

Un ausilio per la valutazione dell'immunità cellulo-mediata anti-CMV

FOGLIO ILLUSTRATIVO

Per uso diagnostico *in vitro*.

Questo foglio illustrativo è relativo all'uso di:

Kit di test diagnostico T-SPOT[®].CMV

Indice

Uso previsto.....	2
Introduzione.....	2
Principi della procedura.....	2
Limiti.....	3
Avvertenze di sicurezza e precauzioni.....	4
Materiali forniti.....	4
Conservazione.....	4
Stabilità.....	4
Attrezzature e materiali necessari ma non forniti.....	4
Preparazione del reagente.....	5
Procedura.....	5
Prelievo e preparazione dei campioni.....	5
Preparazione della piastra e incubazione.....	6
Sviluppo e conta degli spot.....	7
Interpretazione dei risultati e criteri del test.....	8
Controllo della qualità.....	9
Caratteristiche di prestazione del test.....	9
Prestazioni cliniche.....	10
Riferimenti bibliografici.....	11
Glossario dei simboli.....	12

Uso previsto

Il test T-SPOT.CMV è un test diagnostico *in vitro* ideato per valutare il livello di immunità cellulo-mediata anti-CMV di un paziente. Il test T-SPOT.CMV non è destinato a essere usato per determinare l'infezione da CMV e non deve essere usato per identificare o escludere l'infezione da CMV.

Introduzione

Il test T-SPOT.CMV è una versione semplificata della tecnica di analisi ELISPOT (*Enzyme-Linked Immunospot*). I test ELISPOT sono estremamente sensibili poiché la citochina bersaglio viene catturata direttamente attorno alla cellula secernente, prima che venga diluita nel surnatante, legata dai recettori delle cellule adiacenti o degradata. Il test T-SPOT.CMV è concepito per rilevare le cellule T effettrici che rispondono alla stimolazione esercitata dagli antigeni specifici per il citomegalovirus (CMV) attraverso il rilascio di citochine. Il test conta le singole cellule T attivate ed è adatto a tutti i pazienti, a prescindere da età, sesso, etnia, terapia o stato immunitario.

Principi della procedura

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) vengono isolate da un campione di sangue intero e lavate per eliminare eventuali fonti di segnali di interferenza di fondo. Le PBMC vengono poi contaminate in modo da poter usare un numero di cellule standardizzato nel test. Ciò garantisce che anche in presenza di titoli bassi delle cellule T dovuti a sistemi immunitari indeboliti (immunocompromessi e immunosoppressi) sia aggiunto un numero adeguato di PBMC ai pozzetti per la microtitolazione.

Per ogni campione sono necessari quattro pozzetti:

1. Un Controllo negativo per identificare l'attivazione di cellule non specifiche
2. Il Pannello CMV-A: antigene CMV-specifico, IE-1
3. Il Pannello CMV-B: antigene CMV-specifico, pp65
4. Un Controllo positivo: soluzione contenente il mitogeno fitoemoagglutinina (PHA, phytohemagglutinin, un noto attivatore policlonale)¹ per confermare la funzionalità delle PBMC.

Le PBMC vengono incubate con gli antigeni per consentire la stimolazione di eventuali cellule T sensibilizzate presenti. La citochina secreta, in questo caso l'interferone gamma (IFN- γ), viene catturata dagli anticorpi specifici situati sulla membrana che forma la base del pozzetto, e le PBMC e altri materiali indesiderati vengono rimossi mediante lavaggio. Viene quindi aggiunto un secondo anticorpo, coniugato alla fosfatasi alcalina e diretto contro un epitopo diverso sulla molecola di citochina, che si lega alla citochina catturata sulla superficie della membrana. Eventuale coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. A ogni pozzetto viene aggiunto un substrato solubile; 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 T secernente citochine, e la conta degli spot ottenuti dà la misura della quantità di cellule T effettrici sensibili al CMV presenti nel sangue periferico (Figura 1).

