

**T-SPOT<sup>®</sup> TB**



Ένα βοήθημα στη διάγνωση λοίμωξης από φυματίωση

## ΕΣΩΚΛΕΙΣΤΟ ΟΔΗΓΙΩΝ

Για *In Vitro* διαγνωστική χρήση

Αυτό το Εσώκλειστο Οδηγίων περιγράφει τη χρήση του προϊόντος:

T-SPOT. TB 8 (Μορφή πλάκας με ταινίες 8 μικροκυψελίδων πολλαπλής χρήσης.  
Αριθμός καταλόγου: TB.300)

<b>Πίνακας περιεχομένων</b>	<b>Σελίδα</b>
Προοριζόμενη Χρήση	2
Εισαγωγή	2
Αρχές της διαδικασίας	2
Περιορισμοί	3
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις ασφαλείας	4
Παρεχόμενα υλικά	4
Φύλαξη	4
Σταθερότητα	5
Εξοπλισμός και υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	5
Παρασκευή αντιδραστηρίου	5
Διαδικασία	6
Συλλογή δειγμάτων και προετοιμασία	6
Καταμέτρηση κυττάρων και αραιώση	8
Ετοιμασία πλάκας και επώαση	9
Ανάπτυξη κηλίδων και μέτρηση	10
Ποιοτικός έλεγχος	11
Ερμηνεία αποτελεσμάτων και κριτήρια εξέτασης	12
Χαρακτηριστικά απόδοσης εξέτασης	12
Αναφορές	13
Γλωσσάριο συμβόλων	13

## Προοριζόμενη Χρήση

Η εξέταση T-SPOT®.TB είναι μια *in vitro* διαγνωστική δοκιμασία για την ανίχνευση δραστικών T κυττάρων που ανταποκρίνονται σε διέγερση από αντιγόνα του *Mycobacterium tuberculosis* (μυκοβακτηριδίου φυματίωσης) και προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στη διάγνωση λοίμωξης από φυματίωση (TB). Η εξέταση T-SPOT.TB είναι μια απλοποιημένη ενζυμική μέθοδος προσδιορισμού ανοσοκηλίδας (ELISPOT) που απαριθμεί μεμονωμένα, ειδικά ενεργοποιημένα δραστικά T κύτταρα. (TB-ειδικά T κύτταρα).

## Εισαγωγή

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας υπολογίζει ότι το ένα τρίτο του παγκόσμιου πληθυσμού έχει μολυνθεί με το *M. Tuberculosis*. Κάθε άτομο που φέρει λανθάνουσα φυματίωση (LTBI) έχει πιθανότητα περίπου 10% να εξελίξει ενεργή νόσο. Αυτός ο ρυθμός εξέλιξης αυξάνει σε ορισμένες ομάδες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων οι οποίοι έχουν μολυνθεί πρόσφατα και εκείνων με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα.

η ανοσολογική απόκριση σε μόλυνση με *M. tuberculosis* είναι κυρίως μια προκαλούμενη από κύτταρα ανοσοαπόκριση.Ως μέρος αυτής της απάντησης, τα T κύτταρα ευαισθητοποιούνται στα αντιγόνα *M. tuberculosis*. Τα ενεργοποιημένα δραστικά T κύτταρα, τόσο τα CD4 όσο και τα CD8, ειδικά διαχωρισμένα από το αίμα μπορούν να απαριθμηθούν από την ικανότητά τους να διεγείρονται *in vitro* από αυτά τα αντιγόνα<sup>1,2</sup>. Η χρήση επιλεγμένων αντιγόνων για το σύμπλεγμα του *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) βελτιώνει την ειδικότητα εξέτασης για αυτούς τους οργανισμούς μειώνοντας τη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα στο εμβόλιο BCG και στα περισσότερα περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια<sup>3,4</sup>. Δύο ξεχωριστές ομάδες αντιγόνων, που διεγείρουν τις καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες ESAT-6 και CFP10, χρησιμοποιούνται για να βελτιστοποιήσουν την ευαισθησία της δοκιμασίας.

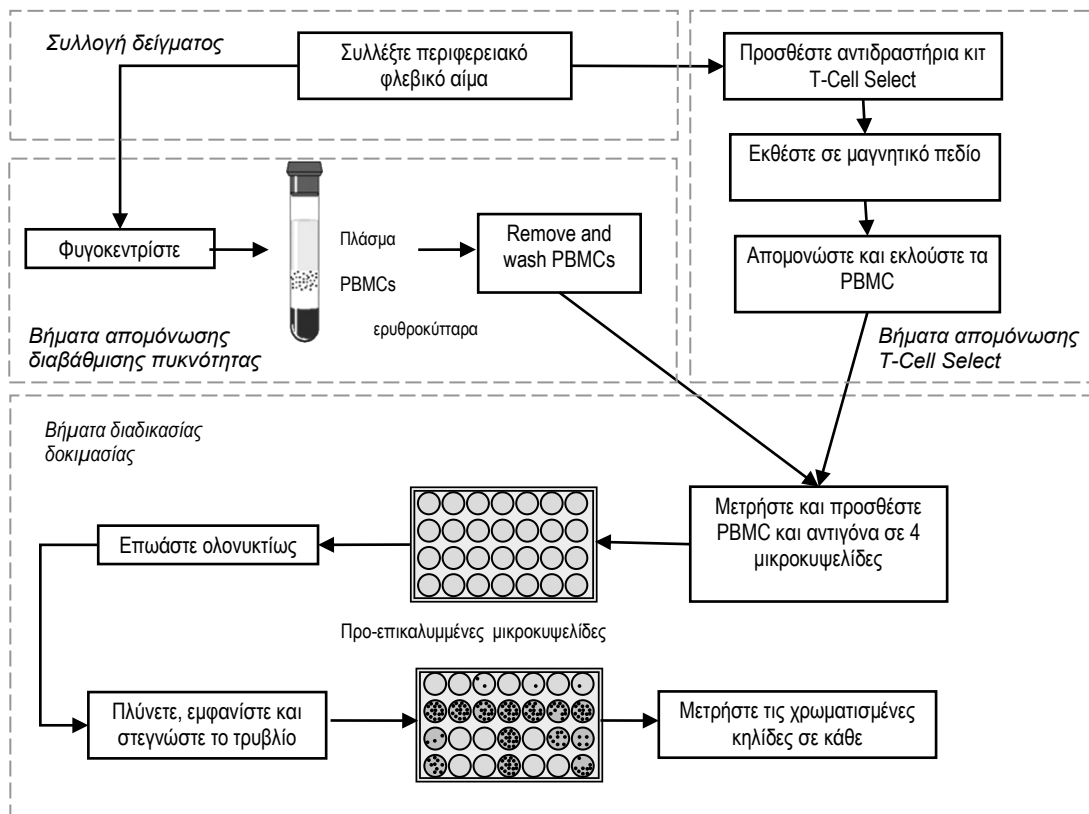
Η εξέταση T-SPOT.TB είναι μια απλοποιημένη παραλλαγή της τεχνικής της εξέτασης ELISPOT. Οι εξετάσεις ELISPOT είναι εξαιρετικά ευαίσθητες καθώς η κυτοκίνη-στόχος συλλαμβάνεται απευθείας γύρω από το εκκριτικό κύτταρο, προτού αραιωθεί στο υπερκείμενο, συλληφθεί από υποδοχείς παρακείμενων κυττάρων ή υποδομηθεί. Αυτό κάνει τις εξετάσεις ELISPOT πολύ πιο ευαίσθητες από τις συμβατικές εξετάσεις ELISA<sup>5</sup>. Η εξέταση T-SPOT.TB είναι σχεδιασμένη για την ανίχνευση δραστικών T κυττάρων που ανταποκρίνονται σε διέγερση από αντιγόνα ειδικά για το *M. tuberculosis*<sup>3,4,6-9</sup>. Η εξέταση απαριθμεί μεμονωμένα ενεργοποιημένα TB-ειδικά T κύτταρα. Είναι κατάλληλη για χρήση με όλους τους ασθενείς σε κίνδυνο LTBI ή για τους οποίους υπάρχει υποψία ότι πάσχουν από φυματίωση<sup>10,11</sup>, ανεξαρτήτως ηλικίας, φύλου, εθνικότητας, θεραπείας ή ανοσιακής κατάστασης.

