

T-SPOT[®].TB

 Oxford
Immunotec
a PerkinElmer company

Ayuda para el diagnóstico de la infección por tuberculosis

PROSPECTO

Para diagnóstico *in vitro*

Este prospecto se refiere al uso de:

T-SPOT.TB 8 (Formato de placa en tiras de 8 pocillos multiuso. Número de catálogo: TB.300)

Índice	Página
Uso previsto	2
Introducción	2
Principios del procedimiento	2
Limitaciones	3
Advertencias y precauciones de seguridad	4
Materiales suministrados	4
Conservación	4
Estabilidad	4
Equipo y materiales requeridos pero no suministrados	5
Preparación de los reactivos	5
Procedimiento	6
Recogida y preparación de las muestras	6
Recuento celular y dilución	8
Preparación e incubación de la placa	9
Revelado y recuento de las manchas	9
Control de calidad	11
Interpretación de los resultados y criterios de ensayo	11
Características de productividad del ensayo	12
Bibliografía	12
Glosario de símbolos	12

Uso previsto

El ensayo T-SPOT®.TB es una prueba diagnóstica *in vitro* para la detección de células T efectoras que responden a la estimulación por antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* que está diseñada para facilitar el diagnóstico de la infección tuberculosa (TB). El ensayo T-SPOT.TB es una versión simplificada del método de análisis inmunoenzimático (ELISPOT) de recuento individual de células T efectoras activadas específicamente en la TB.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud estima que un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis*. Cada persona portadora de infección tuberculosa latente (ITBL) tiene una probabilidad de aproximadamente el 10% de evolucionar hacia la enfermedad activa. Esta tasa de evolución es más alta en determinados grupos, como los infectados recientemente o los que tienen el sistema inmunitario debilitado.

La respuesta inmunitaria a la infección por *M. tuberculosis* es predominantemente una respuesta inmunitaria mediada por células (IMC). Como parte de esta respuesta, las células T están sensibilizadas a los antígenos de *M. tuberculosis*. Las células T efectoras activadas, tanto CD4 como CD8, separadas específicamente de la sangre, pueden contarse por su capacidad para ser estimuladas *in vitro* por dichos antígenos^{1,2}. El uso de antígenos seleccionados para el complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) mejora la especificidad del ensayo para estos microorganismos al reducir la reactividad cruzada con la vacuna BCG y con casi todas las micobacterias ambientales^{3,4}. Se utilizan dos paneles separados de antígenos, que simulan las proteínas ESAT-6 y CFP10 bien definidas, para optimizar la sensibilidad de la prueba.

El ensayo T-SPOT.TB es una variante simplificada de la técnica ELISPOT. El ensayo ELISPOT tiene una sensibilidad excepcional porque la diana citocina es capturada directamente en torno a la célula que la secreta, antes de que se diluya en el sobrenadante, sea capturada por células adyacentes o degradada. Esto hace que el método ELISPOT sea mucho más sensible que el tradicional ELISA⁵. El ensayo T-SPOT.TB se ha diseñado para la detección de células T efectoras que responden a la estimulación por antígenos específicos de *M. tuberculosis*^{3,4,6-9}. El ensayo recuenta células T activadas específicas de TB. Es adecuado para usarse en todos los pacientes con riesgo de ITBL o sospecha de infección tuberculosa^{10,11}, con independencia de su edad, sexo, origen étnico, tratamiento o estado inmunitario.

Principios del procedimiento

Se separan las células mononucleares de sangre periférica (MNSP) de una muestra de sangre total y se lavan para eliminar cualquier fuente que pueda provocar interferencias. A continuación se cuentan las MNSP para garantizar que en el ensayo se usa un número normalizado de células. Esto asegura que incluso quienes presentan títulos bajos de células T debido al debilitamiento del sistema inmunitario (pacientes inmunodeprimidos e inmunosuprimidos) aporten un número suficiente de células a los pocillos de microtitulación. Las etapas de lavado y recuento, así como la técnica ELISPOT proporcionan mayor rendimiento en la detección de la enfermedad tuberculosa y la infección tuberculosa latente.

Para cada muestra se requieren cuatro pocillos (véase la Figura 1):

1. Un Control Nulo para identificar la activación celular inespecífica.
2. Antígenos específicos de la TB, Panel A (ESAT-6).
3. Antígenos específicos de la TB, Panel B (CFP10).
4. Un Control Positivo con fitohemaglutinina (PHA, un conocido activador policlonal¹²) para confirmar la funcionalidad de las MNSP.

