

T-SPOT[®].TB

 Oxford
Immunotec
a PerkinElmer company

Test pro diagnostiku tuberkulózní infekce

PŘÍBALOVÁ INFORMACE

Pro diagnostické použití *in vitro*

Tato příbalová informace obsahuje instrukce k použití:

T-SPOT.TB 8 (destička s 8jamkovými stripy pro opakované použití. Katalogové číslo: TB.300)

Obsah

Účel použití	3
Úvod	3
Princip	3
Omezení	4
Bezpečnostní upozornění a opatření.....	5
Dodaný materiál.....	5
Uchovávání	5
Stabilita	5
Potřebné vybavení a materiály, které nejsou součástí soupravy	6
Příprava činidla	6
Postup	7
Odběr vzorku a jeho příprava	7
Stanovení počtu buněk a ředění.....	9
Založení destičky a inkubace	9
Kultivace spotů a stanovení jejich počtu.....	10
Kontrola kvality	11
Interpretace výsledků a kritéria testu.....	12
Parametry testu	12
Použité zdroje	12
Vysvětlivky symbolů.....	13

Účel použití

T-SPOT®.TB je diagnostický test k *in vitro* detekci efektorových T lymfocytů senzibilizovaných (aktivovaných) antigeny *Mycobacterium tuberculosis*, původců tuberkulózy (TB). Je určen k diagnostice TB infekce. Test T-SPOT.TB je zjednodušenou imunologickou metodou otiskové (spotové) analýzy skvrn (ELISPOT) umožňující zjišťovat počet senzibilizovaných a pro TB specifických efektorových T-lymfocytů informace pro použití.

Úvod

Světová zdravotnická organizace (SZO) odhaduje, že jedna třetina světové populace je infikována bacily *Mycobacterium tuberculosis*. U osob s latentní tuberkulózou (LTBI) je přibližně 10% pravděpodobnost, že se z infekce vyvine TB onemocnění. U některých skupin osob s LTBI (osoby nedávno infikované nebo osoby s oslabeným imunitním systémem) je pravděpodobnost vývoje TB onemocnění dokonce vyšší.

U imunitní odezvy na infekci *M. tuberculosis* jde především o buňkami zprostředkovanou imunitu (CMI). Její součástí je senzibilizace T-lymfocytů antigeny *M. tuberculosis*. Senzibilizované efektorové T-lymfocyty (CD4 i CD8), izolované z krve vyšetřované osoby, lze spočítat na základě jejich schopnosti se stimulovat na základě styku s mykobakteriálními antigeny^{1,2}. Použití antigenů specifických pro mykobakterie skupiny *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) zvyšuje specifitu testu, protože nedochází ke zkřížené reakci s vakcínou BCG a s většinou druhů mykobakterií ze zevního prostředí (environmentálních mykobakterií)^{3,4}. K optimalizaci senzitivity testu jsou použity dva dobře charakterizované panely antigenů, které simulují specifické antigeny ESAT-6 a CFP10.

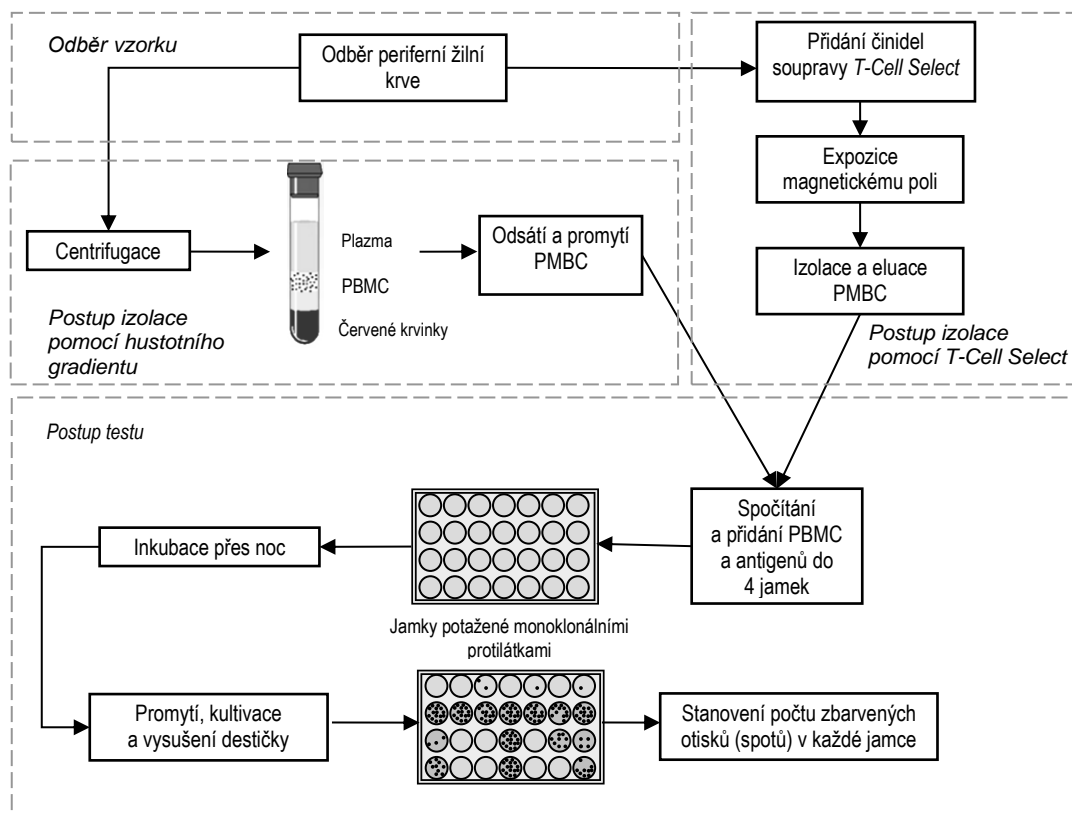
Test T-SPOT.TB je zjednodušenou variantou metody ELISPOT. Ta je senzitivnější než metody ELISA⁵, protože cílový cytokin je identifikován přímo u buňky, která ho vytváří, dříve, než je rozpuštěn v supernatantu, zachycen receptory ostatních buněk nebo zničen. Test T-SPOT.TB je určen k detekci efektorových T-lymfocytů, které reagují na *in vitro* kontakt s antigeny charakteristickými pro *Mycobacterium tuberculosis*^{3,4,6-9}. Test umožňuje zjistit počet senzibilizovaných T-lymfocytů. Je vhodný pro všechny osoby s rizikem LTBI nebo s podezřením na TB onemocnění^{10,11}, a to bez ohledu na věk, pohlaví, etnickou skupinu, způsob léčby nebo stav imunitního systému.