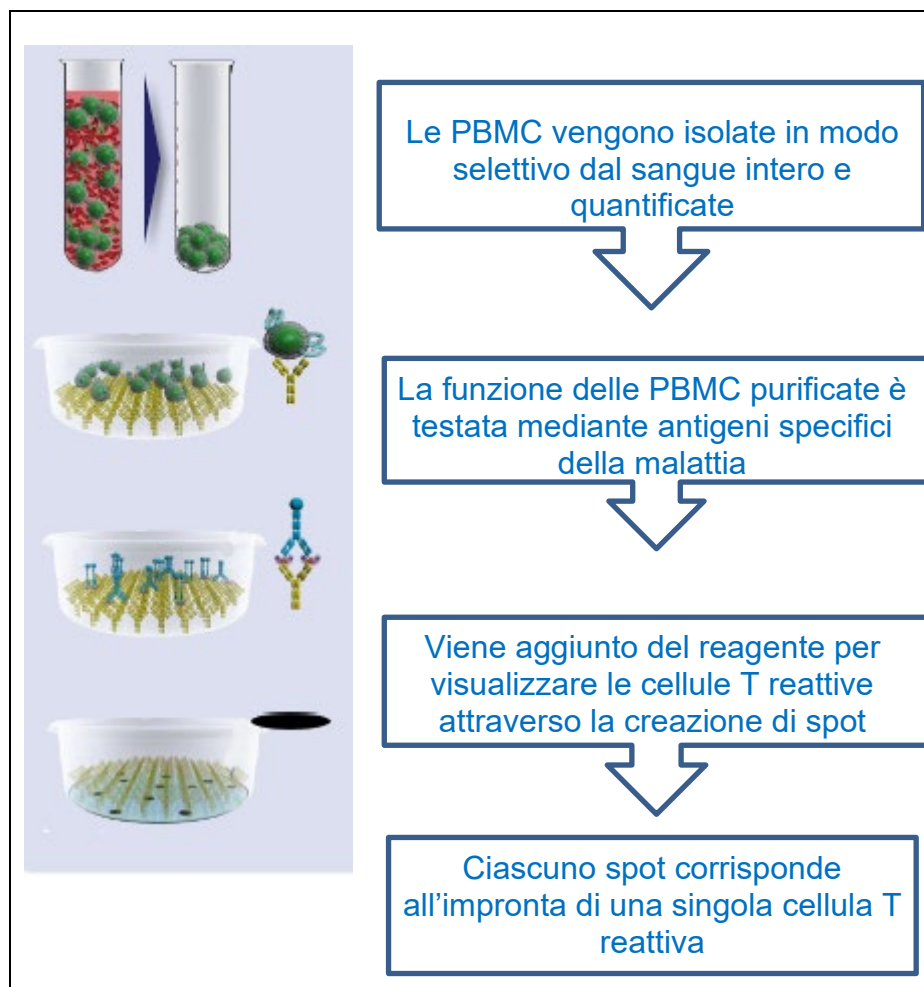


Figura 1. Principio di funzionamento del test T-SPOT.CMV

Limiti

- Soltanto per uso diagnostico *in vitro*.
- Soltanto per uso professionale.
- Non miscelare componenti di kit di lotti differenti.
- Leggere attentamente le istruzioni prima dell'uso.
- Adottare una tecnica asettica per evitare la contaminazione dei reagenti, dei pozzetti, delle sospensioni cellulari e dei terreni 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 va quindi evitata.
- La metodica di separazione cellulare deve essere validata dal laboratorio che esegue il test.

Per quanto concerne la metodica di separazione per gradiente di densità, il sangue deve essere prelevato e analizzato con il test entro 8 ore. Tale limitazione può essere superata utilizzando il reagente T-Cell *Xtend*[®] (disponibile presso Oxford Immunotec). Utilizzando il reagente T-Cell *Xtend* con il test T-SPOT.CMV il tempo di conservazione del campione si prolunga fino a 32 ore.

È possibile utilizzare metodiche di isolamento cellulare alternative, come la selezione con biglie magnetiche, che consente di rimuovere i granulociti dai campioni di sangue, rendendo possibile conservare i campioni fino a 32 ore dopo il prelievo.

- I campioni di sangue devono essere conservati e trasportati al laboratorio a una temperatura compresa tra 15 e 25 °C. Non refrigerare o congelare i campioni di sangue intero.
- I risultati del test T-SPOT.CMV devono essere utilizzati e interpretati soltanto nel contesto del quadro clinico generale.

