




T-SPOT[®] TB



Oxford
Immunotec



Un ausilio per la diagnosi dell'infezione tubercolare

MANUALE D'USO

Per uso diagnostico *in vitro*

Manuale d'uso per:

T-SPOT.TB 8 (formato piastra da 8 pozzetti multi-uso. catalogo Codice prodotto: TB.300)

Indice	Pagina
Usò previsto	2
Introduzione	2
Principi della procedura	2
Limiti	3
Avvertenze di sicurezza e precauzioni	4
Materiale fornito	4
Conservazione	4
Stabilità	5
Attrezzature e materiali necessari ma non forniti	5
Preparazione del reagente	5
Procedura	6
Raccolta e preparazione dei campioni	6
Conta delle cellule e diluizione	8
Preparazione della piastra e incubazione	8
Sviluppo e conta degli spot	9
Controllo di qualità	10
Interpretazione dei risultati e criteri del test	11
Performance del test	11
Riferimenti bibliografici	12
Glossario dei simboli	12

Uso previsto

Il test T-SPOT[®].TB è un test diagnostico *in vitro* per il rilevamento delle cellule T effettrici che rispondono all'attivazione degli antigeni di *Mycobacterium tuberculosis*; il test è utilizzato quale ausilio diagnostico dell'infezione tubercolare (TB). Il test 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 stimulate *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 test 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 test 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 dalla 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 test 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 test 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 test sia usato un numero di cellule standardizzato. Questa procedura garantisce che anche per i campioni che presentano un basso numero di cellule T a causa di sistemi immunitari indeboliti (soggetti immunocompromessi e immunosoppressi) si possa dispensare nel pozzetto per la microtitolazione un numero adeguato di cellule. Le fasi di lavaggio e di conteggio della 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 un'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.

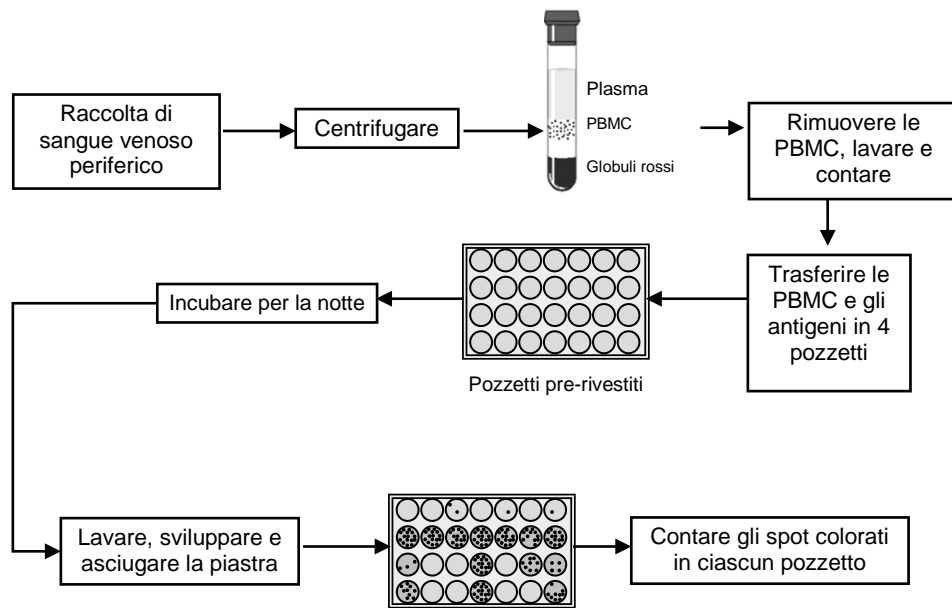


Figura 1: I passaggi principali del test T-SPOT.TB. Osservare che ciascuna piastra comprende 96 pozzetti.

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 non legati vengono rimossi con un lavaggio. Un anticorpo anticorpo secondario coniugato con fosfatasi alcalina e diretto ad un epitopo 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 indica la quantità di cellule T effettrici sensibili a *M. tuberculosis* nel sangue periferico.

