



T-SPOT[®] COVID

 **Oxford**
Immunotec



NOTICE

Pour les diagnostics *in vitro*

Cette notice décrit l'utilisation de :

COV.435/300, COV.435/200

Table des matières

Usage prévu.....	3
Résumé et explication.....	3
Réactifs et conservation.....	5
Conservation et stabilité.....	5
Avertissements et précautions.....	6
Collecte et manipulation des spécimens.....	7
Mode d'emploi.....	8
Contraintes.....	14
Caractéristiques de performance.....	15
Valeurs attendues.....	18
Résolution des problèmes.....	19
Abréviations et glossaire des symboles.....	20
Références.....	20
Coordonnées.....	22
Droits de propriété intellectuelle et historique des révisions de la notice.....	22

1. USAGE PRÉVU

Le test T-SPOT.COVID est une technique standardisée basée sur ELISPOT (immuno-enzymatique) destinée à la détection qualitative d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (lymphocytes T) au SARS-CoV-2 dans un prélèvement de sang total humain (héparine sodium ou lithium ou citrate de sodium). Le test T-SPOT.COVID est destiné à identifier et à surveiller les personnes présentant une réponse immunitaire (lymphocytes T) au SARS-CoV-2 lymphocytes T.

Une réponse des lymphocytes T au SARS-CoV-2 est généralement détectable dans le sang plusieurs jours après, soit une infection initiale, soit la vaccination. La limite de la mesure dans le temps de la réponse des lymphocytes T après l'infection ou la vaccination n'est pas encore bien définie.

2. RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le SARS-CoV-2 est une souche de coronavirus découverte dans la province de Wuhan en Chine en 2019. Le virus s'est rapidement répandu dans le monde entier au cours des premiers mois de 2020, ce qui a conduit à la déclaration d'une pandémie par l'OMS le 11 mars 2020¹. La détection et l'isolement des personnes infectées par le virus SARS-CoV-2, combinés au déploiement mondial des vaccins approuvés contre la COVID-19, ont été essentiels pour contrôler la propagation du virus. Cependant, malgré de nombreux tests COVID-19 et l'accueil largement favorable réservé aux vaccins, il est clair que le virus SARS-CoV-2 ne cesse de se propager et de provoquer une morbidité et une mortalité importantes². On ne sait pas non plus combien de temps durera la protection conférée par les vaccins COVID-19 et on craint que la diminution des réponses immunitaires dans les mois suivant la vaccination n'expose à nouveau les personnes au risque de contracter une forme grave de COVID-19^{3,4}. Ces préoccupations s'observent en particulier dans les populations vulnérables, telles que les personnes immunodéprimées et les personnes âgées, à qui l'on propose déjà dans certains pays⁵ une troisième dose de vaccins afin de « stimuler » la réponse immunitaire induite par le vaccin. Alors qu'un nombre toujours croissant de personnes sont entièrement vaccinées et reçoivent des rappels de vaccination, l'importance de comprendre la réponse immunitaire à la fois à l'infection naturelle et à la vaccination est de plus en plus largement reconnue.

Les tests sérologiques ont été rapidement développés au début de la pandémie et sont encore très utilisés pour fournir des informations sur la capacité d'une personne à développer une réponse immunitaire humorale à la suite à une infection naturelle par le SARS-CoV-2 ou à une vaccination⁶. Cependant, les tests sérologiques fournissent des informations - concernant un seul bras du système immunitaire adaptatif et, à ce titre, les tests d'anticorps seuls peuvent sous-évaluer l'étendue de la réponse immunitaire générée par une personne^{7,8}. Plusieurs études ont montré que la réponse humorale à l'infection naturelle est très variable^{9,10}, avec des titres d'anticorps faible souvent observés chez les personnes souffrant d'une infection COVID-19 asymptomatique^{11,12}. Certaines personnes n'ont pas de réponse humorale détectable⁹. Il a été démontré que les vaccins contre la COVID-19 induisent de fortes réponses humorales chez la majorité des personnes vaccinées¹³; cependant, il est prouvé que ces réponses commencent à décliner dans les mois suivant la deuxième dose^{3,4,14}. Il existe également des personnes souffrant d'immunodéficience primaire, qui ne produisent pas d'anticorps, la sérologie utilisée isolément ne permet pas d'évaluer la réponse immunitaire adaptative de telles personnes.¹⁵

La réponse des lymphocytes T ou immunité à médiation cellulaire, est l'autre bras de la réponse immunitaire adaptative, et le test de détection des lymphocytes T a été utilisé à la fois en recherche et biologie clinique pendant la pandémie de COVID-19 pour fournir de nouvelles informations sur les réponses immunitaires à l'infection et à la vaccination par le SARS-CoV-2¹⁶. Plusieurs publications ont montré que les réponses des lymphocytes T aux coronavirus humains, y compris le SARS-CoV-1 et le SARS-CoV-2, peuvent être fortes et durables¹⁷, certaines personnes qui ont été infectées par le SARS-CoV-1 il y a 17 ans présentent encore aujourd'hui des réponses à médiation cellulaire mesurables avec les lymphocytes T¹⁸. Plusieurs études ont montré que l'immunité des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 se maintient 6 à 9 mois après la primo-infection, ce qui indique que la réponse immunitaire cellulaire est détectable avec les lymphocytes T alors que la sérologie est négative, le titre d'anticorps n'étant plus détectable.^{17,19} Des études montrent désormais des délais similaires après la vaccination²⁰. Ces résultats, ainsi que les études qui ont démontré le rôle essentiel des lymphocytes T dans la clairance virale et la récupération après une infection par le SARS-CoV-2²¹, suggèrent que l'immunité à médiation cellulaire pourrait être un aspect important de toute immunité protectrice développée contre le SARS-CoV-2²². En outre, bien que la dynamique de la réponse spécifique des lymphocytes T au SARS-CoV-2 n'ait pas encore été entièrement élucidée, les données disponibles suggèrent que la majorité des personnes infectées par le SARS-CoV-2 produisent des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2, fonctionnelles, produisant de l'IFN-gamma (IFN- γ), qui peuvent être détectées dans le sang périphérique dès 2 à 4 jours après l'apparition des symptômes²². Des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 ont également été détectées entre les Jours 7 et 14 après la vaccination²³.

Des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 ont été détectées en réponse à de nombreux vaccins actuellement développés^{24,25,26}, et il est de plus en plus important de détecter et de surveiller ces réponses²⁷. Le test T-SPOT.COVID a été utilisé pour mettre en évidence une réponse spécifique des lymphocytes T après la vaccination dans plusieurs

'études^{28,29,30,31,32,33}. Il est important de noter que plusieurs de ces études ont démontré que le test T-SPOT.COVID détecte des réponses des lymphocytes T chez les personnes immunodéprimées^{29,31,32,33}, notamment les patients suivant des thérapies de déplétion des lymphocytes B qui ne développent pas de fortes réponses humorales²⁸.

Le test T-SPOT.COVID est un test ELISPOT standardisé marqué CE IVD. Les tests ELISPOT détectent et mesurent les réponses des lymphocytes T en dénombrant le nombre de lymphocytes T qui sécrètent des cytokines en réponse à une stimulation par des antigènes. Les tests ELISPOT sont exceptionnellement sensibles car la cytokine cible est capturée directement autour de la cellule sécrétrice, la cytokine n'est pas diluée dans le milieu réactionnel et elle n'est pas adsorbée par des cellules adjacentes ou dégradée. De ce fait, les tests ELISPOT sont beaucoup plus sensibles que les tests ELISA classiques^{34,35,36,37}. La sensibilité est importante pour détecter les réponses des lymphocytes T au SARS-CoV-2, car la concentration des lymphocytes T peut être plus faible que celle observée pour d'autres virus qui induisent des réponses des lymphocytes T³⁸. Divers facteurs, dont l'âge³⁹, la gravité de la maladie⁷ et l'immunosuppression⁴⁰, ont été associés à la variabilité de l'ampleur des réponses des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2. Plusieurs études ont mis en évidence l'intérêt de la sensibilité de la technologie ELISPOT, le test T-SPOT.COVID à permis de détecter les réponses des lymphocytes T à la vaccination chez les personnes immunodéprimées^{28,29,30,31,32,33}.

Le test permet de dénombrer les lymphocytes T effecteurs qui répondent à une stimulation utilisant deux puits de peptides distincts dérivés des protéines Spike et des protéines de nucléocapside du SARS-CoV-2. La réponse des lymphocytes T à chaque protéine est mesurée simultanément dans des puits individuels. Les puits d'antigènes T-SPOT.COVID sont conçus sous forme de peptides superposés couvrant les séquences des protéines Spike (COV-A) et nucléocapside (COV-B). Cette conception de peptides offre une couverture maximale des épitopes pour une meilleure détection de la réactivité des lymphocytes T et aucune restriction HLA. Les formules antigéniques de 253 peptides couvrant les régions les plus immunogènes du génome du virus permettent de mesurer l'étendue de l'immunité et garantissent que l'impact des mutations ponctuelles est minimisé. La spécificité du SARS-CoV-2 a été renforcée par l'élimination des séquences peptidiques pouvant présenter une réaction croisée, ayant une forte homologie avec d'autres coronavirus.

PRINCIPE DU TEST

La réponse immunitaire à l'infection par le SARS-CoV-2 est déclenchée par l'activation des lymphocytes B et T. Les lymphocytes T sont sensibilisés aux antigènes du SARS-CoV-2, ils activent les lymphocytes T effectrices CD4 et CD8, qui produisent ensuite la cytokine IFN- γ lorsqu'elles sont stimulées par ces antigènes^{38,39}. Le test T-SPOT.COVID repose sur la méthode immuno-enzymatique (ELISPOT) pour dénombrer les lymphocytes T sensibilisés au SARS-CoV-2 en capturant IFN- γ à proximité des lymphocytes T par lesquelles il a été sécrété⁴³.

