



T-SPOT[®].CMV



Oxford
Immunotec



Bluttest zum Nachweis der zellvermittelten Immunität gegen CMV

PACKUNGSBEILAGE

Zur *In vitro*-Diagnostik

Diese Packungsbeilage bezieht sich auf:

T-SPOT[®].CMV-Testkit

Inhaltsverzeichnis

Verwendung.....	2
Einführung.....	2
Funktionsweise.....	2
Beschränkungen.....	3
Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	4
Packungsinhalt.....	4
Lagerung.....	4
Stabilität.....	4
Für den Test erforderlich, nicht im Lieferumfang enthaltene Geräte und Materialien.....	4
Reagenzvorbereitung.....	5
Verfahrensweise.....	5
Probenentnahme und Vorbereitung.....	5
Plattenvorbereitung und Inkubation.....	6
Punktentwicklung und Zählung.....	8
Auswertung der Ergebnisse und Testkriterien.....	9
Qualitätskontrolle.....	9
Leistungsmerkmale des Assays.....	9
Literatur.....	12
Symbolerklärungen.....	12

Verwendung

Der T-SPOT.CMV-Assay ist ein diagnostischer *in vitro*-Test zum Nachweis des Immunitätsgrades der zellvermittelten Immunität eines Patienten gegen CMV. Der T-SPOT.CMV Test ist nicht zum Nachweis einer CMV-Infektion bestimmt und sollte nicht zur Bestätigung bzw. zum Ausschluss einer CMV-Infektion verwendet werden.

Einführung

Der T-SPOT.CMV Assay ist eine vereinfachte Variante des ELISPOT-Assays. ELISPOT-Assays sind außergewöhnlich empfindlich, da das Zielzytokin direkt in der Nähe der sezernierenden Zelle abgefangen wird, bevor es im Überstand verdünnt, von den Rezeptoren der Nachbarzellen gebunden oder abgebaut wird. Dadurch sind ELISPOT- Assays erheblich empfindlicher als konventionelle ELISA-Assays.¹ Der T-SPOT.CMV-Assay dient zum Nachweis von T-Effektorzellen, die auf die Stimulation durch Zytomegalovirus-(CMV-) spezifische Antigene durch Freisetzung von Zytokinen reagieren. Der Assay zählt einzelne aktivierte T-Zellen und eignet sich für alle Patienten, unabhängig von Alter, Geschlecht, ethnischer Zugehörigkeit, Therapie oder Immunstatus.

Funktionsweise

Aus einer Vollblutprobe werden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gewonnen und gewaschen, um Quellen interferierender Hintergrundsignale zu entfernen. Anschließend werden die PBMC-Zellen gezählt, sodass eine standardisierte Zellzahl im Test verwendet wird. Dadurch wird gewährleistet, dass selbst bei niedrigen T-Zellzahlen infolge eines geschwächten (immunbeeinträchtigten und immunsupprimierten) Immunsystems die Mikrotiter-Wells mit ausreichend vielen PBMC-Zellen beschickt werden können.

Für jede Probe werden 4 Wells benötigt:

1. Nullkontrolle zum Nachweis einer unspezifischen Zellaktivierung
2. Panel CMV-A: CMV-spezifisches Antigen, IE-1
3. Panel CMV-B: CMV-spezifisches Antigen, pp65
4. Positiv-Kontrolle: Mitogenlösung mit Phytohämagglutinin (PHA, einem bekannten polyklonalen Aktivator²) zur Bestätigung der Funktionalität der PBMC-Zellen.

Die PBMC-Zellen werden mit den Antigenen inkubiert, damit eine Stimulation vorhandener sensibilisierter T-Zellen stattfinden kann. Produziertes Zytokin, in diesem Fall Interferon-gamma (IFN- γ), wird mit Hilfe spezifischer Antikörper auf der Membran festgehalten, welche die Basis des Wells bildet. Die Zellen und andere unerwünschte Materialien werden durch Waschen entfernt. Ein zweiter, mit alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des Zytokin-Moleküls gerichtet ist, wird hinzugefügt und bindet sich an das auf der Membranoberfläche festgehaltene Zytokin. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Jedes Well wird mit einem löslichen Substrat versetzt; dieses wird von gebundenem Enzym gespalten, mit dem Ergebnis, dass sich am Reaktionsort ein punktförmiger, unlöslicher Niederschlag bildet. Jeder Punkt stellt eine einzelne, Zytokin ausscheidende T-Zelle dar. Die Anzahl der entstandenen Punkte ist ein Maß für die Menge der CMV-sensitiven T-Effektorzellen im peripheren Blut (Abbildung 1).