## Αρχές της διαδικασίας

Μονοπύρνα κύτταρα περιφερειακού αίματος (PBMC) διαχωρίζονται από ένα δείγμα ολικού αίματος και εκπλένονται ώστε να αφαιρεθούν τυχόν σήματα παρεμβολής υποβάθρου. Κατόπιν, τα PBMC καταμετρούνται έτσι ώστε ένας τυποποιημένος αριθμός κυττάρων να χρησιμοποιείται στην εξέταση. Αυτό εξασφαλίζει ότι ακόμα και εκείνοι που έχουν χαμηλούς τίτλους T κυττάρων λόγω εξασθενημένων ανοσοποιητικών συστημάτων (ανοσοκατασταλμένοι) έχουν επαρκή αριθμό κυττάρων προστιθέμενων στις μικροκυψελίδες μικροπιλοδότησης. Τα στάδια πλύσης και καταμέτρησης καθώς και η τεχνική ELISPOT παρέχουν εξαιρετική απόδοση για την ανίχνευση της φυματίωσης και της λανθάνουσας φυματίωσης.

Τέσσερις μικροκυψελίδες (βλ. Εικόνα 1) απαιτούνται για κάθε δείγμα:

1. Ένας μάρτυρας Nil για την αναγνώριση μη ειδικής κυτταρικής ενεργοποίησης.
2. TB-ειδικά αντιγόνα, Ομάδα A (ESAT-6).
3. TB-ειδικά αντιγόνα, Ομάδα B (CFP10).
4. Ένας θετικός μάρτυρας που περιέχει φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA, ένας γνωστός πολυκλωνικός ενεργοποιητής<sup>12</sup>) για να επιβεβαιώσει τη λειτουργικότητα των PBMC.



Εικόνα 1: Τα κύρια βήματα της εξέτασης T-SPOT.TB. Σημειώστε ότι κάθε πλάκα περιέχει 96 μικροκυψελίδες.

Τα PBMC επωάζονται με τα αντιγόνα ώστε να επιτραπεί διέγερση τυχόν ευαισθητοποιημένων T κυττάρων που είναι παρόντα. Η εκκρινόμενη κυτοκίνη συλλαμβάνεται από ειδικά αντισώματα στη μεμβράνη, που σχηματίζει τη βάση της μικροκυψελίδας, και τα κύτταρα και άλλα ανεπιθύμητα υλικά αφαιρούνται μέσω πλύσης. Ένα δεύτερο αντίσωμα, συζευγμένο σε αλκαλική φωσφατάση και κατευθυνθέν σε ένα διαφορετικό επίτοπο στο μόριο κυτοκίνης, προστίθεται και συνδέεται στην κυτοκίνη που έχει συλληφθεί στην επιφάνεια της μεμβράνης. Τυχόν αδέσμευτο σύζευγμα (conjugate) αφαιρείται μέσω πλύσης. Ένα διαλυτό υπόστρωμα προστίθεται σε κάθε μικροκυψελίδα. Αυτό διασπάται μέσω δεσμευμένου ενζύμου ώστε να σχηματίσει μια κηλίδα αδιάλυτου ιζήματος στο σημείο της αντίδρασης. Κάθε κηλίδα αντιπροσωπεύει το ίχνος ενός μεμονωμένου T κυττάρου που εκκρίνει κυτοκίνη, και η αξιολόγηση του αριθμού των κηλίδων που λαμβάνονται παρέχει μια μέτρηση της πληθώρας των ευαίσθητων στο *M. tuberculosis* δραστικών T κυττάρων στο περιφερειακό αίμα.

### Περιορισμοί

- Για *in vitro* διαγνωστική χρήση μόνο.
- Για επαγγελματική χρήση μόνο.
- Μην αναμειγνύετε συστατικά από διαφορετικές παρτίδες kit.
- Διαβάστε προσεκτικά τις οδηγίες της εξέτασης πριν από τη χρήση.
- Τηρήστε άσηπτη τεχνική ώστε να αποφευχθεί μόλυνση των αντιδραστηρίων, των μικροκυψελίδων εξέτασης, των κυτταρικών εναιωρημάτων και των μέσων κυτταροκαλλιέργειας.
- Παραλλαγή στις καθορισμένες τεχνικές πλύσης και διανομής με πιπέτα, στους χρόνους επώασης ή/και στις θερμοκρασίες ενδέχεται να επηρεάσει τα πραγματικά αποτελέσματα που λαμβάνονται και θα πρέπει να αποφεύγεται.
- Το αίμα θα πρέπει να συλλέγεται και να προχωρήσει στην εξέταση εντός 8 ωρών. Αυτός ο χρονικός περιορισμός μπορεί να ξεπεραστεί χρησιμοποιώντας το kit αντιδραστηρίων T-Cell Select™ ή το αντιδραστήριο T-Cell Xtend® (διατίθεται από την Oxford Immunotec). Όταν το kit αντιδραστηρίων T-Cell Select χρησιμοποιείται με τη δοκιμασία T-SPOT.TB, ο

χρόνος αποθήκευσης του δείγματος αυξάνεται σε 54 ώρες και η διαδικασία απομόνωσης κυττάρων μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Όταν χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο T-Cell *Xtend* ή κάποια άλλη μέθοδος μείωσης κοκκιοκυττάρων με την εξέταση T-SPOT.TB, ο χρόνος φύλαξης του δείγματος αυξάνει στις 32 ώρες.

- Φυλάσσετε και μεταφέρετε τα δείγματα αίματος στο εργαστήριο σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C), συμπεριλαμβανομένων δειγμάτων αίματος για χρήση με το κιτ αντιδραστηρίων T-Cell *Select*. Εάν χρησιμοποιηθεί το αντιδραστήριο T-Cell *Xtend*, τότε τα δείγματα μπορούν να μεταφερθούν και να φυλαχθούν στους 10-25 °C. Μην ψύχετε ή καταψύχετε δείγματα ολικού αίματος.
- Η εξέταση T-SPOT.TB θα πρέπει να χρησιμοποιείται και να ερμηνεύεται μόνο στο πλαίσιο της συνολικής κλινικής εικόνας του ασθενή.
- Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας δεν αποκλείει την πιθανότητα έκθεσης στο *M. tuberculosis* ή της προσβολής από αυτό.
- Τα αντιγόνα ESAT-6 και CFP10 είναι απόντα από στελέχη BCG και από τα περισσότερα περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια, με εξαίρεση τα *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*<sup>3,4</sup> και *M. goodii*.

### Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις ασφαλείας

Θα πρέπει να δίνεται προσοχή κατά το χειρισμό υλικού ανθρώπινης προέλευσης. Όλα τα δείγματα αίματος θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικώς μολυσματικά.

Ο χειρισμός των δειγμάτων αίματος και των συστατικών της εξέτασης, η χρήση τους, η φύλαξη και η απόρριψη θα πρέπει να διεξάγονται σύμφωνα με τις διαδικασίες που ορίζουν οι ισχύοντες εθνικοί κανονισμοί ή οδηγίες περί ασφάλειας από βιολογικούς κινδύνους.

Θα πρέπει να δίνεται προσοχή κατά την εργασία με χημικά. Όλα τα χημικά θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικώς επικίνδυνα.

### Παρεχόμενα υλικά

Το κιτ T-SPOT.TB 8 περιέχει:

1. 1 πλάκα μικροτιτλοδότησης (CW.300): 96 μικροκυψελίδες, που παρέχονται ως 12 ταινίες των 8 μικροκυψελίδων σε ένα πλαίσιο, επικαλυμμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού στην κυτοκίνη γ-ιντερφερόνης (IFN-γ).
2. 2 φιαλίδια (PA.300, 0,8 mL το καθένα) Ομάδα A: περιέχει αντιγόνα ESAT-6, λευκωματίνη βόειου ορού και αντιμικροβιακούς παράγοντες.
3. 2 φιαλίδια ((PB.300, 0,8 mL το καθένα) Ομάδα B: περιέχει αντιγόνα CFP10, λευκωματίνη βόειου ορού και αντιμικροβιακούς παράγοντες.
4. 2 φιαλίδια (CP.300, 0,8 mL το καθένα) Θετικός μάρτυρας: περιέχει φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA), για χρήση ως μάρτυρας κυτταρικής λειτουργικότητας, λευκωματίνη βόειου ορού και αντιμικροβιακούς παράγοντες.
5. 1 φιαλίδιο (CR.300, 50 μL) 200x συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζεύγματος (conjugate): μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού στην κυτοκίνη IFN-γ συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση.
6. 1 φιάλη (SR.300, 25 mL) Διάλυμα υποστρώματος: διάλυμα BCIP/NBT<sup>plus</sup> έτοιμο προς χρήση.
7. Οδηγίες χρήσης που βρίσκονται στο CD μαζί με το Δελτίο Δεδομένων Ασφαλείας Υλικού (MSDS), τον Οδηγό Εκπαίδευσης, τον υπολογιστή αραίωσης κυττάρων T-SPOT, τον υπολογιστή αραίωσης συζεύγματος, τον υπολογιστή ταχύτητας φυγοκεντρωτή και το πρόγραμμα T-SPOT.AutoReporter.

### Φύλαξη

Φυλάσσετε όλα τα συστατικά του κιτ στους 2-8 °C.

Αποφύγετε την παρατεταμένη έκθεση του διαλύματος υποστρώματος στο φως.

## Σταθερότητα

Μην αναμειγνύετε συστατικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Αποθηκεύετε το κιτ που δεν έχει ανοιχτεί στους 2-8 °C. Τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο κουτί του κιτ, εφόσον φυλάσσονται και χρησιμοποιούνται στις συνιστώμενες συνθήκες. Το κιτ δεν πρέπει να χρησιμοποιείται μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην επικέτα του κιτ.

Φυλάτε τα συστατικά του ανοιχτού κιτ στους 2-8 °C. Τα συστατικά του ανοιχτού κιτ πρέπει να χρησιμοποιούνται εντός 8 εβδομάδων μετά το άνοιγμα.

## Εξοπλισμός και υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Πλαίσιο τρυβλίου με ταινίες 8 μικροκυψελίδων (διαθέσιμο από την Oxford Immunotec) για χρήση με το κιτ T-SPOT.TB 8.
2. Μικροβιολογικός θάλαμος Τάξης II (συνιστάται).
3. Σωλήνες συλλογής αίματος, όπως Vacutainer® CPT™ (διαθέσιμο από την Oxford Immunotec), ηπαρινισμένοι σωλήνες ή σωλήνες που περιέχουν κιτρικά.
4. Ficoll®-Raque\* Plus ή εναλλακτικά υλικά διαχωρισμού PBMC.
5. Το αντιδραστήριο T-Cell Xtend (διαθέσιμο από την Oxford Immunotec) μπορεί να χρησιμοποιηθεί με δείγματα που συλλέχθηκαν έως 32 ώρες μετά την φλεβοκέντηση. Το κιτ αντιδραστηρίων T-Cell Select (διαθέσιμο από την Oxford Immunotec) μπορεί να χρησιμοποιηθεί με δείγματα που συλλέχθηκαν έως 54 ώρες μετά την φλεβοκέντηση. Εναλλακτικές μέθοδοι μείωσης κοκκιοκυττάρων μπορούν χρησιμοποιηθούν με δείγματα που έχουν φυλαχθεί πάνω από 32 ώρες. Οι πελάτες πρέπει να επικυρώνουν τις εναλλακτικές μεθόδους Στο δικό τους εργαστήριο.
6. Οι σωλήνες Leucosep μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να απλοποιήσουν το διαχωρισμό των PBMC χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Ficoll\*.
7. Συσκευή Φυγοκέντρησης για προετοιμασία PBMC (ικανή για τουλάχιστον 1800 x g και σε θέση να διατηρεί τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C)).
8. Μια φυγόκεντρος που μπορεί να γίνει πλυσίμο κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή και την πλύση του διαχωρισμένου PBMC, για παράδειγμα Φυγόκεντρος DiaCent-CW (Bio-Rad). Οι πελάτες πρέπει να αξιολογούν τη χρήση αυτού του εξοπλισμού στο δικό τους εργαστήριο.
9. Εξοπλισμός και αντιδραστήρια που να καθιστούν δυνατή την καταμέτρηση PBMC, είτε χειροκίνητα χρησιμοποιώντας κυανούν του τρυπανίου και αιμοκυτταρόμετρο σε ένα μικροσκόπιο ή αυτοματοποιημένα χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο αιματολογικό αναλυτή.
10. Ένας επωαστήρας υγρού τύπου ικανός στους  $37 \pm 1$  °C με παροχή 5 % CO<sub>2</sub>.
11. Μια συσκευή πλύσης τρυβλίων μικροπιλοδότησης ή εξοπλισμός για τη μη αυτόματη πλύση τρυβλίων.
12. Πιπέττες και στείρα ρύγχη πιπέττας.
13. Στείρο διάλυμα D-PBS: όπως το GIBCO® 1 x D-PBS (Invitrogen, αριθμός καταλόγου 14040-091).
14. Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.
15. Ένα μέσο ανάγνωσης του τρυβλίου όπως ένα μικροσκόπιο, ένα ψηφιακό μικροσκόπιο, μεγεθυντικός φακός ή συσκευή απεικόνισης τρυβλίου.
16. Στείρο υλικό κυτταροκαλλιέργειας όπως το GIBCO AIM-V® (Invitrogen, αριθμός καταλόγου 31035-025): η χρήση αυτού του απαλλαγμένου από ορό μέσου για το βήμα επώασης συνιστάται ένθερμα. Το RPMI 1640 (Invitrogen, αριθμός καταλόγου 21875-034) μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο στα αρχικά βήματα προετοιμασίας δείγματος. Συνιστάται υλικά κυτταροκαλλιέργειας να φυλάσσονται σε κατάλληλα κλάσματα και η περίσσεια του υλικού να απορρίπτεται μετά τη χρήση. Τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας θα πρέπει να προθερμαίνονται στους 37 °C προτού χρησιμοποιηθούν με την εξέταση T-SPOT.TB.