Limiti

- Soltanto per uso diagnostico *in vitro*.
- Soltanto per uso professionale.
- Il kit T-SPOT.TB 96 è esclusivamente monouso, mentre il kit T-SPOT.TB 8 è multi-uso.
- Non miscelare i componenti dei kit di lotti differenti.
- Leggere attentamente il manuale prima dell'uso.
- Osservare una tecnica asettica per evitare la contaminazione dei reagenti, dei pozzetti per test, 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 un metodo di deplezione dei granulociti, come il reagente T-Cell Xtend® (disponibile presso Oxford Immunotec). Usando il reagente T-Cell Xtend, o un altro metodo di deplezione dei granulociti, con il test 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 un metodo di deplezione dei granulociti, come il reagente T-Cell Xtend, allora i campioni possono essere trasportati e conservati a temperature fra 10 e 25°C. Non refrigerare o congelare i campioni di sangue intero.
- Il test 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, 12 strisce x 8 pozzetti rivestiti con un anticorpo monoclonale murino verso la citochina interferone gamma (IFN- γ).
2. 2 provette (ciascuna da 0,8 ml) Pannello A: contenenti antigeni ESAT-6, albumina bovina e agenti antimicrobici.
3. 2 provette (ciascuna da 0,8 ml) Pannello B: contenenti antigeni CFP10, albumina bovina e agenti antimicrobici.
4. 2 provette (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 provetta (50 μ l) di reagente coniugato, concentrato a 200x: anticorpo monoclonale murino verso la citochina IFN-g coniugato con fosfatasi alcalina.
6. 1 flacone (25 ml) di soluzione substrato: soluzione BCIP/NBT^{plus} pronta all'uso.
7. Manuale d'uso in un CD insieme a MSDS, Guida Formativa, il calcolatore T-SPOT della diluizione cellulare, il calcolatore della diluizione del coniugato, il calcolatore della velocità di centrifugazione 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 del substrato alla luce.

Stabilità

Non miscelare componenti provenienti da lotti diversi. Conservare il kit non aperto a 2-8 ° C. I componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla scatola, se conservati e trattati secondo le modalità raccomandate. Il kit non deve essere utilizzato oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta del kit.

Conservare i componenti del kit non aperti a 2-8 ° C. Componenti aperti devono essere utilizzati entro 8 settimane di apertura.

Attrezzature e materiali necessari ma non forniti

1. Telaio per piastra da 8 pozzetti (disponibile presso Oxford Immunotec) per l'uso con un kit T-SPOT.TB 8.
2. Cappa microbiologica di Classe II (consigliata).
3. Provette per il prelievo del sangue, tipo Vacutainer® CPT™ (disponibili presso Oxford Immunotec) o provette eparinizzate.
4. Ficoll®-Paque* Plus o altro materiale separatore delle PBMC.
5. Per campioni prelevati fino a 32 ore dopo la venipuntura si può usare il reagente T-Cell Xtend (disponibile presso Oxford Immunotec). Si possono utilizzare metodi alternativi di deplezione dei granulociti per campioni conservati fino a 32 ore. I clienti devono convalidare tali metodi alternativi nei propri laboratori.
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 centrifugare almeno 1800xg e di mantenere i campioni a temperature ambiente (18-25°C)).
8. Nella preparazione e nel lavaggio di PBMC separate, è possibile utilizzare una centrifuga per il lavaggio delle cellule, come ad esempio una centrifuga DiaCent-CW (Bio-Rad). I clienti devono convalidare l'uso di tali attrezzature nei propri laboratori.
9. Attrezzature e reagenti per la conta delle PBMC; manualmente con Trypan Blue e un emocitometro su microscopio o automaticamente con un analizzatore ematologico appropriato.
10. Incubatore umidificato al 5% di CO₂ - 37 ± 1°C.
11. Lavatore per piastre da microtitolazione o materiale per il lavaggio manuale delle piastre.
12. Pipette e puntali per pipette sterili.
13. Soluzione D-PBS sterile: come GIBCO® 1x D-PBS (Invitrogen; codice prodotto 14040-091).
14. Acqua distillata o deionizzata.
15. Un mezzo per la lettura delle piastre, come un microscopio, un microscopio digitale, una lente d'ingrandimento o un sensore di piastre.
16. Un mezzo di coltura sterile come GIBCO AIM V® (Invitrogen; codice prodotto 31035-025): l'uso di questo mezzo privo di siero nella fase d'incubazione è fortemente raccomandato. L'RPMI 1640 (Invitrogen; codice prodotto 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 coltura cellulare deve essere preriscaldato a 37°C prima dell'uso con il test 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 necessario di strisce da 8 pozzetti dal luogo di conservazione e portare a temperatura ambiente. Richiudere le strisce rimanenti nel sacchetto di alluminio includendo il sacchetto di materiale disidratante.
2. Le provette degli antigeni ESAT-6 del *M. tuberculosis* (Pannello A) sono fornite pronte all'uso.
3. Le provette degli antigeni CFP10 del *M. tuberculosis* (Pannello B) sono fornite pronte all'uso.
4. Le provette di Controllo positivo sono fornite pronte all'uso.
5. Preparare il coniugato diluito 1:200. Calcolare il volume di coniugato necessario (vedere il calcolatore T-SPOT della diluizione del coniugato sul CD accluso a ciascun kit per il test). Il reagente può essere preparato immediatamente prima dell'uso o realizzato per