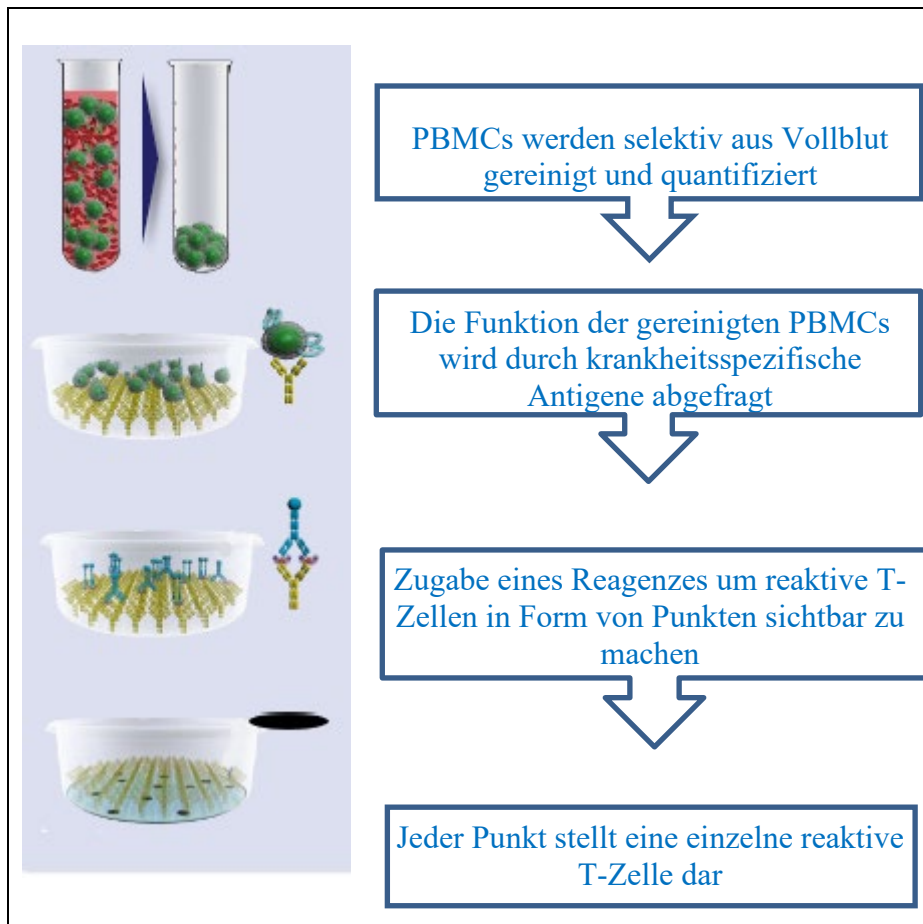


Abbildung 1. T-SPOT.CMV-Testprinzip.

Beschränkungen

- Nur zur *in vitro*-Diagnostik geeignet.
- Nur von Fachkräften anzuwenden.
- Komponenten unterschiedlicher Chargen nicht miteinander mischen.
- Vor dem Gebrauch die Gebrauchsanleitung gründlich lesen.
- Steriles Arbeiten, um eine Kontamination der Reagenzien, Assay-Wells, Zellsuspensionen und Zellkulturmedien zu vermeiden.
- Abweichungen von den genannten Pipettierungs- und Waschtechniken, Inkubationszeiten und/oder -temperaturen können die tatsächlich gewonnenen Ergebnisse beeinträchtigen und sind zu vermeiden.
- Methoden der Zelltrennung sind von dem den Test durchführenden Labor zu validieren.

Bei Anwendung der Dichtegradientenzentrifugation sollte das Blut innerhalb von 8 Stunden entnommen und der Test im selben Zeitraum angesetzt werden. Durch Einsatz des T-Cell *Xtend*[®]-Reagenz (erhältlich von Oxford Immunotec) lässt sich diese Zeitbeschränkung umgehen. Wird das T-Cell *Xtend*-Reagenz zusammen mit dem T-SPOT.CMV-Assay verwendet, erhöht sich die Lagerzeit der Blutprobe auf 32 Stunden.

Es können auch andere Methoden zur Zellisolierung eingesetzt werden wie beispielsweise die Magnetpartikelselektion, mit der Granulozyten aus Blutproben entfernt werden können, und daher für Proben, die bis zu 32 Stunden nach Entnahme gelagert wurden, verwendet werden können.

- Blutproben bei 15-25 °C lagern und zum Labor transportieren. Vollblutproben nicht im Kühlschrank oder Gefrierschrank aufbewahren.

- Die T-SPOT.CMV Testergebnisse sollten nur im Zusammenhang mit dem klinischen Gesamtbild verwendet und ausgewertet werden.

Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Bei der Handhabung von humanem Probenmaterial ist immer Vorsicht geboten. Alle Blutproben sollten als potenziell infektiös behandelt werden. Die Handhabung von Blutproben und Assay-Bestandteilen, deren Verwendung, Lagerung und Entsorgung sollte gemäß den geltenden landesspezifischen Sicherheitsrichtlinien und Bestimmungen erfolgen. Bei der Arbeit mit Chemikalien ist Vorsicht geboten. Alle Chemikalien sind zunächst als potenzielle Schadstoffe anzusehen.

Packungsinhalt

Das T-SPOT.CMV-Testkit enthält:

1. 1 Mikrotiterplatte: 96 Wells als feste 96-Well-Platte oder in Form von 12 Streifen zu je 8 Wells in einem Rahmen, die mit einem murinen monoklonalen Antikörper gegen das Zytokin Interferon-gamma (IFN- γ) beschichtet sind
2. 2 Fläschchen (zu je 0,8 mL) Panel CMV-A mit IE-1-Lösung
3. 2 Fläschchen (zu je 0,8 mL) Panel CMV-B mit pp65-Lösung
4. 2 Fläschchen (zu je 0,8 mL) Positiv-Kontrolle: Mitogenlösung mit Phytohämagglutinin (PHA) zur Kontrolle der Zellfunktionalität
5. 1 Fläschchen (50 μ L) 200-fach konzentriertes Konjugatreagenz: mit alkalischer Phosphatase konjugierter, muriner monoklonaler Antikörper gegen Zytokin IFN- γ
6. 1 Flasche (25 mL) Substratlösung: gebrauchsfertige BCIP/NBT^{plus}-Lösung.

Lagerung

Alle Komponenten des Testkits bei 2-8 °C lagern.
Die Substratlösung vor längerer Lichteinwirkung schützen.

Stabilität

Komponenten unterschiedlicher Chargen dürfen nicht miteinander gemischt werden. Die ungeöffnete Packung bei 2-8 °C lagern. Solange die empfohlenen Hinweise zur Lagerung und Handhabung befolgt werden, sind die Bestandteile des Testkits bis zu dem auf der Verpackung genannten Verfallsdatum stabil. Das Testkit darf nach dem auf dem Kietikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr verwendet werden.

Die geöffneten Kitkomponenten sind bei 2-8 °C zu lagern. Die geöffneten Komponenten müssen innerhalb von 8 Wochen nach dem Öffnen verwendet werden.

Für den Test erforderlich, nicht im Lieferumfang enthaltene Geräte und Materialien

1. Mikrotiterplattenrahmen für 8-Well-Streifen (erhältlich von Oxford Immunotec) bei Verwendung von Platten im Streifenformat.
2. Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II (Empfehlung).
3. Heparinisierte Blutentnehmeröhrchen.
4. Für eine Zellisolierung aus Vollblut erforderliche Reagenzien und Geräte.
5. Geräte und Reagenzien, die eine Zählung der PBMC-Zellen ermöglichen, entweder automatisch mit Hilfe eines Hämatologie-Analysiergeräts oder manuell unter Verwendung von Trypanblau und einer Zählkammer mit einem Mikroskop oder einer anderen Methode.
6. Ein Inkubator mit Befeuchtung und einer Inkubationstemperatur von 37 ± 1 °C und Zufuhr von 5 % CO₂.
7. Mikrotiterplattenwaschgerät oder Gerät zum manuellen Waschen von Platten.

8. Pipetten und sterile Pipettenspitzen.
9. Sterile D-PBS-Lösung, zum Beispiel GIBCO® 1x D-PBS (Invitrogen; Produktcode 14040-091).
10. Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
11. Ein Hilfsmittel zum Lesen der Platte, z.B. Mikroskop, Digitalmikroskop, Vergrößerungsglas oder Mikrotiterplattenbildgerät.
12. Ein steriles Zellkulturmedium, z. B. GIBCO AIM V® (erhältlich von Oxford Immunotec als 50mL-Flasche mit dem Produktcode A18398SA und als 500mL-Flasche mit dem Produktcode A18398DJ oder von Invitrogen mit dem Produktcode 31035-025). Dieses serumfreie Medium wird für den Inkubationsschritt unbedingt empfohlen. RPMI 1640 (Invitrogen, Produktcode 21875-034) sollte nur für die ersten Schritte der Probenpräparation verwendet werden. Es wird empfohlen, das Zellkulturmedium in geeigneten Aliquots aufzubewahren und überschüssiges Material nach dem Gebrauch zu entsorgen. Das Zellkulturmedium sollte vor dem Benutzen mit dem T-SPOT.CMV-Assay auf 37 °C vorgewärmt werden.