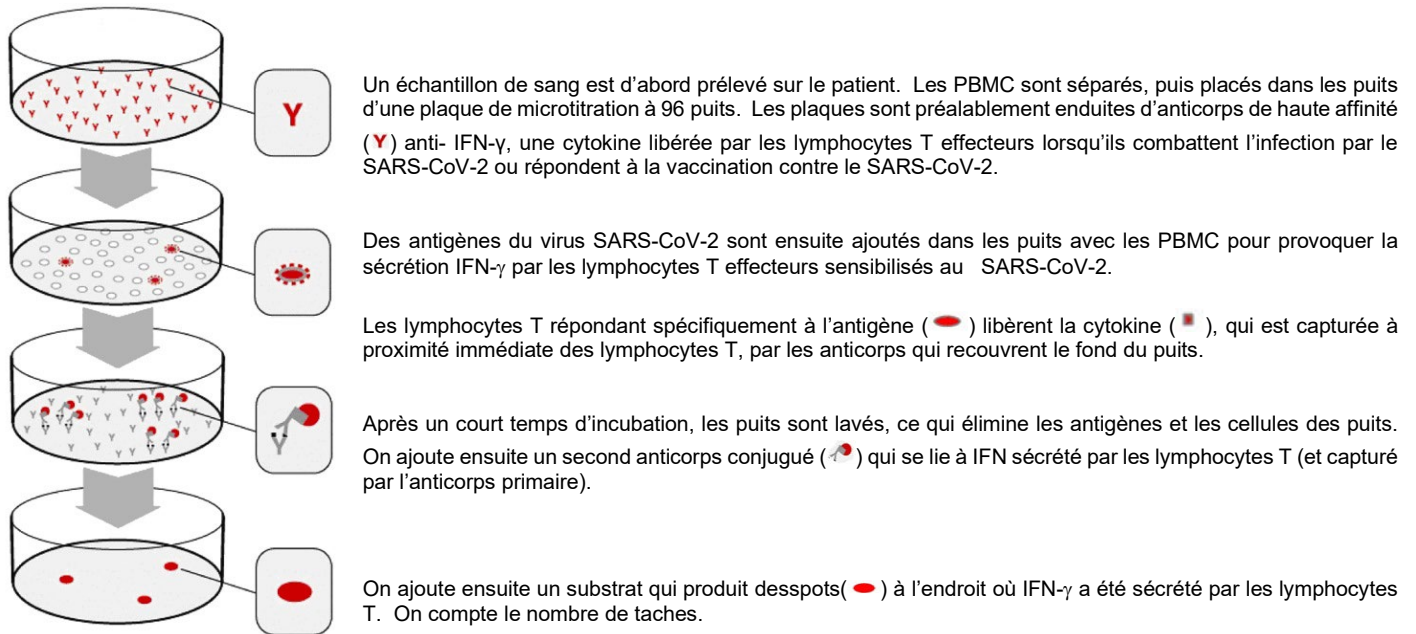
Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont séparées des échantillons de sang entier, lavées puis comptées avant d'être ajoutées au test.

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) isolées sont placées dans des puits de microtitration où elles sont mises en présence d'un témoin de phytohémagglutinine (PHA) (un stimulateur mitogène indiquant la fonctionnalité physiologique des cellules), d'un témoin nul et de deux puits distincts d'antigènes du SARS-CoV-2 dérivés respectivement des protéines Spike et protéines de nucléocapside. Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont incubées avec les antigènes pour permettre la stimulation des lymphocytes T sensibilisés présentes.

La cytokine sécrétée est capturée par des anticorps spécifiques à la surface de la membrane, qui constitue la base des puits, et les cellules et les autres composés chimiques sont éliminées par lavage. Un deuxième anticorps, conjugué à la phosphatase alcaline et dirigé vers un épitope différent de la molécule de cytokine, est ajouté et se lie à la cytokine capturée sur la surface de la membrane. Tout conjugué non lié est éliminé par lavage. Un substrat soluble est ajouté dans chaque puits ; il est clivé par l'enzyme liée pour former une tache (bleu foncé) de précipité insoluble au site de la réaction.

L'évaluation du nombre des spots obtenues fournit une mesure de l'abondance des lymphocytes T effecteurs dans le sang périphérique sensibilisé au SARS-CoV-2. Les principes qui sous-tendent la plateforme de test T-SPOT sont décrits dans la figure 1 ci-dessous.

Figure 1 : Principes du test T-SPOT. À titre indicatif uniquement, se reporter à la section 6, Mode d'emploi, pour les instructions détaillées de la procédure.



3. RÉACTIFS ET CONSERVATION

MATERIEL FOURNI

Les tests T-SPOT.COVID COV.435/300 (bandes de puits 12 x 8 multi-usages) et COV.435/200 contiennent :

- 1 plaque de microtitration : 96 puits, fournis sous forme de 12 bandes de 8 puits individuelles dans un cadre séparé (COV.435/300) ou de bandes de puits 12 x 8 dans une plaque unique (COV.435/200), recouverts d'un anticorps monoclonal de souris anti-cytokine IFN- γ .
- 2 flacons (0,8 mL chacun) Puit A (COV-A) : contiennent des antigènes de la protéine S Spike, de l'albumine de sérum bovin et des agents antimicrobiens.
- 2 flacons (0,8 mL chacun) Puit B (COV-B) : contiennent des antigènes de la protéine nucléocapside, de l'albumine de sérum bovin et des agents antimicrobiens.
- 2 flacons (0,8 mL chacun) Témoin positif : contiennent de la phytohémmagglutinine (PHA), pour le contrôle des fonctions cellulaires, de l'albumine de sérum bovin et des agents antimicrobiens.
- 1 flacon (50 μ L) de réactif conjugué concentré 200 fois : anticorps monoclonal de souris anti-cytokine IFN- γ conjugué à la phosphatase alcaline.
- 1 bouteille (25 mL) de solution de substrat : solution BCIP/NBT^{plus} prête à l'emploi.
7. Notice

Remarque : Les plaques de microtitration solides de 96 puits utilisées dans le kit T-SPOT.COVID COV.435/200 et les bandes de 8 puits utilisées dans le kit COV.435/300 sont des articles à usage unique qui doivent être utilisés immédiatement après ouverture et ne doivent pas être réutilisés. Ne pas mélanger les éléments des différents kits.

CONSERVATION ET STABILITE

Le kit non ouvert doit être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C. Les éléments du kit sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur la boîte du kit, lorsqu'ils sont conservés et manipulés selon les instructions. Le kit ne doit pas être utilisé au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Si la date de péremption d'un élément est postérieure à celle indiquée sur la boîte (extérieure) du kit, ne conservez pas cet élément et ne l'utilisez pas avec un autre kit ; n'utilisez aucun élément du kit après la date de péremption indiquée sur la boîte extérieure du kit.

Conservez les éléments du kit ouverts à une température comprise entre 2 et 8 °C. Les éléments ouverts du test T-SPOT.COVID (COV.435/300) doivent être utilisés dans les 8 semaines suivant leur ouverture et ceux du test T-SPOT.COVID (COV.435/200) dans les 4 semaines suivant leur ouverture, et ce, au plus tard à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit. **Évitez toute exposition prolongée de la solution de substrat à la lumière.**

ÉQUIPEMENT ET MATERIEL REQUIS, MAIS NON FOURNIS

1. Cadre de plaque à bandes de 8 puits (disponible chez Oxford Immunotec).
2. Hotte BLII (recommandée).
3. Tubes de prélèvement sanguin, tels que Vacutainer^{MD} CPTTM, tubes héparinés ou tubes contenant du citrate.
4. Réactif T-Cell *Xtend*^{MD} - les échantillons de sang entier, conservés à température ambiante (18-25 °C) entre 0 et 32 heures après la ponction veineuse, peuvent être traités avec le réactif T-Cell *Xtend*.
5. Ficoll^{MD} (si on n'utilise pas de tubes CPT).
6. Une centrifugeuse pour la préparation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), (capacité d'au moins 1800 RCF (g), capable de maintenir les échantillons à température ambiante (18-25 °C) si l'on utilise des méthodes de centrifugation de densité pour séparer les cellules mononucléées.
7. Équipement et réactifs permettant de compter les cellules mononucléées du sang périphérique, soit manuellement avec du bleu Trypan (ou un autre colorant approprié) et un hémocytomètre sur un microscope, soit automatiquement avec un analyseur hématologique approprié.
8. Un incubateur humidifié pouvant atteindre 37 ± 1 °C avec une alimentation en CO₂ à 5 %.
9. Un laveur automatique de plaques de microtitration ou une pipette à 8 canaux ou une pipette stepper pour laver manuellement les plaques.
10. Des pipettes réglables pour couvrir une gamme de volumes allant de 1 à 1000 µL (par exemple quatre pipettes capables de délivrer des volumes de 1-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL et 100-1000 µL) et des embouts de pipette stériles.
11. Solution PBS (tampon phosphate salin) stérile : telle que GIBCO^{MD} 1x D-PBS (Life Technologies ; numéro de catalogue 14040-133).
12. Eau distillée ou déionisée.
13. Un moyen de visualiser les puits, ou de capturer une image numérique du puits, tel qu'un stéréomicroscope, une loupe ou un imageur de plaque pour permettre le comptage des taches.
14. Un milieu de culture cellulaire stérile tel que GIBCO AIM V^{MD} (Life Technologies ; numéro de catalogue 31035-025, catégorie recherche). (Remarque : Le milieu AIM V est disponible chez Oxford Immunotec). **L'utilisation de ce milieu sans sérum pour l'étape d'incubation est recommandée.** Le milieu RPMI 1640 (Invitrogen ; numéro de catalogue 11875-093) ne peut être utilisé que pour les étapes initiales de préparation des échantillons. Il est recommandé de conserver les milieux de culture cellulaire dans des aliquotes appropriées et de jeter l'excédent après utilisation. **Les milieux de culture cellulaire doivent être préchauffés à 37 °C avant d'être utilisés avec le test T-SPOT.COVID.** Pour éviter les problèmes liés aux milieux contaminés, il est conseillé de répartir les bouteilles de milieux de cultures en petites aliquotes.

4. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Pour le diagnostic *in vitro* uniquement.
- Pour un usage professionnel uniquement.
- Les opérateurs doivent être formés à la procédure de test et s'assurer qu'ils ont bien compris le mode d'emploi avant de réaliser le test.
- Lire attentivement le mode d'emploi du test avant de l'utiliser. Si les instructions figurant dans cette notice ne sont pas respectées à la lettre, les résultats risquent d'être erronés.
- Il faut être très prudent lors de la manipulation de matériel d'origine humaine. Tous les échantillons de sang doivent être considérés comme potentiellement infectieux. La manipulation des échantillons de sang et des éléments du test, leur utilisation, leur conservation et leur élimination doivent respecter les procédures définies dans les directives ou réglementations nationales, ou européennes appropriées en matière de risques biologiques et de sécurité.
- Il faut être très prudent lorsqu'on manipule des produits chimiques. Tous les produits chimiques doivent être considérés comme potentiellement dangereux. Vous pouvez obtenir une fiche de données de sécurité pour le kit auprès d'Oxford Immunotec.
- Les réactifs non utilisés et les échantillons biologiques doivent être jetés conformément aux réglementations nationales ou européennes .
- Le nombre défini dans cette notice de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) doit être ajouté à chaque puits. Le non-respect de cette consigne peut entraîner une interprétation incorrecte du résultat.
- Ne pas mélanger les éléments des différents kits.
- Utiliser une technique aseptique pour éviter de contaminer les réactifs, les puits d'essai, les suspensions cellulaires et les milieux de culture cellulaire.
- Il faut éviter toute variation par rapport aux techniques de pipetage et de lavage, aux durées ou aux températures d'incubation indiquées car cela peut avoir une incidence sur les résultats effectifs obtenus.
- Le sang doit être prélevé et traité le plus rapidement possible.
- Conserver et transporter les échantillons de sang au laboratoire à température ambiante (18-25 °C). Ne pas réfrigérer ou congeler les échantillons de sang entier.
- Le non-respect des temps et températures d'incubation recommandés peut entraîner une interprétation incorrecte des résultats.

- L'endommagement de la membrane de puits causées par les embouts des pipettes ou des laveurs de puits peuvent créer des artefacts dans les puits, peuvent fausser le comptage des spots.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS SPECIFIQUES A L'UTILISATION DU REACTIF T-CELL XTEND

- Le réactif T-Cell *Xtend* n'a pas été évalué pour des utilisations autres qu'avec la plateforme de test T-SPOT.
- Pour le diagnostic *in vitro* uniquement.
- Pour un usage professionnel uniquement.
- Ne pas utiliser le réactif au-delà de la date de péremption.
- Utiliser une technique aseptique lors de l'utilisation de ce produit afin d'éviter de contaminer le réactif.
- Ne pas utiliser de tubes de préparation cellulaire (CPT, Becton Dickinson) ou de tubes de prélèvement sanguin contenant l'anticoagulant acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) avec le réactif T-Cell *Xtend*.
- Ajouter le réactif T-Cell *Xtend* au sang entier avant le traitement de l'échantillon.
- Ne pas diluer ou ajouter d'autres éléments directement au réactif T-Cell *Xtend*.
- Utiliser uniquement des récipients à usage unique pour le prélèvement d'échantillons de sang veineux.
- Ne pas mélanger différents lots de réactifs.

5. COLLECTE ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Chaque laboratoire doit valider ses procédures de collecte et de séparation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) afin d'en obtenir un nombre suffisant. Recommandations :

1. Les échantillons de sang total doivent être conservés à une température comprise entre 18 °C et 25 °C jusqu'à leur traitement.
2. Prélever un échantillon de sang selon le mode d'emploi fourni avec le dispositif de prélèvement. Le contenu du tube doit être agité (8-10 fois) pour s'assurer que le sang total est bien mélangé avec l'anticoagulant. Conserver le sang prélevé à température ambiante (18-25 °C). **Ne pas réfrigérer ou congeler.**
3. Généralement, pour un patient immunocompétent, il est possible d'obtenir suffisamment de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) pour effectuer le test à partir d'échantillons de sang veineux, conformément aux directives suivantes :

Un tube de 8 mL ou deux tubes de 4 mL (CPT) ou un tube de 6 mL au sodium ou à l'héparine de lithium ou au citrate de sodium.

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) d'un patient peuvent être regroupées, à partir de plusieurs tubes de sang qui ont été prélevés et traités simultanément, si nécessaire, pour obtenir suffisamment de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC).

4. Lors de l'utilisation du test T-SPOT.COVID **sans l'utilisation du réactif T-Cell *Xtend***, les échantillons de sang doivent être traités dans les 8 heures suivant le prélèvement. Les échantillons peuvent être recueillis dans des tubes Vacutainer CPT (Becton Dickinson) au citrate de sodium ou héparine de sodium, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) étant séparées dans le tube selon les instructions du fabricant. Les échantillons de sang peuvent également être recueillis dans des tubes de sodium ou d'héparine de lithium ou de citrate de sodium, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) étant ensuite séparées au moyen de techniques de séparation standard telles que Ficoll-Paque^{MD} ou de méthodes alternatives pour isoler la fraction des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Les tubes de prélèvement sanguin contenant l'anticoagulant EDTA ne doivent pas être utilisés.
 - a. Pour les tubes de prélèvement sanguin CPT, centrifuger les tubes CPT de 8 ml à 1600 RCF (g) pendant 28 minutes ou les tubes CPT de 4 mL à 1800 RCF (g) pendant 30 minutes à température ambiante (18-25 °C).
 - b. Si vous utilisez Ficoll-Paque Plus, diluez le sang avec un volume égal de milieu RPMI 1640 (1 partie de sang pour 1 partie de RPMI). Superposer soigneusement le sang dilué sur Ficoll-Paque Plus (2 à 3 parties de sang dilué pour 1 partie de Ficoll-Paque) et centrifuger à 1000 RCF (g) pendant 22 minutes à température ambiante (18-25 °C).

Remarque : Lire les instructions du fabricant avant d'utiliser les tubes CPT ou Ficoll-Paque. Assurez-vous que les tubes sont centrifugés à la bonne vitesse. Les vitesses indiquées ci-dessus sont exprimées en g ou en force centrifuge relative (FCR). Ce n'est pas la même chose que le nombre de tours par minute (tr/min). Si la centrifugeuse ne mesure la vitesse qu'en tr/min, convertissez-la à la valeur RCF recommandée en mesurant le rayon du rotor et en utilisant un tableau de conversion. Les tubes Leucosep (Greiner Bio-One) permettent de gagner du temps dans la séparation par gradient de densité. Ces tubes contiennent une barrière poreuse qui permet de verser l'échantillon de sang sur le milieu de séparation par gradient de densité, il n'est donc pas nécessaire de procéder délicatement pour poser l'échantillon.

5. Lors de l'utilisation du test T-SPOT.COVID **avec l'utilisation du réactif T-Cell *Xtend***, les échantillons de sang doivent être recueillis dans des tubes de sodium ou d'héparine de lithium ou de citrate de sodium. Les tubes Vacutainer CPT et les tubes de prélèvement sanguin contenant l'anticoagulant EDTA ne doivent pas être utilisés. Le réactif T-Cell *Xtend* doit être ajouté avant la séparation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) au moyen de techniques de séparation standard. Les échantillons de sang entier doivent être conservés à

température ambiante (18-25 °C) entre 0 et 32 heures après la ponction veineuse avec l'utilisation du réactif T-Cell *Xtend*.

Si le réactif T-Cell *Xtend* doit être utilisé, il doit l'être juste avant la séparation des cellules, il faut retirer le bouchon du tube de prélèvement sanguin et ajouter 25 µL de la solution de réactif T-Cell *Xtend* par ml d'échantillon sanguin. Remettre le bouchon en place et agiter doucement le tube de prélèvement sanguin 8 à 10 fois pour bien mélanger. Incuber pendant 20 ± 5 minutes à température ambiante (18-25 °C), puis isoler la couche de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) par centrifugation en gradient de densité Ficoll, comme indiqué dans les sections 4b et 6-9. Voir la notice du réactif T-Cell *Xtend* pour plus d'informations.

- Recueillir la bande blanche et trouble des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) avec une pipette et la transférer dans un tube conique de centrifugation de 15 mL. Amener le volume à 10 mL avec le milieu de culture cellulaire. **Le milieu de culture cellulaire pour les étapes de lavage doit être préchauffé à 37 °C avant d'entrer en contact avec les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC).**

Nous savons que les facteurs circulants dans les échantillons de sang totale interfèrent avec les tests d'interféron gamma sur sang totale, par exemple le facteur rhumatoïde, les anticorps hétérophiles et les quantités préexistantes d'interféron gamma. La séparation et le lavage des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) permettent d'éliminer ces substances potentiellement interférentes avant de réaliser le test.

Remarque : Après centrifugation, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) doivent être extraites au moyen d'un embout de pipette de grand diamètre (par exemple 1 mL), en immergeant l'embout de pipette dans la couche de PBMC. Cette couche trouble doit être soigneusement aspirée et transférée dans un tube conique stérile pour les étapes de lavage. Assurez-vous que toute la couche trouble de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) a été recueillie. Il est préférable de prélever une plus grande partie de la couche de plasma que de laisser une partie des PBMC dans le tube de prélèvement sanguin. Cependant, si vous utilisez des tubes CPT, évitez de transférer une partie du gel de séparation, qui peut boucher l'embout. Si cela se produit, transférez les cellules déjà présentes dans l'embout dans un tube de centrifugation, puis utilisez un nouvel embout pour transférer les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) restantes. Divers milieux peuvent être utilisés pour laver les cellules au cours des étapes 3 à 5 ; les milieux AIM V et RPMI 1640 ont donné de bons résultats et sont recommandés.