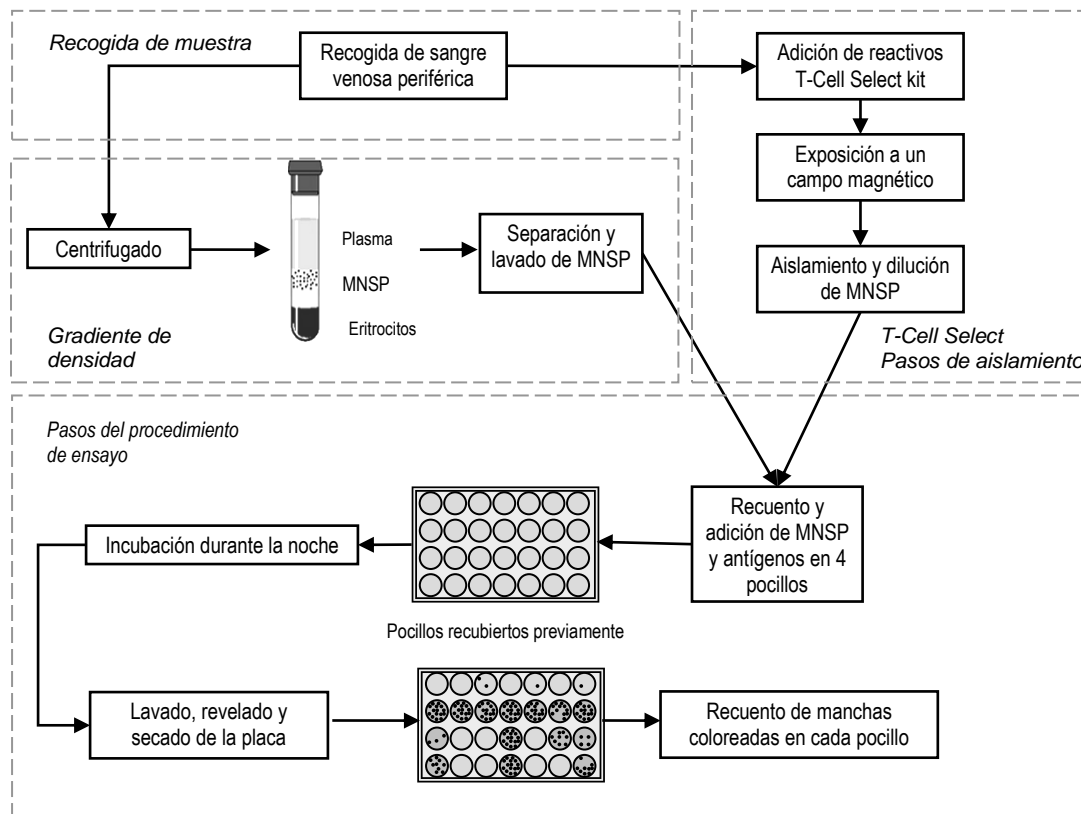


Figura 1: Principales etapas del ensayo T-SPOT.TB. Recuérdese que cada placa tiene 96 pocillos.

Las MNSP se incuban con los antígenos para permitir la estimulación de cualquier célula T sensibilizada presente. La citocina secretada es capturada por anticuerpos específicos de la membrana, que forman la base del pocillo, y mediante lavado se eliminan las células y otros materiales no deseados. Se añade un segundo anticuerpo, conjugado con fosfatasa alcalina y dirigido contra un epítipo diferente de la molécula de citocina, que se une a la citocina capturada en la superficie de la membrana. Todo conjugado no ligado se elimina mediante lavado. Se añade un sustrato soluble a cada pocillo; el sustrato es escindido por la enzima ligada para formar una mancha de precipitado insoluble en el punto de reacción. Cada mancha representa la huella de una célula T individual secretora de citocinas y la evaluación del número de manchas obtenidas determina la abundancia de células T efectoras sensibles a *M. tuberculosis* en sangre periférica.

Limitaciones

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Para uso profesional.
- No mezclar componentes de diferentes lotes de kit.
- Léanse cuidadosamente las instrucciones del ensayo antes de usarlo.
- Realícese una técnica aséptica para evitar la contaminación de los reactivos, los pocillos de análisis, las suspensiones de células y los medios de cultivo celular.
- Las variaciones respecto de lo establecido en cuanto a técnicas de pipeteado y lavado, tiempos de incubación y/o temperaturas pueden influir sobre los resultados reales obtenidos, por lo que deberán evitarse.
- La sangre se obtendrá y procesará para su análisis en un plazo de 8 horas. Esta limitación de tiempo se puede exceder utilizando el kit de reactivos T-Cell Select™ o el reactivo T-Cell Xtend® (comercializados por Oxford Immunotec). Cuando se usa el kit de reactivos T-Cell Select con el ensayo T-SPOT.TB, el tiempo de conservación de la muestra aumenta a 54 horas y el proceso de aislamiento de las células puede automatizarse. Cuando se usa el reactivo T-Cell Xtend u otro método de reducción de granulocitos con el ensayo T-SPOT.TB, el tiempo de conservación de la muestra aumenta hasta 32 horas.
- Conservar y transportar las muestras de sangre al laboratorio a temperatura ambiente (18-25 °C) incluyendo muestras de sangre para el uso con el kit de reactivos T-Cell Select. Si

se utiliza el reactivo T-Cell *Xtend*, entonces las muestras pueden transportarse y conservarse a 10-25 °C. No refrigerar ni congelar las muestras de sangre total.