Reagenzvorbereitung

1. Mikrotiterplatte. Die T-SPOT.CMV-Mikrotiterplatte wird gebrauchsfertig geliefert. Die Platte aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur erwärmen lassen.
2. Die Fläschchen mit Panel CMV-A werden gebrauchsfertig geliefert.
3. Die Fläschchen mit Panel CMV-B werden gebrauchsfertig geliefert.
4. Die Fläschchen mit der Positiv-Kontrolle werden gebrauchsfertig geliefert.
5. Eine Arbeitslösung aus Konjugatreagenz (Verdünnungsverhältnis 1:200) herstellen. Das Volumen der benötigten Konjugatreagenzlösung berechnen und unmittelbar vor der Verwendung herstellen.
6. Die Substratlösung wird gebrauchsfertig geliefert. Die Lösung aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

Verfahrensweise

Bei der Durchführung des Tests sind gute Laborpraktiken Voraussetzung, und diese Gebrauchsanweisung ist unbedingt zu beachten.

Probenentnahme und Vorbereitung

Anwender sollten überprüfen, ob ihre Verfahrensweisen bei der Herstellung und Auszählung von PBMC-Zellen und bei der Auswahl geeigneter Medien zur Unterstützung der T-Zellfunktionalität während der ersten Inkubationsphase geeignet sind. Bei immunkompetenten Patienten kann die für den Test ausreichende Zahl an PBMC-Zellen wie folgt aus venösen Blutproben gewonnen werden:

- Erwachsene und Kinder ≥ 10 Jahre: 12 mL Vollblut in Lithium-Heparin- oder Natrium-Heparin-Röhrchen (z.B. 2 x 6 mL Entnahmeröhrchen)*
- Kinder zwischen ≥ 2 und < 10 Jahren: 6 mL Vollblut in Lithium-Heparin- oder Natrium-Heparin-Röhrchen
- Kinder < 2 Jahren: 2 mL Vollblut in pädiatrischen Lithium- oder Natrium-Röhrchen ..

**Hinweis: Bei Patientengruppen, bei denen eine Zellgewinnung problematisch sein kann (z. B. bei mit hämatopoetischen Stammzellen transplantierten Patienten), sollte ein zusätzliches Röhrchen Blut entnommen werden.*

Bei Anwendung der Dichtegradientenzentrifugation sind die Blutproben bei Raumtemperatur zu lagern und der Test innerhalb von 8 Stunden nach der Probenentnahme durchzuführen oder, wenn die Probe mit dem T-Cell Xtend-Reagenz behandelt wird, innerhalb von 32 Stunden.

Alternative Methoden der Zellisolierung, mit denen Granulozyten aus PBMC-Zellfraktionen isoliert werden können, wie beispielsweise mit der Magnetpartikelselektion, können für Proben, die bis zu 32 Stunden nach Entnahme gelagert wurden, verwendet werden.

Die PBMC-Zellen sollten in AIM V-Medium suspendiert und mit Hilfe einer validierten Methode zur Leukozytenzählung ausgezählt werden. Die Zellsuspension sollte auf $2,5 \times 10^6$ PBMC-Zellen / mL im AIM V-Medium verdünnt werden. 100 μ L der Zellsuspension mit 250.000 PBMC-Zellen werden in vier Test-Wells gegeben wie im nachfolgenden Abschnitt „Plattenvorbereitung und Inkubation“ beschrieben.

Bei einer PBMC-Konzentration von $<2,0 \times 10^6$ PBMC/mL sollte die Suspension zentrifugiert, das PBMC-Pellet in 400 μ L AIM V-Medium resuspendiert und erneut gezählt werden. Liegt die aus einer Patientenprobe isolierte Anzahl von PBMC-Zellen unter 1.000.000, sollte die höchstmögliche Zellkonzentration auf die Platte pipettiert und ein Korrekturfaktor auf die ermittelte Punktzahl angewendet werden, wie im Abschnitt „Ergebnisauswertung und Testkriterien“ beschrieben.

Plattenvorbereitung und Inkubation

Für den T-SPOT.CMV-Assay werden für jede Patientenprobe vier Wells benötigt. Für jede einzelne Probe ist eine Nullkontrolle und eine Positiv-Kontrolle durchzuführen. Es wird empfohlen, die Proben vertikal, wie nachfolgend dargestellt, anzuordnen.

