

T-SPOT[®].TB

 Oxford
Immunotec
a PerkinElmer company

Помощно средство за диагностициране на туберкуозна инфекция

ЛИСТОВКА КЪМ КОМПЛЕКТА

За инвитро диагностична употреба

Тази листовка обхваща употребата на:
T-SPOT.TB 8 (формат плака с 8-ямкови ленти . Каталоген номер: TB.300)

Съдържание

Предназначение	3
Въведение	3
Принципи на методиката	3
Ограничения на теста	4
Предупреждения и предпазни мерки за безопасност	5
Осигурени материали	5
Съхранение	5
Стабилност	6
Необходимо оборудване и материали (не са включени в комплекта)	6
Подготовка на реактивите	7
Методика	7
Взимане на проби и подготовка	7
Преброяване на клетките и разреждане	9
Подготовка на плаката и инкубация	10
Проява на “спотовете” и преброяване	11
Контрол на качеството	13
Интерпретация на резултатите и критерии на теста	13
Характеристики на провеждането на теста	14
Библиография	14
Речник на символите	14

Предназначение

T-SPOT®.TB тестът е инвитро диагностичен тест за откриване на ефекторни Т-клетки, отговарящи на стимулация с антигени на *Mycobacterium tuberculosis* и е предназначен за употреба като помощно средство за диагностициране на туберкулозна инфекция (ТВ). T-SPOT.TB тестът е опростен ензимносвързан имуноспот (ELISPOT) метод, който определя броя на ТВ-специфичните активирани ефекторни Т-клетки.

Въведение

Според Световната Здравна Организация една трета от населението на света е заразено с *M. tuberculosis*. Всяко лице, носител на латентна туберкулозна инфекция (LTBI) е с около 10% шанс да развие активно заболяване. Този процент на прогресиране е повишен сред определени групи пациенти, включително и тези, които са били наскоро заразени и тези с отслабена имунна система.

Имунният отговор към инфекция с *M. tuberculosis*, е основно Клетъчно-Медиран Имунен отговор (CMI). Като част от този отговор, Т-клетките са чувствителни към антигените на *M. tuberculosis*. Активираният ефекторни Т-клетки, както CD4, така и CD8, отделени специфично, могат да бъдат изброени поради способността си да бъдат стимулирани инвитро от тези антигени^{1, 2}. Използването на определени антигени от *M. tuberculosis* комплекс (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) подобрява специфичността на теста, като намалява кръстосаната реактивност към БЦЖ-вакцинацията и към повечето микобактерии в околната среда^{3, 4}. Два отделни панела от антигени, които симулират известните протеини ESAT-6 и CFP10, са използвани за оптимизиране чувствителността на теста.

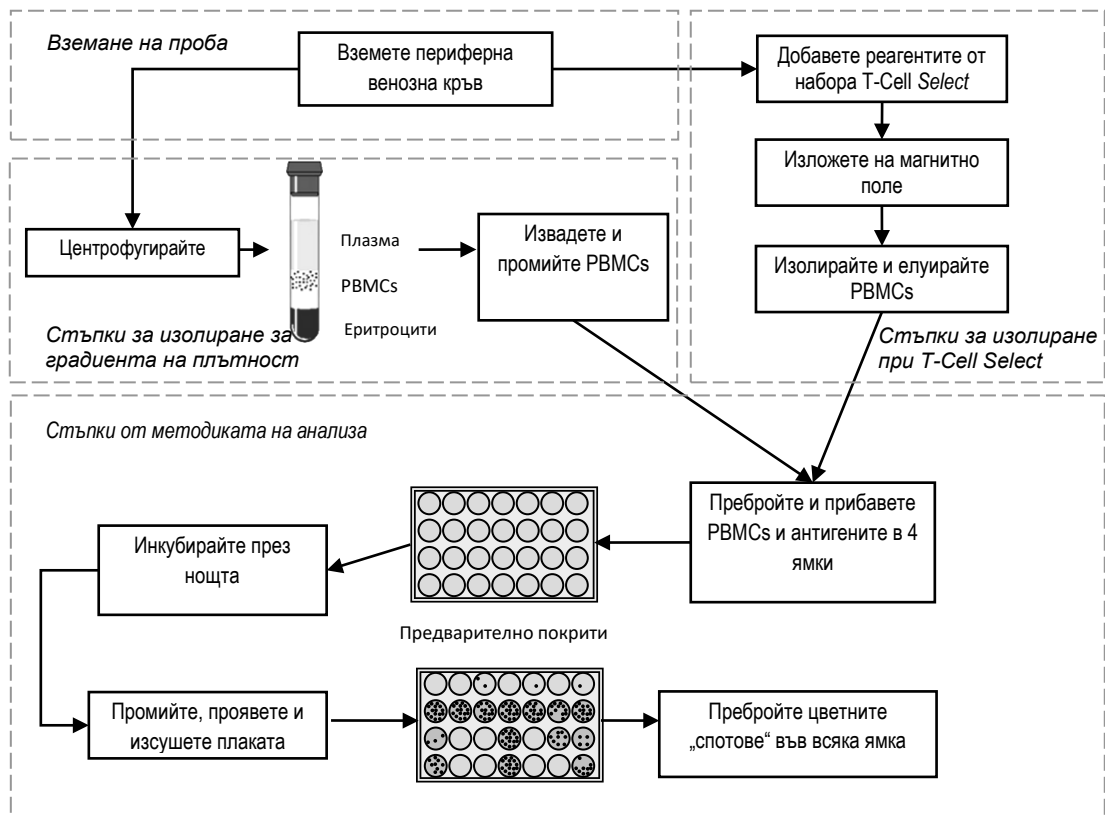
T-SPOT.TB тестът е опростен вариант на ELISPOT методика. ELISPOT тестовете са с висока чувствителност, тъй като прицелният цитокин се захваща пряко около секретирателната клетка, преди тя да бъде разредена в супернатантата, заловен от рецепторите на съседни клетки или разграден. Това прави ELISPOT тестовете много по-чувствителни в сравнение с конвенционалните ELISA тестове⁵. T-SPOT.TB тестът е предназначен за откриване на ефекторните Т-клетки, които отговарят на стимулация с антигени, специфични за *M. tuberculosis*^{3,4,6-9}. Тестът изброява отделните активирани ТВ-специфични Т-клетки. Той е подходящ за употреба при всички пациенти, изложени на риск за латентна туберкулозна инфекция (LTBI) или съмнение за туберкулозна инфекция^{10,11}, независимо от тяхната възраст, пол, етническа принадлежност, терапия или имунен статус.