Avvertenze di sicurezza e precauzioni

È necessario esercitare la debita cautela durante la manipolazione di prodotti di origine umana. Tutti i campioni di sangue devono essere considerati potenzialmente infetti. Per la manipolazione dei campioni di sangue e dei componenti del test, il loro utilizzo, conservazione e smaltimento ci si deve attenere alle procedure definite nelle linee guida o normative nazionali relative alla protezione contro i rischi biologici.

È necessario esercitare la debita cautela nell'utilizzo di sostanze chimiche. Tutte le sostanze chimiche devono essere considerate potenzialmente pericolose.

Materiali forniti

Il kit T-SPOT.CMV contiene:

1. 1 piastra per microtitolazione: 96 pozzetti, forniti come piastra unica da 96 pozzetti o come 12 strisce da 8 pozzetti in un telaio, rivestiti con un anticorpo monoclonale murino diretto contro la citochina IFN- γ
2. 2 flaconcini (ciascuno da 0,8 mL) del Pannello CMV-A contenenti la soluzione di IE-1
3. 2 flaconcini (ciascuno da 0,8 mL) del Pannello CMV-B contenenti la soluzione di pp65
4. 2 flaconcini (ciascuno da 0,8 mL) del Controllo positivo, contenenti fitoemoagglutinina (PHA), da usare per il controllo della funzionalità delle cellule
5. 1 flaconcino (da 50 μ L) di Reagente coniugato in concentrazione 200x: anticorpo monoclonale murino diretto contro la citochina IFN- γ coniugata alla fosfatasi alcalina
6. 1 flacone (da 25 mL) di Soluzione substrato: soluzione BCIP/NBT^{plus} pronta all'uso.

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

Non miscelare componenti di kit di lotti differenti. Conservare il kit non aperto a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. I componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza stampata sulla scatola del kit, purché conservati e manipolati secondo le condizioni raccomandate. Il kit non deve essere utilizzato dopo la data data di scadenza riportata sull'etichetta.

Conservare i componenti del kit aperto a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. I componenti aperti devono essere utilizzati entro 8 settimane dall'apertura.

Attrezzature e materiali necessari ma non forniti

1. Telaio per piastre con strisce da 8 pozzetti (disponibile presso Oxford Immunotec), se si utilizza una piastra con strisce.
2. Cabina di sicurezza microbiologica di Classe II (raccomandata).
3. Provette per il prelievo di sangue eparinizzate.
4. Reagenti e materiali necessari per isolare le cellule dal sangue intero.

5. Attrezzature e reagenti per la conta delle PBMC; ad esempio un analizzatore ematologico per la conta automatizzata, Trypan Blue e un emocitometro per la conta manuale utilizzando un microscopio o altri metodi.
6. Un incubatore umidificato in grado di garantire una temperatura di 37 ± 1 °C con il 5 % di CO₂.
7. Un lavatore per piastre da microtitolazione o materiale per il lavaggio manuale delle piastre.
8. Pipette e puntali per pipette sterili.
9. Soluzione D-PBS sterile, come GIBCO® 1x D-PBS (ThermoFisher Scientific; codice prodotto 14040-091).
10. Acqua distillata o deionizzata.
11. Un mezzo per la lettura delle piastre, come un microscopio, un microscopio digitale, una lente d'ingrandimento o un lettore di piastre.
12. Un terreno di coltura sterile, come GIBCO AIM V® (disponibile presso Oxford Immunotec in flaconi da 50 mL: codice prodotto A18398SA e in flaconi da 500 mL: codice prodotto A18398DJ, oppure ThermoFisher Scientific: codice prodotto 31035-025). L'utilizzo di questo terreno privo di siero nella fase d'incubazione è fortemente raccomandato. RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific; codice prodotto: 21875-034) può essere utilizzato soltanto nei primi passaggi di preparazione dei campioni. Si raccomanda di conservare i terreni di coltura cellulare in aliquote appropriate e di eliminare il materiale in eccesso dopo l'uso. I terreni di coltura cellulare devono essere preriscaldati a 37 °C prima di essere usati con il test T-SPOT.CMV.