## Παρασκευή αντιδραστηρίου

1. Πλάκα μικροπιλοδότησης. Η πλάκα μικροπιλοδότησης T-SPOT.TB 8 παρέχεται έτοιμη προς χρήση. Αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών των 8 μικροκυψελίδων από το χώρο φύλαξης και αφήστε τις να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Επανασφραγίστε τις υπόλοιπες ταινίες στην εξωτερική συσκευασία αλουμινίου και συμπεριλάβετε το σακουλάκι αποξηραντικού μέσου.
2. Τα φιαλίδια *M. tuberculosis* ESAT-6 αντιγόνων (Ομάδα A) παρέχονται έτοιμα προς χρήση.

3. Τα φιαλίδια *M. tuberculosis* CFP10 αντιγόνων (Ομάδα Β) παρέχονται έτοιμα προς χρήση.
4. Τα φιαλίδια Θετικού μάρτυρα παρέχονται έτοιμα προς χρήση.
5. Προετοιμάστε ένα διάλυμα 1:200 αντιδραστηρίου συζεύγματος εργασίας. Υπολογίστε τον όγκο του διαλύματος αντιδραστηρίου συζεύγματος εργασίας που απαιτείται (βλ. τον υπολογιστή αραιώσης συζεύγματος T-SPOT στο CD που παρέχεται με κάθε κιτ εξέτασης). Το αντιδραστήριο μπορεί να παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση ή να ετοιμάζεται στη συγκέντρωση εργασίας (1:200) και να φυλάσσεται για έως έξι εβδομάδες στους 2 °C – 8 °C πριν τη χρήση. Μην χρησιμοποιείτε το αραιωμένο αντιδραστήριο πέρα από αυτή τη διάρκεια ημιζωής.
6. Το διάλυμα υποστρώματος παρέχεται έτοιμο προς χρήση. Αφαιρέστε από το χώρο φύλαξης και αφήστε το να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

### **Διαδικασία**

Η παρούσα εξέταση θα πρέπει να πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τις αρχές της ορθής εργαστηριακής πρακτικής και μέσω αυστηρής τήρησης αυτών των οδηγιών χρήσης.

Η Oxford Immunotec Ltd έχει προετοιμάσει έναν Εκπαιδευτικό Οδηγό που περιγράφει τη συλλογή και την προετοιμασία δειγμάτων, την επιλογή υλικών κυτταροκαλλιέργειας και μεθόδους για την καταμέτρηση κηλίδων. Είναι διαθέσιμος στο CD που παρέχεται με κάθε κιτ εξέτασης, καλώντας στο +44 (0) 1235 442780 ή μέσω εκφόρτωσης από το [www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com).

### **Συλλογή δειγμάτων και προετοιμασία**

Μεμονωμένοι χρήστες θα πρέπει να επικυρώνουν τις διαδικασίες τους για συλλογή PBMC, απαρίθμηση PBMC και επιλογή κατάλληλων υλικών για την υποστήριξη της λειτουργικότητας των T κυττάρων κατά το αρχικό στάδιο επώασης της εξέτασης. Συνήθως, για έναν ανοσοεπαρκή ανοσοεπαρκείς ασθενή, επαρκή PBMC για την εκτέλεση της εξέτασης μπορούν να ληφθούν από δείγματα φλεβικού αίματος σύμφωνα με τις ακόλουθες κατευθυντήριες οδηγίες:

- Ενήλικες και παιδιά 10 ετών και άνω: ένα σωληνάριο των 8 mL ή δύο CPT των 4 mL ή ένα σωληνάριο ηπαρίνης ή κιτρικών των 6 mL
- Παιδιά 2-9 ετών: ένα σωληνάριο CPT, ηπαρίνης ή κιτρικών των 4 mL
- Παιδιά έως 2 ετών: ένα παιδιατρικό σωληνάριο των 2 mL

Τα δείγματα αίματος πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου και η εξέτάσή τους να γίνεται εντός 8 ωρών από τη συλλογή του αίματος ή εντός 32 ωρών και να φυλάσσονται στους 10-25 °C εάν χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο T-Cell *Xtend* ή εντός 54 ωρών με αποθήκευση στους 18-25 °C εάν χρησιμοποιείται το κιτ αντιδραστηρίων T-Cell *Select*.

Τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας θα πρέπει να προθερμαίνονται στους 37 °C προτού χρησιμοποιηθούν με την εξέταση T-SPOT.TB.