concentrazioni lavorative (1:200) e conservato fino a un massimo di sei settimane a 2°C-8°C prima dell'uso. Non utilizzare detergente diluito al di fuori di questo periodo di validità.

6. Il substrato è fornito pronto all'uso. Rimuoverlo dal luogo di conservazione e portarlo 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 all'utilizzo, che descrive la raccolta e la preparazione dei campioni, la selezione del mezzo di coltura e i metodi di conta degli spot. È contenuta nel CD accluso a ciascun kit per il test, e può essere richiesta al numero +44 (0)1235 442780 oppure può essere scaricata 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 da campioni di sangue venoso per svolgere il test secondo le direttive seguenti:

- Adulti e bambini di età superiore a 10 anni: una provetta da 8 ml o due provette CPT da 4 ml oppure una provetta da 6 ml con eparina
- Bambini di età compresa tra 2 e 9 anni: una provetta da 4 ml CPT o eparina
- Bambini fino a 2 anni di età: una provetta pediatrica 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 un mezzo per rimuovere i granulociti, come il reagente T-Cell *Xtend*.

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

Procedura	Note
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.	1. I campioni ematici possono essere raccolti in provette diverse. Presso i nostri laboratori abbiamo utilizzato con successo provette Vacutainer CPT citrato, delle CPT eparina e delle provette standard con eparina o citrato. Le provette CPT sono adatte solo per l'uso con il reagente T-Cell <i>Xtend</i> . I provette EDTA non sono raccomandati.

<p>2. Quando si utilizzano le provette CPT per la raccolta del sangue seguire le istruzioni del fabbricante per la separazione dei PBMC.</p> <p>Quando si utilizzano Vacutainer contenenti eparina o citrato, separare le PBMC mediante centrifugazione attraverso Ficoll-Plaque Plus utilizzando le procedure pubblicate.</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>2. Centrifugare le provette CPT da 8 ml a 1600xg per 28 min o le provette 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 RPMI 1640. Trasferire delicatamente il sangue diluito (2-3 volumi) sul Ficoll-Plaque Plus (1 volume) e centrifugare a 1000xg per 22 min mantenendo la temperatura fra 18 e 25°C.</p> <p>Per campioni prelevati da 8 a 32 ore dopo la venipuntura si può usare il reagente T-Cell <i>Xtend</i> prima di stratificarli su Ficoll-Plaque Plus.</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 vengono utilizzati altri metodi di deplezione dei granulociti, questi devono essere convalidati dal cliente per l'uso con il test T-SPOT. <i>TB</i>.</p>
<p>3a. Raccogliere lo strato bianco opaco 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>3b. In alternativa, può essere utilizzata una centrifuga per il lavaggio delle cellule, ad esempio DiaCent-CW (Bio-Rad) per facilitare la fase di lavaggio delle cellule. Se si utilizza questo sistema, usare DPBS per lavare le cellule.</p>	<p>3a. 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>3b. La metodologia per l'utilizzo della centrifuga per il lavaggio delle cellule durante la preparazione delle PBMC sarà disponibile presso Oxford Immunotec. Tuttavia, i clienti devono convalidare tale metodo nei propri laboratori.</p>
<p>4. Centrifugare a 600xg per 7 min. Rimuovere il surnatante e risospingere il pellet in sospensione in 1 ml di mezzo.</p>	<p>4. Vedere punto 3a, sopra.</p>
<p>5. Aggiungere del mezzo fresco per ottenere e portare a 10 ml e centrifugare a 350xg per 7 min.</p>	<p>5. Vedere punto 3a, sopra.</p>
<p>6. Rimuovere il surnatante e risospingere il pellet in 0,7 ml di mezzo di coltura AIM V.</p>	<p>6. A questo punto il pellet deve essere risospeso nel mezzo di coltura per l'incubazione over-night. Presso i nostri laboratori il mezzo privo di siero AIM V è stato utilizzato con successo ed è fortemente raccomandato.</p>