- Nullkontrolle
- Panel CMV-A
- Panel CMV-B
- Positiv-Kontrolle

Verfahren	Anmerkungen
<p>1. Die Platte aus der Verpackung entnehmen und auf Raumtemperatur erwärmen lassen.</p>	<p>1. Bei Verwendung einer Platte im Streifenformat nur die benötigte Anzahl an Streifen entnehmen, die übrigen Streifen lagern. Die zu verwendenden Streifen in einen leeren, mit Bodenschutz und Deckel versehenen Plattenrahmen einsetzen. Rahmen, Bodenschutz und Deckel sollten zur Wiederverwendung aufbewahrt werden.</p>
<p>2. Für jede Patientenprobe werden 4 Wells benötigt: (i) Geben Sie in jede Nullkontrolle 50 µL des AIM V-Kulturmediums. (ii) Geben Sie in jedes erforderliche Well 50 µL Panel-CMV-A-Lösung. (iii) Geben Sie in jedes erforderliche Well 50 µL Panel-CMV-B-Lösung. (iv) Geben Sie in jedes Well zur Kontrolle der Zellfunktionalität 50 µL Positiv-Kontroll-Lösung.</p>	<p>2. Die Pipettenspitze darf die Membran nicht berühren. Durch die Pipettenspitze verursachte Einkerbungen in der Membran können zu Artefakten in den Wells führen. Möglicherweise ist es erforderlich, leicht gegen die Platte zu klopfen und auf diese Weise sicherzustellen, dass die Lösungen die Membran im Boden eines jeden Wells bedecken. Kräftiges Schütteln ist zu vermeiden, um eine Kreuzkontamination zwischen Antigenen unterschiedlicher Wells zu vermeiden.</p>
<p>3. Jedem der 4 für eine Patientenprobe verwendeten Wells 100 µL der endgültigen Zellsuspension mit 250.000 Zellen des jeweiligen Patienten hinzugeben.</p>	<p>3. Vor der Entnahme eines jeden 100 µL-Aliquots die Zellsuspension mehrere Male in die Pipette aufziehen und wieder herausdrücken, um eine gründliche Mischung der Zellen zu gewährleisten. Es wird empfohlen bei dem Hinzufügen der PBMC-Zellen für jeden neuen Patienten eine neue Pipettenspitze zu verwenden, um die Gefahr einer Kreuzkontamination zwischen den 4 Wells zu vermeiden. Ist es nicht möglich, 250.000 PBMC-Zellen pro Well zu pipettieren, sollte die Zellsuspension unverdünnt pipettiert werden. Auf die ermittelte Punktzahl sollte ein Korrekturfaktor angewendet werden, um die niedrige verwendete Zellanzahl auszugleichen (siehe Abschnitt „Auswertung der Ergebnisse und Testkriterien“).</p>
<p>4. Die Platte in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ über 16-20 Stunden inkubieren.</p>	<p>4. Die Platte nicht mehr bewegen, sobald sie sich im Inkubator befindet. Die Mikrotiterplatten nicht stapeln, da dies zu einer ungleichmäßigen Temperaturverteilung und Belüftung führen kann. Nichtbeachtung der empfohlenen Inkubationszeit bzw. der Inkubationsbedingungen kann zu fehlerhaften Auswertungsergebnissen führen. Prüfen Sie, ob sich im Inkubator ausreichend Wasser befindet, damit die Feuchtigkeit über den Inkubationszeitraum hinweg erhalten bleibt.</p>

Punktentwicklung und Zählung

Beim Waschen und Entwickeln der Platte darauf achten, dass es zu keiner Berührung der Membran durch die Pipettenspitzen oder die Spitzen automatischer Plattenwaschgeräte kommt. Durch Pipettenspitzen oder Spitzen der Geräte verursachte Membranbeschädigungen können zu Artefakten in den Wells führen, welche die Punktzählung beeinträchtigen können.

