticas de laboratorio y ciñéndose estrictamente a estas instrucciones de uso.

Resultados límite (equívocos)

Los resultados límite (equívocos) son aquellos en los que el máximo de los dos resultados de recuento de manchas (panel menos nulo) está entre ± 1 manchas a partir del punto de corte de la prueba determinado por la ROC de ≥ 6 manchas. Los resultados Límite (equívoco), aunque válidos, son menos fiables que los resultados en los que el recuento de manchas está más alejado del punto de corte. Por lo tanto, se recomienda volver a hacer la prueba del paciente con una muestra nueva. Si al hacer la prueba nueva el resultado sigue siendo Límite (equívoco), deberán utilizarse otras pruebas de diagnóstico y/o información epidemiológica para ayudar a determinar el estado de inmunidad del paciente.

Resultados no válidos

Los resultados no válidos son poco comunes y pueden estar relacionados con el estado de inmunidad de la persona a la que se hace la prueba. Pueden estar relacionados también con diversos factores técnicos, que producen potencialmente resultados “altos de fondo”, “mitógenos bajos” y “altos de nulo”, por ejemplo:

- Uso de tubos para obtención de sangre inadecuados.
- Sangre almacenada durante más de 8 horas antes del procesamiento sin usar reactivo T-Cell *Xtend*.
- Sangre conservada fuera del rango de temperatura recomendado antes de procesar las muestras de sangre.
- Contaminación del medio de cultivo celular.
- Lavado de la placa incompleto.











Para los resultados no válidos, se recomienda repetir la prueba utilizando una muestra nueva del paciente. Existen documentos técnicos que tratan los puntos principales de resolución de problemas. Puede obtenerlos poniéndose en contacto con Oxford Immunotec.

11. ABREVIATURAS Y GLOSARIO DE SÍMBOLOS

Abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitrozul de tetrazolio
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
IC	Intervalo de confianza
CLIA	Enmiendas para la mejora de los laboratorios clínicos
CPT	Tubos de preparación de células
CV	Coefficiente de variación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ELISPOT	Inmunoensayo por manchas ligado a enzimas
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHA	Fitohemaglutinina
RCF	Fuerza centrífuga relativa
RoC	Característica operativa del receptor
RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR de transcriptasa inversa
TNF	Factor de necrosis tumoral

Lista de símbolos

	Producto sanitario de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Uso preferente/Fecha de caducidad (año-mes-día)
	Número de lote
	Número de catálogo
	Atención, ver las instrucciones de uso
	Fecha de fabricación
	Fabricante
	Límites de temperatura/Conservar entre
	Consultar las instrucciones de uso
	Representante autorizado en la UE

BS EN ISO 15223-1:2016

Los símbolos utilizados para la prueba T-SPOT.COVID cumplen la norma internacional ISO 15223-1:2016; "Productos sanitarios. Símbolos a utilizar en las etiquetas, el etiquetado y la información a suministrar".