Принципи на методиката

Мононуклеарните клетки в периферната кръв (PBMCs) се отделят от пробата с цялата кръв, измиват се, с оглед да бъдат отстранени източниците на възможни грешки. След това мононуклеарните клетки се изброяват с цел да се използва стандартизиран брой клетки. Това гарантира, че дори при тези пациенти, които имат нисък брой Т-клетки, дължащ се на отслабена имунна система (имунокомпрометирани и имunosупресирани), в пробата ще е достатъчен броя клетки, добавени към ямките. Етапите на измиване и преброяване, както и ELISPOT метода предоставят отлична възпроизводителност при откриването на туберкулозно заболяване и латентна туберкулозна инфекция.

Четири ямки (вж. Фиг. 1) са задължителни за изработването на една проба:

1. Нулева контрола за определяне на неспецифично клетъчно активиране.
2. ТВ-специфични антигени, Панел А (ESAT-6).
3. ТВ-специфични антигени, Панел Б (CFP10).
4. Положителна контрола, съдържаща фитохемаглутинин (РНА, познат още като оликлонален активатор¹²), с оглед да бъде потвърдена функционалността на периферните мононуклеарни клетки.



Фигура 1: Основни стъпки на T-SPOT.TB теста. Всяка плака съдържа 96 ямки.

Мононуклеарните клетки от периферна кръв се инкубират с антигените, за да се позволи стимулацията на всички налични чувствителни Т-клетки. Секретираният цитокин се улавя от специфични антитела върху мембраната, която формира основата на ямката, като клетките и други нежелани материали се отстраняват чрез измиване. Второ антитяло, конюгирано с алкална фосфатаза и насочено към различен епитоп на цитокиновата молекула, се добавя и се свързва с цитокина, захванат към мембранната повърхност. Останалият несвързан конюгат се отстранява чрез измиване. Добавя се разтворим субстрат към всяка ямка, който ензимно разкъсва връзките на свързания конюгат, за да формира „spot“ от неразтворима утайка на мястото на реакция. Всеки „spot“ представлява отпечатък на една индивидуална цитокин-секретираща Т-клетка и оценката на броя на получените „спотове“ предоставя измерване на наличието на чувствителни към *M. tuberculosis* ефекторни Т-клетки в периферната кръв.

Ограничения на теста:

- Единствено за инвитро диагностична употреба .
- Само за професионална употреба.
- Да не се смесват елементи от различни партиди комплекти .
- Прочетете внимателно указанията за теста преди употреба.
- Да се спазва асептична техника, с цел избягване замърсяването на реактивите, отделните ямки, клетъчните суспензии и средите за клетъчни култури.
- Промени в посоченото пипетиране, техниките на измиване, времето за инкубиране и температурите, могат да окажат влияние върху получените резултати, поради което трябва да биват избягвани.
- Кръвта трябва да бъде взета и обработена в рамките на 8 часа. Това ограничение във времето може да бъде преодоляно с помощта на набора с реагенти T-Cell Select™ или реагента T-Cell Xtend® (наличен от Oxford Immunotec). Когато наборът с реагенти T-Cell Select се използва с T-SPOT.TB теста, времето на съхранение на пробата се увеличава до 54 часа и процесът на изолиране на клетките може да се

автоматизира. Когато реагентът T-Cell *Xtend* или друг метод за отстраняване на гранулоцитите се използва с T-SPOT.TB теста, времето на съхранение на пробата се увеличава до 32 часа.