Princip

Periferní krevní mononukleární buňky (PBMC) se separují z periferní krve a promyjí, aby se odstranily všechny zdroje rušivých signálů okolního prostředí. PBMC se pak spočítají, aby se při testu používal standardizovaný počet buněk. Tím je zajištěno, že i u pacientů s nízkými počty T-lymfocytů z důvodu oslabeného imunitního systému (imunokompromitovaní nebo imunosuprimovaní pacienti) bude do mikrotitrační jamkové destičky přidán adekvátní počet buněk. Fáze promývání a počítání, jakož i metoda ELISPOT poskytuje při stanovení onemocnění TB a LTBI vynikající výkonnost.

Pro každý vzorek se používají čtyři jamky (viz obrázek 1):

1. Negativní kontrola – k identifikaci nespecifické aktivaci buněk
2. TB specifické antigeny – panel A (ESAT-6)
3. TB specifické antigeny – panel B (CFP10)
4. Pozitivní kontrola – obsahuje fytohemagglutinin (PHA, polyklonální aktivátor¹²) k potvrzení funkčnosti PBMC



Obrázek 1: Nejdůležitější kroky testu T-SPOT.TB. Nezapomeňte, že každá destička obsahuje 96 jamek.

PBMC se inkubují s antigeny, což umožňuje stimulaci všech přítomných senzibilizovaných T-lymfocytů. Vyloučený cytokin je zachycen specifickými protilátkami na membráně, která vytváří základ jamky. Buňky a další nežádoucí materiál se odstraní promytím. Přidá se další protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou, která je určena pro odlišný epitop na molekule cytokinu. Tato protilátka se váže na cytokin zachycený na povrchu membrány. Všechny nenavázané konjugáty se odstraní promytím. Do každé jamky se přidá rozpustný substrát. Ten se rozštěpí vázaným enzymem, čímž v místě reakce vznikne nerozpustná sraženina – otisk (dále spot). Každý spot představuje otisk jednotlivých T lymfocytů vylučujících cytokin. Vyhodnocením počtu vytvořených spotů se měří zastoupení efektorových T lymfocytů senzitivních vůči bakterii *M. tuberculosis* v periferní krvi.

Omezení

- Pouze k diagnostickému použití *in vitro*.
- Pouze pro profesionální použití.
- Nekombinujte součásti souprav různých šarží.
- Před použitím si důkladně přečtěte návod k použití.
- Dodržujte aseptický postup, abyste předešli kontaminaci činidel, testovacích jamek, buněčných suspenzí a buněčných kultivačních médií.
- Odchylka od stanovených pipetovacích a promývacích postupů, inkubačních dob a/nebo teplot může ovlivnit skutečné výsledky. Vyvarujte se toho.
- Odběr vzorků krve a zahájení jejich testování se musí provést do 8 hodin. Toto časové omezení lze překonat použitím soupravy činidla T-Cell Select™ nebo činidla T-Cell Xtend® (dostupné u společnosti Oxford Immunotec). Pokud se souprava činidla T-Cell Select používá s analýzou T-SPOT.TB, doba uchovávání vzorku se zvyšuje na 54 hodin a proces izolace buněk lze zautomatizovat. Při použití činidla T-Cell Xtend společně s analýzou T-SPOT.TB se zvyšuje doba uchovávání vzorků na 32 hodin.
- Krevní vzorky uchovávejte a přepravujte do laboratoře při pokojové teplotě (18–25 °C), včetně krevních vzorků určených k použití se soupravou činidla T-Cell Select. Pokud bude použito činidlo T-Cell Xtend, pak se mohou vzorky přepravovat a uchovávat při teplotě 10–25 °C. Vzorky plné krve chraňte před chladem a mrazem.