- El ensayo T-SPOT.*TB* se utilizará e interpretará exclusivamente como parte del cuadro clínico global.
- Un resultado negativo no descarta la posibilidad de exposición o infección por *M. tuberculosis*.
- Los antígenos ESAT-6 y CFP10 están ausentes en las cepas de BCG y de la mayoría de micobacterias ambientales, con la excepción de *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} y *M. goodnae*.

Advertencias y precauciones de seguridad

El material de origen humano se manipulará con precaución. Todas las muestras de sangre se considerarán potencialmente infecciosas.

Para la manipulación, uso, conservación y eliminación de las muestras de sangre y de los componentes del ensayo se aplicarán los procedimientos definidos en las recomendaciones o regulaciones nacionales sobre seguridad y riesgos biológicos.

Las sustancias químicas se manipularán con precaución. Todas las sustancias químicas se considerarán potencialmente peligrosas.

Materiales suministrados

El kit T-SPOT.*TB* 8 contiene:

1. 1 placa de microtitulación (CW.300): 96 pocillos, suministrados como 12 tiras de 8 pocillos en un soporte, recubiertos con un anticuerpo monoclonal murino contra la citocina interferón γ (IFN- γ).
2. 2 viales (PA.300, de 0,8 mL cada uno) de Panel A: contiene antígenos ESAT-6, albúmina sérica bovina y antibióticos.
3. 2 viales (PB.300, de 0,8 mL cada uno) de Panel B: contiene antígenos CFP10, albúmina sérica bovina y antibióticos.
4. 2 viales (CP.300, de 0,8 mL cada uno) de Control Positivo: contiene fitohemaglutinina (PHA) que se usará como control de la funcionalidad celular, albúmina sérica bovina y antibióticos.
5. 1 vial (CR.300, 50 μ L) de reactivo conjugado concentrado (200 veces): anticuerpo monoclonal murino contra la citocina IFN γ conjugado con fosfatasa alcalina.
6. 1 frasco (SR.300, 25 mL) de solución sustrato: solución BCIP/NBT^{plus} preparada para usar.
7. Instrucciones de uso, que se encuentran en el CD junto con la Ficha técnica de seguridad, la Guía de uso, el calculador de dilución celular T-SPOT, el calculador de dilución del conjugado, el calculador de velocidad de centrifugación y el programa T-SPOT.*AutoReporter*.

Conservación

Consérvense todos los componentes del kit a 2-8 °C.

Evítese la exposición prolongada a la luz de la solución sustrato.

Estabilidad

No mezcle los componentes entre diferentes lotes de kit. Conserve el kit sin abrir a 2-8 °C. Los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad que figura en la caja del kit, cuando se conservan y manipulan en las condiciones recomendadas. El kit no se debe utilizar después de la fecha de caducidad que figura en la etiqueta.

Una vez abierto, conserve el kit a 2-8 °C y utilice todos los materiales antes de 8 semanas.

Equipo y materiales necesarios, pero no suministrados

1. Soporte para placa de tiras de 8 pocillos (comercializado por Oxford Immunotec).
2. Cabina microbiológica clase II (recomendado).
3. Tubos de recogida de sangre: como Vacutainer® CPT™ (comercializados por Oxford Immunotec), tubos heparinizados o tubos con citrato.
4. Materiales de separación Ficoll®-Paque* Plus o alternativos para MNSP.
5. El reactivo T-Cell Xtend (comercializado por Oxford Immunotec) puede utilizarse en muestras obtenidas hasta 32 horas después de la venopunción. El kit de reactivos T-Cell *Select* (comercializado por Oxford Immunotec) puede utilizarse con muestras recogidas hasta 54 horas después de la venopunción. Otros métodos alternativos de reducción de granulocitos pueden ser utilizados. Los clientes deberán validar los métodos alternativos en sus propios laboratorios.
6. Pueden utilizarse tubos Leucosep para simplificar la separación de MNSP por el método de Ficoll*.
7. Centrífuga para la preparación de MNSP (que alcance como mínimo 1800 x g y pueda mantener las muestras a temperatura ambiente (18-25 °C)).
8. Se puede utilizar una centrífuga para el lavado de células en la preparación y el lavado de MNSP, por ejemplo, una centrífuga DiaCent-CW (Bio-Rad). Los clientes deberán validar el uso de dicho equipo en sus propios laboratorios.
9. Equipo y reactivos para el recuento de MNSP; manual con azul de tripano y un hemocitómetro en un microscopio o automático con un analizador hematológico adecuado.
10. Una incubadora con humidificador que alcance una temperatura de 37 ± 1 °C con suministro de CO₂ del 5 %.
11. Una lavadora de placas de microtitulación o equipo para el lavado manual de las placas.
12. Pipetas y puntas estériles de pipetas.
13. Solución de D-PBS estéril: como GIBCO® 1 x D-PBS (Invitrogen; número de catálogo 14040-091).
14. Agua destilada o desionizada.
15. Un medio de lectura de placas, como un microscopio, un microscopio digital, una lupa o un reproductor de imágenes de placas.
16. Medio de cultivo celular estéril como GIBCO AIM-V® (Invitrogen; número de catálogo 31035-025): se recomienda encarecidamente el uso de este medio exento de suero para la etapa de incubación. Puede utilizarse RPMI 1640 (Invitrogen; número de catálogo 21875-034) en las etapas iniciales de preparación de la muestra. Se recomienda que los medios de cultivo celular se conserven en alícuotas apropiadas y se desechen el material sobrante tras el uso. El medio de cultivo celular debe precalentarse a 37 °C antes de usarlo con el ensayo T-SPOT.TB.