- Съхранявайте и транспортирайте кръвните проби в лабораторията при стайна температура (18-25 °C), включително кръвните проби за използване с набора с реагенти T-Cell *Select*. При използване на реагента T-Cell *Xtend* пробите могат да се транспортират и съхраняват при 10-25 °C. Не поставяйте в хладилник и не замразявайте пробите с цяла кръв.
- T-SPOT.TB тест трябва да се използва и тълкува само в контекста на цялостната клинична картина.
- Отрицателен резултат от теста не изключва възможността за излагане или инфектиране с *M. tuberculosis*.
- Антигените ESAT-6 и CFP10 отсъстват от щамовете на БЦЖ и от повечето нетуберкулозни микобактерии в околната среда, с изключение на *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} и *M. goodii*.

Предупреждения и предпазни мерки при употреба

Работата с материали от човешки произход изисква изключително внимание. Всички кръвни проби трябва да се считат за потенциално заразни.

Обработката на кръвните проби и компонентите на теста, тяхната употреба, съхранение и обезвреждане, трябва да бъдат в съответствие с процедурите, определени в съответните национални наредби или нормативни актове по безопасността на биологичните продукти.

Трябва да се внимава при работа с химикали. Всички химикали трябва да се считат за потенциално опасни.

Осигурени материали

Комплектът T-SPOT.TB 8 тест съдържа:

1. 1 микротитърна плака (CW.300): 96 ямки, доставяни като 12 x 8 ленти в рамка, покрита с мишо моноклонално антитяло срещу цитокин гама-интерферон (IFN- γ).
2. 2 флакона (PA.300, всеки по 0.8 mL) Панел А: съдържа ESAT-6 антигени, говежди серумен албумин и антимикуробни агенти.
3. 2 флакона (PB.300, всеки по 0.8 mL) Панел Б: съдържа CFP-10 антигени, говежди серумен албумин и антимикуробни агенти.
4. 2 флакона (CP.300, всеки по 0.8 mL) Положителна контрола: съдържа фитохемаглутинин (РНА), за употреба като клетъчен функционален контрол, говежди серумен албумин и антимикуробни агенти.
5. 1 флакон (CR.300, 50 μ L) 200 x концентриран конюгиращ реагент (конюгат): мишо моноклонално антитяло към цитокина гама-интерферон (IFN- γ), конюгиран с алкална фосфатаза.
6. 1 бутилка (SR.300, 25 mL) субстратен разтвор: готов за употреба BCIP/NBT^{plus} разтвор.
7. Указания за употреба – на CD, заедно с MSDS (информационен лист за безопасност на материалите), Техническо ръководство, Визуален наръчник на методиката, T-SPOT калкулатор за разреждане на клетки, калкулатор за разреждане на конюгата, калкулатор за скоростта на центрофугиране и програмата T-SPOT.*AutoReporter*.

Съхранение

Съхранявайте всички компоненти на комплекта при температура 2-8 °C.

Избягвайте продължителното излагане на разтвора на субстрата на слънчева светлина.

Стабилност

Не смесвайте компоненти от различни партиди комплекти . Съхранявайте неотворения комплект при 2-8 °С. Компонентите на комплекта са стабилни до изтичане срока на годност, отпечатан върху опаковката, когато се съхраняват и третират при препоръчителните условия. Комплектът не трябва да се използва след изтичане на срока на годност, посочен на етикета на комплекта.

Съхранявайте компонентите на отворения комплект при 2-8 °С. Отворените компоненти трябва да се използват в рамките на 8 седмици след отварянето.

Необходимо оборудване и материали (не са включени в комплекта)

