



T-SPOT® TB 8

Un ausilio per la diagnosi dell'infezione tubercolare

Formato Piastra con striscia da 8 pozzetti (TB.300)

FOGLIO ILLUSTRATIVO

Per uso diagnostico *in vitro*

T-SPOT.TB 8

Formato Piastra con striscia da 8 pozzetti (TB.300)

Indice	Pagina
Uso previsto	2
Introduzione	2
Principi della procedura	2
Limitazioni	3
Avvertenze di sicurezza e precauzioni	4
Materiale fornito	4
Conservazione	4
Stabilità	4
Attrezzature e materiali necessari ma non forniti	4
Preparazione del reagente	5
Procedura	5
Raccolta e preparazione dei campioni	5
Conta delle cellule e diluizione	7
Preparazione della piastra e incubazione	7
Sviluppo e conta degli spot	8
Controllo di qualità	9
Interpretazione dei risultati e criteri del test	10
Caratteristiche di performance del test	10
Riferimenti bibliografici	11
Glossario dei simboli	11

Uso previsto

Il saggio T-SPOT[®].TB è un test diagnostico *in vitro* per il rilevamento delle cellule T effettrici che rispondono all'attivazione ad opera degli antigeni di *Mycobacterium tuberculosis*; il test è destinato ad essere utilizzato quale ausilio diagnostico dell'infezione tubercolare (TB). Il saggio T-SPOT.TB è un test ELISPOT (enzyme-linked immunospot) semplificato che conta le singole cellule T effettrici TB-specifiche attivate.

Introduzione

L'Organizzazione Mondiale della Sanità stima che un terzo della popolazione mondiale sia infettato con il *M. tuberculosis*. Chiunque sia portatore di un'infezione TB latente (ITBL) ha una probabilità di circa il 10% di sviluppare la forma attiva della malattia. Questo tasso di progressione è più elevato in determinati gruppi, fra cui chi è stato infettato di recente e coloro che hanno un sistema immunitario indebolito.

La risposta immunitaria all'infezione da *M. tuberculosis* è principalmente una risposta immunitaria cellulo-mediata (CMI). Nel quadro di questa risposta, le cellule T vengono sensibilizzate verso gli antigeni di *M. tuberculosis*. Le cellule T effettrici attivate, CD4 e CD8, separate in maniera specifica dal sangue possono essere contate in base alla loro capacità di essere stimolate *in vitro* da questi antigeni^{1,2}. L'uso di antigeni selezionati per il complesso *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) migliora la specificità del saggio per questi microrganismi riducendo la reattività crociata per il vaccino BCG e per la maggior parte dei micobatteri dell'ambiente^{3,4}. Per ottimizzare la sensibilità del test vengono utilizzati due pannelli distinti di antigeni che simulano le ben caratterizzate proteine ESAT-6 e CFP10.

Il saggio T-SPOT.TB è una versione semplificata della tecnica ELISPOT. I test ELISPOT sono estremamente sensibili dal momento che la citochina target viene catturata direttamente attorno alla cellula secernente, prima che venga diluita nel supernatante, catturata dai recettori delle cellule adiacenti o degradata. Ciò rende i test ELISPOT molto più sensibili rispetto ai test ELISA convenzionali⁵. Il saggio T-SPOT.TB è concepito per rilevare le cellule effettrici T che rispondono all'attivazione da parte di antigeni specifici di *M. tuberculosis*^{3,4,6-9}. Il saggio conta le singole cellule T effettrici TB-specifiche attivate, ed è adatto per tutti i pazienti a rischio di ITBL o per i quali vi sia il sospetto di tubercolosi^{10,11}, a prescindere da età, sesso, etnia, terapia o stato immunitario.

Principi della procedura

Le cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC) vengono separate dal campione di sangue intero e lavate per eliminare le eventuali fonti di segnali di interferenza di fondo. Le PBMC vengono quindi contate in modo che per il rilevamento sia usato un numero di cellule standardizzato. Questa procedura garantisce che anche i campioni che presentano bassi dosaggi di cellule T a causa di sistemi immunitari indeboliti (soggetti immunocompromessi e immunosoppressi) presentino un numero adeguato di cellule aggiunte ai pozzetti per la microtitolazione. Le fasi di lavaggio e di conteggio così come la tecnica ELISPOT forniscono prestazioni superiori per il rilevamento della tubercolosi e delle infezioni tubercolari latenti.

Per ciascun campione sono necessari quattro pozzetti (vedere Figura 1):-

1. Un Controllo negativo per identificare una eventuale attivazione cellulare non specifica.
2. Antigeni TB-specifici, Pannello A (ESAT-6).
3. Antigeni TB-specifici, Pannello B (CFP10).
4. Un Controllo positivo contenente la fitoemagglutinina (PHA, un noto attivatore policlonale¹²) per confermare la funzionalità delle PBMC.