Διαδικασία	Σημειώσεις
<p>1. Συλλέξτε ένα δείγμα αίματος σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται με τη συσκευή συλλογής. Φυλάσσετε το συλλεγμένο αίμα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) ή στους 10-25 °C εάν χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο T-Cell <i>Xtend</i>. Μην ψύχετε ή καταψύχετε.</p>	<p>1. Τα δείγματα αίματος μπορούν να συλλεχθούν σε ποικίλους σωλήνες. Στα εργαστήριά μας, έχουμε χρησιμοποιήσει με επιτυχία Vacutainer κίτρικού CPT, ηπαρίνης CPT και τυπικά σωληνάρια ηπαρίνης ή κίτρικού άλατος. Οι σωλήνες CPT δεν είναι κατάλληλοι προς χρήση με το αντιδραστήριο T-Cell <i>Xtend</i>. Τα σωληνάρια EDTA δεν συνιστώνται.</p>
<p>2. Όταν χρησιμοποιείτε σωλήνες συλλογής αίματος CPT, ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή για διαχωρισμό των PBMC.</p> <p>Όταν χρησιμοποιείτε σωληνάρια vacutainer συλλογής αίματος που περιέχουν ηπαρίνη ή κίτρικό άλας, διαχωρίστε τα PBMC για φυγοκέντρηση μέσω Ficoll-Paque Plus χρησιμοποιώντας δημοσιευμένες διαδικασίες.</p> <p>Εάν χρησιμοποιούνται σωλήνες Leucosep, το κιτ αντιδραστηρίων T-Cell <i>Select</i> ή το αντιδραστήριο T-Cell <i>Xtend</i> (διαθέσιμο από την Oxford Immunotec), ακολουθήστε τα πρωτόκολλα που παρέχονται με αυτά τα αντιδραστήρια.</p>	<p>2. Φυγοκεντρήστε σωληνάρια των 8 mL CPT στα 1600 x g για 28 λεπτά ή σωληνάρια των 4 mL CPT στα 1800 x g για 30 λεπτά στους 18 °C όπου υπάρχει διαθέσιμη Ψυχόμενη φυγόκεντρος. Αφήστε τη φυγόκεντρο να φτάσει στους 18 °C εάν προηγουμένως έχουν χρησιμοποιηθεί χαμηλότερες θερμοκρασίες. Εάν χρησιμοποιείται μη Ψυχόμενη φυγόκεντρος, βεβαιωθείτε ότι η θερμοκρασία δεν υπερβαίνει τους 25 °C.</p> <p>Εναλλακτικά, αραιώστε το αίμα με ίσο όγκο υλικού RPMI 1640. Τοποθετήστε προσεκτικά το αραιωμένο αίμα (2-3 όγκους) πάνω στο Ficoll-Paque Plus (1 όγκος) και φυγοκεντρήστε στα 1000 x g για 22 λεπτά ενώ διατηρείτε τη θερμοκρασία μεταξύ 18 και 25 °C.</p> <p>Για δείγματα που είναι μεταξύ 8 και 32 ωρών μετά την φλεβοκέντηση, χρησιμοποιείτε το αντιδραστήριο T-Cell <i>Xtend</i> πριν τοποθετήσετε το δείγμα πάνω στο Ficoll-Paque Plus.</p> <p>Για δείγματα που έχουν αποθηκευτεί έως και 54 ώρες μετά τη φλεβοκέντηση, χρησιμοποιήστε το πρωτόκολλο που παρέχεται με το κιτ αντιδραστηρίων T-Cell <i>Select</i>.</p> <p>Ο υπολογιστής ταχύτητας φυγοκέντρου στο CD που περιλαμβάνεται στο κιτ εξέτασης μπορεί να βοηθήσει τη μετατροπή των ταχυτήτων από xg σε rpm.</p> <p>Εάν χρησιμοποιούνται άλλες μέθοδοι διαχωρισμού PBMC, αυτές πρέπει να επικυρώνονται από τον πελάτη για χρήση με την εξέταση T-SPOT.TB.</p>



Διαδικασία	Σημειώσεις
3α. Συλλέξτε τη λευκή, θολή ζώνη PBMC χρησιμοποιώντας μια πιπέττα και μεταφέρετε σε ένα κωνικό σωληνάριο φυγοκέντρησης των 15 mL. Αναπληρώστε τον όγκο στα 10 mL με υλικό κυτταροκαλλιέργειας.	3α. Μια ποικιλία υλικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πλύση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Στα εργαστήριά μας, τόσο το AIM-V όσο και το RPMI 1640 έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και συνιστώνται.
3β. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια φυγόκεντρος, για παράδειγμα μια φυγόκεντρος DiaCent-CW (Bio-Rad), για να διευκολυνθούν τα στάδια πλύσης κυττάρων. Εάν χρησιμοποιείται αυτό το σύστημα, για την πλύση των κυττάρων πρέπει να χρησιμοποιείται DPBS.	3β. Η μεθοδολογία για τη χρήση της φυγόκεντρος για πλύση κυττάρων κατά τη διάρκεια της παρασκευής PBMC θα είναι διαθέσιμη από την Oxford Immunotec. Ωστόσο, οι πελάτες πρέπει να επικυρώνουν αυτή τη μέθοδο σε δικό τους εργαστήριο.
4. Φυγοκεντρήστε στα 600 x g για 7 λεπτά. Απορρίψτε το υπερκείμενο και αραιώστε ξανά το σύμπηκτο (pellet) σε 1 mL υλικού.	4. Βλέπε 3α παραπάνω.
5. Αναπληρώστε τον όγκο στα 10 mL με φρέσκο υλικό και φυγοκεντρήστε στα 350 x g για 7 λεπτά.	5. Βλέπε 3α παραπάνω.
6. Απορρίψτε το υπερκείμενο και αραιώστε ξανά το σύμπηκτο (pellet) σε 0,7 mL μέσο καλλιέργειας AIM-V.	6. Στα στάδιο αυτό, το επιλεγμένο υλικό καλλιέργειας για την ολονύκτια επώαση θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να επαναιωρηθεί το σύμπηκτο (pellet). Στα εργαστήριά μας, το απαλλαγμένο από ορό υλικό AIM-V έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και συνιστάται.

Τα Τ κύτταρα που έχουν ληφθεί από άλλα σωματικά υγρά, όπως η βρογχοκυψελιδική έκπλυση (BAL), η πλευριτική συλλογή (PE) ή η εγκεφαλονωτιαίου υγρού (CSF) έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία με τη δοκιμασία T-SPOT.TB για τον προσδιορισμό της λοίμωξης από φυματίωση (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 και Patel *et al* (2010) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**(4) 569-77). Κατά τη χρήση άλλων δειγμάτων εκτός του αίματος, οι χρήστες πρέπει να επικυρώνουν τις διαδικασίες για τη συλλογή επαρκών μονοπυρηνικών κυττάρων. Οι μέθοδοι επεξεργασίας δειγμάτων BAL περιγράφονται στις δημοσιεύσεις που αναφέρονται ανωτέρω.

Σημείωση 1: Τα όρια για ένα θετικό αποτέλεσμα και οι έγκυροι μάρτυρες για τη δοκιμασία, με χρήση δειγμάτων εκτός του αίματος, δεν έχουν εκτιμηθεί εκτεταμένα και ενδέχεται να διαφέρουν από τη δοκιμασία αίματος. Οι χρήστες πρέπει να καθορίσουν τα κριτήρια ερμηνείας των δοκιμασιών. Οι κλινικοί επιστήμονες πρέπει να ελέγχουν τα αποτελέσματα ανάλογα με την κρίση τους.

Σημείωση 2: Η χρονική διάρκεια για τη λήψη του δείγματος έως την έναρξη της εξέτασης δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα.

#### Καταμέτρηση κυττάρων και αραιώση

Η εξέταση T-SPOT.TB απαιτεί  $2,5 \times 10^5$  βιώσιμα PBMC ανά μικροκυψελίδα. Συνολικά τέσσερις μικροκυψελίδες απαιτούνται για κάθε δείγμα ασθενούς. Ο σωστός αριθμός κυττάρων πρέπει να προστίθεται σε κάθε μικροκυψελίδα. Αδυναμία τήρησης αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη ερμηνεία του αποτελέσματος.

Διαδικασία	Σημειώσεις
1. Πραγματοποιήστε μια καταμέτρηση βιώσιμων κυττάρων.	1. Τα κύτταρα μπορούν να καταμετρηθούν μέσω ποικίλων μεθόδων, περιλαμβανομένης της μη αυτόματης καταμέτρησης χρησιμοποιώντας κυανούν του τρυπανίου και αιμοκυτταρόμετρο ή της αυτοματοποιημένης καταμέτρησης χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο όργανο.

