

T-SPOT[®]. TB

 Oxford
Immunotec
a PerkinElmer company

Segítség a tuberculosis-fertőzés diagnosztikájában

HASZNÁLATI UTASÍTÁS

In Vitro diagnosztikai felhasználásra

A Termékismertető az alábbi termék alkalmazásának leírását tartalmazza:

T-SPOT. TB 8 (Többször használható 8 lyukú mikrotiter lemezcsík.
Katalógusszám: TB.300)

Tartalomjegyzék	Oldal
Felhasználási terület	2
Bevezetés	2
Az eljárás alapjai	2
Kikötések	3
Biztonsági figyelmeztetések és óvintézkedések	4
A készletben található anyagok	4
Tárolás	4
Stabilitás	4
Szükséges, de a készletben nem megtalálható felszerelések és anyagok	5
A reagens elkészítése	5
Eljárás	6
Mintavétel és előkészítés	6
Sejtszámlálás és hígítás	8
A lemez felosztása és inkubálás	9
A foltok előhívása és számlálása	10
Minőségkontroll	11
Az eredmények értelmezése és tesztértékelési kritériumok	11
A teszt teljesítménymutatói	12
Irodalomjegyzék	12
Szimbólumok jegyzéke	12

Felhasználási terület

A T-SPOT®.TB teszt a *Mycobacterium tuberculosis* antigének általi stimulációra reagáló effektor T-sejtek detektálására alkalmas *in vitro* diagnosztikai teszt, amely segédeszközként használható a tuberculosis (TB) fertőzés diagnosztikája során. A T-SPOT.TB teszt olyan egyszerűsített enzimkapcsolt immunospot (ELISPOT) módszer, amely lehetővé teszi az egyes TB-specifikusan aktivált effektor T-sejtek megszámlálását.

Bevezetés

Az Egészségügyi Világszervezet becslései szerint a világ népességének mintegy harmada fertőzött *M. tuberculosis*szal. Minden olyan egyénnél, aki látens TB-fertőzőshordozó (LTBI) , körülbelül 10%-os eséllyel fejlődik ki az aktív megbetegedés. Ez az arány magasabb bizonyos csoportok esetében, amelyekbe a nemrégiben megfertőződtek, valamint a legyengült immunrendszerrel rendelkezők is beletartoznak.

A *M. tuberculosis* hatására kialakuló immunválasz túlnyomórészt sejtmediált immunválasz. E válasz részeként a T-sejtek szenzitizálódnak a *M. tuberculosis* antigénekkal szemben. A vérből specifikusan szeparált aktivált effektor T-sejtek – a CD4 és CD8 sejtek egyaránt – megszámlálhatók a fenti antigénekkal való *in vitro* stimulálhatóságuk alapján.^{1,2} A *M. tuberculosis* komplexre (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*) jellemző válogatott antigének alkalmazása javítja a teszt specifitását ezen organizmusokra vonatkozóan, mivel csökken a BCG-vakcinával és a legtöbb környezeti myobacteriummal való keresztreakció valószínűsége. ^{3,4} A vizsgálat szenzitivitásának optimalizálása érdekében két olyan antigénpanelt alkalmazunk, melyek a jól karakterizált ESAT-6 és CFP10 fehérjéket utánozzák.

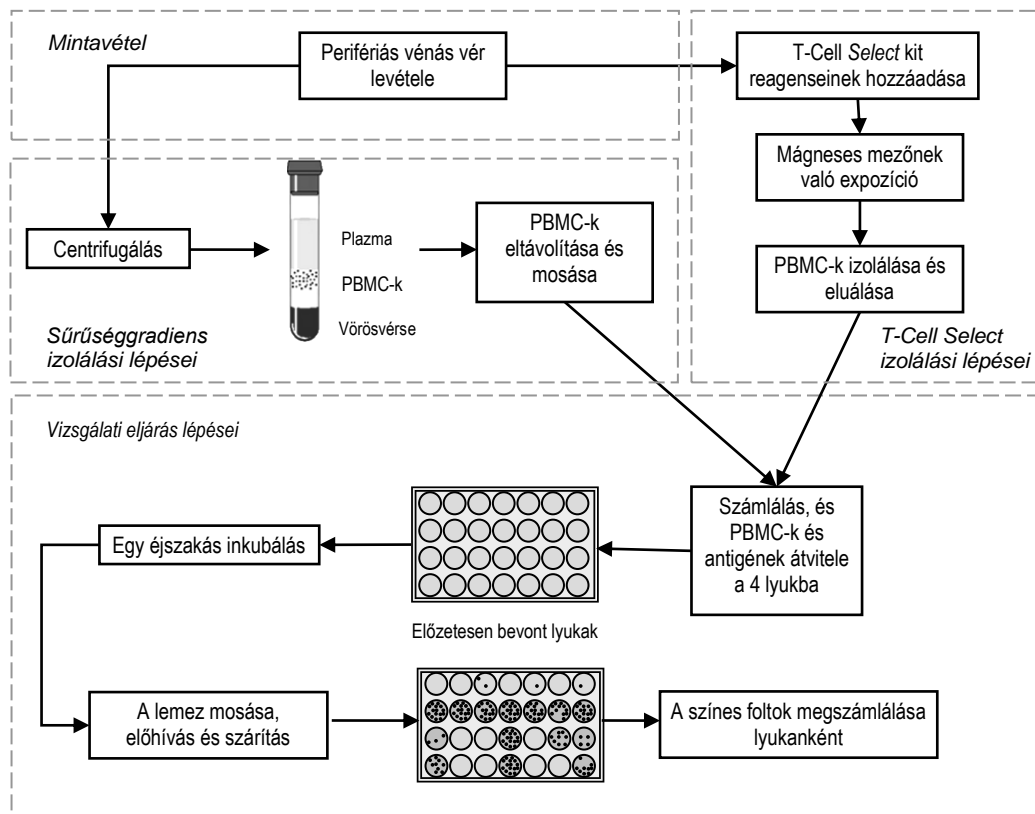
A T-SPOT.TB teszt egy ELISPOT vizsgálati technika egyszerűsített változata. Az ELISPOT tesztek kivételesen érzékenyek, mivel a cél-citokin befogása közvetlenül az azt szecernáló sejt közelében történik meg, mielőtt a citokin elvegyülne a felülúszóban, kötődne a környező sejtek receptoraihoz, vagy lebomlana. Emiatt az ELISPOT tesztek sokkal érzékenyebbek, mint a hagyományos ELISA tesztek.⁵ A T-SPOT.TB teszt lényege, hogy detektálja a *M. tuberculosis*-ra specifikus antigének általi stimulációra reagáló effektor T-sejteket.^{3,4,6-9} A teszt segítségével megszámlálhatók az egyes aktivált TB-specifikus T-sejtek. Korra, nemre, etnikumra, kezelésre vagy immunstátuszra való tekintet nélkül a teszt minden olyan beteg esetében alkalmazható, akinél fennáll az LTBI vagy a TB betegség gyanúja^{10,11}.