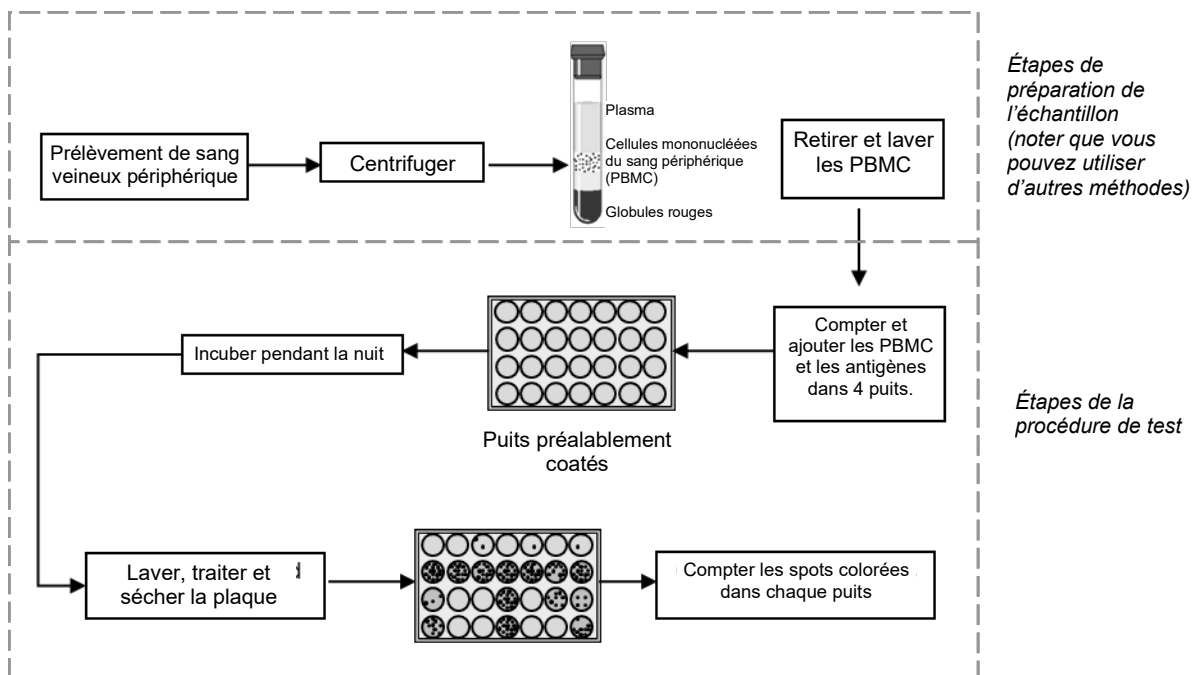
- Centrifuger à 600 RCF (g) pendant 7 minutes. Vider le surnageant et remettre en suspension le culot dans 1 mL de milieu.
- Amener le volume à 10 mL avec du milieu frais et centrifuger à 350 RCF (g) pendant 7 minutes.
- Verser le surnageant et remettre en suspension le culot dans 0,7 mL de milieu de culture cellulaire. **Le milieu sans sérum AIM V a donné de bons résultats et est recommandé.**

Remarque : Les étapes 2 à 7 doivent être réalisées dans une hotte BLII pour protéger l'utilisateur et éviter la contamination des échantillons.

6. MODE D'EMPLOI

Une plaque de test T-SPOT.COVID complète permet de traiter 24 échantillons de patients. Le test est généralement réalisé dans l'après-midi le premier jour et le matin du jour suivant, pour que la phase d'incubation de 16 à 20 heures ait le temps de se faire pendant la nuit. Dans ce cas de figure, l'après-midi du premier jour, les échantillons de sang sont traités pour isoler les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et le test démarre en ajoutant les PBMC et les antigènes à la plaque de test et en plaçant la plaque dans l'incubateur. Le deuxième jour, la plaque est retirée de l'incubateur, les différentes étapes de traitement sont effectuées et la plaque est lue. Le temps de traitement d'une plaque complète est d'environ 3 heures (le temps de travail réel sera inférieur compte tenu des étapes de centrifugation) le premier jour et 30 minutes de travail (sans compter l'incubation d'une heure de l'anticorps secondaire et le temps de séchage de la plaque) le deuxième jour. La procédure à suivre pour le test est résumée dans la figure 2 et décrite plus en détail ci-dessous :

Figure 2 : Schéma illustrant les principales étapes du test T-SPOT.COVID. Notez que les 96 puits des plaques ne sont pas tous représentés dans l'image.



PREPARATION DU REACTIF

1. Les flacons d'antigènes de la protéine S (Spike) du SARS-CoV-2 (puit COV A), d'antigènes de la protéine de la nucléocapside SARS-CoV-2 (puit COV B) et du témoin positif sont fournis prêts à l'emploi.
2. Préparer une solution de réactif conjugué prête à l'emploi à une dilution de 1/200ème. Calculer le volume de la solution de réactif conjugué prête à l'emploi nécessaire. Le réactif conjugué peut être préparé à la concentration qui lui permet d'être prêt à l'emploi et conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant six semaines maximum avant d'être utilisé pour le test.

Remarque : Chaque échantillon de patient utilise 4 puits. 50 µL de réactif conjugué dilué seront ajoutés à chaque puits. Ainsi, pour une bande (2 échantillons, 8 puits), préparer 500 µL de solution prête à l'emploi en ajoutant 2,5 µL de réactif conjugué concentré à 497,5 µL de PBS (tampon phosphate salin). Pour une plaque à 96 puits (24 échantillons), préparer 5 mL de solution à une concentration prête à l'emploi en ajoutant 25 µL de réactif conjugué concentré à 497,5 µL de PBS.

3. La solution de substrat est fournie prête à l'emploi. Avant de retirer la plaque de l'incubateur (jour 2), retirer la solution de substrat du réfrigérateur et la laisser se stabiliser à température ambiante.

COMPTAGE DES CELLULES ET DILUTION

Le test T-SPOT.COVID nécessite $250\ 000 \pm 50\ 000$ cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) par puits. Un total de quatre puits est nécessaire pour chaque échantillon de patient ; il faut donc 1×10^6 cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) par patient. Le nombre de lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 dans l'échantillon est normalisé par rapport à un nombre fixe de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC).

1. Procéder au comptage des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Les cellules peuvent être comptées de différentes façons, notamment manuellement en utilisant du bleu Trypan (ou un autre colorant approprié) et un hémocytomètre, ou en utilisant un analyseur hématologique automatisé.
2. En résumé, pour un comptage manuel avec un hémocytomètre Neubauer utilisant le bleu Trypan, ajouter 10 µL de la suspension cellulaire finale à 40 µL de solution de bleu Trypan à 0,4 % (m/v). Placer un aliquote appropriée sur l'hémocytomètre et compter les cellules dans la grille. Pour d'autres types d'hémocytomètre et pour les appareils automatisés, suivre les instructions du fabricant.

Remarque : Il faut veiller à ce que la suspension cellulaire soit bien mélangée au moment de prélever des aliquotes pour le comptage. Les cellules peuvent se déposer au fond du tube, ce qui entraîne une mauvaise interprétation du nombre réel de cellules. Le mélange doit être effectué soit en remuant doucement le tube avec la main, soit en agitant doucement la suspension en la pipettant de haut en bas plusieurs fois.

3. Calculer la concentration de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) présentes dans la suspension cellulaire.

Remarque : S'assurer que le calcul est correct pour le système de comptage cellulaire utilisé car l'utilisation d'un nombre insuffisant ou excessif de cellules peut entraîner une interprétation incorrecte du résultat.

4. Préparer 500 µL de la suspension cellulaire finale à une concentration de $2,5 \times 10^5$ cellules/100 µL (ce qui donne $1,25 \times 10^6$ cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) au total).

Remarque : S'assurer que les cellules sont bien mélangées, en agitant doucement la suspension en la pipettant de haut en bas plusieurs fois, avant de prélever une aliquote pour la dilution. Il a été démontré qu'un nombre de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) compris entre 200 000 et 300 000 par puits donne des résultats cohérents au test T-SPOT.

PREPARATION DE LA PLAQUE ET INCUBATION

Le test T-SPOT.COVID nécessite l'utilisation de quatre puits pour chaque échantillon de patient. Il faut effectuer un témoin négatif et un témoin positif avec chaque échantillon individuel. Il est recommandé de disposer les échantillons verticalement sur la plaque comme illustré ci-dessous.

- Témoin négatif
- Puit A (COV-A) (Spike)
- Puit B (COV-B) (Nucléocapside)
- Témoin positif

Chaque plaque de 96 puits peut traiter jusqu'à 24 échantillons de patients. Utiliser le nombre de plaques requis pour le nombre d'échantillons que vous souhaitez traiter. Pour COV.435/300, chaque bande permet de traiter 2 échantillons. N'utiliser que le nombre de bandes dont vous avez besoin. Placer les bandes restantes dans le sachet en aluminium avec le sachet de gel de silice. Les bandes restantes doivent être utilisées dans les huit semaines suivant la première ouverture du sachet, à condition qu'elles aient été conservées à une température comprise entre 2 et 8 °C entre-temps.

Le T-SPOT.COVID est un test qui mesure la production IFN- γ des lymphocytes T ; aucune courbe standard n'est nécessaire. Par conséquent, il suffit d'utiliser 4 puits par patient pour chaque échantillon. La disposition recommandée de la plaque pour 24 échantillons est indiquée ci-dessous :

Rangée	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

Clé : N=Témoin négatif, A=Puit A, B=Puit B, M=Témoin positif mitogène.

1. Pour COV.435/300, retirer de l'emballage les bandes de 8 puits coatés requises, les fixer dans un cadre de plaque et les laisser se stabiliser à température ambiante. Retirer uniquement le nombre requis de bandes, refermer l'emballage extérieur en aluminium avec les bandes qui n'ont pas été utilisées et le sachet de produit déshydratant et conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Remarque : Fixer les bandes à utiliser dans un cadre de plaque vide équipé d'un sous-couvercle et d'un couvercle. Les cadres, couvercles et bouchons doivent être conservés et réutilisés.

2. Ajouter dans les puits COVA, COVB et les témoins ;
- Ajouter 50 µL de milieu de culture cellulaire AIM-V dans chaque puits de témoin négatif.
 - Ajouter 50 µL de solution du puitCOV A dans chaque puits requis.
 - Ajouter 50 µL de solution du puitCOV B dans chaque puits requis.
 - Ajouter 50 µL de solution de témoin positif dans chaque puits de témoin de fonctionnalité cellulaire.

Ne pas laisser l'embout de la pipette toucher la membrane. Les dégradations de la membrane causées par les embouts de pipette peuvent provoquer des artefacts lors du comptage des spots dans les puits.

3. Dans chacun des 4 puits qui seront utilisés pour un échantillon de patient, ajouter 100 µl de la suspension cellulaire finale du patient (contenant 250 000 cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC)). Utiliser un nouvel embout pour ajouter les cellules de chaque patient afin d'éviter toute contamination croisée entre les puits. Faire attention à ne pas contaminer les puits adjacents, en faisant passer le liquide d'un puits à l'autre si les embouts de pipette sont réutilisés pour plusieurs puits.

Remarque : Mélanger (comme dans les étapes de comptage et de dilution des cellules) avant de retirer chaque aliquote de 100 µL.

4. Incuber la plaque avec le couvercle dans un incubateur humidifié à 37 °C avec 5 % de CO₂ pendant 16 à 20 heures. Éviter de remuer la plaque une fois dans l'incubateur. Ne pas empiler les plaques, car cela peut entraîner une répartition inégale de la température et une mauvaise ventilation.

Remarque : L'incubateur CO₂ doit être humidifié. Vérifier que la coupelle d'eau contient suffisamment d'eau pour que l'atmosphère soit humide.