Preparación de los reactivos

1. Placa de microtitulación. La placa de microtitulación de T-SPOT.TB 8 se suministra preparada para usar. Extraer del envase el número necesario de tiras de 8 pocillos y dejar que alcance la temperatura ambiente. Volver a introducir las tiras restantes en el envoltorio exterior de aluminio e incluir la bolsa de desecante.
2. Los viales de antígenos ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Panel A) se suministran preparados para usar.
3. Los viales de antígenos CFP10 de *M. tuberculosis* (Panel B) se suministran listos para usar.
4. Los viales de Control Positivo se suministran listos para usar.
5. Preparar una dilución 1:200 de la solución de trabajo de reactivo conjugado. Calcular el volumen necesario de solución de trabajo de reactivo conjugado (véase el calculador de dilución del conjugado T-SPOT en el CD que acompaña a cada kit de ensayo). El reactivo puede prepararse inmediatamente antes de su uso o prepararse a la concentración de trabajo (1:200) y conservarse hasta seis semanas a una temperatura de 2- 8 °C. No se debe utilizar el reactivo diluido una vez transcurrido el periodo de validez.
6. La solución de sustrato se suministra preparada para usar. Extraer del embalaje y dejar que alcance la temperatura ambiente.

Procedimiento

El ensayo se practicará de acuerdo con los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio y siguiendo estrictamente estas instrucciones de uso.

Oxford Immunotec Ltd ha preparado una Guía de uso que describe la recogida y preparación de muestras, la selección de medios de cultivo celular y métodos de recuento de las manchas. Este material se encuentra en el CD que acompaña a cada kit de ensayo y pueden solicitarse llamando al +44 (0) 1235 442780 u obtenerse de www.oxfordimmunotec.com.

Recogida y preparación de muestras

Cada usuario validará sus procedimientos de recogida de MNSP, recuento de MNSP y elección de medios adecuados para apoyar la funcionalidad de las células T durante la etapa de incubación primaria del ensayo. En el caso de un paciente inmunocompetente, normalmente pueden obtenerse MNSP suficientes para el ensayo a partir de muestras de sangre venosa de acuerdo con las siguientes directrices:

- Adultos y niños de edad igual o superior a 10 años: un tubo CPT de 8 ml o dos tubos CPT de 4 ml o un tubo de heparina de 6 mL o un tubo de citrato
- Niños de 2 a 9 años: un tubo CPT, de heparina o de citrato de 4 mL
- Niños hasta de 2 años: un tubo pediátrico de 2 mL

Las muestras de sangre se conservarán a temperatura ambiente y se analizarán en el curso de las 8 horas siguientes a su extracción, en el curso de 32 horas con conservación a 10-25 °C si se usa el reactivo T-Cell *Xtend*, o a las 54 horas con conservación a 18-25 °C si se usa el kit de reactivos T-Cell *Select*.

El medio de cultivo celular debe precalentarse a 37 °C antes de usarlo con el ensayo T-SPOT.TB.

Procedimiento	Notas
1. Recoger la muestra de sangre de acuerdo con las instrucciones suministradas con el dispositivo de recogida. Conservar la sangre recogida a temperatura ambiente (18-25 °C) o a 10-25 °C si se usa el reactivo T-Cell <i>Xtend</i> . No refrigerar ni congelar.	1. Las muestras de sangre pueden recogerse en tubos de varios tipos. En nuestros laboratorios, hemos utilizado con resultados satisfactorios, tubos Vacutainer CPT con citrato, CPT con heparina y tubos estándar con heparina o citrato. Los tubos de CPT no son aptos para el uso con el reactivo T-Cell <i>Xtend</i> . No se recomiendan los tubos con EDTA.