- Test T-SPOT. *TB* lze použít a vyhodnocovat pouze v kontextu s celkovým klinickým obrazem.
- Negativní výsledky testu nevylučují možnost expozice nebo infekce *M. tuberculosis*.
- Antigeny ESAT-6 a CFP10 nejsou přítomny v kmenech BCG a ve většině mykobakterií ze zevního prostředí (environmentálních) s výjimkou *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} a *M. goodii*.

Bezpečnostní upozornění a opatření

Při manipulaci s materiálem lidského původu je třeba dbát opatrnosti. Všechny krevní vzorky je třeba považovat za možný zdroj infekce.

Nakládání s krevními vzorky a součástmi testu, jejich používání, uchovávání a likvidace musí být v souladu s postupy stanovenými v příslušných národních směrnicích a předpisech týkajících se ochrany před biologickým nebezpečím.

Nakládání s krevními vzorky a součástmi testu, jejich používání, uchovávání a likvidace musí být v souladu s postupy stanovenými v příslušných národních směrnicích a předpisech týkajících se ochrany před biologickým nebezpečím.

Při manipulaci s chemikáliemi je třeba dbát opatrnosti. Všechny chemické látky je třeba považovat za zdroj možného nebezpečí.

Dodaný materiál

Souprava T-SPOT. *TB* 8 obsahuje:

1. 1 mikrotitrační destičku (CW.300): 96 jamek, dodávaná ve formátu 12 x 8 jamkový strip v rámečku na dně s vrstvou myších monoklonálních protilátek proti interferonu gama (IFN- γ) cytokinu,
2. 2 ampulky (PA.300, každá o objemu 0,8 mL) pro panel A: obsahují antigeny ESAT-6, albumin z bovinního séra a antimikrobiální činidlo,
3. 2 ampulky (PB.300, každá o objemu 0,8 mL) pro panel B: obsahují antigeny CFP10, albumin z bovinního séra a antimikrobiální činidlo,
4. 2 ampulky (CP.300, každá o objemu 0,8 mL) pro pozitivní kontrolu: obsahují fytohemaglutinin (PHA) pro kontrolu funkčnosti buněk, bovinní sérum a antimikrobiální činidlo,
5. 1 ampulku (CR.300, 50 μ L) s 200násobným koncentrátem konjugačního činidla: myší monoklonální protilátku proti IFN- γ cytokinu konjugovanou s alkalickou fosfatázou,
6. 1 lahvičku (SR.300, 25 mL) substrátového roztoku: hotový roztok BCIP/NBT^{plus},
7. Návod k použití, který naleznete na CD společně s bezpečnostními listy (MSDS), školící příručkou, kalkulačkou ředění buněk T-SPOT, kalkulačkou konjugovaného ředění, kalkulačkou rychlosti odstředování a programem T-SPOT.*AutoReporter*.

Uchovávání

Všechny součásti soupravy uchovávejte při teplotě 2–8 °C.

Substrátový roztok chraňte před dlouhodobým působením světla.

Stabilita

Nekombinujte součásti souprav různých šarží. Soupravu v uzavřeném obalu uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Součásti soupravy jsou za podmínek doporučených pro jejich uchovávání a manipulaci stabilní až do data expirace uvedeného na obalu soupravy. Soupravu nepoužívejte po uplynutí data expirace vyznačeném na štítku soupravy.

Po otevření uchovávejte součásti soupravy při teplotě 2–8 °C. Součásti soupravy spotřebujte během 8 týdnů po otevření.