1. Рамка за 8-якмови плаки (налична от Oxford Immunotec).
2. Клас II микробиологичен кабинет (препоръчително).
3. Епруветки за взимане на кръв, като Vacutainer® CPT™ (налични от Oxford Immunotec), хепаринизирани епруветки или епруветки с цитрат.
4. Ficoll® Raque* Plus или алтернативни средства за разделяне на мононуклеарни клетки от периферна кръв.
5. Реагент T-Cell Xtend (наличен от Oxford Immunotec) може да бъде използван при проби, взети до 32 часа след венепункция. Комплектът с реагенти T-Cell Select (наличен от Oxford Immunotec) може да бъде използван при проби, взети до 54 часа след венепункция. За пробите, съхранявани до 32 часа, могат да се използват алтернативни методи за отстраняване на гранулоцитите. Клиентите трябва да валидират алтернативните методи в лабораториите си.
6. Епруветки Leucoser, които могат да се използват за опростяване на отделянето на мононуклеарните клетки от периферна кръв, използвайки Ficoll* метода.
7. Центрофуга за подготовка на мононуклеарните клетки от периферна кръв (с възможност най-малко 1800 x g и възможност за поддържане на пробите при стайна температура (18-25 °C)).
8. При подготовката и измиването на отделените мононуклеарни клетки от периферна кръв може да се използва центрофуга за измиване на клетки, например центрофуга DiaCent-CW (Bio-Rad). Клиентите трябва да валидират употребата на такова оборудване в лабораторията си.
9. Оборудване и реактиви за преброяване на мононуклеарните клетки от периферна кръв; както ръчно, чрез трипаново синьо и хемцитометър чрез микроскоп или автоматично с помощта на подходящ хематологичен анализатор.
10. Инкубатор поддържащ 37 ± 1 °C, с овлажняване и с приток на 5% CO₂.
11. Измиваща машина за микротитърна плака или оборудване за ръчно измиване на плаки.
12. Пипети и стерилни крайници за пипети.
13. Стерилен D-PBS (фосфатен физиологичен разтвор): като GIBCO® 1 x D-PBS (Invitrogen; каталожен номер 14040-091).
14. Дестилирана или дейонизирана вода.
15. Средство за разчитане на плаки, като микроскоп, цифров микроскоп, лупа или визуализатор на плаки.
16. Стерилна среда за клетъчна култура като GIBCO AIM-V® (Invitrogen; каталожен номер 31035-025): използването на тази безсерумна среда за инкубационната стъпка е силно препоръчително. RPMI 1640 (Invitrogen; каталожен номер 21875-034) може да се използва само като първа стъпка при подготовката на пробите. Препоръчително е, средите за клетъчни култури да се съхраняват в подходящи аликвоти и излишния материал да се изхвърля след употреба. Средите за клетъчна култура, трябва да бъдат предварително затоплени до 37 °C преди употреба с T-SPOT.TB теста.

Подготовка на реактивите

1. Микротитърна плака. Микротитърната плака на T-SPOT.TB теста 8, се доставя готова за употреба. Отделете необходимия брой от 8-ямкови ленти от формата и ги оставете да се темперират до стайна температура. Затворете останалите ленти обратно в опаковката и поставете влагоулавящата торбичка.
2. Флаконите с антигени ESAT-6 на *M. tuberculosis* (Панел А) се доставят готови за употреба.
3. Флаконите с антигени CFP10 на *M. tuberculosis* (Панел Б) се доставят готови за употреба.
4. Флаконите с Положителната контрола се доставят готови за употреба.
5. Пригответе разреждане 1:200 от разтвора на Концентрирания Конюгиращ Реагент. Изчислете обема на необходимия разтвор от получения работен разтвор на Конюгата (вж. T-SPOT калкулатора за разреждане на конюгата, в компактдиска предоставен с всеки комплект тест). Реагентът може да бъде подготвен непосредствено преди употреба или да бъде приготвен в работната концентрация (1:200) и да се съхранява за период до шест седмици при 2°C – 8°C преди употреба. Не използвайте разреждения реагент след изтичане на срока на годност.
6. Субстратният разтвор се предлага готов за употреба. Извадете от опаковката и оставете да се темперира до стайна температура.

Методика

Този тест трябва да бъде извършван според принципите за Добрата Лабораторна Практика и при стриктно спазване на инструкциите за употреба.

Oxford Immunotec Ltd е изготвила Визуален Наръчник на методиката и Технически Справочник, които описват събирането и подготовката на пробите, избора на средите за клетъчни култури и методите за броене на „спотове“. Те са налични на CD, което е във всеки един комплект тест, като се обадите на +44(0)1235 442780 или чрез изтегляне от www.oxfordimmunotec.com.

Взимане на проби и подготовка

Индивидуалните потребители трябва да валидират своите процедури за събиране на мононуклеарни клетки от периферна кръв, изброяването им и избора на подходящи среди за поддържане функционалността на Т-клетките по време на етапа на начална инкубация. Обикновено, за имунокомпетентни пациенти, достатъчно количество мононуклеарни клетки от периферна кръв, за да бъде извършен теста, може да се получи от венозни кръвни проби в съответствие със следните насоки:

- Възрастни и деца на 10 години и повече: една 8 mL или две 4 mL CPT епруветки или една 6ml епруветка с литиев хепарин или цитрат
- Деца между 2-9 години: една 4 mL CPT епруветка, епруветка с литиев хепарин или цитрат
- Деца до 2 години: една 2 mL детска епруветка

Кръвните проби трябва да се съхраняват при стайна температура и да бъдат обработени в рамките на 8 часа от вземането на кръвта, в рамките на 32 часа, като се съхраняват при 10-25 °C, ако се използва реагентът T-Cell *Xtend*, или в рамките на 54 часа като се съхраняват при 18-25°C, ако се използва комплектът с реагенти T-Cell *Select*.

Средите за клетъчна култура, трябва да бъдат предварително затоплени до 37 °C преди употреба с T-SPOT.TB теста.