DEVELOPPEMENT ET COMPTAGE DES SPOTS

1. Retirer la plaque de l'incubateur et jeter le milieu de culture cellulaire dans un récipient approprié.

Remarque : À ce moment-là, retirer la solution de substrat du kit et la laisser se stabiliser à température ambiante.

2. Ajouter 200 µl de solution PBS (tampon phosphate salin) dans chaque puits. **Ne pas utiliser de PBS contenant du Tween^{MD} ou d'autres détergents, car cela provoque un bruit de fond élevé lors du comptage des spots.**
Remarque : Utiliser une solution PBS fraîchement préparée ou stérile.

3. Jeter la solution PBS. Renouveler le lavage des puits 3 fois avec une solution PBS fraîche pour chaque lavage. Vous pouvez utiliser un laveur automatique pour les étapes de lavage.

Remarque : Pour le lavage, une pipette multicanaux ou un laveur de plaques peuvent être utilisés. Jeter la solution PBS dans un récipient approprié après chaque lavage. Ne pas utiliser de pipettes pour retirer la solution PBS car cela risque d'endommager la membrane. Si vous utilisez un laveur de plaques, assurez-vous que le collecteur est ajusté de façon à ce que les embouts ne touchent pas la membrane. Après le dernier lavage, tapoter la plaque sur une serviette non pelucheuse pour s'assurer que toute la solution PBS est éliminée - tout excès restant diluera davantage le réactif conjugué.

4. Si cela n'a pas déjà été fait lors de l'étape de préparation des réactifs, diluer le réactif conjugué concentré 200 fois dans la solution PBS pour créer la solution prête à l'emploi.

5. Ajouter 50 µl de solution de réactif conjugué dans chaque puits et incuber à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant une heure.

Remarque : Il est recommandé d'utiliser une pipette multicanaux ou une pipette stepper. Veiller à ce que le réactif conjugué soit ajouté à chaque puits car la solution est claire et non colorée - il peut donc être difficile de voir dans quels puits il a été ajouté.

6. Jeter le conjugué et effectuer les quatre lavages avec la solution PBS comme décrit dans les étapes 2. et 3. ci-dessus.

7. Ajouter 50 µl de solution de substrat dans chaque puits et incuber à température ambiante pendant 7 minutes.

8. Laver soigneusement la plaque avec de l'eau distillée ou déionisée pour arrêter la réaction de révélation.

9. Laisser sécher la plaque dans un endroit bien ventilé ou dans une étuve sèche à une température maximale de 37 °C.

Remarque : Lesspots deviennent plus visibles au fur et à mesure que la plaque sèche ; veiller donc à ce que la plaque soit bien sèche avant la lecture. Laisser sécher pendant 4 heures à 37 °C ou au moins 16 heures à température ambiante.

10. Compter et noter le nombre spots distincts, bleu foncé, sur la membrane de chaque puits. Appliquer les critères d'interprétation des résultats (voir ci-dessous) pour déterminer si un échantillon de patient est « réactif » ou « non réactif ». **Les spots produits à la suite de la stimulation de l'antigène doivent apparaître comme des spots larges, ronds et sombres. On observe souvent un effet de gradient avec un centre plus sombre et une périphérie plus diffuse. Les artefacts non spécifiques qui peuvent se produire sont plus petits, moins intenses et de forme irrégulière.**

Remarque : Les spots peuvent être comptés directement dans le puits avec une loupe ou un stéréomicroscope ou à partir d'une image numérique capturée à partir d'un microscope ou d'un imageur de plaque.

Une fois séchées, les plaques de test restent stables et il n'est donc pas nécessaire de les lire immédiatement. Les plaques peuvent être archivées pour un contrôle de qualité rétrospectif ou un réexamen pendant 12 mois maximum si elles sont conservées dans un environnement sec et sombre à température ambiante.

CONTROLE DE QUALITE

Un résultat typique devrait présenter peu ou pas despots dans le témoin négatif et 20spots ou plus dans le témoin positif (voir les figures 4a et b pour les résultats typiques de l'étude clinique américaine).

Un nombre despots dans le témoin négatif supérieur à 10 doit être considéré comme « non valide ».

Généralement, le nombre despots du témoin positif de la fonctionnalité cellulaire doit être ≥ 20 ou présenter une saturation (trop despots à compter). Un petit nombre de patients peuvent avoir des lymphocytes T qui ne présentent qu'une réponse limitée au PHA¹. Lorsque le nombre despots du témoin positif est < 20 , il doit être considéré comme « non valide », à moins que le puit A ou le puit B ne soit « réactif ou limite (ambigu) », comme décrit dans les critères d'interprétation des résultats et de test (voir ci-dessous), auquel cas le résultat est valide.

Dans le cas de résultats non valides, ceux-ci doivent être signalés comme « non valides » et il est recommandé de prélever un autre échantillon et de tester à nouveau l'individu.

INTERPRETATION DES RESULTATS ET CRITERES DE TEST

Reportez-vous à la section Contrôle qualité avant d'appliquer les critères suivants.

Les résultats du test T-SPOT.COVID sont interprétés en soustrayant le nombre despots dans le puits de témoin négatif du nombre despots dans chacun des puits COVA, COVB puit, conformément à l'algorithme suivant :

- Le résultat du test est réactif si (Puit A- témoin négatif) et/ou (Puit B- témoin négatif) ≥ 8 taches.
- Le résultat du test est non réactif si (Puit A- témoin négatif) et (Puit B- témoin négatif) ≤ 4 taches. Cela comprend les valeurs inférieures à zéro.
- Les résultats où le nombre despots le plus élevé du puit A ou du puit B est tel que le nombre despots (puit A ou B moins témoin négatif) est de 5, 6 ou 7spotsdoivent être considérés comme limites (ambigus) et il est recommandé de refaire le test en prélevant un autre échantillon du patient.
- Si le résultat est toujours limite (ambigu) lors d'un nouveau test avec un autre échantillon, il faut avoir recours à d'autres tests de diagnostic ou à des informations épidémiologiques pour déterminer la réponse immunitaire adaptative ou à médiation cellulaire à une infection récente ou antérieure par le SARS-CoV-2 ou à la vaccination contre le SARS-CoV-2.
- **Un résultat « réactif » indique que l'échantillon contient des lymphocytes T effecteurs sensibilisés au SARS-CoV-2. La présence de lymphocytes T sensibilisés pourrait être le résultat d'une vaccination ou d'une infection par le SARS-CoV-2.**
- **Un résultat « non réactif » indique qu'aucune cellule T effectrice sensibilisée au SARS-CoV-2 n'a été détectée.**

L'algorithme d'interprétation est décrit dans le schéma suivant (figure 3) et dans les tableaux 1 à 3. Cet algorithme comprend également des critères de contrôle de la qualité.

Figure 3 – Schéma de l'algorithme

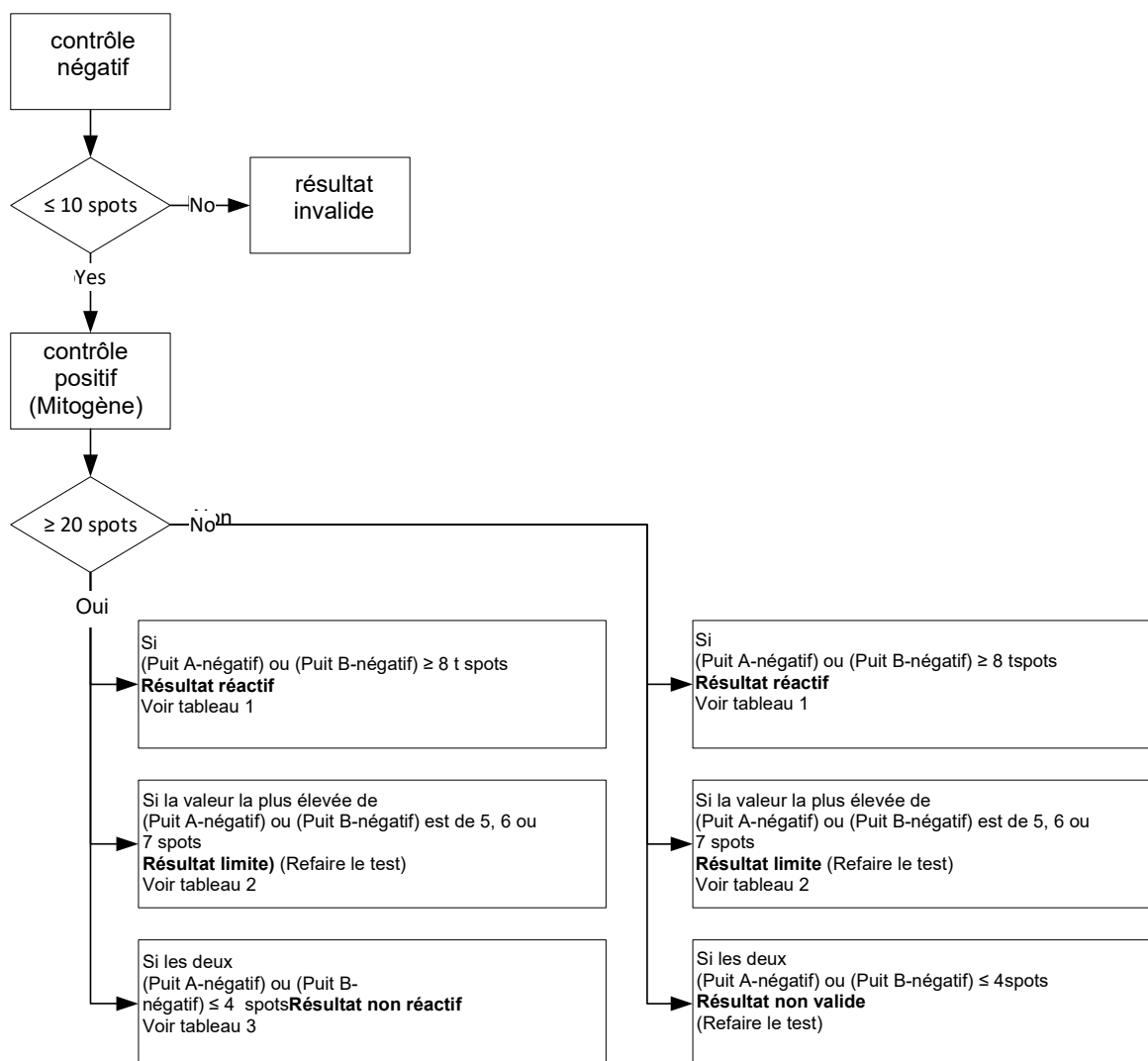


Tableau 1 : Interprétation en cas de réaction : (Puit A moins négatif) ou (Puit B moins négatif) ≥ 8spots

Témoin négatif Nombre de puits	Le puit A ou le puit B a le nombre suivant de taches [†]	Interprétation des résultats
0	≥ 8	Réactif
1	≥ 9	Réactif
2	≥ 10	Réactif
3	≥ 11	Réactif
4	≥ 12	Réactif
5	≥ 13	Réactif
6	≥ 14	Réactif
7	≥ 15	Réactif
8	≥ 16	Réactif
9	≥ 17	Réactif
10	≥ 18	Réactif
> 10 taches	s/o	Non valide**

[†]Remarque : Le nombre des spots le plus élevé du puit négatif doit être utilisé pour déterminer le résultat du test.