Preparazione del reagente

1. Piastra per microtitolazione. La piastra per microtitolazione T-SPOT.CMV è fornita pronta all'uso. Rimuovere la piastra dal luogo di conservazione e lasciarla stabilizzare a temperatura ambiente.
2. I flaconcini di antigeni del Pannello CMV-A sono forniti pronti all'uso.
3. I flaconcini di antigeni del Pannello CMV-B sono forniti pronti all'uso.
4. I flaconcini di Controllo positivo sono forniti pronti all'uso.
5. Preparare una soluzione di lavoro di Reagente coniugato diluito 1:200. Calcolare il volume della soluzione di lavoro di Reagente coniugato necessario e prepararla immediatamente prima dell'uso.
6. La Soluzione substrato è fornita pronta all'uso. Rimuovere dal luogo di conservazione e lasciare stabilizzare a temperatura ambiente.

Procedura

Il test deve essere eseguito nel rispetto dei principi di Buona pratica di laboratorio e seguendo scrupolosamente queste Istruzioni per l'uso.

Prelievo e preparazione dei campioni

I singoli utilizzatori devono validare le loro proprie procedure di prelievo delle PBMC, di conta delle PBMC e di scelta del terreno appropriato per supportare la funzionalità delle cellule T durante la fase di incubazione primaria del test. Normalmente da campioni di sangue venoso è possibile ottenere una quantità di PBMC sufficiente per svolgere il test seguendo le linee guida riportate di seguito:

- Adulti e bambini di età pari o superiore a 10 anni: 12 mL di sangue intero raccolto in provette con litio o eparina di sodio (per es. 2 provette per prelievo da 6 mL)*

- Bambini di età compresa tra ≥ 2 e < 10 anni: 6 mL di sangue intero raccolto in provette con litio o eparina di sodio
- Bambini di età inferiore a 2 anni: 2 mL di sangue intero raccolto in provette pediatriche con litio o eparina di sodio.

**Nota: nelle popolazioni di pazienti in cui la raccolta di cellule potrebbe essere problematica (per es. in caso di pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche) si deve prelevare un'ulteriore provetta di sangue.*

Se si utilizza il metodo di centrifugazione in gradiente di densità, i campioni di sangue devono essere conservati a temperatura ambiente e analizzati entro 8 ore dal prelievo di sangue o entro 32 ore se trattati con il reagente T-Cell Xtend.

Metodiche alternative per isolare le cellule e separare i granulociti dalla frazione di PBMC, come la selezione mediante biglie magnetiche, possono essere usate per i campioni conservati fino a 32 ore.

Le PBMC devono essere sospese in terreno AIM V e contate utilizzando una metodica validata di valutazione della conta leucocitaria. La sospensione cellulare deve essere diluita fino a ottenere $2,5 \times 10^6$ PBMC/mL in terreno AIM V. 100 μ L di sospensione cellulare contenente 250.000 PBMC dovranno essere aggiunti a quattro pozzetti di analisi, come illustrato nella sezione che segue "Preparazione della piastra e incubazione".

Se la concentrazione di PBMC è $< 2,0 \times 10^6$ PBMC/mL, la sospensione deve essere centrifugata, il pellet di PBMC rimesso in sospensione in 400 μ L di terreno AIM V e la conta deve essere ripetuta. Se il numero di PBMC isolate dal campione di un paziente è inferiore a 1.000.000, si dovrà testare la massima concentrazione di cellule possibile, applicando un fattore di correzione alla conta di spot ottenuta, come illustrato nella sezione "Interpretazione dei risultati e criteri del test".

Preparazione della piastra e incubazione

Il test T-SPOT.CMV richiede l'uso di quattro pozzetti per ciascun campione di un paziente. Per ogni singolo campione si devono utilizzare un Controllo negativo e un Controllo positivo. Si raccomanda di sistemare i campioni sulla piastra in senso verticale, come illustrato di seguito.

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

Procedura	Note
1. Rimuovere la piastra dalla confezione e lasciarla stabilizzare a temperatura ambiente.	1. Se si utilizza una piastra per strisce, rimuovere solo il numero di strisce necessario e rimettere le strisce rimanenti nella confezione. Tagliare le strisce da utilizzare in un telaio per piastre vuoto dotato di una copertura inferiore e un coperchio. Telai, coperture e coperchi possono essere conservati e riutilizzati.