Процедура	Бележки
<p>1. Вземете кръвна проба, според инструкциите за работа с типа епруветки. Съхранявайте взетата кръв при стайна температура (18-25 °C) или при 10-25 °C, ако се използва реагента T-Cell <i>Xtend</i>. Да не се съхранява в хладилник или да не се замразява.</p>	<p>1. Кръвните проби могат да бъдат взети в различни епруветки. В нашите лаборатории успешно са използвани епруветките CPT Vacutainer с цитрат, CPT с хепарин и стандартни епруветки с хепарин или цитрат. CPT епруветките не са подходящи за употреба с реагента T-Cell <i>Xtend</i>. EDTA епруветки не се препоръчват.</p>
<p>2. При използване на CPT епруветки, следвайте инструкциите на производителя за отделяне на мононуклеарните клетки от периферна кръв.</p> <p>При използване на епруветки Vacutainer, съдържащи хепарин или цитрат за вземане на кръв, отделете мононуклеарните клетки от периферна кръв чрез центрофугиране с Ficoll-Paque Plus, използвайки публикуваните процедури.</p> <p>При използване на епруветки Leucoser, комплекта с реагенти T-Cell <i>Select</i> или реагента T-Cell <i>Xtend</i> (наличен от Oxford Immunotec), следвайте протоколите, предоставени с тези реагенти.</p>	<p>2. Центрофугирайте 8 mL CPT епруветки на 1600 x g за 28 мин., или 4 mL CPT епруветки на 1800 x g за 30 мин. при 18 °C, когато е на разположение охлаждаща центрофуга. Температурата на центрофугата трябва да бъде повишена до 18 °C, ако преди това са били използвани по-ниски температури. Ако се използва неохладяща центрофуга, машината трябва да бъде подсикурена така, че температурата да не надхвърли 25 °C.</p> <p>Алтернатива: разрежете кръвта с равен обем среда RPMI 1640. Внимателно поставете слой от разредената кръв (2-3 части, обема) върху Ficoll-Paque Plus (1 обем) и центрофугирайте при 1000 x g за 22 минути, като спазвате температура между 18-25 °C.</p> <p>Ако пробите са съхранявани 8 до 32 часа след венепункцията, използвайте реагента T-Cell <i>Xtend</i>, преди да ги поставите върху Ficoll-Paque-Plus.</p> <p>За проби, съхранявани до 54 часа след венепункцията, използвайте протокола, предоставен с комплекта с реагенти T-Cell <i>Select</i>. Калкулаторът за скоростта на центрофугиране (намиращ се на компактдиска, включен в комплекта) може да ви помогне за превръщането на скоростта от x g в rpm.</p> <p>Ако се използват други методи за отделяне на PBMC, те трябва да бъдат валидирани от клиента за употреба с T-SPOT.TB теста.</p>
<p>3а. Съберете бялата мътна лента от мононуклеарни клетки от периферната кръв с помощта на пипета и я прехвърлете в 15 mL конична центрофужна епруветка. Допълнете обема до 10 mL със среда за клетъчна култура.</p>	<p>3а. Различни среди могат да се използват за измиване на клетките по време на този процес. Препоръчителни са средите AIM-V и RPMI 1640.</p> <p>3б. Методологията за употреба на центрофуга за измиване на клетките по време на подготовката</p>

3б. За улесняване на етапите на измиване на клетките може да се използва и центрофуга за измиване на клетки, напр. DiaCent-CW (Bio-Rad). Ако се използва тази система, тогава за измиване на клетките трябва да се използва DPBS.	на мононуклеарните клетки от периферна кръв ще бъде налична от Oxford Immunotec. Въпреки това, клиентите трябва да валидират този метод в лабораториите си.
4. Центрофугирайте при 600 x g за 7 мин. Излейте супернатантата и разтворете остатъка в 1 mL среда.	4. Вж. т.3а по - горе
5. Допълнете обема до 10 mL със свежа среда и центрофугирайте при 350 x g за 7 мин.	5. Вж. т.3а по - горе
6. Излейте супернатантата и разтворете остатъка в 0.7 mL AIM-V среда.	6. На този етап, средата за култура за инкубацията през нощта, трябва да бъде използвана за ресуспендиране на остатъка. Препоръчителна е безсерумна среда AIM-V.

T-клетки, получени от други телесни течности, като бронхоалвеоларен лаваж (BAL), плеврална ефузия (PE) или гръбначномозъчна течност (ликвор) (CSF), са използвани успешно с T-SPOT.TB теста за идентифициране на TB инфекция и заболяване (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 and Patel *et al* (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77). Ако използват некръвни проби, потребителите трябва да валидират процедурите за вземане на достатъчно мононуклеарни клетки. Методите за обработване на проби от BAL са описани в публикациите, посочени по-горе.

Забележка 1: Граничната стойност за положителния резултат и валидните контроли за теста при използване на некръвни проби не са изследвани обстойно и може да се различават от кръвния тест. Потребителите трябва да дефинират собствени критерии за интерпретация. Лекарите трябва да използват собствената си преценка при преглеждането на резултатите.