Procedimiento	Notas
<p>2. Al usar tubos de recogida CPT, síganse las instrucciones del fabricante para la separación de MNSP.</p> <p>Al emplear tubos de vacío con heparina o citrato para la recogida de sangre, separar los MNSP mediante centrifugación con Ficoll-Paque Plus siguiendo los procedimientos publicados.</p> <p>Si se utilizan tubos Leucosep, el kit de reactivos T-Cell <i>Select</i> o el reactivo T-Cell <i>Xtend</i> (comercializado por Oxford Immunotec), síganse los protocolos que acompañan a los reactivos mencionados.</p>	<p>2. Centrifugar los tubos CPT de 8 mL a 1600 x g durante 28 min o los tubos CPT de 4 mL a 1800 x g durante 30 min a 18 °C si se dispone de una centrifugadora refrigerada. Esperar a que la centrifugadora llegue a 18 °C si antes se había utilizado a temperaturas más bajas. Si se utiliza una centrifugadora sin refrigeración, hay que asegurarse de que la temperatura no sobrepasa los 25 °C.</p> <p>Otra opción es diluir la sangre con un volumen equivalente de medio RPMI 1640. Depositar cuidadosamente en capas la sangre diluida (2-3 volúmenes) sobre Ficoll-Paque Plus (1 volumen) y centrifugar a 1000 x g durante 22 min a una temperatura de 18 a 25 °C.</p> <p>Para muestras conservadas entre 8 y 32 horas después de la venopunción, se debe utilizar el reactivo T-Cell <i>Xtend</i> antes de depositarlas en capas en Ficoll-Paque Plus.</p> <p>Para las muestras conservadas hasta 54 horas después de la venopunción, usar el protocolo facilitado con el kit de reactivos T-Cell <i>Select</i>.</p> <p>El calculador de velocidades de centrifugación del CD que acompaña al kit de ensayo ayuda a convertir las velocidades de centrifugación entre G y rpm.</p> <p>Si se utilizan otros métodos de separación de MNSP, el cliente deberá validar su uso con el ensayo T-SPOT.<i>TB</i>.</p>
<p>3a. Recoger la banda blanca nebulosa de MNSP con una pipeta y transferir a un tubo de centrifugado cónico de 15 mL. Enrasar a 10 mL con medio de cultivo celular.</p> <p>3b. Como alternativa, puede utilizarse una centrífuga para el lavado de células, p. ej., DiaCent-CW (Bio-Rad) para facilitar las fases de lavado de células. Si se utiliza este sistema, se deberá utilizar DPBS para lavar las células.</p>	<p>3a. Puede utilizarse una variedad de medios para el lavado de las células durante este proceso. En nuestros laboratorios, se han utilizado AIM-V y RPMI 1640 con buenos resultados y se recomienda su uso.</p> <p>3b. La metodología del uso de la centrífuga para el lavado de células durante la preparación de MNSP está disponible en Oxford Immunotec. Sin embargo, los clientes deberán validar este método en sus propios laboratorios.</p>
<p>4. Centrifugar a 600 x g durante 7 min. Verter el sobrenadante y resuspender el precipitado en 1 mL de medio.</p>	<p>4. Véase 3a, más arriba.</p>
<p>5. Enrasar a 10 mL con medio fresco y centrifugar a 350 x g durante 7 min.</p>	<p>5. Véase 3a, más arriba.</p>
<p>6. Retirar el sobrenadante y volver a suspender el precipitado en 0,7 mL de medio de cultivo AIM-V.</p>	<p>6. En esta etapa, se utilizará el medio de cultivo para la incubación durante la noche para resuspender el precipitado. En nuestros laboratorios se ha utilizado el medio sin suero AIM-V con buenos resultados y se recomienda encarecidamente.</p>

Se han utilizado con éxito células T obtenidas de otros líquidos corporales, como lavado broncoalveolar (LBA), derrame pleural (DP) o fluido cerebroespinal (FCS), con el análisis T-SPOT.TB para identificar la infección y la enfermedad TB (Jafari *et al* (2006) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **174** 1048-1054, Jafari *et al* (20) 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 y Patel *et al* (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77). Si se utilizan muestras distintas de la sangre, los usuarios deben validar los procedimientos para la recogida de células mononucleares suficientes. Los métodos para el procesamiento de las muestras de LBA se describen en las publicaciones mencionadas anteriormente.

Nota 1: No se han estudiado con detenimiento el valor de corte para un resultado positivo y controles válidos del análisis, empleando muestras distintas de la sangre, y podrían diferir de los correspondientes al análisis de sangre. Los usuarios deben definir sus criterios de interpretación del análisis. Los médicos deben aplicar su juicio clínico al examinar los resultados.

Nota 2: No se ha estudiado con detenimiento la duración de la obtención de la muestra para comenzar el ensayo.