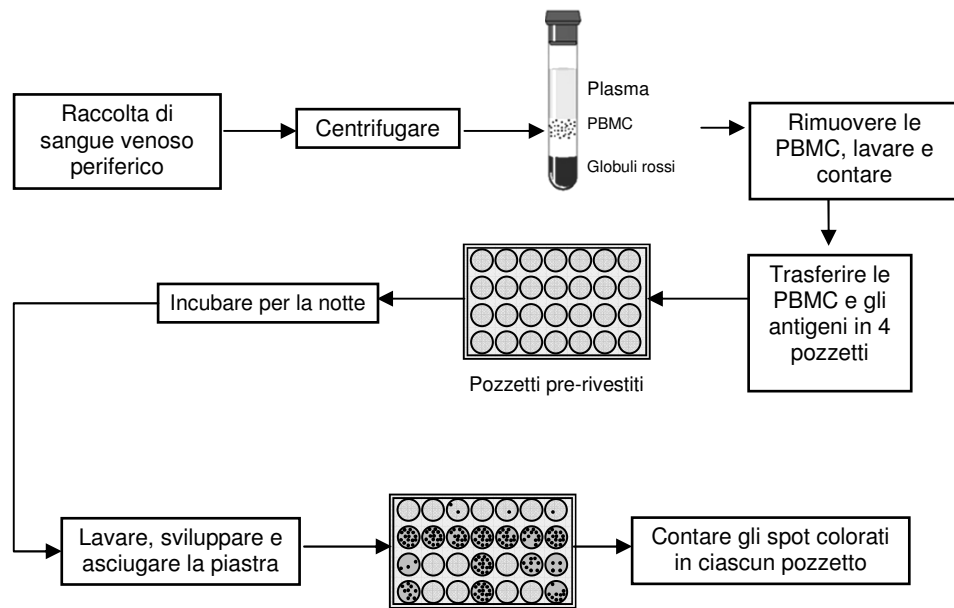


Figura 1: I passaggi principali del saggio T-SPOT.TB. Osservare che ciascuna piastra comprende 96 pozzetti.

Le PBMC sono incubate con gli antigeni per consentire la stimolazione delle cellule T sensibilizzate eventualmente presenti. La citochina prodotta viene catturata dagli anticorpi specifici sulla membrana, che forma la base del pozzetto, mentre le cellule e gli altri materiali indesiderati vengono rimossi con un lavaggio. Un secondo anticorpo, coniugato alla fosfatasi alcalina e diretto su un epitomo differente della molecola di citochina, viene introdotto e si fissa alla citochina catturata sulla superficie della membrana. Tutto il coniugato non fissato viene rimosso mediante lavaggio. Un substrato solubile viene aggiunto in ciascun pozzetto; questo viene separato dall'enzima legato e forma uno spot di precipitato insolubile nel sito di reazione. Ciascuno spot rappresenta l'impronta di una singola cellula citochina-secerne, e la conta degli spot ottenuti dà la misura della quantità di cellule T effettrici sensibili a *M. tuberculosis* nel sangue periferico.

Limitazioni

- Soltanto per uso diagnostico *in vitro*.
- Soltanto per uso professionale.
- Conservare il kit integro ad una temperatura da 2 a 8°C. Il kit non deve essere utilizzato dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Conservare i componenti del kit aperto a 2-8°C. Utilizzare i componenti entro 8 settimane dall'apertura, ma sempre entro la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Non miscelare le componenti dei kit di lotti differenti.
- Leggere attentamente le istruzioni prima dell'uso.
- Osservare una tecnica asettica per evitare la contaminazione dei reagenti, dei pozzetti, delle sospensioni cellulari e dei mezzi di coltura delle cellule.
- Ogni variazione alle tecniche di pipettatura e di lavaggio indicate, e ai tempi e/o alle temperature di incubazione può influenzare i risultati ottenuti e quindi è da evitare.
- Il sangue raccolto per il test deve essere utilizzato entro 8 ore. Questo limite di tempo può essere superato usando il reagente T-Cell *Xtend*TM (disponibile presso Oxford Immunotec). Usando il reagente T-Cell *Xtend* con il saggio T-SPOT.TB, il tempo di conservazione del campione aumenta a 32 ore.
- I campioni di sangue devono essere conservati e trasportati al laboratorio a temperatura ambiente (18-25°C). Se si usa il reagente T-Cell *Xtend*, i campioni possono essere trasportati e conservati a temperature fra 10 e 25°C. Non refrigerare o congelare i campioni di sangue intero.
- Il saggio T-SPOT.TB deve essere utilizzato e interpretato soltanto nel contesto del quadro clinico generale.