<p>2. Sono necessari 4 diversi pozzetti per ciascun campione di un paziente:</p> <p>(i) Inserire 50 µL di terreno di coltura AIM V in ciascun pozzetto di Controllo negativo</p> <p>(ii) Inserire 50 µL di soluzione Pannello CMV-A in ciascuno dei pozzetti necessari</p> <p>(iii) Inserire 50 µL di soluzione Pannello CMV-B in ciascuno dei pozzetti necessari</p> <p>(iv) Inserire 50 µL di soluzione di Controllo positivo in ciascun pozzetto di controllo della funzionalità delle cellule.</p>	<p>2. Non toccare la membrana con il puntale della pipetta. Eventuali intaccature sulla membrana provocate dal puntale delle pipette possono produrre artefatti nei pozzetti. Può essere necessario picchiettare delicatamente 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 tra antigeni di pozzetti diversi.</p>
<p>3. In ciascuno dei 4 pozzetti che sarà utilizzato per il campione di un paziente, inserire 100 µL di sospensione cellulare finale del paziente contenente 250.000 PBMC.</p>	<p>3. Muovere delicatamente la pipetta in alto e in basso nella sospensione cellulare per miscelarla prima di prelevare ciascuna aliquota da 100 µL.</p> <p>Si raccomanda di utilizzare un puntale nuovo a ogni nuova aggiunta di PBMC di un paziente per evitare la possibilità di contaminazione crociata tra i 4 pozzetti.</p> <p>Se non è possibile inserire 250.000 PBMC per pozzetto, la sospensione cellulare deve essere posta nella piastra non diluita. Una quantità compresa tra 75.000 e 250.000 è accettabile e si dovrà applicare un fattore di correzione per normalizzare la conta di spot ottenuta fino a 250.000 (vedere sezione "Interpretazione dei risultati e criteri del test").</p>
<p>4. Incubare la piastra in un incubatore umidificato a 37 °C con CO₂ al 5 % per 16-20 ore.</p>	<p>4. Evitare di agitare la piastra una volta che è stata riposta nell'incubatore. Non impilare le piastre poiché ciò porterebbe a una distribuzione di temperatura e una ventilazione non omogenee. Il mancato rispetto del tempo e delle condizioni di incubazione raccomandati può produrre un'interpretazione erronea del risultato. Verificare che l'incubatore contenga una quantità di acqua sufficiente a mantenere l'umidità per tutto il periodo di incubazione.</p>

Sviluppo e conta degli spot

Durante la fase di lavaggio della piastra e di sviluppo, non toccare la membrana con il puntale delle pipette o del lavatore di pozzetti automatizzato. Eventuali intaccature sulla membrana provocate dal puntale delle pipette o del lavatore di pozzetti possono produrre artefatti nei pozzetti, e ciò potrebbero interferire con il conteggio degli spot.

Procedura	Note
1. Rimuovere la piastra dall'incubatore ed eliminare il terreno di coltura cellulare.	1. A questo punto, estrarre la Soluzione substrato dal kit e lasciarla stabilizzare a temperatura ambiente.
2. Aggiungere 200 µL di soluzione D-PBS a ciascun pozzetto.	
3. Eliminare la soluzione D-PBS. Ripetere il lavaggio dei pozzetti per altre 3 volte	3. Eliminare tutta la soluzione D-PBS rimasta dall'ultima fase di lavaggio capovolgendo

utilizzando soluzione D-PBS nuova a ogni lavaggio.	delicatamente la piastra su carta assorbente prima di continuare.
4. Diluire il Reagente coniugato concentrato a 200x con la D-PBS per ottenere la soluzione di lavoro.	4. Non utilizzare D-PBS contenente Tween® o altri detergenti, in quanto ciò genera conte di fondo elevate. Accertarsi di preparare una quantità di soluzione di lavoro solo leggermente eccedente il necessario (tale da consentire uno scarto). Per ciascuna 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. Per questo calcolo è possibile utilizzare il calcolatore di diluizione del coniugato presente nel CD incluso in ciascun kit di test.
5. Aggiungere 50 µL di soluzione di lavoro di Reagente coniugato a ogni pozzetto e incubare a 2-8 °C per 1 ora.	5. Il mancato rispetto del tempo di incubazione raccomandato può produrre un'interpretazione erronea del risultato.
6. Eliminare il coniugato ed effettuare quattro lavaggi con D-PBS come descritto sopra nei passaggi 2 e 3.	
7. Aggiungere 50 µL di Soluzione substrato a ciascun pozzetto e incubare a temperatura ambiente per 7 minuti.	7. Il mancato rispetto del tempo di incubazione raccomandato può produrre un'interpretazione erronea del risultato.
8. Lavare la piastra a fondo con acqua distillata o deionizzata per arrestare la reazione di rivelazione.	
9. Lasciare asciugare la piastra ponendola in un'area ben ventilata oppure in un forno a una temperatura massima di 37 °C.	9. A mano a mano che la piastra si asciugherà gli spot diverranno più visibili. Lasciare asciugare per 4 ore a 37 °C oppure per tutta la notte a temperatura ambiente.
10. Contare e annotare il numero di spot distinti di colore blu scuro osservabili sulla membrana di ciascun pozzetto. Seguire i passaggi della sezione che segue "Interpretazione dei risultati e criteri del test".	