Tableau 2 : Interprétation limite (ambiguë) : La plus élevée des deux valeurs entre (Puit A moins négatif) et (Puit B moins négatif) est de 5, 6 ou 7 taches.

Témoin négatif Nombre de puits	La plus élevée des deux valeurs entre le puit A et le puit B a le nombre suivant de taches	Interprétation des résultats
0	5, 6 ou 7	Limite (indéterminé)
1	6, 7 ou 8	Limite
2	7, 8 ou 9	Limite
3	8, 9 ou 10	Limite
4	9, 10 ou 11	Limite
5	10, 11 ou 12	Limite
6	11, 12 ou 13	Limite
7	12, 13 ou 14	Limite
8	13, 14 ou 15	Limite
9	14, 15 ou 16	Limite
10	15, 16 ou 17	Limite
> 10 taches	s/o	Non valide**

Tableau 3 : Interprétation négative : (Puit A moins négatif) et (Puit B moins négatif) ≤ 4 taches

Témoin négatif Nombre de puits	Le puit A et le puit B ont le nombre suivant de taches	Interprétation des résultats
0	≤ 4	Non-réactif
1	≤ 5	Non-réactif
2	≤ 6	Non-réactif
3	≤ 7	Non-réactif
4	≤ 8	Non-réactif
5	≤ 9	Non-réactif
6	≤ 10	Non-réactif
7	≤ 11	Non-réactif
8	≤ 12	Non-réactif
9	≤ 13	Non-réactif
10	≤ 14	Non-réactif
> 10 taches	s/o	Non valide**

* Les résultats où le nombre des spots le plus élevé du puit A ou du puit B est tel que le nombre des spots (puit moins négatif) est de 5, 6 ou 7 spots doivent être considérés comme limites (ambigus) et il est recommandé de refaire le test en prélevant un autre échantillon du patient.

** Dans le cas de résultats non valides, ceux-ci doivent être signalés comme « non valides » et il est recommandé de prélever un autre échantillon et de tester à nouveau l'individu.

7. CONTRAINTES

- Si les instructions figurant dans cette notice ne sont pas respectées à la lettre, les résultats risquent d'être erronés.
- Une exécution incorrecte du test peut entraîner des réponses faussement réactives ou faussement non réactives.
- Un résultat réactif peut être dû à un état infectieux ou à une infection antérieure par le SARS-CoV-2, ou à une vaccination contre le SARS-CoV-2.
- Un faux résultat non réactif peut être causé par un prélèvement sanguin incorrect ou une manipulation inadéquate de l'échantillon, affectant la fonction lymphocytaire.
- Un résultat non réactif à la fois pour le COV-A et le COV-B n'exclut pas la possibilité qu'une personne ait développé une réponse immunitaire adaptative après une infection ou une vaccination.
- Les résultats du test T-SPOT.COVID, avec ou sans l'utilisation du réactif T-Cell Xtend, n'ont pas été suffisamment évalués avec des échantillons provenant d'individus âgés de moins de 18 ans, de femmes enceintes et de patients hémophiles.
- Un faux résultat réactif peut être obtenu pour le test T-SPOT.COVID lorsqu'il est réalisé sur des sujets précédemment exposés au SARS-CoV-1 et à d'autres coronavirus similaires. D'autres tests sont nécessaires si ces infections sont suspectées. Ce kit a été testé sur des échantillons disponibles à l'époque. Les résultats obtenus avec les nouvelles mutations du SARS-CoV-2 n'ont pas encore été évalués.
- Les résultats du test T-SPOT.COVID doivent être utilisés conjointement avec les antécédents épidémiologiques de chaque personne, son état médical actuel et les résultats d'autres évaluations diagnostiques.

- Un résultat de test non réactif n'exclut pas la possibilité d'une exposition au SARS-CoV-2, d'une infection par ce virus ou d'une vaccination réussie contre le SARS-CoV-2. Les patients ayant été récemment vaccinés ou exposés à des personnes infectées par le SARS-CoV-2 et présentant un résultat non réactif au test T-SPOT.COVID doivent envisager un nouveau test dans les 2 semaines ou si d'autres symptômes cliniques pertinents indiquent une infection possible.
- Il n'est pas recommandé d'utiliser des échantillons réfrigérés ou congelés avec le test T-SPOT.COVID.

CONTRAINTES SPÉCIFIQUES À L'UTILISATION DU RÉACTIF T-CELL XTEND

1. Le réactif T-Cell *Xtend* n'a pas été évalué pour une utilisation autre qu'avec les tests T-SPOT.
2. Ne pas réfrigérer ou congeler les échantillons de sang entier. Conserver et transporter les échantillons de sang au laboratoire à une température comprise entre 18 °C et 25 °C.
3. Si les procédures recommandées pour le pipetage, les techniques de lavage, les temps d'incubation ou les températures ne sont pas respectées à la lettre, cela peut avoir une incidence sur les résultats des tests.

8. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

La valeur seuil du test T-SPOT.COVID a été déterminée au cours du développement en utilisant l'analyse de la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic). La valeur maximale de différenciation entre les individus positifs confirmés par PCR et ceux présentant un faible risque d'infection a été fixée à 6 taches. En outre, une zone limite de 5 à 7 a été définie pour tenir compte de la variation du test et de l'incertitude autour de la valeur seuil. Des données récentes indiquent que le même seuil est approprié pour différencier les individus vaccinés et non vaccinés⁴⁴.

Caractéristiques des performances analytiques

L'interférence des anticorps hétérophiles ou de IFN- γ intrinsèque dans l'échantillon de sang est minimisée par la séparation et le lavage de la fraction des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) du sang total. Cela permet d'éliminer les interférences liées à de IFN- γ , d'autres fractions plasmatiques interférentes, l'hémoglobine et tout anticorps hétérophile présents dans le prélèvement de sang.

D'autres cytokines que IFN- γ devraient être produites par les leucocytes, notamment l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-12, le TNF α , l'IFN- α et l'IFN- β . Les anticorps des plaques ont été testés pour détecter une éventuelle réaction croisée avec la paire d'anticorps utilisée dans le test T-SPOT. Les résultats ont montré que la paire d'anticorps utilisée dans le test T-SPOT ne présentait pas de preuve de réaction croisée avec d'autres cytokines.

La variabilité intra-test a été analysée en comparant avec un test T-SPOT réalisé sur la même plaque par le même opérateur. Les expériences ont été réalisées par trois opérateurs sur neuf plaques, ce qui a permis d'obtenir une fourchette de CV (coefficients de variation) en % représentative de la variation inhérente au test. La fourchette obtenue pour les nombres élevés despots ($210,4 \pm 11,6$) est comprise entre des CV de 2,2 % et 7,7 % (CV moyen = 4,4 %), le nombre moyen despots ($71,2 \pm 8,5$) donnent une fourchette comprise entre 6,6 % et 16,5 % de CV (CV moyen = 11,0 %), tandis que les nombres despot proches du seuil (nombre moyen despots = $5,7 \pm 1,3$) donnent un CV moyen = 22,0 %.

Des données sur la précision inter-tests ont été recueillies en utilisant trois lots de kits pour trois opérateurs différents afin d'analyser les trois mêmes échantillons à six reprises. Le CV mesuré sur les trois échantillons, par les trois opérateurs et les trois lots était de 3,7 % pour les échantillons donnant un nombre moyen despots de 210,4. Pour les nombres despots proches de la limite du test T-SPOT.COVID, la variation inter-test était de 25,0 %. Pour les nombres moyens de spots, le CV moyen était de 13,9 %. Les CV des résultats étaient cohérents pour chacun des lots testés.

La reproductibilité inter-opérateur a été évaluée en utilisant trois opérateurs et une plaque de chacun des trois lots de kits. Les CV observés entre les opérateurs allaient de 3,6 % à 5,8 %

Caractéristiques des performances cliniques

Une étude a été réalisée, en utilisant le seuil déterminé fixé à 6spots(données internes), pour évaluer la performance clinique du test T-SPOT.COVID dans le cas d'une infection au SARS-CoV-2 confirmée par PCR (en utilisant des sujets asymptomatiques et symptomatiques) afin d'évaluer la performance du test chez les personnes souffrant d'une infection aiguë ou les sujets convalescents. En outre, la performance du test a été évaluée chez des sujets jugés à faible risque relatif d'infection. Tous les échantillons ont été testés avec un test sérologique IgG anti-N (Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG) comme comparateur avec le test T-SPOT.COVID.

Au total, 281 sujets répondant aux critères de sélection ont été recrutés pour l'étude. Parmi eux, 169 sujets ont été recrutés dans le groupe d'infection au SARS-CoV-2 confirmée par PCR (la cohorte positive). Parmi eux, un sujet a été exclu en raison d'un nombre trop faible de PBMC et 17 en raison de l'absence de résultats sérologiques, ce qui permis d'inclure les 151 sujets disponibles pour l'analyse.

Au total, 112 sujets ont été recrutés dans la cohorte à faible risque, dont 4 n'avaient pas de résultats sérologiques de confirmation et 6 autres sujets ont été exclus après le retour d'un test sérologique de confirmation positif. Il restait donc 102 sujets, dont un échantillon a été exclu en raison d'un nombre trop faible de PBMC et un autre en raison de problèmes techniques avec le test T-SPOT.COVID. Par conséquent, 100 sujets à faible risque ont été retenus pour l'analyse.