Verfahren	Anmerkungen
1. Die Platte aus dem Inkubator nehmen und das Zellkulturmedium abgießen.	1. Zu diesem Zeitpunkt die Substratlösung aus dem Testkit entnehmen und bei Raumtemperatur stehen lassen.
2. In jedes Well 200 µL D-PBS-Lösung geben.	
3. Die D-PBS-Lösung abgießen. Das Waschen der Wells 3-mal wiederholen. Für jeden Waschvorgang frische D-PBS-Lösung verwenden.	3. Vor dem nächsten Schritt die gesamte D-PBS-Lösung des letzten Waschvorgangs durch Umdrehen der Platte auf saugfähigem Papier abgießen.
4. Das konzentrierte Konjugatreagenz im Verhältnis 1:200 mit D-PBS-Lösung verdünnen. Dies ist die für die Arbeitslösung erforderliche Verdünnung.	4. Verwenden Sie keine D-PBS-Lösung, die Tween® oder sonstige Detergenzien enthält, da dies zu hohen Hintergrundzählungen führt. Achten Sie darauf, dass nur ein kleiner Überschuss (für eventuellen Verlust) Arbeitslösung in der erforderlichen Verdünnung hergestellt wird. Für jeden Streifen mit 8 Wells (jede benötigt 50 µL) stellen Sie 500 µL Arbeitslösung durch Zugabe von 2,5 µL konzentriertem Konjugatreagenz zu 497,5 µL D-PBS-Lösung her. Für diese Berechnung kann der Konjugatverdünnungsrechner auf der mit jedem Testkit mitgelieferten CD verwendet werden.
5. In jedes Well 50 µL der Konjugat-Arbeitslösung geben und 1 Stunde bei 2-8 °C inkubieren.	5. Nichtbeachtung der empfohlenen Inkubationszeit kann zu fehlerhaften Auswertungsergebnissen führen.
6. Das Konjugat abgießen und 4-mal mit D-PBS-Lösung waschen (siehe Schritt 2 und 3).	
7. In jedes Well 50 µL Substratlösung geben und bei Raumtemperatur 7 Minuten lang inkubieren.	7. Nichtbeachtung der empfohlenen Inkubationszeit kann zu fehlerhaften Auswertungsergebnissen führen.
8. Die Platte gründlich mit destilliertem oder deionisiertem Wasser waschen, um die Nachweisreaktion zu stoppen.	
9. Die Platte an einem gut belüfteten Ort oder Sterilisator bei bis zu 37 °C trocknen lassen.	9. Während die Platte austrocknet, werden die Punkte besser sichtbar. 4 Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur trocknen lassen.
10. Die auffälligen, dunkelblauen Punkte auf der Membran eines jeden Wells zählen und notieren. Dabei die Kriterien zur Auswertung der Ergebnisse und die Testkriterien anwenden (siehe unten).	10. Die Punkte können auf unterschiedliche Weise sichtbar gemacht werden: Manuell durch ein Vergrößerungsglas, durch ein geeignetes Mikroskop, ein Digitalmikroskop oder durch Verwendung eines speziellen ELISPOT-Plattenbildgerätes.

Auswertung der Ergebnisse und Testkriterien

Die Ergebnisse des T-SPOT.CMV-Tests werden ausgewertet, indem man die Punktzahl in dem Well der Nullkontrolle von der Punktzahl in jedem der Panels abzieht. Das Testergebnis wird ermittelt durch die maximale normalisierte Punktzahl entweder für Panel CMV-A oder Panel CMV-B. Die Punktzahl deutet auf die Stärke der zellulären Immunantwort auf CMV hin.

Die optimale Anzahl der in jedes der 4 Test-Wells zu gebenden PBMC-Zellen liegt bei 250.000 (pro Test sind 1.000.000 PBMC-Zellen erforderlich). Jede Zahl zwischen 200.000 und 300.000 PBMC-Zellen kann verwendet werden, ohne dass sich dies auf das Testergebnis auswirkt. Liegt die Zahl der pipettierten PBMC-Zellen pro Well unter 200.000, sollte ein Korrekturfaktor verwendet werden:

- ≥ 200.000 und ≤ 300.000 pro Well hinzugegebene PBMC-Zellen: keine Korrektur erforderlich
- ≥ 75.000 und < 200.000 pro Well hinzugegebene PBMC-Zellen: Es muss ein Korrekturfaktor auf die gewonnene Punktzählung angewendet werden, um die niedrigere Anzahl an verwendeten PBMC-Zellen auszugleichen.
- < 75.000 pro Well hinzugegebene PBMC-Zellen: Es wird ein neuer Test empfohlen.

Anmerkung: Die Vorbereitung der PBMC-Zellen wird im Abschnitt „Probenentnahme und Vorbereitung“ beschrieben.

Qualitätskontrolle

Bei einem typischen Ergebnis wären wenige oder gar keine Punkte in der Nullkontrolle zu erwarten. Eine Nullkontrolle mit mehr als 10 Punkten gilt als „unbestimmt“. Daher sollte dem Patienten eine neue Probe entnommen und die Untersuchung wiederholt werden.

Bei einem typischen Ergebnis wären mehr als 20 Punkte in der Positiv-Kontrolle mit Phytohämagglutinin (PHA) zur Kontrolle der Zellfunktionalität oder die Positiv-Kontrolle würde eine Sättigung zeigen (zu viele Punkte, um sie zählen zu können). Es wird empfohlen, bei Patienten, deren Reaktion auf PHA bei < 20 Punkten liegt, eine erneute Untersuchung durchzuführen. Ergibt die wiederholte Untersuchung immer noch < 20 Punkte, ist der Patient auf Grund der auffällig niedrigen Immunantworten und einer möglichen Zellanergie als „Hochrisikopatient“ einzustufen.