Potřebné vybavení a materiály, které nejsou součástí soupravy

1. Rámeček na destičku s 8jamkovými stripy (dostupný u společnosti Oxford Immunotec).
2. Mikrobiologický bezpečnostní box třídy II (doporučeno).
3. Zkumavky k odběru krve, např. Vacutainer® CPT™ (dostupné u společnosti Oxford Immunotec), zkumavky s heparinem nebo citrátem.
4. Ficoll®-Paque Plus nebo alternativní materiál k separaci PBMC.
5. Činidlo T-Cell *Xtend* (dostupné u společnosti Oxford Immunotec), které lze použít u vzorků odebraných až do 32 hodin po venepunkci. Souprava činidla T-Cell *Select* (dostupná u společnosti Oxford Immunotec), které lze použít u vzorků odebraných až do 54 hodin po venepunkci. Alternativní metody granulocytové deplece lze použít pro vzorky uchovávané až 32 hodin. Zákazníci musí alternativní metody validovat ve své laboratoři.
6. Zkumavky Leucosep, které lze použít k usnadnění separace PBMC za použití metody Ficoll*.
7. Centrifuga pro separaci PBMC (minimální rychlost 1 800 x g, schopnost udržet vzorky při pokojové teplotě 18–25 °C).
8. Centrifuga pro promývání buněk se může použít k preparaci a promývání separovaného PBMC, například centrifuga DiaCent-CW (Bio-Rad). Zákazníci musí použití takového zařízení validovat ve své laboratoři.
9. Vybavení a činidla umožňující počítání PBMC – u manuálního počítání lze použít Trypan Blue a hemocytometr v mikroskopu; u automatického počítání pak vhodný hematologický analyzátor.
10. Inkubátor se zvlhčovacím systémem zajišťující teplotu 37 ± 1 °C a přívodem 5% CO₂.
11. Myčka mikrotitračních destiček nebo zařízení k ručnímu promývání destiček.
12. Pipety a sterilní pipetovací špičky.
13. Sterilní roztok D-PBS, např. GIBCO® 1 x D-PBS (Invitrogen; katalogové číslo 14040-091).
14. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
15. Prostředky k vyhodnocení destiček, např. mikroskop, digitální mikroskop, lupa nebo čtečka destiček.
16. Sterilní buněčné kultivační médium, například GIBCO AIM-V® (Invitrogen; katalogové číslo 31035-025): k provedení inkubace důrazně doporučujeme použít toto médium bez séra. RPMI 1640 (Invitrogen; katalogové číslo 21875-034) lze použít pouze v úvodních fázích přípravy vzorku. Buněčné kultivační médium doporučujeme uchovávat v odpovídajících poměrných dávkách a přebytečný materiál po použití zlikvidovat. Buněčné kultivační médium je třeba před použitím s testem T-SPOT.TB předehřát na 37 °C.

Příprava činidla

1. Mikrotitrační destička: mikrotitrační destička T-SPOT.TB 8 je dodávána k okamžitému použití. Vyndejte potřebný počet 8jamkových stripů z místa jejich skladování a nechte vytemperovat na pokojovou teplotu. Zbývající stripy zabalte zpátky do vnějšího obalu a přiložte absorbent vlhkosti.
2. Ampulky s antigeny *M. tuberculosis* ESAT-6 (panel A) jsou dodávány k okamžitému použití.
3. Ampulky s antigeny *M. tuberculosis* CFP10 (panel B) jsou dodávány k okamžitému použití.
4. Ampulky pro pozitivní kontrolu jsou dodávány k okamžitému použití.
5. Připravte si zředěný pracovní roztok konjugačního činidla v poměru 1:200. Vypočítejte objem potřebného pracovního roztoku konjugačního činidla (viz kalkulačka ředění konjugačního roztoku T-SPOT na CD, které je součástí každé testovací soupravy). Reagencii lze připravit bezprostředně před použitím nebo namíchat pracovní koncentraci (1:200) a uchovávat až šest týdnů při teplotě 2 °C – 8 °C před použitím. Naředěnou reagentii nepoužívejte po uplynutí této doby použitelnosti.
6. Substrátový roztok je dodáván k okamžitému použití. Vyjměte jej z místa skladování a nechte vytemperovat na pokojovou teplotu.

Postup

Tento test musí být proveden v souladu se zásadami správné laboratorní praxe za přísného dodržení tohoto návodu k použití.

Společnost Oxford Immunotec Ltd připravila školicí příručku, ve které je popsán odběr a příprava vzorků, výběr buněčného kultivačního média a metody počítání spotů. Tyto materiály jsou dostupné na CD, které je součástí každé testovací soupravy. Můžete je získat také na telefonním čísle +44(0)1235 442780 nebo si je stáhnout z webových stránek www.oxfordimmunotec.com.

Odběr vzorku a jeho příprava

Jednotliví uživatelé musí zkontrolovat správnost svých postupů při odběru PBMC, počítání PBMC a výběru vhodných médií tak, aby zachovali funkčnost T lymfocytů během první inkubační fáze testu. U imunokompetentních pacientů lze dostatečný počet PBMC pro tento test získat ze vzorků žilní krve podle následujících pokynů:

- Dospělí a děti ve věku od 10 let: jedna 8ml nebo dvě 4 mL zkumavky CPT nebo jedna 6ml zkumavka s heparinem nebo citrátem
- Děti ve věku 2–9 let: jedna 4 mL zkumavka CPT, zkumavka s heparinem nebo citrátem
- Děti ve věku do 2 let: jedna 2 mL pediatrická zkumavka

Krevní vzorky musí být uchovávány při pokojové teplotě a testovány během 8 hodin od odběru krve nebo během 32 hodin a při teplotě 10–25 °C, pokud se používá činidlo T-Cell *Xtend*, nebo během 54 hodin a při teplotě 18–25 °C, pokud se používá souprava činidla T-Cell *Select*.

Před použitím testu T-SPOT. *TB* musí být buněčné kultivační médium předeřháto na 37 °C.