Interpretazione dei risultati e criteri del test

Il numero ottimale di PBMC da aggiungere a ciascuno dei 4 pozzetti da testare è 250.000 (sono necessarie 1.000.000 di PBMC per ogni test).

- Se il numero di cellule PBMC aggiunte a ciascun pozzetto è stato ≥ 75.000 e ≤ 250.000 è necessario applicare un fattore di correzione per normalizzare la conta degli spot a 250.000 PBMC. Nello specifico:
 - Fattore = $250.000/\text{numero di cellule aggiunte per pozzetto}$
 - Numero di spot del Controllo negativo per 250.000 PBMC = fattore di conta* degli spot ottenuto
 - Numero di spot del CMV-A per 250.000 PBMC = fattore di conta* degli spot ottenuto
 - Numero di spot del CMV-B per 250.000 PBMC = fattore di conta* degli spot ottenuto
 - Numero di spot del PHA per 250.000 PBMC = fattore di conta* degli spot ottenuto

- < 75.000 PBMC aggiunte per pozzetto: numero di cellule insufficiente, si raccomanda di ripetere il test.
- Si devono diluire > 250.000 PMBC per ottenere 250.000 PBMC per 100 µL (per un volume totale di almeno 400 µL).

Occorre osservare che una sospensione cellulare compresa tra > 250.000 e ≤ 300.000 può essere inserita nella piastra senza diluizione

Per ulteriori istruzioni, consultare il calcolatore del fattore di correzione per la conta degli spot di Oxford Immunotec (CSCF-CMV-UK).

I risultati del test T-SPOT.CMV vengono interpretati sottraendo il numero di spot del pozzetto del Controllo negativo da quelli dei pannelli CMV-A, CMV-B e PHA. Il numero di spot è indicativo dell'entità della risposta immunitaria cellulare nei confronti del CMV.

NB. la fase di preparazione delle PBMC è illustrata nella sezione "Prelievo e preparazione dei campioni".

Controllo della qualità

Un risultato tipico prevederebbe pochi o nessuno spot nel pozzetto del Controllo negativo. Il risultato della conta degli spot di un Controllo negativo sarà considerato "Indeterminato" se il numero degli spot contati sarà superiore a 10 ogni 250.000 PBMC. In questo caso si dovrà prelevare un altro campione dal paziente e ripetere il test.

Normalmente, il numero di spot per il pozzetto del Controllo positivo di funzionalità delle cellule contenente fitoemoagglutinina (PHA) dovrebbe essere superiore a 20 o mostrare una saturazione (spot troppo numerosi da contare).

Nei test condotti è stato dimostrato che il 100 % dei soggetti sani (n = 94 test), il 98,6 % dei pazienti sottoposti a trapianto di rene (n = 146 test) e il 99,7 % dei pazienti sottoposti a trapianto di cellule ematopoietiche (HCT, n = 290 test) ha dato risultati validi nel pozzetto di Controllo negativo (≤ 10 spot nel pozzetto di Controllo negativo).

Nei test condotti è stato dimostrato che il 100 % dei soggetti sani (n = 94 test), il 97,3 % dei pazienti sottoposti a trapianto di rene (n = 146 test) e il 93,4 % dei pazienti sottoposti ad HCT (n = 290 test) ha fatto ottenere ≥ 20 spot in risposta alla PHA.