Az eljárás alapjai

A teljes vérmintától el kell különíteni a perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC), és meg kell mosni, hogy eltávolítsunk minden zavaró háttérjelet. Ezt követi a PBMC-k megszámlálása azért, hogy a teszt során standardizált sejtszámot alkalmazzanak. Ezáltal biztosítható, hogy még azoknál a személyeknél is megfelelő számú sejt kerüljön a mikrotiter lyukakba, akiknél az immunrendszer gyengülése miatt a T-sejtek titere csökkent (immunkárosodás, illetve immunszuppresszió). A mosási és számlálási lépések és az ELISPOT technika kimagasló eredményességet biztosítanak a TB betegség és látens TB fertőzés észlelése terén.

Minden minta esetén négy lyuk szükséges (lásd 1. ábra):-

1. Null-kontroll a nem specifikus sejtaktiváció felismerésére.
2. TB-specifikus antigének, „A” Panel (ESAT-6).
3. TB-specifikus antigének, „B” Panel (CFP10).
4. Phytohaemagglutinint (PHA, ismert poliklonális aktivátor¹²) tartalmazó pozitív kontroll a PBMC-k működőképességének igazolására.



1. ábra: A T-SPOT.TB teszt fő lépései. Felhívjuk a figyelmét, hogy minden lemez 96 lyukat tartalmaz.

A PBMC-eket az antigénnel együtt inkubáljuk, hogy a jelen lévő szenzitizált T-sejtek stimulációjára sor kerülhessen. A szecernált citokint a lyuk bázisát alkotó membránon lévő specifikus antitestek kötik meg; a többi felesleges anyag mosással eltávolítható. Ezután alkalikus foszfatázzal konjugált, a citokinmolekula eltérő epitópjához illeszkedő második antitestet adunk a rendszerhez, amely kötődik a membrán felszínén csapdába esett citokinhez. A kötésbe nem lépő konjugátumokat mosással eltávolítjuk. Minden lyukba szolubilis szubsztrátot adunk; ezt a megkötött enzim hasítja, és így foltként megjelenő oldhatatlan precipitátum keletkezik a reakció helyén. Mindegyik folt egy citokint szecernáló T-sejt lenyomatának felel meg, és a foltok számának meghatározásával megállapítható a *M. tuberculosis*-ra szenzitív effektor T-sejtek mennyisége a perifériás vérben.

Kikötések

- Kizárólag *in vitro* diagnosztikai alkalmazásra.
- Kizárólag professzionális felhasználásra.
- A különböző készletekből származó összetevők nem keverhetők.
- Használat előtt figyelmesen olvassa el a teszt útmutatóját.
- A reagensek, reakciólyukak, sejtszuspenziók és sejttenyésztő médiumok kontaminálódásának elkerülése érdekében aseptikus technika alkalmazása javasolt.
- Az itt javasolt pipettázási és mosási technikák, inkubációs idők és/vagy hőmérsékletek megváltoztatása befolyásolhatja a vizsgálat eredményét, ezért kerülendő.
- A vérminta levételének és előkészítésének a teszt előtt 8 órán belül meg kell történnie. Ez az időkorlát kiterjeszhető a T-Cell Select™ reagens kit vagy a T-Cell Xtend® reagens alkalmazásával (beszerezhető az Oxford Immunotec-től). Amennyiben a T-Cell Select reagens kitet a T-SPOT.TB teszttel használják, a minta tárolási ideje 54 órára nő, a sejtzolálási folyamat pedig automatizálható. Amennyiben T-Cell Xtend reagenst vagy más granulocita depléciós módszert használ a T-SPOT.TB teszthez, akkor a minta tárolhatósága 32 órára növekszik.
- A vérminták tárolása és laboratóriumba szállítása szobahőmérsékleten (18-25 °C) történjen, a T-Cell Select reagens kittel használandó vérmintákat is beleértve. Ha T-Cell