- Un risultato negativo del test non esclude la possibilità di un'esposizione o di un'infezione con *M. tuberculosis*.
- Gli antigeni ESAT-6 e CFP10 non sono presenti nei ceppi di BCG e nella maggior parte dei mycobacteria nell'ambiente, con l'eccezione di *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} e *M. goodnae*.

Avvertenze di sicurezza e precauzioni

È necessario prendere precauzioni durante la manipolazione di prodotti d'origine umana. Tutti i campioni ematici devono essere considerati potenzialmente infetti.

La manipolazione dei campioni ematici e dei componenti del test, il loro uso, conservazione e smaltimento devono essere eseguiti in conformità alle procedure stipulate nelle direttive o nei regolamenti nazionali appropriati per la protezione contro i rischi biologici.

È necessario prendere precauzioni durante la lavorazione con prodotti chimici. Tutti i prodotti chimici devono essere considerati potenzialmente pericolosi.

Materiale fornito

Il kit T-SPOT.TB 8 contiene:

1. 1 piastra per microtitolazione: 96 pozzetti, in dotazione come 12 strisce da 8 pozzetti in un telaio, rivestiti con un anticorpo monoclonale murino alla citochina interferone gamma (IFN-g).
2. 2 fiale (ciascuna da 0,8 ml) Pannello A: contenenti antigeni ESAT-6, albumina bovina e agenti antimicrobici.
3. 2 fiale (ciascuna da 0,8 ml) Pannello B: contenenti antigeni CFP10, albumina bovina e agenti antimicrobici.
4. 2 fiale (ciascuna da 0,8 ml) Controllo positivo: contenenti la fitoemagglutinina (PHA) utilizzata per il controllo della funzionalità delle cellule, albumina bovina e agenti antimicrobici.
5. 1 fiala (50 µl) di reagente coniugato, concentrato a 200x: anticorpo monoclonale murino alla citochina IFN-g coniugata alla fosfatasi alcalina.
6. 1 flacone (25 ml) di soluzione substrato: soluzione BCIP/NBT^{plus} pronta all'uso.
7. Istruzioni per l'uso in un CD insieme a MSDS, Manuale tecnico, Guida illustrata della procedura del test, il calcolatore T-SPOT della diluizione cellulare, il calcolatore della diluizione del coniugato, il calcolatore della velocità di centrifuga e il programma T-SPOT.AutoReporter.

Conservazione

Conservare tutti i componenti del kit a una temperatura compresa tra 2 e 8°C. Evitare l'esposizione prolungata della soluzione substrato alla luce.

Stabilità

I componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza stampata sulla scatola, purché conservati e manipolati secondo le istruzioni.

Attrezzature e materiali necessari ma non forniti

1. Telaio per piastre con striscia da 8 pozzetti (disponibile presso Oxford Immunotec).
2. Cabina microbiologica di Classe II (raccomandata).
3. Tubi per il prelievo del sangue, tipo Vacutainer[®] CPT[™] (disponibili presso Oxford Immunotec) o eparinizzati.
4. FICOLL-PAQUE* PLUS o altro materiale separatore delle PBMC.
5. Per campioni prelevati più di 8 ore in precedenza si può usare il reagente T-Cell Xtend (disponibile presso Oxford Immunotec).

6. Per semplificare la separazione delle PBMC con il metodo FICOLL* si possono usare tubi Leucosep.
7. Centrifuga per la preparazione delle PBMC (capace di almeno 1800xg e di mantenere i campioni a temperatura ambiente (18-25°C)).
8. Attrezzature e reagenti per la conta delle PBMC; manualmente con Trypan Blue e un emocitometro su microscopio o automaticamente con un analizzatore ematologico appropriato.
9. Incubatore umidificato al 5% di CO₂ - 37 ± 1 °C.
10. Lavatore per piastre da microtitolazione o materiale per il lavaggio manuale delle piastre.
11. Pipette e punte per pipette sterili.
12. Soluzione PBS sterile: come GIBCO® 1x D-PBS (Invitrogen; numero catalogo 14040-091).
13. Acqua distillata o deionizzata.
14. Un mezzo per la lettura delle piastre, come un microscopio, un microscopio digitale, una lente d'ingrandimento o un sensore di piastre.
15. Un mezzo di coltura sterile come GIBCO AIM V® (Invitrogen; numero catalogo 31035-025): l'uso di questo mezzo privo di siero nella fase d'incubazione è fortemente raccomandato. L' RPMI 1640 (Invitrogen; numero catalogo 21875-034) può essere utilizzato soltanto per i primi passaggi di preparazione dei campioni. Si raccomanda di conservare il mezzo di coltura in aliquote appropriate e di eliminare il materiale in eccesso dopo l'uso. Il mezzo di colture cellulare deve essere preriscaldato a 37 °C prima dell'uso con il saggio T-SPOT.TB.