Caratteristiche di prestazione del test

1) Test di controllo della qualità

Il test T-SPOT.CMV conta le cellule T effettrici sensibilizzate agli antigeni del CMV. La prestazione del test è stata valutata analizzando una coorte di 88 soggetti immunocompetenti con sierologia positiva o negativa confermata mediante valutazione delle immunoglobuline IgG CMV-specifiche (Tabella 1).

Quale indicazione delle prestazioni analitiche del test, è stata calcolata la concordanza complessiva tra i risultati delle analisi sierologiche e del test T-SPOT.CMV, che è risultata pari al 98,9 %:

- 48 campioni dei 48 risultati negativi all'analisi sierologica hanno dato un basso livello di risposta al test T-SPOT.CMV: una concordanza del 100 %.
- 39 campioni dei 40 risultati positivi all'analisi sierologica hanno dato un elevato livello di risposta al test T-SPOT.CMV: una concordanza del 97,5 %.

		Il test T-SPOT.CMV		
		Livello alto	Livello basso	Totale
Sierologia	Positivo	39	1	40
	Negativo	0	48	48
Totale		39	49	88

Tabella 1. Differenziazione tra soggetti sieronegativi (siero-) e sieropositivi (siero+) in base alla rispettive risposte cellulari misurate con il test T-SPOT.CMV.

2) Riproducibilità

La riproducibilità dei risultati del test T-SPOT.CMV è stata valutata utilizzando campioni che danno conte degli spot che rientrano nei seguenti tre intervalli: > 70 spot, 20-70 spot e 5-15 spot. Il coefficiente di variazione percentuale (CV) è stato calcolato per i seguenti parametri: riproducibilità intra-saggio, riproducibilità inter-saggio, riproducibilità inter-lotto, riproducibilità inter-operatore e riproducibilità inter-laboratorio (Tabella 2).

	Conta degli spot elevata (> 70) CV %	Conta degli spot intermedia (20-70) CV %	Conta degli spot bassa (5-15) CV %
Riproducibilità intra-saggio	6,93 %	11,21 %	21,48 %
Riproducibilità inter-saggio	4,01 %	14,38 %	24,48 %
Riproducibilità inter-lotto	3,99 %	14,33 %	23,14 %
Riproducibilità inter-operatore	3,98 %	14,36 %	23,86 %
Riproducibilità inter-laboratorio	3,82 %	14,32 %	24,43 %

Tabella 2. Valori di riproducibilità ottenuti dal test T-SPOT.CMV negli intervalli di conta degli spot elevata, intermedia e bassa.

Prestazioni cliniche

1) Trapianto di organi solidi

L'immunità cellulare anti-CMV è stata valutata in 15 pazienti sottoposti a trapianto di organi solidi (trapianto di rene), trattati con timoglobulina e CMV-sieropositivi, in diversi punti temporali tra le 4 e le 22 settimane dopo il trapianto. Utilizzando il test T-SPOT.CMV, le risposte cellulari anti-CMV sono state rilevate in 14 dei 15 pazienti (93,3 %).

2) Trapianto di cellule staminali ematopoietiche

In 63 pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche è stata valutata la ricostituzione dell'immunità cellulare anti-CMV utilizzando il test T-SPOT.CMV 30, 60, 100 e 180 giorni dopo il trapianto. È stata poi valutata la correlazione tra risultati del test T-SPOT.CMV e gli eventi indicanti la riattivazione del CMV. I test T-SPOT.CMV sono stati effettuati non più di 30 giorni prima del verificarsi di eventi correlati al CMV.

I pazienti che hanno fatto osservare un elevato livello di immunità cellulare anti-CMV (elevata conta degli spot nel test T-SPOT.CMV) sono risultati a rischio inferiore di riattivazione del CMV nei 30 giorni successivi (Figura 2). È stato dimostrato che il test T-SPOT.CMV può essere utilizzato per valutare il livello immunità cellulare anti-CMV di un paziente e che è in grado di fornire un'indicazione del livello di protezione contro la riattivazione del CMV².