In Tests zeigten sich valide Nullkontrollen (≤ 10 Punkte in dem Well der Nullkontrolle) bei 100 % der gesunden Individuen (n=94 Tests), 98,6 % der Nierentransplantationspatienten (n=146 Tests) und 99,7 % der Patienten mit einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HCT-Patienten) (n=290 Tests).

In Tests zeigten sich ≥ 20 Punkte als Reaktion auf PHA bei 100 % der gesunden Individuen (n=94 Tests), 97,3 % der Nierentransplantationspatienten (n=146 Tests) und 93,4 % der HCT-Patienten (n=290 Tests).

Leistungsmerkmale des Assays

1) Qualitätskontrolltest

Mit dem T-SPOT.CMV-Test werden die gegenüber CMV-Antigenen sensibilisierten T-Effektorzellen gezählt. Die Testspezifität wurde durch Testung einer Kohorte von 88 immunkompetenten Personen ermittelt, die anhand des CMV-spezifischen Immunoglobulin-IgG-Nachweises als seronegativ bzw. seropositiv bestätigt wurden (Tabelle 1).

Als Indikator für die analytische Genauigkeit des Tests wurde die Gesamtübereinstimmung zwischen Serologie und den Testergebnissen des T-SPOT.CMV-Tests errechnet: 98,9 %:

- 48 von 48 seronegativen Proben zeigten eine schwache Reaktion auf den T-SPOT.CMV-Test: 100 % Übereinstimmung
- 39 von 40 seropositiven Proben zeigten eine starke Reaktion auf den T-SPOT.CMV-Test: 97,5 % Übereinstimmung.

		T-SPOT.CMV-Test		Insgesamt
		Stark	Schwach	
Serologie	Positiv	39	1	40
	Negativ	0	48	48
Insgesamt		39	49	88

Tabelle 1. Unterscheidung zwischen seronegativen (Sero-) und seropositiven (Sero+) Individuen auf Grund ihrer mit dem T-SPOT.CMV-Test gemessenen Zellantworten.

2) Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des T-SPOT.CMV-Tests wurde an Proben getestet, die Punktzahlen innerhalb von drei Zählbereichen ergeben: >70 Punkte, 20-70 Punkte und 5-15 Punkte. Der prozentuale Variationskoeffizient (% VK) wurde für die folgenden Parameter errechnet: Intra-Assay-Reproduzierbarkeit, Inter-Assay-Reproduzierbarkeit, Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge, Inter-Operator-Reproduzierbarkeit und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit (Tabelle 2).

	Hohe Punktzahl (>70) % VK	Mittlere Punktzahl (20-70) % VK	Niedrige Punktzahl (5-15) % VK
Intra-Assay-Reproduzierbarkeit	6,93 %	11,21 %	21,48 %
Inter-Assay-Reproduzierbarkeit	4,01 %	14,38 %	24,48 %
Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge	3,99 %	14,33 %	23,14 %
Inter-Operator-Reproduzierbarkeit	3,98 %	14,36 %	23,86 %
Inter-Labor-Reproduzierbarkeit	3,82 %	14,32 %	24,43 %

Tabelle 2. Erhaltene Reproduzierbarkeitswerte für den T-SPOT.CMV-Test im hohen, mittleren und niedrigen Zählbereich.

Klinische Leistungsdaten

1) Organtransplantation

Die zelluläre Immunität gegen CMV wurde bei 15 mit Thymoglobulin behandelten, CMV-seropositiven Organtransplantatempfängern (Nierentransplantat) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation zwischen 4 und 22 Wochen nachgewiesen. Die Zellantworten gegen CMV wurden bei 14/15 Patienten (93,3 %) mit dem T-SPOT.CMV-Test nachgewiesen.

2) Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die Rekonstitution der zellulären Immunität gegen CMV wurde bei 63 CMV-seropositiven Empfängern eines hämatopoetischen Stammzelltransplantats mit dem T-SPOT.CMV-Test

30, 60, 100 und 180 Tage nach der Transplantation nachgewiesen. Nachgewiesen wurde auch die Korrelation zwischen den T-SPOT.CMV-Testergebnissen und einer CMV-Reaktivierung. T-SPOT.CMV-Tests wurden maximal 30 Tage vor Auftreten von CMV-Ereignissen durchgeführt.