Postup	Poznámky
1. Provedte odběr krve podle pokynů pro odběr dodaných spolu s odběrovou pomůckou. Odebrané vzorky uchovávejte při pokojové teplotě (18–25 °C) nebo při teplotě 10–25 °C, pokud použijete činidlo T-Cell <i>Xtend</i> . Chraňte před chladem a mrazem.	1. Krevní vzorky lze odebírat do různých zkumavek. V našich laboratořích jsme úspěšně použili zkumavky Vacutainer CPT s citrátem sodným, heparinem a standardní zkumavky s heparinem nebo citrátem. Použití zkumavek CPT s činidlem T-Cell <i>Xtend</i> není vhodné Zkumavky EDTA nedoporučujeme.
2. Při použití zkumavek CPT pro odběr krve dodržujte pokyny výrobce pro separaci PBMC. Při použití zkumavek vacutainer obsahujících heparin nebo citrát k odběru krve separujte PBMC odstředěním při využití média Ficoll-Paque Plus podle uvedených postupů. Pokud se použijí zkumavky Leucosep, souprava činidla T-Cell <i>Select</i> nebo činidlo T-Cell <i>Xtend</i> (dostupné u společnosti Oxford Immunotec), postupujte podle protokolů dodávaných s těmito činidly.	2. Pokud máte k dispozici centrifugu s chlazením, odstředějte 8ml zkumavky CPT při rychlosti 1 600 x g po dobu 28 minut nebo 4ml zkumavky CPT při rychlosti 1 800 x g po dobu 30 minut a při teplotě 18 °C. Pokud jste předtím pracovali při nižší teplotě, uveďte centrifugu na teplotu 18 °C. Pokud používáte centrifugu bez chlazení, zajistěte, aby teplota nevystoupila nad 25 °C. Krev můžete případně zředit stejným množstvím média RPMI 1640. Zředěnou krev (2–3 objemové jednotky) opatrně uložte ve vrstvě na médium Ficoll-Paque Plus (1 objemová jednotka) a odstředějte při rychlosti 1 000 x g po dobu 22 minut. Teplotu udržujte v rozsahu mezi 18 a 25 °C. U vzorků starých mezi 8 až 32 hodinami od venepunkce použijte před uložením vzorku ve vrstvách na Ficoll-Paque-Plus činidlo T-Cell <i>Xtend</i> . U vzorků starých až 54 hodin od venepunkce použijte protokol dodaný se soupravou činidla T-Cell <i>Select</i> . Kalkulačka rychlosti odstředování na CD, které je součástí testovací soupravy, vám pomůže převést rychlost z jednotek xg na ot. /min (rpm). Pokud budou použity jiné metody separace PBMC, pak je musí zákazník validovat pro použití s testem T-SPOT. <i>TB</i> .
3a. Pomocí pipety odeberte bílou, zakalenou vrstvu PBMC a přeneste ji do 15 mL kónické zkumavky pro odstředování. Doplňte buněčným kultivačním médiem na objem 10 mL. 3b. Jako alternativu můžete použít centrifugu na promývání buněk DiaCent-CW (Bio-Rad) k usnadnění stádií promývání buněk. Pokud se tento systém použije, pak je nutné k promývání buněk použít DPBS.	3a. K promývání buněk během tohoto procesu lze použít různá média. V našich laboratořích jsme úspěšně použili médium AIM-V i RPMI 1640 a doporučujeme je i vám. 3b. Metodologie k použití centrifugy k promývání buněk během přípravy PBMC bude k dispozici u společnosti Oxford Immunotec. Zákazníci si však tuto metodu musí ve svých laboratořích validovat.
4. Odstředějte při rychlosti 600 x g po dobu 7 minut. Slijte supernatant a sediment znovu rozpustěte v 1 mL média.	4. Viz bod 3a uvedený výše.
5. Doplňte čerstvým médiem na objem 10 ml a odstředějte při rychlosti 350 x g po dobu 7 minut.	5. Viz bod 3a uvedený výše.
6. Slijte supernatant a sediment znovu rozpustěte v 0,7 ml kultivačního média AIM-V.	6. V této fázi je třeba použít kultivační médium pro noční inkubaci, aby došlo k rozpuštění sedimentu. V našich laboratořích jsme úspěšně použili médium bez séra AIM-V a doporučujeme je i vám.

T-lymfocyty získané z jiných tělních tekutin, jako například z bronchoalveolární laváže (BAL), pleurálního výpotku (PE) nebo mozkomíšního moku (CSF) byly úspěšně použity s testem T-SPOT.*TB* k identifikaci infekce tuberkulózou (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). Pokud se použijí jiné vzorky než krevní, uživatelé musí validovat postupy pro odběr dostatečného množství mononukleárních buněk. Procesy ke zpracování vzorků BAL jsou popsány v publikacích uvedených shora.