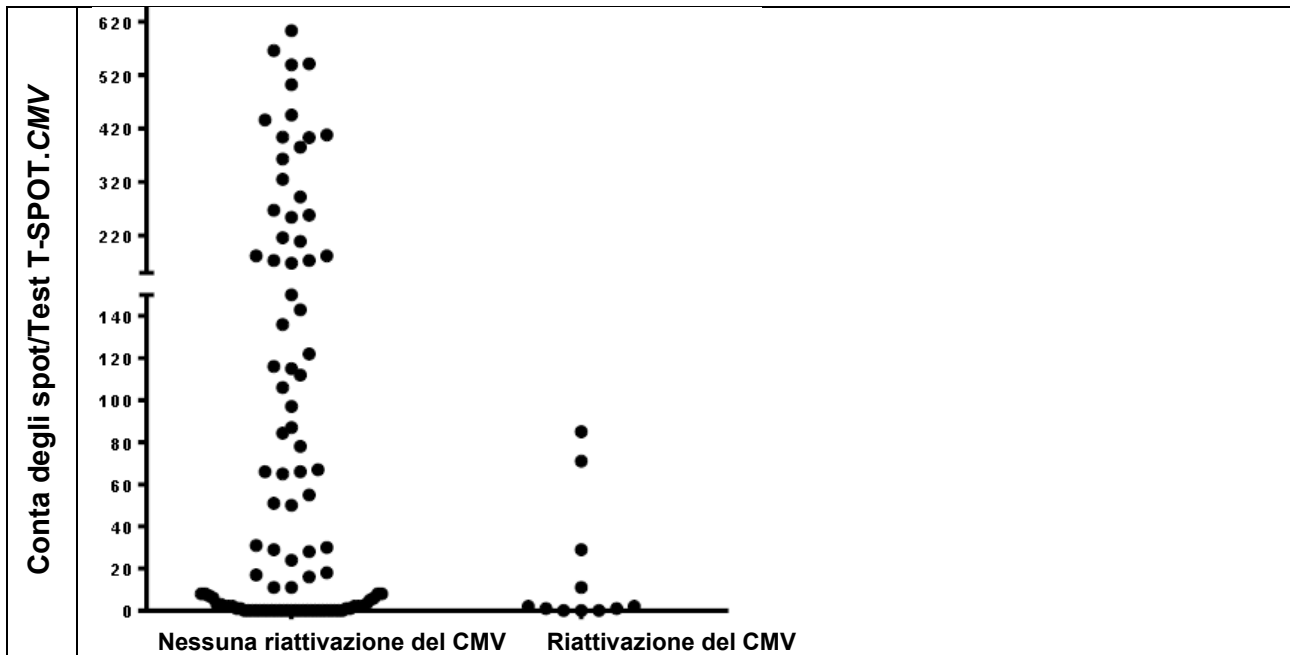











Figura 2. Immunità cellulare anti-CMV valutata utilizzando il test T-SPOT.CMV in 63 pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche al basale e il giorno 30, 60, 100 e 180 dopo il trapianto.

Riferimenti bibliografici

1. Linea guida approvata dall'NCCLS. *Performance of single Cell Immune Response Assays*, I/LA26-A
2. 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.

Glossario dei simboli

	Usare entro/scadenza (anno-mese-giorno)
	Numero di lotto
	Numero di catalogo
	Attenzione, leggere le istruzioni per l'uso
	Produttore
	Sufficiente per "n" test
	Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Limite di temperatura/Conservare nell'intervallo
	Consultare le istruzioni per l'uso

T-SPOT, T-Cell *Xtend* e il logo Oxford Immunotec sono marchi registrati di Oxford Immunotec Ltd.

AIM V e GIBCO sono marchi registrati di ThermoFisher Scientific.

CPT e Vacutainer sono marchi registrati di Becton Dickinson.

*FICOLL e FICOLL-PAQUE sono marchi registrati delle società GE.

Tween è un marchio registrato di Uniqema Americas LLC.

L'uso del reagente T-Cell *Xtend* è protetto dai brevetti e dai brevetti in corso di registrazione elencati di seguito; US9090871, EP2084508, JP5992393, CN101529221, AU2007-303994, CA2665205, IN2165/DELNP/2009.

L'uso del test è protetto dai brevetti e dai brevetti in corso di registrazione elencati di seguito; US7575870, EP941478, JP4094674, AU728357, CA2272881; US6207161, US6242567.

© 2023, Oxford Immunotec Ltd. Tutti i diritti riservati.

Produttore

Oxford Immunotec Ltd

143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon

Oxfordshire, OX14 4SE, Regno Unito

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