<b>Διαδικασία</b>	<b>Σημειώσεις</b>
2. Εν συντομία, για μη αυτόματη καταμέτρηση χρησιμοποιώντας ένα αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, προσθέστε 10 µL από το τελικό κυτταρικό εναιώρημα σε 40 µL 0,4 % (w/v) διαλύματος κυανού του τρυπανίου. Τοποθετήστε ένα κατάλληλο κλάσμα πάνω στο αιμοκυτταρόμετρο και καταμετρήστε τα κύτταρα στο πλέγμα. Για άλλους τύπους αιμοκυτταρόμετρου και για αυτοματοποιημένες συσκευές, ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή.	2. Προσοχή θα πρέπει να δίνεται ώστε να εξασφαλιστεί ότι το κυτταρικό εναιώρημα είναι πλήρως αναμεμιγμένο αμέσως πριν από την αφαίρεση των κλασμάτων για αραίωση ή για καταμέτρηση. Τα κύτταρα μπορεί να κατακαθίσουν προς το κάτω μέρος του σωληναρίου οδηγώντας σε παρερμηνεία του πραγματικού αριθμού κυττάρων.
3. Υπολογίστε τη συγκέντρωση των βιώσιμων κυττάρων που είναι παρόντα στο πυκνό κυτταρικό εναιώρημα.	3. Βεβαιωθείτε ότι ο υπολογισμός είναι σωστός για το σύστημα καταμέτρησης κυττάρων που χρησιμοποιείται καθώς η χρήση είτε ανεπαρκών κυττάρων είτε περίσσειας κυττάρων ενδέχεται να οδηγήσει σε λανθασμένη ερμηνεία του αποτελέσματος. Ο υπολογιστής αραίωσης κυττάρων T-SPOT στο CD που περιλαμβάνεται σε κάθε κιτ εξέτασης θα διευκολύνει αυτό τον υπολογισμό.
4. Προετοιμάστε 500 µL από το τελικό κυτταρικό εναιώρημα σε συγκέντρωση 2,5 x 10 <sup>5</sup> κύτταρα / 100 µL.	4. Βεβαιωθείτε ότι τα κύτταρα έχουν αναμιχθεί καλά προτού αφαιρέσετε ένα κλάσμα για αραίωση.

#### **Ετοιμασία πλάκας και επώαση**

Η εξέταση T-SPOT.TB απαιτεί τη χρησιμοποίηση τεσσάρων μικροκυψελίδων για κάθε δείγμα ασθενούς. Ένας μάρτυρας Nil και ένας θετικός μάρτυρας κυτταρικής λειτουργικότητας θα πρέπει να εκτελούνται με κάθε μεμονωμένο δείγμα. Συνιστάται τα δείγματα να ταξινομούνται κάθετα στη πλάκα όπως φαίνεται παρακάτω.

- Μάρτυρας Nil
- Ομάδα A
- Ομάδα B
- Θετικός μάρτυρας

<b>Διαδικασία</b>	<b>Σημειώσεις</b>
1. Αφαιρέστε τις προεπικαλυμμένες ταινίες 8 μικροκυψελίδων από τη συσκευασία, στερεώστε σε ένα πλαίσιο πλάκας και αφήστε να εξισορροπηθούν σε θερμοκρασία δωματίου.	1. Αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών μόνο και φυλάξτε τις υπόλοιπες ταινίες. Στερεώστε τις προς χρήση ταινίες σε ένα κενό πλαίσιο τρυβλίου προσαρμοσμένο με εσωτερικό κάλυμμα και καπάκι. Πλαίσια, καλύμματα και καπάκια πρέπει να κρατούνται και να επαναχρησιμοποιούνται.

<b>Διαδικασία</b>	<b>Σημειώσεις</b>
<p>2. Κάθε δείγμα ασθενούς απαιτεί τη χρήση 4 μεμονωμένων μικροκυψελίδων.</p> <p>(i) Προσθέστε 50 μL υλικού καλλιέργειας AIM V σε κάθε μικροκυψελίδα μάρτυρα Nil.</p> <p>(ii) Προσθέστε 50 μL διαλύματος Ομάδας A σε κάθε μικροκυψελίδα που χρειάζεται.</p> <p>(iii) Προσθέστε 50 μL διαλύματος Ομάδας B σε κάθε μικροκυψελίδα που χρειάζεται.</p> <p>(iv) Προσθέστε 50 μL διαλύματος Θετικού μάρτυρα σε κάθε μικροκυψελίδα μάρτυρα κυτταρικής λειτουργικότητας.</p>	<p>2. Μην επιτρέψετε στο άκρο της πιπέτας να ακουμπήσει τη μεμβράνη. Εγκοπές στη μεμβράνη που προκαλούνται από άκρα πιπέτας ενδέχεται να προκαλέσουν τεχνήματα στις μικροκυψελίδες.</p> <p>Μπορεί να χρειαστεί να χτυπήσετε ελαφρά το τρυβλίο προκειμένου να εξασφαλίσετε ότι τα διαλύματα καλύπτουν τη μεμβράνη στη βάση κάθε μικροκυψελίδας. Η ισχυρή ανάδευση θα πρέπει να αποφεύγεται προκειμένου να ελαχιστοποιείται η διασταυρούμενη μόλυνση των αντιγόνων μεταξύ των μικροκυψελίδων.</p>
<p>3. Σε κάθε μια από τις 4 μικροκυψελίδες που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για ένα δείγμα ασθενούς, προσθέστε 100 μL από το τελικό κυτταρικό εναιώρημα του ασθενούς (που περιέχει 250.000 βιώσιμα κύτταρα).</p>	<p>3. Χρησιμοποιώντας την πιπέτα αναρροφήστε και απελευθερώστε απαλά το κυτταρικό εναιώρημα προκειμένου να εξασφαλίσετε πλήρη ανάμιξη πριν από την αφαίρεση κάθε κλάσματος 100 μL.</p> <p>Συνιστάται να χρησιμοποιείται ένα καινούργιο άκρο για κάθε προσθήκη κυττάρων του κάθε ασθενούς προκειμένου να αποφευχθεί διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των 4 μικροκυψελίδων.</p>
<p>4. Επώαστε τη πλάκα σε έναν επωαστήρα υγρού τύπου στους 37 °C με 5 % CO<sub>2</sub> για 16-20 ώρες.</p>	<p>4. Αποφύγετε να διαταράσσετε τη πλάκα άπαξ και εισαχθεί στον επωαστήρα. Μην στοιβάζετε τις πλάκες καθώς κάτι τέτοιο ενδέχεται να οδηγήσει σε ανομοιογενή κατανομή θερμοκρασίας και αερισμού Αδυναμία τήρησης του συνιστώμενου χρόνου και των συνθηκών επώασης ενδέχεται να οδηγήσει σε λανθασμένη ερμηνεία του αποτελέσματος. Ελέγξτε ότι ο επωαστήρας περιέχει επαρκές νερό ώστε να διατηρεί υγρασία για το χρόνο επώασης.</p>

### **Ανάπτυξη κηλίδων και μέτρηση**

Κατά την πλύση των τρυβλίων και τα βήματα ανάπτυξης μην ακουμπάτε τη μεμβράνη με τα άκρα της πιπέτας ή με τα άκρα της αυτοματοποιημένης συσκευής πλύσης μικροκυψελίδων. Εντομές στη μεμβράνη που προκαλούνται από άκρα πιπέτας ή από άκρα συσκευής πλύσης μικροκυψελίδων ενδέχεται να προκαλέσουν τεχνήματα στις μικροκυψελίδες, γεγονός που μπορεί να παρέμβει στην καταμέτρηση κηλίδων.