Забележка 2: Продължителността на периода от вземане на пробата до започване на теста не е проучвана обстойно.

Преброяване на клетките и разреждане

T-SPOT.TB тестът изисква 2.5×10^5 жизнеспособни мононуклеарни клетки от периферната кръв на ямка. Общо четири ямки са необходими за пробата от всеки пациент. Правилен брой клетки трябва да се добавят към всяка ямка. Неспазването на броя клетки във всяка една ямка може да доведе до неправилно тълкуване на резултата.

Процедура	Бележки
1. Извършете преброяване на жизнеспособните клетки.	1. Клетките могат да се броят чрез най-различни методи, вкл. ръчно преброяване, използвайки трипаново синьо и хемоцитометър или автоматизирано преброяване с помощта на подходяща апаратура.

Процедура	Бележки
2. При ръчно преброяване с хемоцитометър на Neubauer, добавете 10µL от окончателната клетъчна суспензия към 40 µL 0,4% (w/v) разтвор на трипаново синьо. Поставете подходящ аликвот върху хемоцитометъра и пребройте клетките в мрежата. За други типове хемоцитометри автоматични устройства, следвайте инструкциите на производителя.	2. От изключително значение е клетъчната суспензия да е добре смесена непосредствено преди вземането на аликвоти за разреждане или за преброяване. Клетките могат да се утаят на дъното на епруветката, което да доведе до неправилно тълкуване на реалния брой на клетките.
3. Изчислете концентрацията на жизнеспособните клетки присъстващи в наличната клетъчна суспензия.	3. Уверете се, че изчислението е правилно за използваната клетъчна преброяваща система, тъй като използването на недостатъчен брой или излишък на клетки, може да доведе до неправилно тълкуване на резултата. Калкулаторът за клетъчно разреждане върху CD (предоставен с всеки комплект) ще улесни това изчисление.
4. Подгответе 500 µL от окончателната клетъчна суспензия с концентрация на 2.5×10^5 клетки /100 µL.	4. Уверете се, клетките са добре разбъркани преди вземането на аликвот за разреждане.

Подготовка на плаката и инкубация

T-SPOT.TB тестът изисква четири ямки, които се използват за пробата на един пациент. Нулевата контрола и Положителната контрола за оценка на клетъчната функционалност, трябва да се извършват при всяка отделна проба. Препоръчва се, пробите да са подредени вертикално върху плаката, както е показано по-долу.

- Нулева контрола
- Панел А
- Панел В
- Позитивна контрола

Процедура	Бележки
1. Извадете предварително покритите 8- ямкови ленти от опаковката, прикрепете ги в рамката за плаки. Трябва да бъдат темперирани на стайна температура.	1. Извадете само необходимия брой ленти и върнете останалите в опаковката. Прикрепете лентите, които ще бъдат използвани, в празна рамка за плаки, оборудвана с дъно и капак. Рамките, калъфите и капачетата трябва да бъдат запазени и за следваща употреба.
2. Всяка проба от пациент се нуждае от 4 индивидуални ямки: (i) Добавете 50 µL среда AIM V за всяка ямка с Нулева Контрола. (ii) Добавете 50 µL разтвор от Панел А към всяка показана ямка. (iii) Добавете 50 µL разтвор от Панел Б към всяка показана ямка. (iv) Добавете 50 µL разтвор от Положителната Контрола към всяка ямка за контрол и функционалност на клетките.	2. Не позволявайте на накрайника на пипетата да се докосва до мембраната. Наранявания на мембраната причинени от накрайника на пипетата, може да доведе до артефакти в ямките. Внимателно потупайте плаката на плота, за да се уверите, че разтворите покриват мембраната в основата на всяка ямка. Трябва да се избягва силното тръскане, за да се намали кръстосано замърсяване с антигените между ямките.
3. Във всяка от 4-те ямки, които се използват за обработване на пробата от всеки пациент, добавете 100 µL на последната клетъчна суспензия (съдържащ 250 000 жизнеспособни клетки) от пациента.	3. Внимателно пипетирайте клетъчната суспензия отгоре надолу, за да бъде осигурено пълно смесване преди отделянето на всеки 100 µL аликвот. Препоръчително е използването на нов накрайник при всяко добавяне към ямките за всеки пациент, за да бъде избегнато кръстосано замърсяване между 4- те ямки.
4. Инкубирайте плаката при 37 °C в инкубатор с овлажняване и 5% CO ₂ за 16-20 часа.	4. Избягвайте движението на плаката, след като вече бъде поставена в инкубатора. Не трябва да се допуска натрупване на плаки една върху друга, тъй като това може да доведе до нееднакво разпределение на температурата и променена вентилация. Неспазването на препоръчвания инкубационен период и условия, може да доведе до неправилно тълкуване на резултатите. Проверете дали инкубатора съдържа достатъчно количество вода за поддържане на влажността през инкубационния период.