Preparazione del reagente

1. Piastra per microtitolazione. La piastra per microtitolazione T-SPOT.TB 8 è fornita pronta all'uso. Rimuovere il numero richiesto di strisce da 8 pozzetti dal luogo di conservazione e lasciare stabilizzare a temperatura ambiente. Risigillare le rimanenti strisce nella pellicola esterna di alluminio con il sacchetto di materiale disidratante.
2. Le fiale degli antigeni ESAT-6 del *M. tuberculosis* (Pannello A) sono fornite pronte all'uso.
3. Le fiale degli antigeni CFP10 del *M. tuberculosis* (Pannello B) sono fornite pronte all'uso.
4. Le fiale di Controllo positivo sono fornite pronte all'uso.
5. Preparare una soluzione da lavoro di coniugato diluito 1:200. Calcolare il volume della soluzione da lavoro di coniugato necessario (vedere il calcolatore T-SPOT della diluizione del coniugato sul CD accluso a ciascun kit) e prepararla immediatamente prima dell'uso.
6. La soluzione substrato è fornita pronta all'uso. Rimuoverla dal luogo di conservazione e lasciarla stabilizzare a temperatura ambiente.

Procedura

Il test deve essere eseguito secondo i principi della Buona Pratica di Laboratorio e seguendo scrupolosamente queste Istruzioni d'uso.

Oxford Immunotec Ltd ha preparato una Guida illustrata della procedura del test e un Manuale tecnico, che descrivono la raccolta e la preparazione dei campioni, la selezione del mezzo di coltura e i metodi di conta degli spot. Questi sono contenuti nel CD accluso a ciascun kit, possono essere richiesti al numero +44 (0)1235 442780 oppure possono essere scaricati dal sito www.oxfordimmunotec.com.

Raccolta e preparazione dei campioni

Gli utilizzatori devono validare le loro proprie procedure di raccolta e di conta delle PBMC e di scelta del mezzo appropriato per supportare la funzionalità delle cellule T durante la fase d'incubazione primaria del test. Normalmente, per un paziente immunocompetente, è possibile ottenere una quantità sufficiente di PBMC proveniente da campioni di sangue venoso per svolgere il test secondo le direttive seguenti:

- Adulti e bambini di età superiore a 10 anni: un tubo da 8 ml o due tubi CPT da 4 ml oppure un tubo da 6 ml con litio eparina
- Bambini di età compresa tra 2 e 9 anni: un tubo da 4 ml CPT o con litio eparina
- Bambini fino a 2 anni di età: un tubo pediatrico da 2 ml

I campioni ematici devono essere conservati a temperatura ambiente e testati entro otto ore dalla raccolta, oppure entro 32 ore se conservati a 10-25 °C e trattati con il reagente T-Cell *Xtend*.

Il mezzo di coltura cellulare deve essere preriscaldato a 37 °C prima dell'uso con il saggio T-SPOT.TB.