<b>Διαδικασία</b>	<b>Σημειώσεις</b>
<p>1. Αφαιρέστε τη πλάκα από τον επωαστήρα.</p>	<p>1. Σε περίπτωση αναπόφευκτης καθυστέρησης στην επεξεργασία, π.χ. προβλήματα εξασφάλισης πόρων κατά το σαββατοκύριακο, οι πλάκες πρέπει να αφαιρούνται από τον επωαστήρα και να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2 – 8 °C. Ο μέγιστος συνιστώμενος χρόνος φύλαξης είναι 72 ώρες και οι πλάκες πρέπει να καλύπτονται κατά τη φύλαξη. Ο πελάτης πρέπει να επικυρώνει τη διαδικασία σε δικό του εργαστήριο.</p>
<p>2. Απορρίψτε το υλικό κυτταροκαλλιέργειας και προσθέστε 200 μL διάλυμα D-PBS σε κάθε μικροκυψελίδα.</p>	<p>2. Στο σημείο αυτό αφαιρέστε το διάλυμα υποστρώματος από το κιτ και αφήστε το να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.</p>

Διαδικασία	Σημειώσεις
3. Απορρίψτε το διάλυμα D-PBS. Επαναλάβετε την πλύση μικροκυψελίδων 3 επιπλέον φορές με φρέσκο διάλυμα D-PBS για κάθε πλύση.	3. Απορρίψτε όλα τα D-PBS από το τελικό βήμα πλύσης αναποδογυρίζοντας τη πλάκα πάνω σε απορροφητικό χαρτί προτού συνεχίσετε.
4. Αραιώστε το συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζεύγματος 200 φορές σε D-PBS προκειμένου να δημιουργήσετε το διάλυμα ισχύος εργασίας.	4. Μην χρησιμοποιήσετε D-PBS που περιέχει Tween® ή άλλα απορρυπαντικά, καθώς αυτό προκαλεί υψηλές καταμετρήσεις υποβάθρου. Εξασφαλίστε ότι προετοιμάζεται μόνο μικρή περίσσεια (που να επιτρέπει την απώλεια) διαλύματος ισχύος εργασίας.  Για κάθε ταινία 8 μικροκυψελίδων (κάθε μικροκυψελίδα απαιτεί 50 µL), αναπληρώστε 500 µL διαλύματος ισχύος εργασίας προσθέτοντας 2,5 µL συμπυκνωμένου αντιδραστήριου συζεύγματος σε 497,5 µL D-PBS. Για τον υπολογισμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο υπολογιστής αραιώσης συζεύγματος στο CD που συνοδεύει κάθε κιτ εξέτασης.
5. Προσθέστε 50 µL διάλυμα αντιδραστήριου συζεύγματος ισχύος εργασίας σε κάθε μικροκυψελίδα και επωάστε στους 2-8 °C για 1 ώρα.	5. Αδυναμία τήρησης του συνιστώμενου χρόνου επώασης ενδέχεται να οδηγήσει σε λανθασμένη ερμηνεία του αποτελέσματος.
6. Απορρίψτε το σύζευγμα και πραγματοποιήστε τέσσερις πλύσεις D-PBS όπως περιγράφεται στα βήματα 2 και 3 παραπάνω.	
7. Προσθέστε 50 µL διάλυμα υποστρώματος σε κάθε μικροκυψελίδα και επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 7 λεπτά.	7. Αδυναμία τήρησης του συνιστώμενου χρόνου επώασης ενδέχεται να οδηγήσει σε λανθασμένη ερμηνεία του αποτελέσματος.
8. Πλύνετε σχολαστικά τη πλάκα με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό προκειμένου να σταματήσετε την αντίδραση ανίχνευσης.	
9. Αφήστε τη πλάκα να στεγνώσει αφήνοντας το σε ένα καλά αεριζόμενο σημείο ή σε φούρνο σε θερμοκρασία έως 37 °C.	9. Οι κηλίδες γίνονται πιο ορατές καθώς στεγνώνει το τρυβλίο. Αφήστε να στεγνώσει για 4 ώρες στους 37 °C ή ολονυκτίως σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Καταμετρήστε και καταγράψτε τον αριθμό των ευδιάκριτων, σκούρων κυανών κηλίδων πάνω στη μεμβράνη κάθε μικροκυψελίδα. Εφαρμόστε την Ερμηνεία Αποτελεσμάτων και τα Κριτήρια Εξέτασης (βλ. παρακάτω) για να καθορίσετε εάν το δείγμα του ασθενούς είναι «Θετικό» ή «Αρνητικό» σε αντιγόνα TB.	10. Οι κηλίδες μπορούν να οπτικοποιηθούν μέσω διαφόρων μεθόδων, περιλαμβανομένης της μη αυτόματης χρήσης ενός μεγεθυντικού φακού χειρός, ή ενός κατάλληλου μικροσκοπίου, ενός ψηφιακού μικροσκοπίου ή χρησιμοποιώντας ένα όργανο απεικόνισης τρυβλίου ELISPOT αποκλειστικής χρήσης. Ένας οδηγός εκπαίδευσης καταμέτρησης κηλίδων (το πρόγραμμα T-SPOT. <i>Tutor</i> ) μπορεί να προμηθευτεί μέσω της ιστοσελίδας της Oxford Immunotec.

### Ποιοτικός έλεγχος

Ένα τυπικό αποτέλεσμα θα αναμένεται να έχει λίγες ή καθόλου κηλίδες στο μάρτυρα Nil και περισσότερες από 20 κηλίδες στο θετικό μάρτυρα.

Μια καταμέτρηση κηλίδων μάρτυρα Nil πέραν των 10 κηλίδων θα πρέπει να θεωρείται «Ακαθόριστη». Ανατρέξτε στον Οδηγός Εκπαίδευσης του T-SPOT.TB για πιθανά αίτια (εκφορτώστε από το [www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)). Ένα άλλο δείγμα θα πρέπει να συλλεχθεί από το άτομο και να εξεταστεί.

Συνήθως, η καταμέτρηση κηλίδων κυτταρικής λειτουργικότητας θετικού μάρτυρα θα πρέπει να είναι  $\geq 20$  ή να δείχνει κορεσμό (υπερβολικά μεγάλος αριθμός κηλίδων για να καταμετρηθούν). Ένα μικρό ποσοστό ασθενών μπορεί να έχει T κύτταρα που δείχνουν μόνο περιορισμένη απάντηση σε ΡΗΑ<sup>13,14</sup>. Όπου η καταμέτρηση κηλίδων θετικού μάρτυρα είναι  $< 20$  κηλίδες, θα πρέπει να θεωρείται «Ακαθόριστη», εκτός εάν είτε η Ομάδα Α είτε η Ομάδα Β είναι «Θετική» όπως περιγράφεται στην Ερμηνεία Αποτελεσμάτων και τα Κριτήρια Εξέτασης (βλ. παρακάτω), στην οποία περίπτωση το αποτέλεσμα είναι έγκυρο.