Xtend reagenst kíván alkalmazni, akkor a minták 10-25 °C-on szállíthatók és tárolhatók. A teljes vérminta hűtése és fagyasztása tilos.

- A T-SPOT.*TB* teszt felhasználása és értelmezése csak a teljes klinikai kép kontextusában történhet.
- A negatív vizsgálati eredmény nem zárja ki a *M. tuberculosis* expozíció vagy fertőzés lehetőségét.
- Az ESAT-6 és CFP10 antigének nincsenek jelen a BCG törzsekben és a legtöbb környezeti mycobacteriumban, kivéve *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} és *M. goodii*.

Biztonsági figyelmeztetések és óvintézkedések

Az emberi eredetű anyagok kezelése során elővigyázatosság szükséges. Minden vérmintát potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni.

A vérminták és a tesztkészlet elemeinek kezelése, alkalmazása, tárolása és megsemmisítése során a biológiai veszélyességgel kapcsolatos vonatkozó nemzeti irányelvek illetve szabályozások értelmében kell eljárni.

A kémiai anyagok alkalmazása során elővigyázatosság szükséges. Minden kémiai anyagot potenciálisan veszélyesnek kell tekinteni.

A készletben található anyagok

A T-SPOT.*TB* 8 készlet tartalma:

1. 1 mikrotiter lemez (CW.300): 96 lyuk, 12 x 8 lyukú lemezcsíkként keretben, melyek fala az interferon-gamma (IFN- γ) citokin ellen termelt monoklonális egér-antitesttel van bevonva.
2. 2 ampulla (PA.300, egyenként 0,8 mL) „A” Panel: ESAT-6 antigéneket, szarvasmarha szérum albumint és antimikrobás anyagokat tartalmaz.
3. 2 ampulla (PB.300, egyenként 0,8 mL) „B” Panel: CFP10 antigéneket, szarvasmarha szérum albumint és antimikrobás anyagokat tartalmaz.
4. 2 ampulla (CP.300, egyenként 0,8 mL) Pozitív Kontroll: a sejtek működőképességének ellenőrzésére phytohaemagglutinint (PHA), szarvasmarha szérum albumint és antimikrobás anyagokat tartalmaz.
5. 1 ampulla (CR.300, 50 μ L) 200-szorosára koncentrált Konjugált Reagens: interferon-gamma (IFN- γ) citokin ellen termelt monoklonális egérantitest alkalikus foszfatázzal konjugálva.
6. 1 üveg (SR.300, 25 mL) Szubsztrátoldat: felhasználásra kész BCIP/NBT^{plus} oldat.
7. Használati Utasítás, amely a CD-n található a Biztonsági Adatlappal (MSDS), Képzési útmutatóval, T-SPOT sejt-hígítási számológéppel, konjugátum-hígítási számológéppel, a centrifugasebesség átváltására szolgáló segédprogrammal és a T-SPOT.*AutoReporter* programmal együtt.

Tárolás

A készlet minden eleme 2-8 °C között tárolandó.

A Szubsztrátoldatot nem szabad hosszú távú fényhatásnak kitenni.

Stabilitás

A különböző készletekből származó összetevők nem keverhetők. A bontatlan készlet 2–8 °C között tárolandó. A készlet elemei az előírt feltételeknek megfelelő tárolás és kezelés mellett a dobozra nyomtatott lejárat dátumig stabilak. A készletet a címkén feltüntetett lejárat dátumon túl tilos felhasználni.

A felbontott készlet elemei 2–8°C között tárolandók. A felbontott elemek a felbontást követő 8 héten belül felhasználandók.