Проява на “спотове” и преброяване

По време на измиването на плаката и етапите на извършване на теста не докосвайте мембраната с накрайниците на пипетата при ръчно или автоматизирано измиване на ямките. Наранявания на мембраната, причинени от пипетата или накрайниците при измиване на ямките, могат да се проявят като артефакти в ямките и да попречат при отчитането на “спотове”.

Процедура	Бележки
1. Извадете плаката от инкубатора.	1. В случай на неизбежно забавяне на обработката, напр. проблеми с ресурси през уикенда, плаките могат да бъдат извадени от инкубатора и съхранени при 2°C–8°C. Максималното препоръчително време на съхранение е 72 часа и плаките трябва да бъдат покрити по време на съхранение. Клиентът трябва да валидира тази процедура в лабораторията си.
2. Изхвърлете клетъчната среда и добавете 200 µL разтвор на D-PBS към всяка ямка.	2. По това време се изважда Субстратният Разтвор от комплекта, като се оставя да се темперира до стайна температура.
3. Отстранете разтвора D-PBS. Повторете измиването още 3 пъти със свеж D-PBS разтвор при всяко измиване.	3. Отстранете D-PBS от последното измиване като обърнете плаката върху абсорбираща хартия, преди следващата процедура.
4. Разтворете Концентриран Конюгат 200 пъти в D-PBS, за да се създаде разтвор с работна концентрация.	4. Да не се използва D-PBS, съдържащ Tween® или други детергенти, тъй като това причинява силен фон. Уверете се, че само малък излишък (за да ограничите загуба) от разтвора с работна концентрация е подготвен. Така, за всяка лента с 8-ямки (всяка ямка изисква 50 µL), пригответе 500 µL от разтвора с работна концентрация, като добавите 2.5 µL от разтвора на Концентрирания Конюгат във 497.5 µL D-PBS. Калкулаторът за разреждане на Конюгата (наличен на CD, предоставен с всеки комплект), може да ви помогне при това изчисление.
5. Добавете 50 µL разтвор на Работния Конюгат към всяка ямка и инкубирайте при температура 2-8 °C в продължение на 1 час.	5. Неспазването на препоръчаното време за инкубация може да доведе до неправилно тълкуване на резултата.
6. Отстранете Конюгата и изпълнете 4 измивания с D-PBS, както е описано в стъпки 2. и 3. по-горе.	
7. Добавете 50 µL Субстратен Разтвор към всяка ямка и инкубирайте на стайна температура за 7 мин.	7. Неспазването на препоръчаното време за инкубация може да доведе до неправилно тълкуване на резултата.
8. Внимателно измийте плаката с дестилирана или дейонизирана вода, за да спрете реакцията по проявяване.	
9. Оставете плаката да изсъхне в добре проветриво място или в сушилня при температура до 37 °C.	9. “Спотовете” стават по-видими, когато плаката изсъхне. Времето за съхнене е 4 часа при 37 °C или една нощ при стайна температура.

Процедура	Бележки
10. Пребройте и запишете броя на отделните тъмно сини "спотове" по мембраната на всяка ямка. Приложете „Интерпретация на резултатите и Анализ на Критериите (виж подолу), за определяне пробата на пациента дали е "положителна" или "отрицателна" към ТВ антигени.	10. "Спотовете" могат да бъдат визуализирани чрез редица методи, включително и ръчно с помощта на лупа, подходящ микроскоп, цифров микроскоп или с помощта на специален ELISPOT визуализатор на плаки. Тренировъчен наръчник по преброяване на "спотовете" (програма T-SPOT. <i>Tutor</i>) може да бъде намерена на уебсайта на Oxford Immunotec.

Контрол на качеството

При отчитането на резултатите се очаква да има малко или никакви "спотове" в Нулевата контрола и повече от 20 "спота" в Положителната контрола.

Резултат в Нулевата контрола с над 10 "спота" се счита като "Неопределен". За възможни причини, можете да се обърнете към Техническия Наръчник на T-SPOT.TB (може да бъде изтеглен от www.oxfordimmunotec.com). Препоръчително е да бъде взета нова проба от пациента и да бъде изследвана.

Обикновено клетъчната функционалност в Положителната контрола се оценява по броя на "спотовете", които трябва бъдат ≥ 20 или да има насищане (твърде много "спотове", за да бъдат преброени). Една малка част от пациентите могат да имат Т-клетки, които показват ограничен отговор към фитохемаглутинин РНА^{13,14}. Когато броят на "спотовете" в Положителната контрола е < 20 "спота", следва резултата да се счита за „Неопределен“, освен ако панел А или панел Б е "Положителен", както е описано в „Тълкуване на резултати и анализ на критериите“ (вж. подолу), като в този случай резултата е валиден.

Поради потенциалните биологични и системни вариации, когато по-високата от (Панел А минус Нулевата Контрола) и (Панел Б минус Нулевата контрола) е 5, 6 или 7 "спота", резултатът може да се счита за граничен (несигурен). Граничните (несигурни) резултати, въпреки че са валидни, са по-малко надеждни от резултатите, при които броят на "спотовете" е много над граничните стойности. Ето защо се препоръчва повторно изследване на пациента, като се използва нова проба. Ако резултатът е все още граничен (несигурен) при повторното изследване, тогава другите диагностични тестове и /или епидемиологични данни трябва да се използват, за да се определи възможната инфекция с ТВ при пациента.