Λόγω πιθανών βιολογικών και συστηματικών παραλλαγών, όπου το μεγαλύτερο του (Ομάδα Α μείον μάρτυρας Nil) και (Ομάδα Β μείον μάρτυρας Nil) είναι 5, 6, ή 7 κηλίδες, το αποτέλεσμα μπορεί να θεωρηθεί Οριακό (διφορούμενο). Τα οριακά (διφορούμενα) αποτελέσματα, αν και έγκυρα, είναι λιγότερο αξιόπιστα από αποτελέσματα όπου η καταμέτρηση κηλίδων είναι πέρα από την αποκοπή. Επομένως, συνιστάται επανεξέταση του ασθενούς, χρησιμοποιώντας ένα νέο δείγμα. Εάν το αποτέλεσμα εξακολουθεί να είναι οριακό (διφορούμενο) κατά την επανεξέταση, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν άλλες διαγνωστικές εξετάσεις ή/και επιδημιολογικές πληροφορίες προκειμένου να προσδιοριστεί η κατάσταση λοίμωξης από TB του ασθενούς.

Ενώ τα αντιγόνα ESAT-6 και CFP10 είναι απόντα από στελέχη BCG του *M. bovis* και από τα περισσότερα περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια, είναι πιθανό ένα «Θετικό» αποτέλεσμα της δοκιμασίας T-SPOT.TB να οφείλεται σε λοίμωξη με *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* ή *M. goodii*. Εναλλακτικές δοκιμασίες απαιτούνται εάν υπάρχει υποψία αυτών των λοιμώξεων.

### **Ερμηνεία αποτελεσμάτων και κριτήρια εξέτασης**

Ανατρέξτε στην ενότητα Ποιοτικού Ελέγχου προτού εφαρμόσετε τα ακόλουθα κριτήρια.

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας T-SPOT.TB ερμηνεύονται αφαιρώντας την καταμέτρηση κηλίδων στη μικροκυψελίδα του μάρτυρα Nil από την καταμέτρηση κηλίδων σε καθεμία από τις Ομάδες, σύμφωνα με τον ακόλουθο αλγόριθμο:

- Το αποτέλεσμα της δοκιμασίας είναι «Θετικό» εάν (Ομάδα Α μείον μάρτυρας Nil) ή/και (Ομάδα Β μείον μάρτυρας Nil)  $\geq 6$  κηλίδες.
- Το αποτέλεσμα της δοκιμασίας είναι «Αρνητικό» εάν (Ομάδα Α μείον μάρτυρας Nil) και (Ομάδα Β μείον μάρτυρας Nil)  $\leq 5$  κηλίδες. Αυτό περιλαμβάνει τιμές μικρότερες του μηδενός.

**Ένα «Θετικό» αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι το δείγμα περιέχει δραστικά T κύτταρα αντιδρώντα στο *M. Tuberculosis*.**

**Ένα «Αρνητικό» αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι το δείγμα πιθανώς δεν περιέχει δραστικά T κύτταρα αντιδρώντα στο *M. Tuberculosis*.**

### **Χαρακτηριστικά απόδοσης εξέτασης**

Η **ειδικότητα** αξιολογήθηκε μέσω της εξέτασης 93 δειγμάτων από δότες οι οποίοι κρίθηκαν από το ιατρικό ιστορικό και από προσωπικές πληροφορίες ότι είναι χαμηλού κινδύνου για λοίμωξη με *M. tuberculosis*. Η ειδικότητα της εξέτασης T-SPOT.TB υπολογίστηκε ως 100% (93/93) (95% όρια εμπιστοσύνης 95,8 % - 100 %).











Η **ευαισθησία** αξιολογήθηκε μέσω της εξέτασης 87 δειγμάτων από περιπτώσεις λοίμωξης *M. tuberculosis* επιβεβαιωμένες από καλλιέργειες περιλαμβανομένων Ανοσοκατασταλμένων ομάδων. Η ευαισθησία της εξέτασης T-SPOT.TB υπολογίστηκε ως 98,8% (86/87) (95% όρια εμπιστοσύνης 90,8 % - 99,9 %).

Η **Επαναληψιμότητα** αξιολογήθηκε, ως υποκατάστατος δείκτης της διακύμανσης για την εξέταση, μέσω ανάλυσης εις διπλούν δειγμάτων αίματος που Εκτελέστηκαν στην ίδια πλάκα. Συνολικά 145 δείγματα αίματος από 140 μεμονωμένους δότες εξετάστηκαν εις διπλούν (δύο μικροκυψελίδες για κάθε Ομάδα Α και Ομάδα Β) χρησιμοποιώντας την εξέταση T-SPOT.TB. Σε 142/145 (97,9 %) αναλύσεις εις διπλούν, παρατηρήθηκε κλινική συμφωνία. Δύο αναλύσεις εις διπλούν έδωσαν ασύμφωνα οριακά αποτελέσματα και μόνο 1/145 δείγματα έδωσαν αντιφατικά αποτελέσματα.

## Αναφορές

1. Janeway and Travers (1996) *Immunobiology* 2<sup>nd</sup> Ed.
2. Staines *et al* (1999) *Introducing Immunology* 2<sup>nd</sup> Ed.
3. Chapman *et al* (2002) *AIDS*, **16** (17): 2285-2293.
4. Ewer *et al* (2003) *Lancet*, **361**: 1168-1173.
5. See [www.elispot-analyzers.de/english/science-elispot-assays.html](http://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.

## Γλωσσάριο συμβόλων

-  Χρήση έως/Ημερομηνία λήξης (Έτος-Μήνας-Ημέρα)
-  Αριθμός παρτίδας
-  Αριθμός καταλόγου
-  Προσοχή, βλ. οδηγίες χρήσης
-  Κατασκευαστής
-  Επαρκές για δοκιμασίες “n”
-  *In vitro* διαγνωστική συσκευή
-  Περιορισμός θερμοκρασίας/Διατηρήστε σε θερμοκρασία μεταξύ
-  Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
-  Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος για την ΕΕ

### Στοιχεία επικοινωνίας

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

Για λήψεις υλικού υποστήριξης προϊόντων και περισσότερες τεχνικές πληροφορίες, επισκεφτείτε την ιστοσελίδα μας:

[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

Τα T-SPOT, T-Cell *Xtend* και το λογότυπο Oxford Immunotec είναι σήματα κατατεθέντα της Oxford Immunotec Limited.

Το T-Cell *Select* είναι εμπορικό σήμα της Oxford Immunotec Limited.

Τα AIM-V και GIBCO είναι εμπορικά σήματα της Life Technologies Corporation.

Τα CPT και Vacutainer είναι εμπορικά σήματα της Becton, Dickinson and Company.

Τα Ficoll και Ficoll-Paque είναι σήματα κατατεθέντα της Cytiva, θυγατρικής της Global Life Sciences Solutions USA LLC.

Η χρήση του αντιδραστηρίου T-Cell *Xtend* προστατεύεται από τα ακόλουθα διπλώματα ευρεσιτεχνίας και διπλώματα ευρεσιτεχνίας που βρίσκονται στο στάδιο της έγκρισης: EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Αριθμός αναθεώρησης: 5 Ημερομηνία έκδοσης: Νοέμβριος 2023  
© Oxford Immunotec Limited, 2023. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

### 🏢 Κατασκευαστής

Oxford Immunotec Ltd  
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon  
Oxfordshire, OX14 4SE, UK  
[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

 Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος για την Ευρωπαϊκή Ένωση

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



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



[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)