Szükséges, de a készletben nem megtalálható felszerelések és anyagok

1. 8 lyukú lemezcsíkok kerete (beszerezhető az Oxford Immunotec-től) a T-SPOT.TB 8 készlethez.
2. II. osztályú mikrobiológiai fülke (ajánlott).
3. Vérvételi csövek, például Vacutainer® CPT™ (beszerezhető az Oxford Immunotec-től), heparinizált kémcsövek vagy citrártartalmú kémcsövek.
4. Ficoll®-Paque* Plus vagy egyéb PBMC szeparáló anyag.
5. A legfeljebb 32 órával korábban levett minták esetében a T-Cell *Xtend* reagenst (beszerezhető az Oxford Immunotec-től) alkalmazhatja. A legfeljebb 54 órával korábban levett minták esetében a T-Cell *Select* reagens kitet (beszerezhető az Oxford Immunotec-től) alkalmazhatja. A legfeljebb 32 órán keresztül tárolt mintákhoz már granulocita depléciós módszert is lehet használni. A vevőnek ebben az esetben saját laboratóriumában kell validálni a másik módszert.
6. A Leucosep csövek alkalmazásával egyszerűsítheti a PBMC-k Ficoll*-módszerrel végzett szeparálását.
7. Centrifuga a PBMC előkészítéséhez (legalább 1800 x g elérésére alkalmas, és képes a mintákat szobahőmérsékleten tartani (18-25 °C)).
8. A szeparált PBMC előkészítésére és mosására sejtmosó centrifugát, például DiaCent-CW centrifugát (Bio-Rad) lehet használni. A vevőnek saját laboratóriumában magának kell validálnia ennek a készüléknek a használatát.
9. A PBMC-k számolásához szükséges eszközök és reagensek; manuális módszer esetében tripánkéék és mikroszkópra szerelt hemocitóméter, vagy automata eljárás esetén megfelelő hematológiai analízátor.
10. 37±1 °C fenntartására alkalmas párasított inkubátor, amiben 5 %-os CO₂ szintet lehet fenntartani.
11. Mikrotiter lemezmosó vagy a lemezek manuális mosásához szükséges eszközök.
12. Pipetták és steril pipettavégek.
13. Steril D-PBS-oldat: például GIBCO® 1x D-PBS (Invitrogen; katalógusszám: 14040-091).
14. Desztillált vagy ionmentes víz.
15. A lemez leolvasására alkalmas eszköz, például mikroszkóp, digitális mikroszkóp nagyítóüveg vagy lemezolvasó (ELISPOT Plate Imager).
16. Steril sejttenyésztő médium, például GIBCO AIM-V® (Invitrogen; katalógusszám: 31035-025); a fenti szérumentes médium alkalmazása az inkubáció során erősen ajánlott. Az RPMI 1640 (Invitrogen; katalógusszám: 21875-034) csak a minta előkészítésének kezdeti szakaszán alkalmazható. Javasolt, hogy a sejttenyésztő médiumot megfelelő aliquotokban tárolják, és a többletet használat után semmisítsék meg. A sejttenyésztő médiumot a T-SPOT.TB teszttel való felhasználás előtt 37 °C-ra kell melegíteni.

A reagens elkészítése

1. Mikrotiter lemez. A T-SPOT.TB 8 mikrotiter lemez használatra kész állapotban kerül forgalomba. A tárolóból vegye ki a szükséges számú 8 lyukú lemezcsíkot, és hagyja szobahőmérsékleten akklimatizálódni. A maradék lemezcsíkok külső fóliacsomagolását a nedvszívó tasakkal együtt zárja vissza.
2. A *M. tuberculosis* ESAT-6 antigén („A” Panel) ampullák használatra kész állapotban kerülnek forgalomba.
3. A *M. tuberculosis* CFP10 antigén („B” Panel) használatra kész állapotban kerülnek forgalomba.
4. A Pozitív Kontroll ampullák használatra kész állapotban kerülnek forgalomba.
5. Készítsen 1:200 hígítású Konjugált Reagens munkaoldatot. Számolja ki a szükséges Konjugált Reagens munkaoldat mennyiségét (lásd a T-SPOT konjugátumhígítási számológépet, amelyet minden tesztkészlethez mellékeltek CD-n megtalál). A reagenst közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni, vagy legfeljebb a munkakonzentrációig (1:200) lehet elkészíteni és azt maximum 6 hétig lehet 2–8 °C között tárolni a felhasználás előtt. Ne használja a hígított reagenst ezen az élettartamon túl.
6. A Szubsztrátoldat használatra kész állapotban kerül forgalomba. A raktárból kiemelve hagyja szobahőmérsékleten akklimatizálódni.

Eljárás

A tesztet a Helyes Laboratóriumi Gyakorlat alapelveinek szem előtt tartásával és jelen alkalmazási útmutató szigorú követésével kell végezni.

Az Oxford Immunotec Ltd kidolgozott egy Képzési útmutatót, amely leírja a mintavétel és előkészítés, a sejtenyésző médium kiválasztása és a foltszámláló módszerek laboratóriumainkban kiértékelt módozatait. Az útmutató elérhető a minden tesztkészlethez mellékelt CD-n, illetve az alábbi telefonszámon: +44 (0) 1235 442780, vagy letölthető a www.oxfordimmunotec.com oldalról.

Mintavétel és előkészítés

Az egyes felhasználóknak ki kell értékelniük a PBMC-k gyűjtésére és a PBMC-k megszámlálására szolgáló eljárásaikat, és a T-sejt működőképességének megőrzésére megfelelő médiumot kell választaniuk a teszt elsődleges inkubálási fázisában. Immunkompetens betegeknél jellemzően elegendő PMBC nyerhető ki a vizsgálat céljára a vénás vérmintákból, az alábbi irányelvek követésével:

- Felnőttek és 10 éves vagy annál idősebb gyermekek: egy 8 mL-es vagy két 4 mL-es CPT cső, vagy egy 6 mL-es heparinos vagy citrátos cső
- 2-9 éves gyermekek: egy 4 mL-es CPT, heparinos vagy citrátos cső
- Gyermekek 2 éves korig: egy 2 mL-es gyermekgyógyászati cső

A vérmintákat szobahőmérsékleten kell tárolni, és a vérvételtől számított 8 órán belül el kell végezni a tesztet, amennyiben a mintát T-Cell *Xtend* reagenssel kezeli, akkor a minta 10-25 °C-on történő tárolását követően 32 órán belül el kell végezni a vizsgálatot, vagy ha a T-Cell *Select* reagens kitet használja, akkor 54 órán belül, 18-25 °C-on való tárolást követően.