Recuento celular y dilución

El ensayo T-SPOT.TB requiere $2,5 \times 10^5$ MNSP viables por pocillo. Se precisa un total de cuatro pocillos para cada muestra. A cada pocillo debe añadirse un número correcto de células; en caso contrario, la interpretación del resultado será incorrecta.

Procedimiento	Notas
1. Efectuar un recuento de células viables.	1. Las células pueden contarse con diversos métodos, como el recuento manual con azul de tripano y un hemocitómetro o el recuento automatizado con un instrumento adecuado.
2. En resumen, para el recuento manual con un hemocitómetro Neubauer, añadir 10 µL de la suspensión celular final a 40 µL de solución de azul de tripano al 0,4 % (p/v). Colocar una alícuota adecuada en el hemocitómetro y contar las células en la cuadrícula. Para otros tipos de hemocítopómetros y dispositivos automatizados, síganse las instrucciones del fabricante.	2. Se asegurará que la suspensión de células está completamente mezclada inmediatamente antes de retirar las alícuotas para la dilución o para el recuento. Las células pueden posarse en el fondo del tubo, lo que provocaría una interpretación incorrecta del número real de células.
3. Calcular la concentración de células viables en la suspensión celular madre.	3. Garantizar que los cálculos del sistema de recuento celular son correctos, pues el uso de un número insuficiente o excesivo de células puede llevar a una interpretación incorrecta de los resultados. El calculador de dilución celular T-SPOT del CD que acompaña a cada kit de ensayo facilita este cálculo.
4. Preparar 500 µL de la suspensión celular final en una concentración de $2,5 \times 10^5$ células / 100 µL.	4. Garantizar que las células se mezclan completamente antes de retirar una alícuota para la dilución.

Preparación e incubación de la placa

El ensayo T-SPOT. *TB* requiere el uso de cuatro pocillos por muestra. Se efectuará un Control Nulo y un Control Positivo de funcionalidad celular con cada muestra individual. Se recomienda que las muestras se dispongan verticalmente en la placa como se ilustra a continuación.

- Control Nulo
- Panel A
- Panel B
- Control Positivo

Procedimiento	Notes
1. Extraer del envase las tiras de 8 pocillos recubiertas de antemano, sujetarlas a un soporte de placas y dejar que alcancen la temperatura ambiente.	1. Extraer únicamente el número necesario de tiras y volver a meter en resto en el envase. Sujetar las tiras que se vayan a usar a un soporte de placas vacío que tenga cubierta y tapa. Los soportes, las cubiertas y las tapas se deben conservar y reutilizar.
2. Cada muestra requiere el uso de 4 pocillos individuales. (i) Añadir 50 µL de medio de cultivo AIM-V a cada pocillo de Control Nulo. (ii) Añadir 50 µL de solución del Panel A a los pocillos a los que sea necesario. (iii) Añadir 50 µL de solución del Panel B a los pocillos a los que sea necesario. (iv) Añadir 50 µL de solución de Control Positivo a cada pocillo de control de funcionalidad celular.	2. Impedir que la punta de la pipeta toque la membrana. Las muescas en la membrana causadas por la punta de la pipeta pueden causar artefactos en los pocillos. Puede ser necesario golpear suavemente la placa para garantizar que las soluciones cubren la membrana en la base de cada pocillo. No agitar de forma vigorosa para minimizar la contaminación cruzada de los antígenos entre los pocillos.
3. Añadir a cada uno de los 4 pocillos que se usarán para la muestra de un paciente 100 µL de la suspensión celular final del paciente (que contiene 250.000 células viables).	3. Pipetear cuidadosamente la suspensión celular hacia arriba y abajo para garantizar una mezcla completa antes de retirar cada alícuota de 100 µL. Se recomienda utilizar una punta nueva para cada adición de células de cada paciente, para evitar la contaminación cruzada entre los 4 pocillos.
4. Incubar la placa en una incubadora con humidificador a 37 °C con CO ₂ al 5 % durante 16-20 horas.	4. No alterar la placa una vez que esté en la incubadora. No apilar las placas, pues ello determinaría la distribución irregular de la temperatura y la ventilación. El incumplimiento del tiempo y las condiciones recomendados de incubación podría originar una interpretación incorrecta del resultado. Asegurarse de que la incubadora contiene agua suficiente para mantener la humedad durante el tiempo de incubación.

Revelado y recuento de las manchas

Durante las etapas de lavado y revelado no se tocarán las membranas con las puntas de las pipetas ni con las puntas de la lavadora automática de pocillos. Las muescas en la membrana causadas por las puntas de las pipetas o las lavadoras de pocillos pueden provocar artefactos en los pocillos que podrían interferir con el recuento de las manchas.