Poznámka 1: Hranice pro pozitivní výsledek a validních kontrol testu a použití jiných vzorků než krevních nebyly rozsáhle hodnoceny a mohou se od krevních testů lišit. Uživatelé by měli definovat svá kritéria interpretace testů. Kliničtí lékaři by měli při hodnocení výsledků používat vlastní úsudek.

Poznámka 2: Doba od získání vzorku po zahájení testu nebyla nijak rozsáhle studována.

Stanovení počtu buněk a ředění

Test T-SPOT.TB vyžaduje $2,5 \times 10^5$ životaschopných PBMC na jamku. Pro každý vzorek pacienta je zapotřebí všech čtyř jamek. Do každé jamky musíte přidat správný počet buněk. Pokud tak neučiníte, může dojít k nesprávné interpretaci výsledků.

Postup	Poznámky
1. Provedte stanovení počtu životaschopných buněk.	1. Buňky lze počítat různými metodami včetně ručního počítání při použití Trypan Blue a hemocytometru nebo automatického počítání pomocí vhodného zařízení.
2. V případě ručního počítání s Neubauerovým hemocytometrem přidejte 10 μ L konečné buněčné suspenze k 40 μ L 0,4% (w/v) roztoku Trypan Blue. Umístěte odpovídající poměrné množství roztoku do hemocytometru a spočítejte buňky v mřížce. U jiných typů hemocytometru a v případě automatických zařízení postupujte podle pokynů výrobce.	2. Dbejte na to, aby byla buněčná suspenze důkladně promíchána bezprostředně před odebráním poměrného množství k naředění nebo počítání. Buňky se mohou usadit u dna zkumavky, což může vést k nesprávnému stanovení skutečného počtu buněk.
3. Vypočítejte koncentraci životaschopných buněk přítomných v materiálu buněčné suspenze.	3. Přesvědčte se, zda jste použili správný způsob výpočtu pro použitý systém počítání buněk, neboť nedostatečný nebo nadměrný počet buněk může vést k nesprávné interpretaci výsledků. Kalkulačka ředění buněk T-SPOT na CD, které je součástí každé testovací soupravy, vám výpočet usnadní.
4. Připravte 500 μ L konečné buněčné suspenze při koncentraci $2,5 \times 10^5$ buněk / 100 μ L.	4. Před odběrem poměrného množství k ředění zajistěte, aby byly buňky důkladně promíchány.

Založení destičky a inkubace

Test T-SPOT.TB vyžaduje pro každý vzorek pacienta čtyři jamky. Negativní kontrola a pozitivní kontrola funkčnosti musí proběhnout u každého jednotlivého vzorku. Doporučujeme vertikální uspořádání vzorků na destičce tak, jak je uvedeno níže.

- Negativní kontrola
- Panel A
- Panel B
- Pozitivní kontrola

Postup	Poznámky
1. Oddělte předem potažené 8jamkové stripy z balení, připevněte je do rámečku destičky a nechte je vytemperovat na pokojovou teplotu.	1. Vyjměte pouze potřebný počet stripů, zbytek vložte zpět na místo skladování. Potřebné stripy připevněte do prázdného rámečku destičky opatřeného krytem a víkem. Rámečky, kryty a víka lze používat opakovaně.
2. Vzorek každého pacienta vyžaduje 4 samostatné jamky. (i) Přidejte 50 µL kultivačního média AIM V do každé jamky pro negativní kontrolu. (ii) Přidejte 50 µL roztoku pro panel A do každé potřebné jamky. (iii) Přidejte 50 µL roztoku pro panel B do každé potřebné jamky. (iv) Přidejte 50 µL roztoku pro pozitivní kontrolu do každé jamky určené pro kontrolu funkčnosti buněk.	2. Nedoťkejte se membrány pipetovací špičkou. Otisky na membráně způsobené pipetovací špičkou mohou způsobit artefakty v jamkách. Možná bude nutné jemně destičku poklepat, aby došlo k pokrytí membrány roztokem na dně každé jamky. Vyvarujte se prudkých pohybů, zmírníte tak zkříženou kontaminaci antigenů mezi jamkami.
3. Do každé ze čtyř jamek určených pro vzorky pacienta přidejte 100 µL konečné buněčné suspenze pacienta (obsahující 250 000 životaschopných buněk).	3. Buněčnou suspenzi jemně nasajte do pipety a vypusťte, aby byla před odběrem každého poměrného množství o objemu 100 µL důkladně promíchána. Pro dávkování buněk každého pacienta doporučujeme použít novou pipetovací špičku. Zabráníte tak zkřížené kontaminaci mezi 4 jamkami.
4. Destičku inkubujte v inkubátoru se zvlhčovacím systémem při teplotě 37 °C s 5% CO ₂ po dobu 16–20 hodin.	4. S destičkou v inkubátoru již nemanipulujte. Destičky neukládejte na sebe, mohlo by dojít k nerovnoměrnému rozložení teploty a větrání. Nedodržení doporučené doby a podmínek inkubace může vést k nesprávné interpretaci výsledků. Zkontrolujte, zda inkubátor obsahuje dostatečné množství vody pro zachování vlhkosti během inkubační doby.