A sejtenyésző médiumot a T-SPOT.TB tesztrel való felhasználás előtt 37 °C-ra kell melegíteni.

Eljárás	Megjegyzések
<p>1. A vérvételi eszközhöz mellékelt útmutatásnak megfelelően végezze el a vérvételt. A levett vért tárolja szobahőmérsékleten (18-25 °C), vagy a T-Cell <i>Xtend</i> reagens alkalmazása esetén 10-25 °C-on. Ne hűtse vagy fagyassza.</p>	<p>1. A vérminták levétele különféle csövekbe történhet. Laboratóriumunkban sikerrel alkalmaztuk a Vacutainer citrát CPT, heparin CPT és standard heparin vagy citrát csöveket. A CTP csövek nem használhatók a T-Cell <i>Xtend</i> reagenssel. Az EDTA csöveket nem javasoljuk.</p>
<p>2. CPT vérvételi csövek használata esetén kövesse a gyártó utasításait a PBMC-k szeparációja során.</p> <p>Ha heparin vagy citrát tartalmú vákuumcsövet használ a vérminták levételéhez, a PBMC-k szeparálásához végezzen centrifugálást Ficoll-Paque Plus-szal, a publikált eljárásrendnek megfelelően.</p> <p>Ha Leucosep csöveket, a T-Cell <i>Select</i> reagens kitet vagy a T-Cell <i>Xtend</i> reagenst használ (beszerezhető az Oxford Immunotec-től), kövesse a reagensekhez megadott protokollokat.</p>	<p>2. A 8 mL-es CPT csöveket centrifugálja 1600 x g-vel 28 percig, vagy a 4ml-es CPT csöveket 1800 x g-vel 30 percig, 18 °C-on, amennyiben hűthető centrifuga rendelkezésre áll. Amennyiben előzőleg alacsonyabb hőmérsékletet használt, hagyja, hogy a centrifuga hőmérséklete elérje a 18 °C-ot. Ha nem hűthető centrifugát használ, akkor biztosítsa, hogy a hőmérséklet ne emelkedjen 25 °C fölé.</p> <p>Más esetben hígítsa a vért azonos térfogatú RPMI médiummal. A hígított vért (2-3 térfogategység) óvatosan rétegezze a Ficoll-Paque Plus-ra (1 térfogategység), és centrifugálja 1000 x g-vel 22 percig, miközben a hőmérsékletet 18-25 °C között tartja.</p> <p>A vérvételt követően 8–32 órán keresztül tárolt minták esetében használja a T-Cell <i>Xtend</i> reagenst, mielőtt a mintát a Ficoll-Paque-Plus-ra rétegi.</p> <p>A vér levételét követően legfeljebb 54 óráig tárolt minták esetében kövesse a T-Cell <i>Select</i> reagens kithoz adott protokollt.</p> <p>A minden tesztkészlethez mellékelt CD-n megtalálható segédprogram segít átváltani a x g és az rpm-ben megadott értékeket.</p> <p>Amennyiben más PBMC szeparációs módszert alkalmaz, akkor ezeket a vevőnek validálnia kell a T-SPOT. <i>TB</i> teszttel való használatra.</p>
<p>3a. Pipetta használatával nyerje ki a fehér, felhőszerű PBMC sávot, és töltsse fel 15 mL-es kúpos centrifugacsőbe. Töltsse fel 10 mL-ig sejtenyészítő médiummal.</p> <p>3b. Más esetben sejtmosó centrifugát, például DiaCent-CW-t (BioRad) is lehet alkalmazni a sejtmosás fázisainak elősegítésére. Amennyiben ezt a módszert alkalmazza, akkor DPBS-t használjon sejtmosásra.</p>	<p>3a. Különféle médiumok használhatók a sejtek mosására az eljárás során. Laboratóriumainkban az AIM-V és RPMI 1640 médiumokat egyaránt sikerrel alkalmaztuk, ezeket javasoljuk.</p> <p>3b. A PBMC elkészítése során a sejtmosásra használt centrifuga módszertanát az Oxford Immunotec biztosítja. A vevőknek azonban a módszert saját laboratóriumukban is validálniuk kell.</p>
<p>4. Végezzen 7 percen keresztül 600 x g centrifugálást. Öntse le a felülúszót, és oldja fel a pelletet 1 mL médiumban.</p>	<p>4. Lásd 3a. pont.</p>
<p>5. Töltsse fel a csövet 10 mL-ig friss médiummal, és végezzen 7 percen keresztül 350 x g centrifugálást.</p>	<p>5. Lásd 3a. pont.</p>

Eljárás	Megjegyzések
6. Öntse le a felülúszót, és keverje el az üledéket 0,7 mL AIM-V tenyésztő médiumban.	6. Ebben a fázisban az egyéjszakás inkubáláshoz való médiumot kell alkalmazni az üledék elkeverésére. Laboratóriumainkban szérumentes AIM-V médiumot használtunk sikerrel, és ezt erősen javasoljuk.