Procedimiento	Notas
1. Retirar la placa de la incubadora.	1. En el caso de un retraso inevitable del procesamiento, p. ej., problemas de recursos durante un fin de semana, se pueden extraer las placas de la incubadora y conservarlas a una temperatura de 2-8 °C. El tiempo máximo de conservación recomendado es de 72 horas y las placas deberán estar tapadas durante el almacenamiento. El cliente deberá validar este proceso en su propio laboratorio.
2. Desechar el medio de cultivo celular y añadir 200 µL de solución D-PBS a cada pocillo.	2. En este momento, retirar la solución de sustrato del kit y dejar que alcance la temperatura ambiente.
3. Desechar la solución D-PBS. Repetir el lavado del pocillo 3 veces más con solución D-PBS nueva para cada lavado.	3. Desechar todo el D-PBS de la etapa de lavado final invirtiendo la placa sobre papel absorbente antes de continuar.
4. Diluir el reactivo conjugado concentrado 200 veces en D-PBS para crear la solución a concentración de trabajo.	4. No utilizar D-PBS que contenga Tween® u otros detergentes, pues esto provoca recuentos de fondo elevados. Hay que asegurarse de que sólo se prepara un pequeño exceso (para compensar las pérdidas) de solución a concentración de trabajo. Para cada tira de 8 pocillos (cada pocillo necesita 50 µL), se preparan 500 µL de solución a concentración de trabajo añadiendo 25 µl de reactivo conjugado concentrado a 497,5 µL de D-PBS. Puede utilizarse para esta operación el calculador de dilución del conjugado del CD que acompaña a cada kit de ensayo.
5. Añadir 50 µL de solución de reactivo conjugado a concentración de trabajo a cada pocillo e incubar a 2-8 °C durante 1 hora.	5. El incumplimiento del tiempo recomendado de incubación puede causar una interpretación incorrecta del resultado.
6. Desechar el conjugado y efectuar cuatro lavados con D-PBS como se describe en las etapas 2 y 3, más arriba.	
7. Añadir 50 µL de solución de sustrato a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 7 min.	7. El incumplimiento del tiempo recomendado de incubación puede causar una interpretación incorrecta del resultado.
8. Lavar la placa minuciosamente con agua destilada o agua desionizada para detener la reacción de detección.	
9. Dejar secar la placa en un área bien ventilada o en un horno a una temperatura máxima de 37 °C.	9. Las manchas en forma de puntos se hacen más visibles a medida que se seca la placa. Dejar secar 4 horas a 37 °C o durante una noche a temperatura ambiente.
10. Contar y registrar el número de manchas azul oscuro, bien diferenciadas, en la membrana de cada pocillo. Aplicar la interpretación de los resultados y los criterios de ensayo (véase más adelante) para determinar si la muestra de un paciente es "Positiva" o "Negativa" a los antígenos de la tuberculosis.	10. Las manchas pueden visualizarse con varios métodos: manualmente con una lupa, un microscopio adecuado, un microscopio digital o con un reproductor de imágenes de placas ELISPOT específico. En la página web de Oxford Immunotec puede obtenerse una guía de formación de recuento de manchas (el programa T-SPOT. <i>Tutor</i>).

Control de calidad

Un resultado típico tendría pocos puntos o ninguno en el Control Nulo y más de 20 puntos en el Control Positivo.

Un recuento de puntos del Control Nulo superior a 10 deberá considerarse "Indeterminado". Consulte las posibles causas en la Guía de uso de T-SPOT.TB (puede descargarlo de www.oxfordimmunotec.com). Se recomienda realizar el ensayo con una nueva muestra.

Típicamente, el recuento de puntos del Control Positivo indicador de funcionalidad celular debería ser ≥ 20 o presentar saturación (demasiados puntos que impiden el recuento). Una pequeña proporción de pacientes pueden tener células T que muestren sólo una respuesta limitada a la PHA^{13,14}. Cuando el recuento del Control Positivo sea < 20 puntos debe considerarse como "Indeterminado", salvo que el Panel A o el Panel B sean "Positivos" tal como se describe en Interpretación de los resultados y Criterios del ensayo (véase a continuación), circunstancias en las que el resultado se considerará válido.

Debido a las posibles variaciones biológicas y sistemáticas, cuando el valor más alto de (panel A menos control nulo) y (panel B menos control nulo) sea 5, 6 o 7 puntos, el resultado puede considerarse límite (dudoso). Los resultados límite (dudosos), aunque válidos, son menos fiables que aquéllos en los que el recuento de puntos está más alejado del punto de corte. Por tanto, se recomienda repetir el análisis del paciente con una muestra nueva. Si el resultado sigue siendo límite (dudoso), hay que emplear otras pruebas diagnósticas o recurrir a información epidemiológica para determinar el estado de infección tuberculosa del paciente.

Aunque los antígenos ESAT-6 y CFP10 están ausentes en las cepas de BCG de *M. bovis* y en la mayoría de micobacterias ambientales, es posible que un resultado T-SPOT.TB "Positivo" se deba a una infección por *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* o *M. goodii*. Si se sospechan tales infecciones, hay que realizar análisis alternativos.