Kultivace spotů a stanovení jejich počtu

Během promývání destiček a fází kultivace se pipetovacími špičkami nebo hroty automatických myček jamek nedotýkejte membrány. Otisky na membránách způsobené pipetovacími špičkami nebo hroty myček jamek mohou vytvořit artefakty v jamkách, což by mohlo ovlivnit počítání spotů.

Postup	Poznámky
1. Vyjměte destičku z inkubátoru.	1. V případě nevyhnutelného zpoždění při zpracování, např. problémy se zdrojem přes víkend, destičky lze z inkubátoru vyjmout a skladovat při 2–8 °C. Maximální doporučená doba skladování je 72 hodin a destičky je nutné během skladování zakrýt. Zákazník by měl tento proces validovat ve své vlastní laboratoři.
2. Slijte inkubační médium a do každé jamky přidejte 200 µL roztoku D-PBS.	2. V této době odstraňte substrátový roztok ze soupravy a nechte jej, aby dosáhl pokojové teploty.
3. Roztok D-PBS slijte. Zopakujte promytí jamek ještě třikrát, vždy s čerstvým roztokem D-PBS.	3. Před tím, než budete pokračovat, vylijte všechen roztok D-PBS z posledního promývání tak, že destičku obrátíte a položíte na savý papír.

Postup	Poznámky
4. Zředte koncentrované konjugační činidlo roztokem D-PBS v poměru 1:200 a vytvořte stabilní pracovní roztok.	4. Nepoužívejte roztok D-PBS s obsahem roztoku Tween® nebo jiných čisticích prostředků, může dojít ke zvýšení počtu artefaktů na pozadí jamky. Připravte jen o trochu více stabilního pracovního roztoku, než budete potřebovat (pro případ doplnění ztrát). Pro každý strip s 8 jamkami (do každé jamky je potřeba 50 µL) tedy připravte 500 µL stabilního pracovního roztoku přidáním 2,5 µL koncentrovaného konjugačního činidla do 497,5 µL D-PBS. K tomuto výpočtu můžete použít kalkulačku konjugovaného ředění na CD, které je součástí každé testovací soupravy.
5. Přidejte 50 µL stabilního pracovního roztoku konjugačního činidla do každé jamky a inkubujte při teplotě 2–8 °C po dobu 1 hodiny.	5. Nedodržení doporučené doby inkubace může vést k nesprávné interpretaci výsledku.
6. Slijte konjugát a proveďte čtyři promytí roztokem D-PBS, jak je popsáno výše v bodech 2 a 3.	
7. Přidejte 50 µL substrátového roztoku do každé jamky a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 7 minut.	7. Nedodržení doporučené doby a podmínek inkubace může vést k nesprávné interpretaci výsledku.
8. Destičku důkladně promyjte destilovanou nebo deionizovanou vodou, abyste zastavili detekční reakci.	
9. Nechte destičku uschnout v dobře větrané místnosti nebo v sušárně při teplotě do 37 °C.	9. Spoty na schnoucí destičce jsou stále zřetelnější. Nechte je sušit po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C nebo přes noc při pokojové teplotě.
10. Spočítejte a zaznamenejte počet ohraničených tmavě modrých spotů na membráně každé jamky. Podle části Interpretace výsledků a kritéria testu (viz níže) stanovte, zda je vzorek pacienta „pozitivní“ nebo „negativní“ vůči antigenům TB.	10. Spoty lze zjistit různými metodami, včetně ruční za použití lupy, vhodného mikroskopu, digitálního mikroskopu nebo pomocí speciální čtečky destiček ELISPOT. Výukový průvodce pro počítání spotů (program T-SPOT.Tutor) je k dispozici na webových stránkách společnosti Oxford Immunotec.

Kontrola kvality

Typickým výsledkem by mělo být jen pár spotů nebo žádné spoty v jamce negativní kontroly a více než 20 spotů v jamce pozitivní kontroly.

Pokud se v jamce negativní kontroly objeví více než 10 spotů je výsledek považován za „neurčitý“. Možné příčiny zjistíte ve školící příručce T-SPOT.TB (tuto lze stáhnout z webových stránek www.oxfordimmunotec.com). V takovém případě je nutný odběr dalšího vzorku pacienta a jeho testování.

Běžně by měl být počet spotů v jamce pro pozitivní kontrolu funkčnosti ≥ 20 nebo by měl vykazovat nasycenost (příliš mnoho spotů ke stanovení počtu). Malý podíl pacientů může mít T-lymfocyty vykazující pouze omezenou odezvu na PHA^{13,14}. Případy s počtem spotů v jamce pro pozitivní kontrolu < 20 jsou považovány za „neurčité“ s výjimkou případů, kdy je jeden z panelů (panel A nebo panel B) „pozitivní“, jak je popsáno v části Interpretace výsledků a kritéria testu (viz níže). V těchto případech je výsledek platný.