Procedura	Note
<p>1. Raccogliere un campione di sangue secondo le istruzioni fornite con il dispositivo di raccolta. Conservare il sangue raccolto a temperatura ambiente (18-25 °C) oppure a 10-25 °C se si usa il reagente T-Cell <i>Xtend</i>. Non refrigerare o congelare.</p>	<p>1. I campioni ematici possono essere raccolti in tubi diversi. Presso i nostri laboratori abbiamo utilizzato con successo tubi Vacutainer CPT citrato di sodio, dei tubi CPT eparina sodica e dei tubi standard con litio eparina. Con il reagente T-Cell <i>Xtend</i> si possono usare solo tubi con litio eparina.</p> <p>I tubi EDTA non sono raccomandati.</p>
<p>2. Con i tubi CPT per la raccolta del sangue seguire le istruzioni del fabbricante per la separazione dei PBMC.</p> <p>Per metodi di raccolta del sangue alternativi, separare le PBMC mediante centrifugazione attraverso FICOLL-PAQUE PLUS utilizzando le procedure pubblicate.</p>	<p>2. Centrifugare i tubi CPT da 8 ml a 1600xg per 28 min o i tubi CPT da 4 ml a 1800xg per 30 min a 18 °C se si dispone di una centrifuga refrigerata. Se sono state usate precedentemente temperature più basse, attendere che la centrifuga abbia raggiunto i 18 °C. Se si usa una centrifuga non refrigerata, accertarsi che la temperatura non superi i 25 °C.</p> <p>In alternativa, diluire il sangue con un uguale volume di mezzo RPMI 1640. Trasferire delicatamente il sangue diluito (2-3 volumi) sul FICOLL-PAQUE PLUS (1 volume) e centrifugare a 1000xg per 22 min mantenendo la temperatura fra 18 e 25 °C.</p> <p>Il calcolatore della velocità di centrifuga sul CD accluso al kit può essere utile per la conversione della velocità da xg a giri/min.</p> <p>Se i campioni sono stati prelevati da 8 a 32 ore prima, vanno miscelati con il reagente T-Cell <i>Xtend</i> prima di stratificarli su FICOLL-PAQUE PLUS.</p> <p>Se si usano tubi Leucosep o il reagente T-Cell <i>Xtend</i> (disponibile presso Oxford Immunotec), seguire la procedura acclusa a questi prodotti.</p>
<p>3. Raccogliere la banda bianca opaca delle PBMC con una pipetta e trasferire in un tubo conico da 15 ml per centrifuga. Aggiungere il mezzo di coltura delle cellule fino ad ottenere un volume di 10 ml.</p>	<p>3. Durante questo processo possono essere usati vari mezzi per lavare le cellule. Presso i nostri laboratori sia AIM-V sia RPMI 1640 sono stati utilizzati con successo e sono raccomandati.</p>
<p>4. Centrifugare a 600xg per 7 min. Rimuovere il surnatante e mettere il pellet in sospensione in 1 ml di mezzo.</p>	<p>4. Vedere punto 3, sopra.</p>
<p>5. Aggiungere del mezzo fresco per ottenere un volume di 10 ml e centrifugare a 350xg per 7 min.</p>	<p>5. Vedere punto 3, sopra.</p>

6. Rimuovere il surnatante e mettere il pellet in sospensione in 0,7 ml di mezzo di coltura AIM V.	6. A questo punto il pellet deve essere messo in sospensione nel mezzo di coltura per l'incubazione di notte. Presso i nostri laboratori il mezzo privo di siero AIM V è stato utilizzato con successo ed è fortemente raccomandato.
--	--

Conta delle cellule e diluizione

Il saggio T-SPOT.TB richiede una quantità di $2,5 \times 10^5$ PBMC vitali per pozzetto. Per ciascun campione di un paziente sono necessari complessivamente quattro pozzetti. Il quantitativo di cellule introdotto in ciascun pozzetto deve essere corretto. In caso contrario si può avere una lettura inesatta del risultato.

Procedura	Note
1. Eseguire la conta delle cellule vitali.	1. Le cellule possono essere contate con vari metodi diversi, fra cui una conta manuale utilizzando Trypan Blue e un emocitometro o una conta automatica con un'apparecchiatura apposita.
2. In breve, per la conta manuale con un emocitometro Neubauer, aggiungere 10 µl della sospensione cellulare finale a 40 µl di soluzione di Trypan Blue 0,4% (p/v). Trasferire un'aliquota appropriata nell'emocitometro e contare le cellule nella griglia. Per altri tipi di emocitometro e per i dispositivi automatizzati, seguire le istruzioni del fabbricante.	2. Prestare attenzione per assicurarsi che la sospensione con le cellule sia accuratamente miscelata prima del prelievo delle aliquote per la diluizione o per le conte. Le cellule possono depositarsi sul fondo del tubo provocando un'interpretazione errata del loro numero reale.
3. Calcolare la concentrazione di cellule vitali presenti nella sospensione di cellule madre.	3. Assicurarsi che il calcolo sia corretto per il sistema di conta utilizzato poiché l'uso di un numero insufficiente o eccessivo di cellule può produrre un'interpretazione erronea del risultato. Il calcolatore T-SPOT della diluizione cellulare sul CD accluso a ciascun kit potrà facilitare il calcolo.
4. Preparare 500 µl della sospensione finale delle cellule a una concentrazione di $2,5 \times 10^5$ cellule/100 µl.	4. Assicurarsi che le cellule siano ben miscelate prima di prelevare un'aliquota per la diluizione.

Preparazione della piastra e incubazione

Il saggio T-SPOT.TB necessita di quattro pozzetti per ciascun campione di un paziente. Un Controllo negativo e un Controllo positivo delle cellule funzionali devono essere effettuati su ciascun singolo campione. Si raccomanda di disporre i campioni verticalmente sulla piastra come illustrato di seguito.