Interpretación de los resultados y Criterios del ensayo

Véase el apartado de Control de calidad antes de aplicar los criterios siguientes.

Los resultados de T-SPOT.TB se interpretan restando el recuento de puntos del pocillo de control nulo del recuento de cada uno de los paneles, aplicando el algoritmo siguiente:

- El resultado es "Positivo" si (panel A menos control nulo) y/o (panel B menos control nulo) ≥ 6 manchas.
- El resultado es "Negativo" si tanto (panel A menos control nulo) como (panel B menos control nulo) ≤ 5 manchas. Esto incluye los valores inferiores a cero.

Un resultado "Positivo" indica que la muestra contiene células T efectoras reactivas a *M. tuberculosis*.

Un resultado "Negativo" indica que la muestra probablemente no contiene células T efectoras reactivas a *M. tuberculosis*.

Características de rendimiento del ensayo

La **especificidad** se evaluó mediante el análisis de 93 muestras de donantes a los que se adjudicó un riesgo bajo de infección por *M. tuberculosis* a partir de la historia clínica y la información personal. Se calculó que la especificidad del ensayo T-SPOT.TB era del 100 % (93/93) (límites de confianza del 95 %, 95,8 % - 100 %).











La **sensibilidad** se evaluó mediante el análisis de 87 muestras de cultivos de casos confirmados de infección por *M. tuberculosis* infección, con inclusión de grupos inmunodeprimidos. Se calculó que la sensibilidad del ensayo T-SPOT.TB era del 98,8 % (86/87) (límites de confianza del 95 %, 90,8 % - 99,9 %).

La **reproducibilidad** se evaluó, como marcador indirecto de la variación intraanalítica, mediante análisis de muestras de sangre duplicadas efectuados en la misma placa. Se analizaron por duplicado 145 muestras de sangre de 140 donantes individuales (dos pocillos del Panel A y dos pocillos del Panel B) mediante el ensayo T-SPOT.TB. Se observó concordancia clínica en 142/145 (97,9 %) análisis duplicados. Dos análisis duplicados produjeron resultados discordantes límites y sólo 1/145 muestras produjeron resultados discrepantes.

Bibliografía

1. Janeway y Travers (1996) *Immunobiology* 2nd Ed.
2. Staines y cols. (1999) *Introducing Immunology* 2nd Ed.
3. Chapman y cols. (2002) *AIDS*, **16** (17): 2285-2293.
4. Ewer y cols. (2003) *Lancet*, **361**: 1168-1173.
5. Véase www.elispot-analyzers.de/english/science-elispot-assays.html
6. Pathan y cols. (2001) *J. Immunol.*, **167**: 5217-5225.
7. Lalvani y cols. (2001) *Lancet*, **357**: 2017-2021.
8. Lalvani y cols. (2001) *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **163**: 824-828.
9. Lalvani y cols. (2001) *J. Infect. Dis.*, **183**: 469-477.
10. Meier y cols. (2005) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **24**: 529-536.
11. Zellweger y cols. (2005) *Int. J. Tuberculosis y Lung Dis.*, **9**(11): 1242-1247.
12. Directrices aprobadas del NCCLS. *Performance of single Cell Immune Response Assays*, I/LA26-A
13. Koller y cols. (2003) *Clin. Exp. Immunol.*, **132**(2): 225-231.
14. Apollonj y cols. (1975) *Immunol. Commum.*, **4**(5): 453-463.

Glosario de símbolos

	Uso preferente /Fecha de caducidad (Año-Mes-Día)
	Número de lote
	Número de catálogo
	Atención, véanse las instrucciones de uso
	Fabricante
	Suficiente para “n” pruebas
	Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Limitación de temperatura/Consérvese entre
	Véanse las instrucciones de uso
	Representante autorizado de la UE

Información de contacto

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

Para descargar documentos del producto y más información técnica, visite nuestro sitio web:
www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT, T-Cell *Xtend* y el logotipo de Oxford Immunotec son marcas comerciales registradas de Oxford Immunotec Limited.

T-Cell *Select* es una marca comercial de Oxford Immunotec Limited.

AIM-V y GIBCO son marcas registradas de Life Technologies Corporation.

CPT y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company.

Ficoll y Ficoll-Paque son marcas comerciales registradas de Cytiva, un afiliado de Global Life Sciences Solutions USA LLC.

Tween es una marca comercial registrada de Croda Americas LLC.

El uso del reactivo T-Cell *Xtend* está protegido por las siguientes patentes y patentes en trámite:
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Número de revisión: 4 Fecha de emisión: Julio 2022

© 2022 Oxford Immunotec. Reservados todos los derechos.

■ Fabricante

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

 Representante autorizado de la UE

Oxford Immunotec (Irlanda)
Unit 3d North Point House,
North Point Business Park,
New Mallow Road,
Cork, T23 AT2P
República de Irlanda