Egyéb testnedvekből, például bronchoalveolaris mosásból (BAL), pleurális folyadékgyüleméből (PE) vagy cerebrospinális folyadékból (CSF) nyert T-sejteket sikeresen használtak a T-SPOT.TB vizsgálatban TB-fertőzés és -betegség felismerésére (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 és Patel *et al* (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77). Nem vérből nyert minták használata esetén a felhasználóknak validálniuk kell az elegendő mononukleáris sejt gyűjtésére vonatkozó eljárást. A BAL-minták feldolgozási módszerének leírása megtalálható a fenti publikációkban.

1. megjegyzés: Nem vérből nyert minták használata esetén a pozitív eredmény küszöbértékei valamint a vizsgálat érvényességének ellenőrzése még nincs széleskörűen értékelve, és eltérhet a vérvizsgálatétól. A felhasználóknak meg kell határozniuk a vizsgálatok értékelésének kritériumait. Az orvosoknak az eredmények áttekintésekor kellő mérlegeléssel kell eljárniuk.

2. megjegyzés: A minta kinyerése és a teszt megkezdése közötti időre vonatkozóan nincsenek kiterjedt vizsgálati eredmények.

Sejtszámlálás és hígítás

A T-SPOT.TB teszt alkalmazása során lyukanként $2,5 \times 10^5$ életképes PBMC szükséges. Minden betegmintához összesen négy lyuk szükséges. Minden lyukba megfelelő számú sejtet kell helyezni. Amennyiben ezt nem sikerül megvalósítani, az az eredmények hibás értelmezéséhez vezethet.

Eljárás	Megjegyzések
1. Az életképes sejtek megszámlálása.	1. A sejtek megszámlálása különféle módszerekkel történhet, így manuálisan, tripánkék és hemocitóméter alkalmazásával, vagy automatikusan, megfelelő berendezés segítségével.
2. Röviden: Neubauer hemocitóméterrel végzett manuális számláláshoz a végső sejtszuszpenzióból 10 µL-t adjon 40 mL 0,4 %-os (w/v) tripánkék oldathoz. Helyezzen az elegyből megfelelő mennyiséget a hemocitóméterre, és számolja meg a rácson belül lévő sejteket. Más típusú haemocytométerek illetve automata eszközök esetén kövesse a gyártó útmutatását.	2. Ügyelni kell arra, hogy közvetlenül az aliquot-ok hígításra vagy számlálásra való eltávolítása előtt a szuszpenziót alaposan felkeverjék. A sejtek a cső aljára ülepedhetnek, ami a sejtszám téves megítéléséhez vezethet.
3. Számítsa ki az alap sejtoldatban lévő életképes sejtek koncentrációját.	3. Győződjön meg arról, hogy az alkalmazott sejtszámláló rendszer pontosan számol, mivel a szükségesnél kisebb vagy nagyobb számú sejt felhasználása egyaránt az eredmény helytelen értelmezéséhez vezethet. A minden tesztkészlethez mellékelt CD-n megtalálható T-SPOT sejthígítási számológép segít ennek kiszámításában.
4. Készítsen 500 µL, $2,5 \times 10^5$ sejt/100 µL koncentrációjú oldatot a végső sejtszuszpenzióból.	4. Győződjön meg arról, hogy a sejteket alaposan elkeverte, mielőtt az aliquot-okat hígításra eltávolítaná.

A lemez felosztása és inkubálás

A T-SPOT.TB teszt alkalmazása során minden minta esetén négy lyuk felhasználása szükséges. Minden egyes minta mellett Null-kontrollt és a sejt működőképességét ellenőrző Pozitív Kontrollt is el kell végezni. Javasoljuk, hogy a mintákat függőlegesen vigyék fel a lemezre, az alább bemutatott módon.