- Controllo negativo
- Pannello A
- Pannello B
- Controllo positivo

Procedura	Note
1. Rimuovere la striscia da 8 pozzetti pre- rivestita dal suo imballaggio, tagliare in un telaio per piastre e lasciare stabilizzare a temperatura ambiente.	1. Rimuovere solo il numero di strisce necessario e conservare le strisce rimanenti. Tagliare le strisce da utilizzare in un telaio per piastre vuoto con una copertura inferiore e un coperchio. Telai, coperture inferiori e coperchi possono essere conservati e riutilizzati.
2. Sono necessari quattro pozzetti per ciascun campione di un paziente; (i) Introdurre 50 µl di mezzo di coltura AIM V in ciascun pozzetto di Controllo negativo. (ii) Introdurre 50 µl di soluzione del Pannello A in ciascuno dei 4 pozzetti necessari. (iii) Introdurre 50 µl di soluzione del Pannello B in ciascuno dei 4 pozzetti necessari. (iv) Introdurre 50 µl di soluzione di Controllo positivo in ciascun pozzetto di controllo della funzionalità delle cellule.	2. Non toccare la membrana con la punta della pipetta. Le impronte sulla membrane causate dalla punta delle pipette possono produrre artefatti nei pozzetti. Può essere necessario battere leggermente la piastra per assicurarsi che le soluzioni coprano la membrana sul fondo di ciascun pozzetto. Evitare di agitare vigorosamente per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione crociata degli antigeni nei pozzetti.
3. In ciascuno dei 4 pozzetti che sarà utilizzato per il campione di un paziente, introdurre 100 µl di sospensione finale del paziente (contenente 250.000 cellule vitali).	3. Prelevare delicatamente la sospensione di cellule con una pipetta per miscelarle bene, quindi liberare la soluzione premendo la pipetta e ripetere la procedura più volte prima di rimuovere ciascuna aliquota da 100 µl. Si raccomanda di utilizzare una punta nuova per ciascuna nuova introduzione di cellule di un paziente per evitare la possibilità di contaminazione crociata tra i 4 pozzetti.
4. Incubare la piastra in un incubatore umidificato a 37°C con CO ₂ al 5% per 16-20 ore.	4. Evitare di agitare la piastra una volta che questa si trova nell'incubatore. Non impilare le piastre in quanto ciò porterebbe a una distribuzione di temperatura e una ventilazione non omogenea. Il mancato rispetto del tempo e delle condizioni di incubazione può produrre un'interpretazione erronea del risultato. Verificare che l'incubatore contenga acqua sufficiente a mantenere l'umidità per tutto il tempo di incubazione.

Sviluppo e conta degli spot

Durante la fase di lavaggio e di sviluppo, non toccare la membrana con la punta delle pipette o con le punte del lavatore dei pozzetti automatizzato. Impronte sulla membrane causate dalla punta delle pipette o del sistema di lavaggio dei pozzetti possono tradursi in artefatti nei pozzetti, che possono interferire con la conta degli spot.

Procedura	Note
1. Rimuovere la piastra dall'incubatore ed eliminare il mezzo di coltura delle cellule.	1. A questo punto, estrarre la soluzione substrato dal kit e lasciarla stabilizzare a temperatura ambiente.
2. Introdurre 200 µl di soluzione PBS in ciascun pozzetto.	
3. Eliminare la soluzione PBS. Ripetere il lavaggio dei pozzetti ancora per 3 volte con soluzione nuova a ogni lavaggio.	3. Eliminare tutte le PBS dall'ultima fase di lavaggio invertendo la piastra su carta assorbente prima di continuare.

4. Diluire il reagente coniugato concentrato a 1/200 con la PBS per ottenere la soluzione di lavoro.	4. Non utilizzare PBS contenente Tween [®] o altri tipi di detergente, in quanto ciò provoca conte del fondo elevate. Accertarsi che venga preparato solo un lieve eccesso della soluzione di lavoro (tale da consentire uno scarto). Pertanto, per una striscia da 8 pozzetti, (ognuno dei quali richiede 50 µl), preparare 500 µl di soluzione di lavoro aggiungendo 2,5 µl di reagente coniugato concentrato a 497,5 µl di PBS. Per questo calcolo si può utilizzare il calcolatore della diluizione del coniugato sul CD accluso a ciascun kit.
5. Aggiungere 50 µl di soluzione di reagente coniugato di lavoro ad ogni pozzetto e incubare a 2-8°C per 1 ora.	5. Il mancato rispetto del tempo di incubazione può produrre un'interpretazione erronea del risultato.
6. Eliminare il coniugato ed effettuare quattro lavaggi con PBS come descritto per i passaggi 2 e 3 descritti sopra.	
7. Introdurre 50 µl di soluzione substrato in ciascun pozzetto e incubare a temperatura ambiente per 7 min.	7. Il mancato rispetto del tempo di incubazione può produrre un'interpretazione erronea del risultato.
8. Lavare la piastra a fondo con acqua distillata o demonizzata per arrestare la reazione di rivelazione.	
9. Lasciare asciugare la piastra ponendola in una area ben ventilata oppure in un forno a una temperatura massima di 37°C.	9. Gli spot appariranno meglio con l'asciugatura della piastra. Lasciare asciugare per 4 ore a 37°C o per tutta la notte a temperatura ambiente.
10. Contare e annotare il numero di spot distinti di colore blu scuro sulla membrana di ciascun pozzetto. Applicare l'Interpretazione dei risultati e i Criteri del test (vedi qui di seguito) per determinare se il campione del paziente è "Positivo" o "Negativo" agli antigeni della TB.	10. Gli spot possono essere visualizzati in varie maniere, fra cui manualmente con una lente di ingrandimento, un microscopio adeguato, un microscopio digitale o un apposito sensore di piastra ELISPOT. Sul sito Oxford Immunotec è disponibile una Guida che allena alla conta degli spot (il programma T-SPOT. <i>Tutor</i>).