Le cellule T ottenute da altri fluidi corporei come il lavaggio broncoalveolare (BAL), versamento pleurico (PE) o liquido cerebrospinale (CSF) sono state usate con successo con il test di T-SPOT. *TB* per identificare infezioni e malattie TB (Jafari *et al* (2006) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **174** 1048-1054, Jafari *et al* (2008) Eur. Resp. J. **31** 261-265, Strassburg *et al* (2008) Eur. Resp. J. **31** 1132-1135, Jafari *et al* (2009) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **180**(7) 666-673, Dheda *et al* (2009) Thorax **64**(10) 847-853 e Patel *et al* (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77). Se si utilizzano campioni non ematici, gli utenti devono convalidare le procedure per la raccolta di

sufficienti cellule mononucleari. I metodi per trattare i campioni BAL sono descritti nelle pubblicazioni di cui sopra.

Nota 1: Il cut-off per un risultato positivo e controlli validi per il test, utilizzando campioni non ematici, non sono stati sufficientemente valutati e possono differire dalle analisi del sangue. Gli utenti devono definire i criteri di interpretazione del test. I medici devono usare il loro giudizio in sede di revisione dei risultati.

Nota 2: Il tempo per ottenere il campione per iniziare il test non è stato studiato approfonditamente.

Conta delle cellule e diluizione

Il test 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 portare ad un'interpretazione errata 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 test T-SPOT.TB necessita di quattro pozzetti per ciascun campione di un paziente. Per ciascun singolo campione deve essere eseguito un Controllo negativo e un Controllo positivo delle cellule funzionali. 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 le strisce a 8 pozzetti dalla confezione fissarla con una clip su un telaio e portare a temperatura ambiente.	1. Rimuovere solo il numero richiesto di strisce, e conservare le altre. Fissare le strisce da utilizzare in una piastra vuota dotata di coperchio ed una base. Telai, coperchi e basi devono essere conservati e riutilizzati.
2. Sono necessari quattro pozzetti per ciascun campione di un paziente; (i) Dispensare 50 µl di mezzo di coltura AIM V in ciascun pozzetto di Controllo negativo. (ii) Dispensare 50 µl di soluzione del Pannello A in ciascuno dei 4 pozzetti necessari. (iii) Dispensare 50 µl di soluzione del Pannello B in ciascuno dei 4 pozzetti necessari. (iv) Dispensare 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 membrana 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 cross-contaminazione degli antigeni nei pozzetti.
3. In ciascuno dei 4 pozzetti che sarà utilizzato per il campione di un paziente, dispensare 100 µl di sospensione finale del paziente (contenente 250.000 cellule vitali).	3. Pipettare delicatamente la sospensione cellulare, assicurarsi che sia miscelata bene prima di prelevare i 100 µl. Si raccomanda di utilizzare un nuovo puntale per ciascun paziente per evitare la possibilità di cross-contaminazione 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 portare ad un'interpretazione errata 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 automatico dei pozzetti. 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.	1. Nel caso di ritardo inevitabile nel processo, ad esempio per problemi di risorse durante il weekend, le piastre possono essere rimosse dall'incubatore e conservate a 2°C-8°C. Il tempo di stoccaggio massimo è 72 ore, durante il quale le piastre devono essere coperte. Il cliente deve convalidare tale processo nel proprio laboratorio.
2. Eliminare il mezzo di coltura delle cellule ed aggiungere 200 µl di soluzione D-PBS in ciascun pozzetto.	2. A questo punto, rimuovere la soluzione substrato dal kit e lasciarlo stabilizzare a temperatura ambiente.
3. Eliminare la soluzione D-PBS. Ripetere il lavaggio dei pozzetti ancora per 3 volte con soluzione nuova a ogni lavaggio.	3. Eliminare tutte le D-PBS dall'ultima fase di lavaggio invertendo la piastra su carta assorbente prima di continuare.