12. BIBLIOGRAFÍA

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, Rouphael NG *et al.* An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 – Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2020; 383:1920-1931
26. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK *et al.* Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomized controlled trial. *The Lancet.* 2020; 396(10249):467-478
27. Sauer K, Harris T. An effective COVID-19 vaccine needs to engage T cells. *Front. Immunol.* 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.581807>
28. Simon D, Tascilar K, Schmidt K *et al.* Brief Report: Humoral and cellular immune responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination in B cell depleted autoimmune patients. *Arthritis & Rheumatology.* 2021; DOI: 10.1002/art.41914
29. Lindemann M, Klisanin V, Thummler L *et al.* Humoral and cellular vaccination responses against SARS-CoV-2 in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Vaccines.* 2021; 9(10): 1075
30. Trougakos IP, Terpos E, Zirou C *et al.* Comparative kinetics of SARS-CoV-2 anti-spike protein RBD IgGs and neutralizing antibodies in convalescent and naïve recipients of the BNT162b2 mRNA vaccine versus COVID-19 patients. *BMC Medicine.* 2021; 19: 208
31. Gounant V, Ferre VM, Soussi G *et al.* Efficacy of SARS-CoV-2 vaccine in thoracic cancer patients: a prospective study supporting a third dose in patients with minimal serologic response after two vaccine doses. *Journal of Thoracic Oncology.* 2022; 17(2): 239-251
32. Ramasamy K, Sadeler R, Jeans S *et al.* Immune response to COVID-19 vaccination is attenuated by poor disease control and antimyeloma therapy with vaccine driven divergent T cell response. *British Journal of Haematology.* 2022; doi: 10.1111/bjh.18066
33. Simon D, Tascilar K, Fagni F *et al.* Efficacy and safety of SARS-CoV-2 revaccination in non-responders with immune-mediated inflammatory disease. *Ann Rheum Dis.* 2021; doi: 10.1136/annrheumdis-2021-221554
34. Koller MD, Kiener HP, Aringer M, Graninger WB, Meuer S, Samstag Y, Smolen JS. Functional and molecular aspects of transient T cell unresponsiveness: role of selective interleukin-2 deficiency. *Clin Exp Immunol.* 2003; 132(2): 225-231
35. Kouwenhoven M, Ozenci V, Teleshova N *et al.* Enzyme-linked immunospot assays provide a sensitive tool for detection of cytokine secretion by monocytes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 2001; 8(6): 1248-1257
36. Tanguay S, Killion J. Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994;13: 259-263
37. Cox JH, Ferrari G, Janetzki S. Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay. *Methods.* 2006; 38(4): 274-82
38. Lehmann A, Kirchenbaum G, Zhang T, Reche P, Lehmann P. Deconvoluting the T cell response to SARS-CoV-2: specificity versus chance and cognate cross-reactivity. *Frontiers in Immunology.* 2021; doi: 10.3389/fimmu.2021.635942
39. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM *et al.* Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and association with age and disease severity. *Cell.* 2020; 183(4): 996-1012
40. Wei J, Zhao J, Han M, Meng F, Zhou J. SARS-CoV-2 infection in immunocompromised patients: humoral versus cell-mediated

immunity. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2020; 8(2)

41. Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, van Dissel JT, Theisen M, Andersen P and Ottenhoff T. Antigenic equivalence of Human T Cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and Culture Filtrate Protein 10 and to mixtures of synthetic proteins. *Infection and Immunity*. 2000; 68(6): 3314-3321.
42. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G and Hill AVS. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2001; 163: 824-828.
43. NCCLS Approved Guideline. Performance of Single Cell Immune Response Assays, I/LA26-A
44. Brill L, Rechtman A, Zveik O, Haham N, Oiknine-Dijian E, Wolf D, Levin N, Raposo C and Vaknin-Dembinsky A. Humoral and T-Cell Response to SARS-CoV-2 Vaccination in Patients With Multiple Sclerosis Treated with Ocrelizumab. *JAM Neurol*. 2021. Doi:10.1001/Jamaneurol.2021.3599

13. NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES GRAVES

Si se produce un incidente grave en relación con este producto, debe notificarse al Servicio al cliente. En los Estados Miembros de la Unión Europea, los incidentes graves también deben notificarse a la autoridad competente (el departamento gubernamental responsable de los productos sanitarios de diagnóstico in vitro) de su país. Consulte el sitio web de su gobierno para saber cómo contactar con su autoridad competente. Por "incidente grave" se entiende cualquier incidente que directa o indirectamente haya conducido, pueda haber conducido o pueda conducir a:

- el fallecimiento de un paciente, usuario u otra persona;
- el deterioro grave, temporal o permanente, del estado de salud de un paciente, usuario u otra persona;
- una amenaza grave para la salud pública.

14. INFORMACIÓN DE CONTACTO

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

Para descargas de asistencia de producto e información técnica adicional, visite nuestro sitio web:

www.oxfordimmunotec.com

Fabricante

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

 Representante autorizado en la UE

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

T-SPOT y T-Cell *Xtend* son marcas comerciales registradas de Oxford Immunotec Ltd.

El logotipo de Oxford Immunotec es una marca comercial registrada de Oxford Immunotec Ltd.

AIM V y GIBCO son marcas comerciales registradas de Life Technologies Corporation.

CPT y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company.

Ficoll y Ficoll-Paque son marcas comerciales registradas de Cytiva, una filial de Global Life Sciences Solutions USA LLC.

Tween es una marca comercial registrada de Croda Americas LLC.

El uso del reactivo T-Cell *Xtend* está protegido por las siguientes patentes y patentes en trámite:

EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Número de la revisión: 5 Fecha de publicación: Abril 2023

© 2023 Oxford Immunotec. Reservados todos los derechos.

Número de versión	Fecha de lanzamiento	Modificaciones
1-4	Detalles disponibles,	previa solicitud en Oxford Immunotec.
5	Abril 2023	Adición historial de revisión. Adición de instrucciones para reportar graves incidentes



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