Controllo di qualità

Un risultato tipico prevederebbe pochi o nessuno spot nel pozzetto del Controllo negativo e oltre 20 spot nel Controllo positivo.

Un Controllo negativo sarà considerato come "Indeterminato" se il numero degli spot contati è superiore a 10. Fare riferimento al Manuale Tecnico T-SPOT. *TB* per le possibili cause (scaricare da www.oxfordimmunotec.com). Sarà necessario prelevare un altro campione dal paziente e ripetere il test.

Normalmente, il numero di spot per il Controllo positivo di funzionalità delle cellule dovrebbe essere ≥ 20 o mostrare una saturazione (spot troppo numerosi da contare). È possibile che le cellule T di una piccola parte dei pazienti mostrino soltanto una risposta limitata alla PHA^{13,14}. Nel caso che il numero di spot del Controllo positivo sia < 20 spot, dovrebbe essere considerato come "Indeterminato", a meno che il Pannello A o il Pannello B sia "Positivo" come descritto nella Interpretazione dei risultati e Criteri del test (vedi qui di seguito), nel qual caso il risultato è valido.

A causa delle variazioni biologiche e sistematiche potenziali, nel caso il valore più elevato di (Pannello A meno Controllo negativo) e (Pannello B meno Controllo negativo) sia 5, 6 o 7 spot, il risultato può essere considerato borderline (equivoco). I risultati borderline (equivoci), sebbene validi, sono meno attendibili dei risultati con un numero di spot più lontano dal valore soglia. Si raccomanda perciò di ripetere il test con un nuovo campione prelevato dal paziente. Se il risultato ottenuto con la ripetizione del test è ancora borderline (equivoco), bisogna usare altri test

diagnostici e/o informazioni epidemiologiche per arrivare a stabilire la presenza o meno di infezione TB nel paziente.

Sebbene gli antigeni ESAT-6 e CFP10 siano assenti nei ceppi BCG di *M. bovis* e nella maggior parte dei micobatteri ambientali, è possibile che un risultato T-SPOT.TB "Positivo" sia dovuto ad un'infezione da *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* o *M. goodii*. In caso di sospetto di queste infezioni, sono richiesti altri test.

Interpretazione dei risultati e criteri del test

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

I risultati del saggio T-SPOT.TB si interpretano sottraendo il numero di spot nel pozzetto del Controllo negativo dal numero di spot presenti in ciascun pannello, applicando il seguente algoritmo:

- Il risultato del test è "Positivo" se (Pannello A meno Controllo negativo) e/o (Pannello B meno Controllo negativo) ≥ 6 spot.
- Il risultato del test è "Negativo" se entrambe (Pannello A meno Controllo negativo) e (Pannello B meno Controllo negativo) ≤ 5 spot. Rientrano in questa categoria anche i valori minori di zero.

Un risultato "Positivo" indica che il campione contiene cellule T effettrici reattive al *M. tuberculosis*.

Un risultato "Negativo" indica che il campione probabilmente non contiene cellule T effettrici reattive al *M. tuberculosis*.

Caratteristiche di performance del test

La **specificità** è stata valutata testando 93 campioni da donatori che, in base alla loro storia medica e personale, sono stati giudicati essere a basso rischio di infezione da *M. tuberculosis*. La specificità del saggio T-SPOT.TB è stata calcolata essere del 100% (93/93) (limiti di confidenza al 95% pari al 95,8% - 100%).










La **sensibilità** è stata valutata testando 87 campioni da casi di infezione da *M. tuberculosis* confermati da coltura, compresi gruppi di soggetti immunocompromessi. La sensibilità del saggio T-SPOT.TB è stata calcolata essere del 98,8% (86/87) (limiti di confidenza al 95% pari al 90,8% - 99,9%).