Vlivem možných biologických a systematických variací lze výsledek považovat za hraniční (nejistý), pokud je vyšší výsledek z (panelu A minus negativní kontrola) a (panelu B minus negativní kontrola) 5, 6 nebo 7 spotů. Hraniční (nejisté) výsledky, ačkoli jsou validní, jsou méně spolehlivé než výsledky, kde je počet spotů vyšší. Zde se proto doporučuje nové testování pacienta s použitím nového vzorku. Pokud je výsledek nového testování stále hraniční (nejistý), pak je nutno použít ke stanovení stavu tuberkulózní infekce u pacienta jiné diagnostické testy či epidemiologické informace.

Protože u kmenů BCG *M. bovis* a většiny environmentálních mykobakterií nejsou přítomny antigeny ESAT-6 a CFP10, je možné, že „pozitivní“ výsledek testu T-SPOT.TB je důsledkem infekce *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* nebo *M. goodii*. Pokud existuje podezření na tyto infekce, je nutné provést další testy.

Interpretace výsledků a kritéria testu

Před uplatněním následujících kritérií se seznámte s částí Kontrola kvality.

Výsledky testu T-SPOT.TB vyhodnotíte tak, že odečtete počet spotů v jamce negativní kontroly od počtu spotů v každém panelu podle následujícího vzorce:

- Výsledek testu je „pozitivní“, pokud (panel A minus negativní kontrola) a/nebo (panel B minus negativní kontrola) ≥ 6 spotů.
- Výsledek testu je „negativní“, pokud jak (panel A minus negativní kontrola), tak i (panel B minus negativní kontrola) ≤ 5 spotů. Sem patří i hodnoty menší než nula.

„Pozitivní“ výsledek značí, že vzorek obsahuje efektorové T lymfocyty reagující na antigeny *M. tuberculosis*.

„Negativní“ výsledek značí, že vzorek pravděpodobně neobsahuje efektorové T lymfocyty reagující na antigeny *M. tuberculosis*.

Parametry testu

Specifická byla hodnocena testováním 93 vzorků dárců vybraných podle anamnézy a osobních informací, u nichž je nízké riziko infekce bakterií *M. tuberculosis*. Vypočtená specifická testu T-SPOT.TB činila 100 % (93/93) (95% interval spolehlivosti 95,8 % – 100 %).











Senzitivita byla hodnocena testováním 87 vzorků, u kterých byla infekce bakterií *M. tuberculosis* potvrzena kultivací, včetně imunokompromitovaných skupin. Vypočtená senzitivita testu T-SPOT.TB činila 98,8 % (86/87) (95% interval spolehlivosti 90,8 % – 99,9 %).

Reprodukovatelnost, jako zástupný marker variace v rámci testu, byla hodnocena testováním duplikátů krevních vzorků kultivovaných na stejné destičce. Test T-SPOT.TB byl proveden dvojmo celkem u 145 krevních vzorků odebraných od 140 jednotlivých dárců (dvě jamky pro panel A a dvě jamky pro panel B). V 97,9 % případů (142/145) duplicitního testu byla pozorována klinická shoda. Dva dvojité testy poskytly nesouhlasné hraniční výsledky a pouze 1 vzorek ze 145 poskytl rozporné výsledky.

Použité zdroje:

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. Viz 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.

Vysvětlivky značka

-  Použití do / Datum expirace (rok-měsíc-den)
-  Číslo šarže
-  Katalogové číslo
-  Pozor, viz návod k použití
-  Výrobce
-  Stačí pro „n“ testů
-  Prostředek pro diagnostiku *in vitro*
-  Teplotní omezení / Skladovat při teplotě mezi
-  Viz návod k použití
-  Zplnomocněný zástupce pro EU

Kontaktní informace

Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, UK
Tel.: +44 (0) 1235 442780
E-mail: info@oxfordimmunotec.com

Podpůrné dokumenty výrobku ke stažení a další technické informace naleznete na naší webové stránce:

www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT, T-Cell *Xtend* a loga Oxford Immunotec jsou registrované ochranné známky společnosti Oxford Immunotec Limited.

T-Cell *Select* je ochranná známka společnosti Oxford Immunotec Limited.

AIM-V a GIBCO jsou ochranné známky společnosti Life Technologies Corporation.

CPT a Vacutainer jsou ochranné známky společnosti Becton, Dickinson and Company.

Ficoll a Ficoll-Paque jsou registrované ochranné známky společnosti Cytiva, přidružené společnosti Global Life Sciences Solutions USA LLC.

Tween je registrovaná ochranná známka společnosti Croda Americas LLC

Použití činidla T-Cell *Xtend* je chráněno následujícími patenty a patenty v řízení:

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

Číslo revize: 4 Datum vydání: Červenec 2022

© 2022 Oxford Immunotec. Všechna práva vyhrazena.

Výrobce

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

 Zplnomocněný zástupce pro Evropskou unii

Oxford Immunotec (Ireland)
Unit 3d North Point House,
North Point Business Park,
New Mallow Road,
Cork, T23 AT2P
Irská republika