Patienten mit einer starken zellulären Immunität gegen CMV (hohe Punktzahl im T-SPOT.CMV-Test) waren weniger durch eine CMV-Reaktivierung innerhalb der nächsten 30 Tage gefährdet (Abbildung 2). Es zeigte sich, dass der T-SPOT.CMV-Test zum Nachweis des zellulären Immunitätsgrades des Patienten gegenüber CMV eingesetzt werden kann und dass der Test ein Indikator für den Grad der Schutzwirkung gegen eine CMV-Reaktivierung sein kann.³

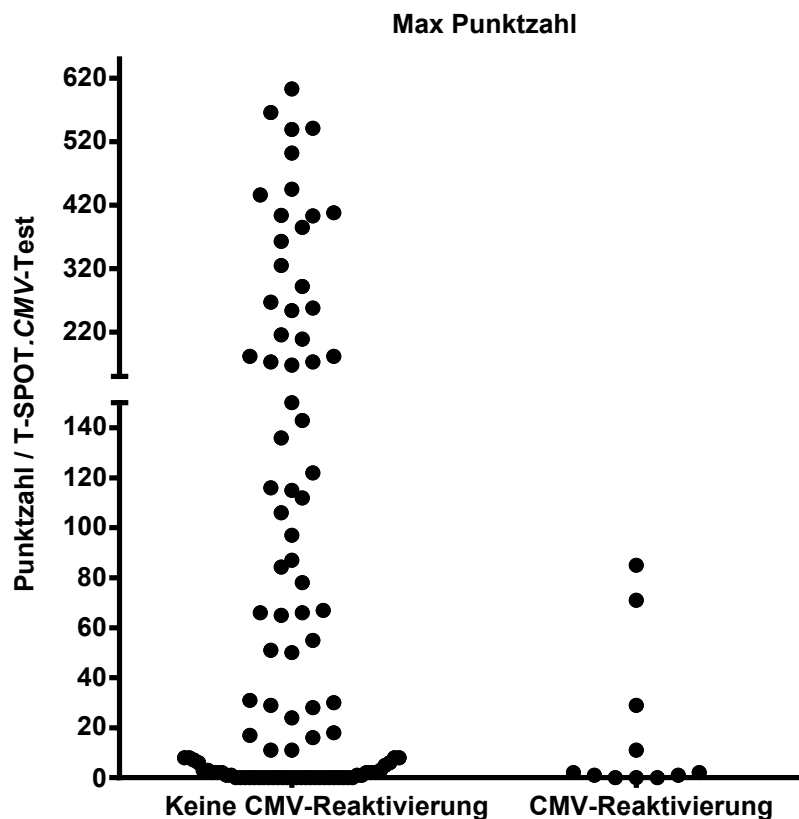











Abbildung 2. Nachweis der zellulären Immunität gegenüber CMV mit dem T-SPOT.CMV-Test bei 63 Empfängern von hämatopoetischen Stammzelltransplantaten zur Baseline und 30, 60, 100 und 180 Tage nach der Transplantation.

Literatur

1. Siehe www.elispot-analyzers.de/english/science-elispot-assays.html
2. NCCLS Approved Guideline. *Performance of single Cell Immune Response Assays*, I/LA26-A
3. Neshet et al. - Immune Monitoring with the T-SPOT®.CMV assay of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant (allo-HCT) Recipients: A Proof of Concept in the Clinical Setting. ICAAC 2014.

Symbolerklärungen

	Verfallsdatum (Jahr-Monat-Tag)
	Chargennummer
	Katalognummer
	Achtung, siehe Gebrauchsanweisung
	Hersteller
	Ausreichend für „n“ Tests
	<i>In vitro</i> -Diagnostikum
	Temperaturbeschränkung/Lagerung bei
	Siehe Gebrauchsanweisung

T-SPOT, T-Cell *Xtend* und das Oxford-Immunotec-Logo sind Warenzeichen von Oxford Immunotec Limited.
AIM-V und GIBCO sind Warenzeichen von Invitrogen.
CPT und Vacutainer sind Warenzeichen von Becton Dickinson.
* FICOLL und FICOLL-PAQUE sind Warenzeichen von GE Companies.
Tween ist ein Warenzeichen von Uniqema Americas LLC

Die Verwendung des T-Cell *Xtend*-Reagenz ist durch die folgenden Patente und Patentanmeldungen geschützt: US9090871, EP2084508, JP5992393, CN101529221, AU2007-303994, CA2665205, IN2165/DELNP/2009.

Die Verwendung des Assays ist durch die folgenden Patente und Patentanmeldungen geschützt: US7575870, EP941478, JP4094674, AU728357, CA2272881; US6207161, US6242567.

© 2023, Oxford Immunotec Limited. Alle Rechte vorbehalten.

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



Oxford Immunotec Ltd.
143 Park Drive East, Milton Park,
Abingdon, Oxfordshire, OX14 4SE, UK.
Tel: +44 (0)1235 442780
Fax: +44 (0)1235 442781



www.oxfordimmunotec.com