Les données démographiques de la cohorte confirmée par PCR et de la cohorte à faible risque sont résumées ci-dessous :

Cohorte	Infection au SARS-CoV-2 confirmée par PCR	Faible risque relatif d'infection
Nombre de sujets	168	100
Âge moyen (années) (écart-type)	50,5 (15,2) entre 19 et 83 ans	54,7 (15,7) entre 18 et 87 ans
% Hommes	38,7 % (65/168)	36,0 % (36/100)
Moyenne du temps écoulé depuis le premier test PCR positif (jours) (fourchette)	83,4 (0,249)	Sans objet
% symptomatique	95,8 % (161/168)	Sans objet

Concordance positive parmi les individus confirmés par PCR

151 patients, identifiés comme ayant déjà été testés positifs pour le SARS-CoV-2 par PCR, ont été évalués par le biais du test T-SPOT.COVID et du test sérologique IgG anti-N. Le temps écoulé depuis le premier résultat du test PCR a été relevé, et variait de 2 jours à 249 jours. Aucun résultat du test T-SPOT.COVID n'était invalide pour cette cohorte.

Tableau 4 : Pourcentage de concordance positive avec la PCR dans le temps, en intégrant tous les résultats du T-SPOT.COVID et du test sérologique IgG anti-N, avec un seuil de réactivité de 6spotset en ignorant la zone limite (limites incluses).

Jours depuis le premier test PCR positif	T-SPOT.COVID		IgG anti-N	
	Concordance positive	IC (intervalle de confiance) à 95 %	Concordance positive	IC (intervalle de confiance) à 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 %

Tableau 5 : Pourcentage de concordance positive avec la PCR sur la durée, en intégrant tous les résultats du test T-SPOT.COVID et du test sérologique IgG anti-N, en utilisant uniquement les résultats réactifs et non réactifs pour le test T-SPOT.COVID (c'est-à-dire en excluant ceux qui se situent dans la zone limite).

Jours depuis le premier test PCR positif	T-SPOT.COVID		IgG anti-N	
	Concordance positive	IC (intervalle de confiance) à 95 %	Concordance positive	IC (intervalle de confiance) à 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 %

Ces données montrent un pourcentage de concordance positive entre le test T-SPOT.COVID et la PCR de 92,6 % (96,6 % en excluant les résultats limites) jusqu'à 60 jours après un résultat positif à la PCR. Après ce délai, le pourcentage de concordance diminue légèrement. Jusqu'à 60 jours après le résultat de la PCR, la concordance positive était de 80,7 % (83,3 % en utilisant uniquement les résultats déterminés).

Globalement, ces données montrent un pourcentage de concordance positive entre le test sérologique IgG anti-N et la PCR de 74,5 % jusqu'à 60 jours après un résultat positif du test PCR. Après ce délai, le pourcentage de concordance diminue. Jusqu'à 60 jours après le résultat de la PCR, la concordance positive pour la sérologie IgG anti-N était de 38,6 %.

Lymphocytes T Concordance négative chez les personnes présentant un risque relatif d'infection plus faible

Nous avons recruté une cohorte de participants, dans un contexte endémique, mais qui avaient un risque relatif plus faible d'infection par le SARS-CoV-2 sur la base des critères suivants : (i) l'absence de symptômes signalés par les participants eux-mêmes et compatibles avec une infection par le SARS-CoV-2, (ii) l'absence d'antécédents de test PCR positif pour le SARS-CoV-2, (iii) l'absence de participation à un essai vaccinal et l'absence de vaccin COVID-19 et (iv) un test sérologique anti-N à flux latéral négatif (Kit de test des anticorps IgM/IgG pour le SARS-CoV-2 de Biohit) utilisé comme dépistage de base au moment de l'inscription et (v) la confirmation d'un test sérologique négatif par un test sérologique de laboratoire (test sérologique IgG anti-N, Abbott Architect 6R86-32 (COV2-IgG)).

Tableau 6 : Pourcentage de concordance négative

	N	Positif	Négatif	Concordance négative (%) (IC à 95 %)
Y compris la zone limite	100	3	97	97,0 % (91,5-99,4)
Sans la zone limite	98	2	96	98,0 % (92,8-99,8)

97,0 % des résultats du test T-SPOT.COVID (97/100) étaient inférieurs au seuil de 6spots (intervalles de confiance à 95 % : 91,5-99,4 %). Deux résultats étaient limites (5 et 7 spots). Lorsque ces résultats ont été exclus, 98,0 % (IC à 92,8-99,8 %) des résultats du test T-SPOT.COVID (96/98) étaient non réactifs. Il n'y a pas eu de résultats non valides.

Bien que nous ayons pris toutes les mesures raisonnables pour nous assurer que cette cohorte était à faible risque d'infection, nous ne pouvons pas exclure la possibilité qu'une partie de ce groupe ait eu, ou ait encore, une infection asymptomatique et qu'ils étaient séronégatifs au moment du test, mais chez qui le test T-SPOT.COVID a pu détecter une réponse des lymphocytes T.

9. VALEURS ATTENDUES

Les figures 5a et b illustrent la fourchette du nombre despots observées en réponse aux antigènes des témoins négatifs et positifs et aux antigènes du SARS-CoV-2 qui ont été observés dans nos études cliniques (voir la section 8 pour plus de détails sur les cohortes d'études cliniques).

Figure 5a : Histogramme des réponses de témoin négatif de toute l'étude sujets (n = 251).

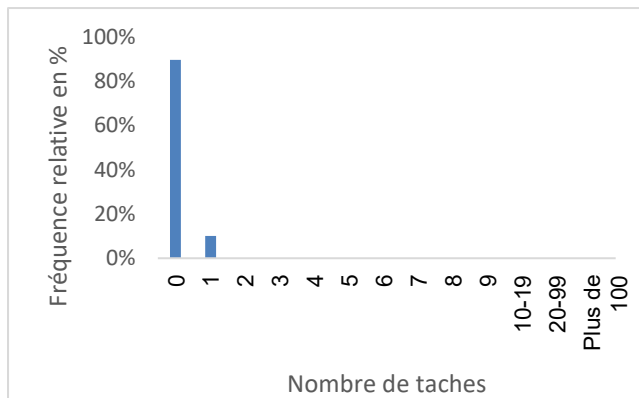
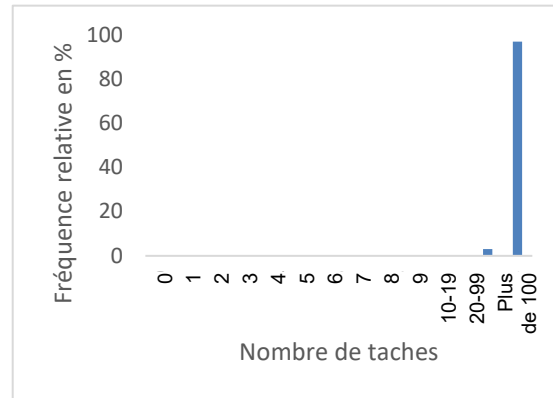


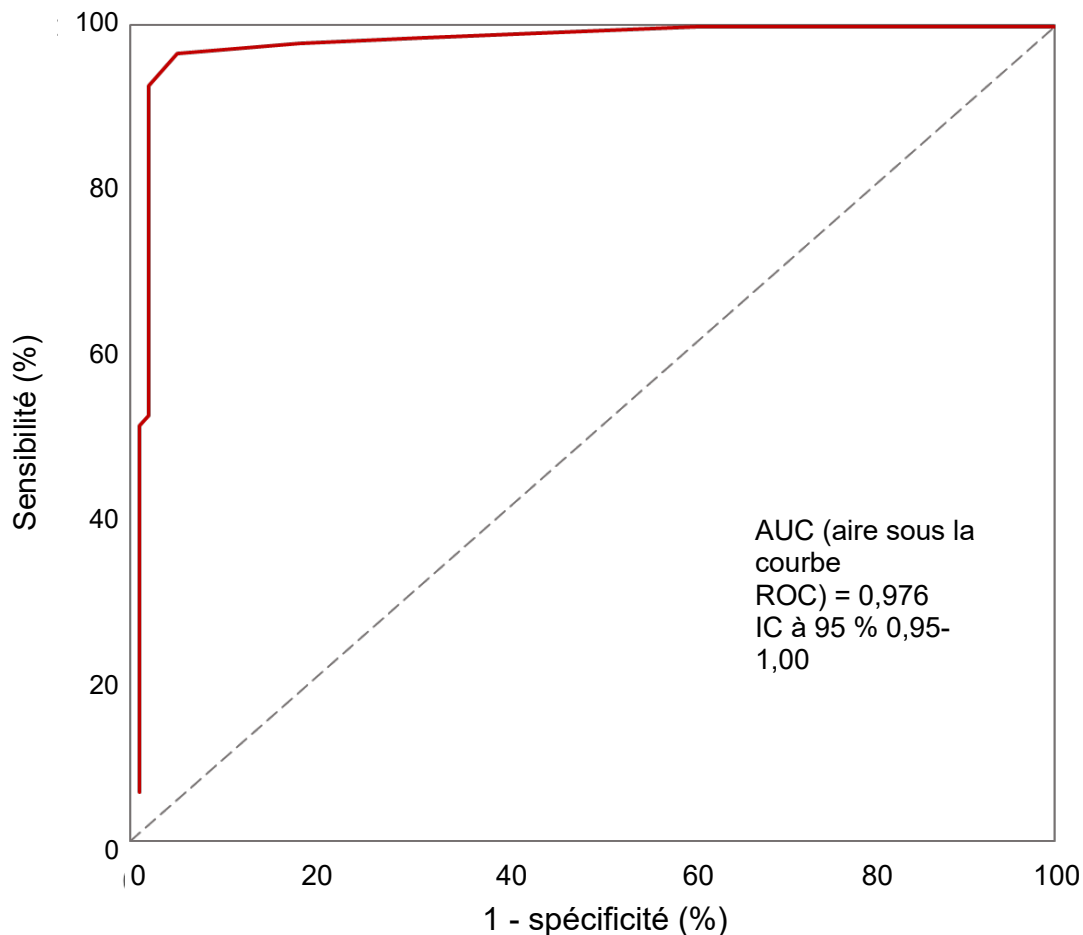
Figure 5b : Histogramme de témoin positif réponses de tous les sujets de l'étude (n = 251)



La grande majorité des puits du témoin négatif n'ont produit aucun spot et aucun nombre despots supérieur à un n'a été observé dans le témoin négatif. La réponse au témoin positif a été forte et aucun cas de nombre despot inférieur à 20 n'a été observé avec le témoin positif.