Докато ESAT-6 и CFP10 антигени отсъстват от БЦЖ щамове на *M.bovis* и от повечето микобактерии в околната среда, възможно е "положителен" резултат на T-SPOT.TB да се дължи на инфекция с *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* или *M. goodii*. Необходими са алтернативни изследвания, ако се подозират тези инфекции.

Интерпретация на резултатите и критерии на теста

Обърнете се към раздел „Контрол на качеството“, преди прилагане на следните критерии.

Резултатите на T-SPOT.TB се тълкуват като се извади броят на "спотовете" в ямката на Нулевата контрола от броя на "спотовете" във всеки един от панелите, в съответствие със следния алгоритъм:

- Резултатът от теста е "Положителен", ако (Панел А минус Нулевата контрола) и /или (панел Б минус Нулевата контрола) ≥ 6 "спота".
- Резултатът от теста е "Отрицателен", ако и двете (Панел А минус Нулевата контрола) и (Панел Б минус Нулевата контрола) ≤ 5 "спота". Това включва и стойности по-малки от нула.

"Положителеният" резултат показва, че пробата съдържа ефекторни Т-клетки, реагиращи на *M. tuberculosis*.

"Отрицателеният" резултат показва, че пробата вероятно не съдържа ефекторни Т-клетки, реагиращи на *M. tuberculosis*.

Характеристики на провеждането на теста

Специфичността е била оценена чрез изследване на 93 проби от донори, определени по история на заболяването и лични данни, които са били с нисък риск от заразяване с *M. tuberculosis*. Специфичността на T-SPOT.TB теста е изчислена на 100 % (93/93) (95 % доверителен интервал 95.8 % - 100 %).











Чувствителността е била оценена чрез изследване на 87 проби от култури, потвърдени случаи с инфекция от *M. tuberculosis*, включително и имунокомпрометирани групи. Чувствителността на T-SPOT.TB теста е изчислена като 98.8 % (86/87) (95 % доверителен интервал 90.8 % - 99.9 %).

Репродуктивността е била оценена, като заместителен маркер за вариации в рамките на теста чрез анализ на дубликатни кръвни проби, изследвани на една и съща плака. Общо 145 кръвни проби от 140 индивидуални донори са били изследвани по два пъти (две ямки за всеки от Панел А и Панел Б) с помощта на T-SPOT.TB теста. При 142/145 (97.9 %) от двойните анализи, се наблюдава клинично съгласуване. Само 2 дублиращи се анализа са дали противоречиви гранични резултати и само 1/145 проби е дала несъответстващи резултати.

Библиография

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. Посетете: www.elispot-analyzers.de/english/science-elispot-assays.html
6. Pathan *et al* (2001) *J. Immunol.*, **167**: 5217-5225.
7. Lalvani *et al* (2001) *Lancet*, **357**: 2017-2021.
8. Lalvani *et al* (2001) *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **163**: 824-828.
9. Lalvani *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.

Речник на символите

-  Използвайте до изтичане срока на годност (Година-Месец-Ден)
-  Партиден номер
-  Каталоген номер
-  Внимание, вижте инструкциите за употреба
-  Производител
-  Достатъчен за „n“-на брой теста
-  Медицинско изделие за инвитро диагностика
-  Температурни ограничения/съхранявайте между
-  Консултирайте се с инструкциите за употреба
-  Упълномощен представител за ЕС

Информация за контакт

Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Обединено кралство
Тел.: +44 (0) 1235 442780
Имейл: info@oxfordimmunotec.com

За изтегляне на материали за продуктите и допълнителна техническа информация, моля, посетете нашия уеб сайт:
www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT, T-Cell *Xtend* и логото на Oxford Immunotec са регистрирани търговски марки на Oxford Immunotec Limited.

T-Cell *Select* е търговска марка на Oxford Immunotec Limited.

AIM-V и GIBCO са търговски марки на Life Technologies Corporation.

CPT и Vacutainer са търговски марки на Becton, Dickinson and Company.

Ficoll и Ficoll-Paque са регистрирани търговски марки на Cytiva, поделение на Global Life Sciences Solutions USA LLC.

Тween е регистрирана търговска марка на Croda Americas LLC.

Употребата на реагента T-Cell *Xtend* е защитена от следните патенти и патенти в процес на регистрация:

EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Преработка номер: 4 Дата на издаване: Юли 2022 г.

© 2022 Oxford Immunotec. Всички права запазени.

🏭 Производител

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

 Упълномощен представител за ЕС

Oxford Immunotec (Ирландия)

Unit 3d North Point House,
North Point Business Park,
New Mallow Road,
Cork, T23 AT2P
Република Ирландия