La **riproducibilità** è stata valutata come marker sostitutivo della variazione intra-test, attraverso un'analisi dei campioni di sangue eseguita in doppio sulla medesima piastra. Complessivamente 145 campioni di sangue provenienti da 140 donatori differenti sono stati testati in doppio (due pozzetti per il Pannello A e due pozzetti per il Pannello B) usando il saggio T-SPOT.TB. È stata osservata concordanza clinica in 142/145 (97,9%) dei test in doppio. Due test in doppio hanno prodotto dei risultati marginalmente discordanti e soltanto 1 campione dei 145 ha prodotto un risultato discrepante.

Riferimenti bibliografici

1. Janeway and Travers (1996) *Immunobiology* 2nd Ed.
2. Staines *et al* (1999) *Introducing Immunology* 2nd Ed.
3. Chapman *et al* (2002) *AIDS*, **16** (17): 2285-2293.
4. Ewer *et al* (2003) *Lancet*, **361**: 1168-1173.
5. See www.elispot-analyzers.de/english/science-elispot-assays.html
6. Pathan *et al* (2001) *J. Immunol.*, **167**: 5217-5225.
7. Lavani *et al* (2001) *Lancet*, **357**: 2017-2021.
8. Lavani *et al* (2001) *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **163**: 824-828.
9. Lavani *et al* (2001) *J. Infect. Dis.*, **183**: 469-477.
10. Meier *et al* (2005) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **24**: 529-536.
11. Zellweger *et al* (2005) *Int. J. Tuberculosis and Lung Dis.*, **9**(11): 1242-1247.
12. NCCLS Approved Guideline. *Performance of single Cell Immune Response Assays, I/LA26-A*
13. Koller *et al* (2003) *Clin. Exp. Immunol.*, **132**(2): 225-231.
14. Apollonj *et al* (1975) *Immunol. Commum.*, **4**(5): 453-463.

Glossario dei simboli

	Usare entro/Scadenza (Anno-Mese-Giorno)
	Numero di lotto
	Numero di catalogo
	Attenzione, vedere le istruzioni d'uso
	Fabbricante
	Sufficiente per "n" test
	Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Limite di temperatura/Conservare entro
	Fare riferimento alle istruzioni d'uso

T-SPOT, T-Cell *Xtend* e il logo Oxford Immunotec sono marchi depositati di Oxford Immunotec Limited.
AIM V e GIBCO sono marchi depositati di Invitrogen.
CPT e Vacutainer sono marchi depositati di Becton Dickinson.
* FICOLL e FICOLL-PAQUE sono marchi depositati di GE Companies.
Tween è un marchio depositato di Uniqema Americas LLC.

Il saggio T-SPOT.TB è protetto dai seguenti brevetti, depositati ed in corso di registrazione:
US 09/308,725, EP 941478, JP 1998-524410, AU 728357, CA 2272881, EP 1152012, AU 765013, US 7115361, US 09/830,839, EP 99952697.3, JP 2000-579635, ZA 2001-3356, US 7135280, EP 02726998.4, JP 2002-554719, AU 2002-219338, CA 2483236, CZ 2003/001866, IN 0105/DELNP/2003, NZ 526807, US 6290969, US 6338852, US 6350456, US 6458366, US 6962710, EP 850305, EP 851927, EP 1203817, JP 2001-517069, AU 727602, AU 756833, AU 753995, BR 9610262, BR 9610268, CA 2230885, CA 2230927, CN 1200146, CN 1200147, CZ 9800628, HU 9900902, IL 123506, NO 9800883, PL 325373, TR 9800411, ZA 9607394, ZA 9607395, US 5955077, EP 706571, JP 2001-515359, AU 682879, CA 2165949, NZ 267984, US 1999/132505, EP 928851, JP 2000-615041, AU 773268, CA 2372583

Il reagente T-Cell *Xtend* è protetto dai seguenti brevetti, depositati ed in corso di registrazione:
WO 2008/041004

Il saggio T-SPOT.TB integra una tecnologia brevettata accordata sotto licenza dallo Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark e Isis Innovation Limited, Oxford, Regno Unito.

Il saggio T-SPOT.TB viene venduto sotto licenza dal Public Health Research Institute e può essere utilizzato in base ai diritti di brevetto PHRI esclusivamente per uso diagnostico *in vitro* per l'uomo.

© Oxford Immunotec Limited, 2009. Tutti i diritti riservati.

Fabbricante
Oxford Immunotec Ltd
94C Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4RY, Regno Unito
www.oxfordimmunotec.com



Oxford Immunotec Limited, 94C Milton Park,
Abingdon, Oxon OX14 4RY, UK
Tel: +44 (0)1235 442780 Fax: +44 (0)1235 442781
E-mail: info@oxfordimmunotec.com

www.oxfordimmunotec.com