<p>4. Diluire il reagente coniugato concentrato a 1/200 con la D-PBS per ottenere la soluzione di lavoro.</p>	<p>4. Non utilizzare D-PBS contenente Tween® o altri tipi di detergente, in quanto ciò provoca un elevato background di fondo. Accertarsi che venga preparato solo un lieve eccesso della soluzione di lavoro (tale da consentire uno scarto).</p> <p>Pertanto, per T-SPOT.TB 96, per cui ognuno dei 96 pozzetti, richiede 50 µl, preparare 5 ml di soluzione di lavoro aggiungendo 25 µl di reagente coniugato concentrato a 4975 µl di D-PBS.</p> <p>Per T-SPOT.TB 8 e per ogni 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 D-PBS.</p>
<p>5. Dispensare 50 µl di soluzione di reagente coniugato diluito ad ogni pozzetto e incubare a 2-8°C per 1 ora.</p>	<p>5. Il mancato rispetto del tempo di incubazione può portare ad un'interpretazione errata del risultato.</p>
<p>6. Eliminare il coniugato ed effettuare quattro lavaggi con D-PBS come per i passaggi 2 e 3 descritti sopra.</p>	
<p>7. Dispensare 50 µl di substrato in ciascun pozzetto e incubare a temperatura ambiente per 7 min.</p>	<p>7. Il mancato rispetto del tempo di incubazione può portare ad un'interpretazione errata del risultato.</p>
<p>8. Lavare la piastra a fondo con acqua distillata o deionizzata per bloccare la reazione di rivelazione.</p>	
<p>9. Lasciare asciugare la piastra ponendola in una area ben ventilata oppure in un forno a una temperatura massima di 37°C.</p>	<p>9. Gli spot sono più visibili quando la piastra è asciutta. Lasciare asciugare per 4 ore a 37°C o per tutta la notte a temperatura ambiente.</p>
<p>10. Contare e annotare il numero di spot distinti di colore blu scuro presenti 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.</p>	<p>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 dà indicazioni sulla conta degli spot (il programma T-SPOT.Tutor).</p>

Controllo di qualità

Un buon risultato 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 alla Guida Formativa 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 dei potenziali biologici o variazioni sistematiche, 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 cut-off. 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 test 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*.

Performance del test

La **specificità** è stata valutata testando 93 campioni da donatori che, in base alla loro storia clinica e personale, sono stati giudicati a basso rischio di infezione da *M. tuberculosis*. La specificità del test 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 test 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 test 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
	Codice prodotto
	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 test T-SPOT.TB è protetto dai seguenti brevetti, depositati ed in corso di registrazione:

US7575870, US8617821, US14/090,221, EP941478, JP4094674, AU728357, CA2272881; US7115361; US7632646, EP1144447, JP4633931, ZA2001-3356; US7901898, US8216795, US8507211, US9005902; EP1203817, JP43245597, AU727602, CA2653566, CN1200147, CZ300953, HU0900047, NO9800883, TR2009/01109, ZA9607394, ZW10496; US5955077; US7579141, US8021832, US9238066, EP1214088, EP2087906, JP4820489, AU773268, CA2372583

L'uso del reagente T-Cell *Xtend* è protetto dai seguenti brevetti, depositati ed in corso di registrazione:

EP2084508; US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP2014-112089, IN2165/DELNP/2009, CA2665205

Il test T-SPOT.TB integra una tecnologia brevettata accordata sotto licenza dallo Statens Serum Institut, Copenhagen, Danimarca.

© Oxford Immunotec Limited, 2016. Tutti i diritti riservati.

Fabbricante

Oxford Immunotec Ltd

94C Innovation Drive Milton Park, Abingdon

Oxfordshire, OX14 4RZ, Regno Unito

www.oxfordimmunotec.com



Oxford Immunotec Ltd.
94C Innovation Drive, Milton Park,
Abingdon, Oxfordshire, OX14 4RZ, UK.
Tel: +44 (0)1235 442780
Fax: +44 (0)1235 442781



www.oxfordimmunotec.com