- Null-kontroll
- „A” Panel
- „B” Panel
- Pozitív Kontroll

Eljárás	Megjegyzések
1. A T-SPOT.TB 8 használata esetén vegye ki az előzetesen bevont 8 lyukú lemezcsíkot a csomagolásból, helyezze a lemezkeretbe, és hagyja szobahőmérsékleten akklimatizálódni.	1. Csak a szükséges számú lemezcsíkot vegye ki, a többit zárja vissza a csomagolásba. Helyezze a felhasználandó lemezcsíkokat egy aljzattal és fedéllel ellátott üres lemezkeretbe. A keretek, aljzatok és fedelek megőrzendők és újra felhasználandók.
2. Minden betegmintánál 4 külön lyuk felhasználása szükséges; (i) Töltsön 50 µL AIM-V tenyésztő médiumot mindegyik null-kontroll lyukba. (ii) Töltsön 50 µL „A” Panel oldatot mindegyik megfelelő lyukba. (iii) Töltsön 50 µL „B” Panel oldatot mindegyik megfelelő lyukba. (iv) Töltsön 50 µL Pozitív Kontroll oldatot mindegyik sejt működőképesség ellenőrzésére szolgáló lyukba.	2. Ne érintse a pipettavéget a membránhoz. A pipettavég által okozott mélyedések a membránon műtermékeket hozhatnak létre a lyukakban. Szükség lehet a lemez finom ütögetésére annak érdekében, hogy az oldatok minden lyuk alján befedjék a membránt. A lyukak közötti antigén kereszt-kontamináció minimalizása érdekében kerülendő a durva behatás.
3. Az adott beteg mintájához használt mind a 4 lyukba helyezzen 100 µL-t a beteg végső sejtszuszpenziójából (250 000 életképes sejtet tartalmaz).	3. Az egyes 100 µL-es aliquot-ok eltávolítása előtt az alapos keveredés érdekében pipettával mozgassa a sejtszuszpenziót fel és le. Javasoljuk, hogy a betegek sejtjeinek minden egyes bejuttatása során használjon új pipettavéget, így elkerülhető a 4 lyuk közötti kereszt-kontamináció.
4. Inkubálja a lemezt párasított inkubátorban 37 °C-on, 5 % CO ₂ mellett 16-20 órán keresztül.	4. Az inkubátorban lévő lemezek mozgatása kerülendő. A lemezeket ne tegye egymásra, mert így a hőmérséklet-eloszlás és szellőzés egyenetlenné válik. A javasolt inkubációs idő és inkubációs körülmények be nem tartása az eredmények helytelen értelmezéséhez vezethet. Ellenőrizze, hogy elegendő mennyiségű víz van-e az inkubátorban ahhoz, hogy a készülék fenntartsa a megfelelő páratartalmat az inkubációs idő alatt.

A foltok előhívása és számlálása

A lemezmosás és az előhívás fázisában ne érintse meg a membránt a pipettavégekkel vagy automata lemezmosó végekkel. A pipetta vagy a lemezmosó végek által okozott mélyedések a membránon műtermékeket hozhatnak létre a lyukakban, ami zavaró lehet a foltok számlálása során.

Eljárás	Megjegyzések
1. Vegye ki a lemezt az inkubátorból.	1. Ha az eljárás során elkerülhetetlen kérés adódik, például forrásproblémák merülnek fel a hétvége alatt, akkor a lemezeket ki lehet venni az inkubátorból, és 2–8 °C-on lehet tárolni. A javasolt maximális tárolási idő 72 óra, és a lemezeket tárolás közben le kell fedni. Ezt a folyamatot a vevőknek saját laboratóriumukban is validálniuk kell.
2. Öntse ki a sejtenyésző médiumot és helyezzen 200 µL D-PBS-oldatot mindegyik lyukba.	2. Ekkor vegye ki a Szubsztrátoldatot a csomagból, és szobahőmérsékleten hagyja akklimatizálódni.
3. Öntse ki a D-PBS-oldatot. További 3 alkalommal ismétlje a lyuk mosását, minden mosáshoz használjon friss D-PBS-oldatot.	3. Mielőtt továbblépne, a lemezt nedvszívó papírra borítva távolítsa el a mosáshoz használt összes D-PBS-t.
4. A munkaoldat elkészítéséhez PBS-sel hígítsa a koncentrált Konjugált Reagenst 200-szorosára.	4. Ne használjon Tween®-t vagy egyéb detergenst tartalmazó D-PBS-t, mivel ez nagymennyiségű háttérjelet eredményez. A szükségesnél kevéssel több munkaoldatot készítsen (a véletlen veszteség pótlására). A T-SPOT.TB 8 esetén mindegyik 8 lyukú lemezcsíkhöz (ahol mindegyik lyukhoz 50 µL oldat szükséges) készítsen max. 500 µL munkaoldatot 2,5 µL koncentrált Konjugált Reagens és 497,5 µL D-PBS felhasználásával. A számításhoz felhasználhatja a minden tesztkészlethez mellékelt CD-n megtalálható konjugátumhígítási számológépet.
5. Helyezzen 50 µL Konjugált Reagens munkaoldatot mindegyik lyukba, és 2-8 °C-on inkubálja 1 órán keresztül.	5. A javasolt inkubációs idő be nem tartása az eredmények helytelen értelmezéséhez vezethet.
6. Öntse ki a konjugátumot, és végezzen négy PBS-mosást a 2. és 3. lépésben leírtaknak megfelelően.	
7. Helyezzen 50 µL Szubsztrátoldatot mindegyik lyukba, és szobahőmérsékleten inkubálja 7 percen keresztül.	7. A javasolt inkubációs idő be nem tartása az eredmények helytelen értelmezéséhez vezethet.
8. A detektálási reakció leállítása érdekében alaposan mossa ki a lemezt desztillált vagy ioncserélt vízzel.	
9. Jól szellőző helyen vagy maximum 37 °C-os sütőben hagyja a lemezt megszáradni.	9. A foltok a lemez száradása során egyre jobban láthatók lesznek. 37 °C-on 4 órás, szobahőmérsékleten egy éjszakás száradási idő szükséges.
10. Számolja meg és jegyezze fel mindegyik lyuk membránján a jól körülhatárolt, sötétkék foltok számát. Az eredmények értelmezése és tesztértékelési kritériumok (lásd alább) alkalmazásával határozza meg, hogy az adott minta a TB antigének szempontjából „pozitív” vagy „negatív”.	10. A foltok számos különféle módszerrel megtekinthetők. Manuálisan kézi nagyítóüveggel, megfelelő mikroszkóppal, digitális mikroszkóppal, illetve erre a célra készült ELISPOT lemezolvasó készülékkel is. A foltszámlálással kapcsolatos képzési útmutató (a T-SPOT.Tutor program) az Oxford Immunotec honlapján keresztül érhető el.