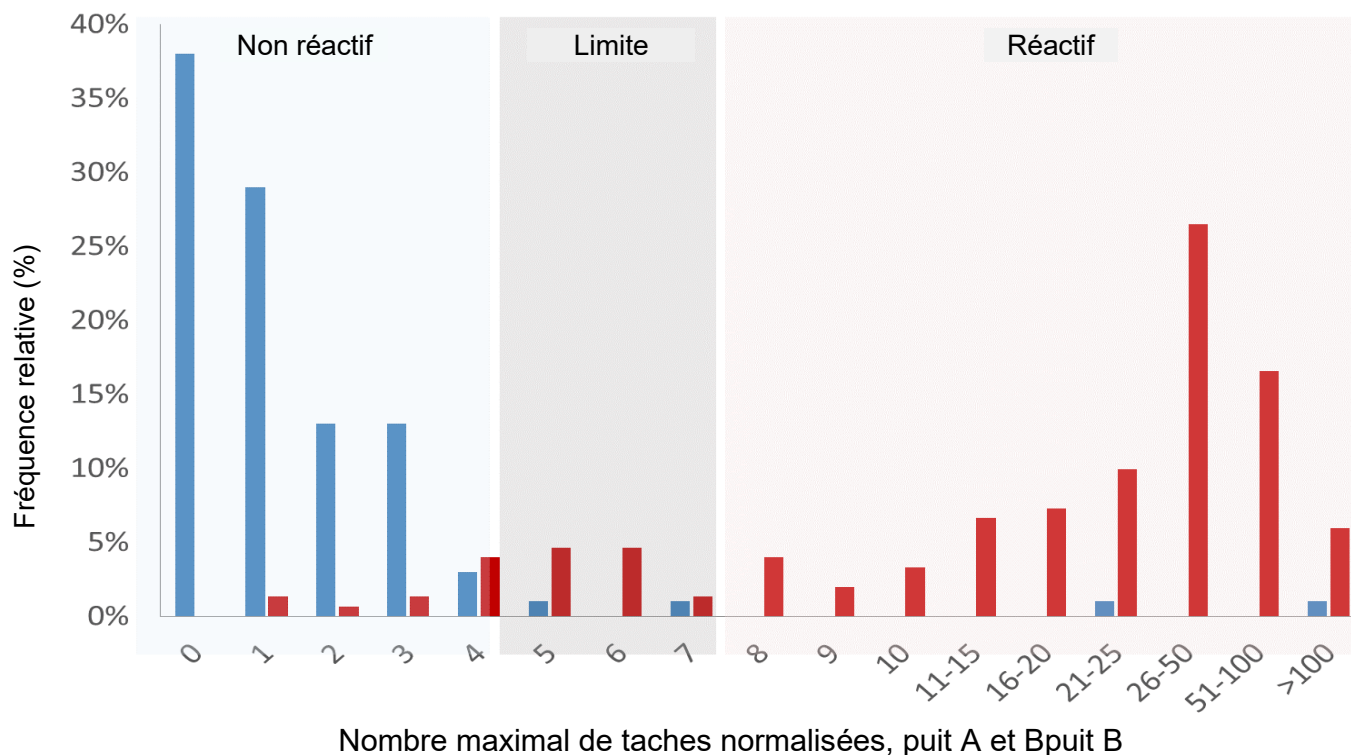
La valeur seuil du test a été confirmée par les études cliniques. La figure 6 montre la courbe ROC créée à partir des données obtenues pendant les études cliniques. Un seuil de 6spots a permis d'obtenir la séparation maximale entre les deux cohortes, validant ainsi le niveau pré-sélectionné.

Figure 6 : Courbe ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) créée en utilisant les données de validation générées par 151 sujets confirmés par PCR (permettant d'estimer la sensibilité) et 100 sujets présentant un risque relatif d'infection plus faible (permettant d'estimer la spécificité).



Les mêmes données ont également été utilisées pour confirmer les avantages de la définition d'une zone limite, comme le montre la figure 7.

Figure 7 : Graphique montrant la répartition du nombre despots observées avec le test T-SPOT.COVID dans les études cliniques américaines, avec une superposition des critères d'interprétation donnés pour le test. Le « nombre maximal despots normalisés » est la réponse maximale (puit A et B moins négatif) du puit A ou du puit B (n = 251). La fréquence relative des différents nombres despots est indiquée pour la cohorte clinique à faible risque (barres bleues) et pour la cohorte confirmée par PCR (barres rouges).



La majorité des sujets de la cohorte à faible risque (barres bleues) ont présenté un niveau de réactivité nul ou faible, 96,0 % d'entre eux se situant dans la fourchette de 0 à 4 taches. Les sujets confirmés par PCR (barres rouges) présentaient des niveaux élevés de réactivité, 23,2 % se situant entre 8 et 20 spots et la majorité (58,9 %) étant supérieure à 20 taches. La partie grisée représente la zone limite ambiguë (5, 6 ou 7 taches) où, comme prévu, on observe un chevauchement entre les répartitions du nombre despots des deux cohortes de l'étude. Tous les tests dont les résultats se situent dans cette zone doivent être refaits.

10. RÉOLUTION DES PROBLÈMES

Ce test doit être réalisé selon les principes des bonnes pratiques de laboratoire et en respectant strictement le présent mode d'emploi.

Résultats limites (ambigus)

Les résultats limites (ambigus) sont les résultats pour lesquels le plus grand nombre despots (puit A ou B moins négatif) correspond au seuil du test déterminé par ROC de ≥ 6 taches, à ± 1 tache près. Les résultats limites, bien que valides, sont moins fiables que les résultats pour lesquels l'écart entre le nombre despots et le seuil est plus important. Il est donc recommandé de tester à nouveau le patient, en utilisant un nouvel échantillon. Si le résultat est toujours limite (ambigu) lors du nouveau test, d'autres tests de diagnostic ou des informations épidémiologiques doivent être utilisés pour aider à déterminer le statut immunitaire du patient.

Résultats non valides

Les résultats non valides sont rares et peuvent être dus à l'état immunitaire de la personne testée. Ils peuvent également être dus à un certain nombre de facteurs techniques, qui peuvent donner lieu à des résultats « bruit de fond élevé », « mitogène nombre de spot faible » et « négatif élevé », comme :

- Utilisation de tubes de prélèvement sanguin inappropriés
- Conservation du sang plus de 8 heures avant le traitement sans utiliser le réactif T-Cell Xtend

- Conservation du sang en dehors de la fourchette de température recommandée avant le traitement des échantillons sanguins
- Contamination du milieu de culture cellulaire
- Lavage insuffisant de la plaque











Il est recommandé de refaire le test en utilisant un nouvel échantillon du patient en cas de résultats non valides. Des documents techniques portant sur les principaux problèmes rencontrés sont disponibles. Vous pouvez les obtenir en contactant Oxford Immunotec.

11. ABRÉVIATIONS ET GLOSSAIRE DES SYMBOLES

Abréviations

AUC	Aire sous la courbe
BCIP/NBT	5-bromo, 4-chloro, 3-indoylphosphate/nitrobleu tétrazolium
CDC	Centres de contrôle et de prévention des maladies
IC	Intervalle de confiance
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments
CPT	Tubes de préparation de cellules
CV	Coefficient de variation
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
ELISA	Essai d'immuno-absorption enzymatique
ELISPOT	Essai d'immuno-spot enzymatique
IFN- γ	Interféron gamma
IL	Interleukine
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PHA	Phytohémagglutinine
RCF	Force centrifuge relative
ROC	Courbe sensibilité/spécificité
RPM	Nombre de tours par minute
RT-PCR	Transcriptase inverse PCR
TNF	Facteur de nécrose tumorale

Glossaire des symboles

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Date d'utilisation/expiration (année-mois-jour)
	Numéro de lot
	Numéro de catalogue
	Attention, voir mode d'emploi
	Date de fabrication
	Fabricant
	Limite de température/ Conservation à une température comprise entre
	Consulter le mode d'emploi
	Représentant agréé de l'UE

BS EN ISO 15223-1:2016

Les symboles utilisés pour le test T-SPOT.COVID sont conformes à la norme internationale ISO 15223-1:2016 ; « Dispositifs médicaux - Symboles à utiliser avec les étiquettes de dispositifs médicaux, l'étiquetage et les informations à fournir ».

12. RÉFÉRENCES

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, Roupheal 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*.

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. SIGNALEMENT D'INCIDENTS GRAVES

Si un incident grave lié au dispositif est survenu, il doit être signalé au service client. Dans les États membres de l'Union européenne, les incidents graves doivent également être signalés à l'autorité compétente (le service gouvernemental responsable des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro) de votre pays. Veuillez consulter le site Internet de votre gouvernement pour savoir comment contacter votre autorité compétente. Un « incident grave » désigne tout incident ayant entraîné directement ou indirectement, susceptible d'avoir entraîné ou susceptible d'entraîner :

- le décès d'un patient, d'un utilisateur ou d'une autre personne ;
- une grave dégradation, temporaire ou permanente, de l'état de santé d'un patient, d'un utilisateur ou d'une autre personne ;
- une menace grave pour la santé publique

14. COORDONNÉES

Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park,
Abingdon, Oxfordshire, OX14 4SE, Royaume-Uni
Tél : +44 (0) 1235 442780

Pour télécharger le support produit et obtenir des informations techniques supplémentaires, veuillez consulter notre site web :

www.oxfordimmunotec.com

Fabricant

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

Représentant agréé de l'UE

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

T-SPOT et T-Cell Xtend sont des marques déposées d'Oxford Immunotec Ltd.

Le logo Oxford Immunotec est une marque déposée d'Oxford Immunotec Ltd.

AIM V et GIBCO sont des marques déposées de Life Technologies Corporation.

CPT et Vacutainer sont des marques déposées de Becton, Dickinson and Company.

Ficoll et Ficoll-Paque sont des marques déposées de Cytiva, une filiale de Global Life Sciences Solutions USA LLC.

Tween est une marque déposée de Croda Americas LLC.

L'utilisation du réactif T-Cell *Xtend* est protégée par les brevets suivants et les brevets en instance :
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Numéro de révision : 5 Date d'émission : Avril 2023
© 2023 Oxford Immunotec. Tous droits réservés

Numéro de version	Date de lancement	Modifications
1-4	Détails disponibles,	sur demande auprès d'Oxford Immunotec.
5	Avril 2023	Changement d'adresse du fabricant. Ajout de l'historique des révisions. Ajout d'instructions pour signaler les incidents graves.



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