Minőségkontroll

Jellegzetesen a Null-kontroll lyukban egyáltalán nincs vagy csak kevés folt jelenik meg, míg a Pozitív kontroll lyukban több mint 20 folt látható.

Ha a Null-kontroll lyukban 10-nél több folt jelenik meg, a besorolás „Meghatározhatatlan”. A lehetséges okok tekintetében utalunk a T-SPOT.TB Képzési útmutatóra (letölthető a www.oxfordimmunotec.com oldalról). Az érintett személytől újból mintát kell venni és ismételt meg kell azt vizsgálni.

Jellegzetes esetben a sejtek működőképességét ellenőrző Pozitív kontroll lyukakban a foltok száma ≥ 20 vagy telítődést mutat (megszámlálhatatlanul sok folt). A betegek egy kis hányadánál a T-sejtek korlátozottan reagálnak a PHA-ra.^{13,14} Amennyiben a Pozitív kontroll foltok száma < 20 , a besorolás „Meghatározhatatlan”, kivéve, ha az „A” Panel vagy a „B” panel „pozitív”. Az eredmények értelmezése és tesztértékelési kritériumok alapján (lásd alább), mivel ilyen esetekben az eredmény érvényes.

A lehetséges biológiai és szisztematikus variációk miatt, amennyiben az („A” panel mínusz a Null-kontroll) illetve a („B” panel mínusz a Null-kontroll) közül a nagyobb 5, 6 vagy 7 pont, az eredmény határesetnek (bizonytalan) tekintendő. A határeset (bizonytalan) eredmények érvényesek ugyan, de kevésbé megbízhatóak, mint azon eredmények, amelyeknél a foltszám távolabb esik a küszöbértéktől. Éppen ezért javasolt egy új minta segítségével a beteg ismételt vizsgálata. Ha az eredmény az ismételt vizsgálat során még mindig határesetnek (bizonytalan) adódik, akkor más diagnosztikus vizsgálatok és/vagy epidemiológiai információ segítségével kell meghatározni a beteg TB-fertőzésre vonatkozó állapotát.

Bár az ESAT-6 és a CFP10 antigének nincsenek jelen a *M. bovis* BCG törzseiben és a legtöbb környezeti mycobacteriumban, lehetséges, hogy a „pozitív” T-SPOT.TB vizsgálati eredmény háttérben *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* vagy *M. gordonae* fertőzés áll. Amennyiben felmerül e fertőzések lehetősége, alternatív vizsgálómódszerekre van szükség.

Az eredmények értelmezése és tesztértékelési kritériumok

Az alábbi kritériumok alkalmazása előtt tekintse át a Minőségkontroll bekezdésben foglaltakat.

A T-SPOT.TB teszttel kapott vizsgálati eredmények interpretációja úgy zajlik, hogy az alábbi algoritmus szerint a panel összes lyukának foltszámából kivonják a Null-kontroll lyukában észlelt foltszámot:

- A vizsgálat eredménye „pozitív”, ha az („A” panel mínusz a Null-kontroll) és 6 vagy a („B” panel mínusz a Null-kontroll) ≥ 6 folt.
- A vizsgálat eredménye „negatív” ha az („A” panel mínusz a Null-kontroll) és a („B” panel mínusz a Null-kontroll) is ≤ 5 folt. Ebbe beletartoznak a nullánál kisebb értékek is.

A „pozitív” eredmény azt jelzi, hogy a minta *M. tuberculosis*-ra reagáló effektor T-sejteket tartalmaz.

A „negatív” eredmény azt jelzi, hogy a minta valószínűleg nem tartalmaz *M. tuberculosis*-ra reagáló effektor T-sejteket.

A vizsgálat teljesítménymutatói

Specifititás: 93 olyan donortól származó mintát vizsgáltunk, akiknél kórtörténetük és személyes tájékozódás alapján csekély volt a *M. tuberculosis* fertőzöttség kockázata. A T-SPOT.TB teszt specifititása 100%-nak adódott (93/93) (95%--os konfidencia-intervallum; 95,8% - 100%).











Szenzitivitás: 87 olyan mintát vizsgáltunk, melyek esetében tenyésztéssel *M. tuberculosis* fertőzés igazolódott; az alanyok között immunkárosodott egyének is voltak. A T-SPOT.TB teszt szenzitivitása 98,8%-nak adódott (86/87) (95%--os konfidencia-intervallum; 90,8% - 99,9%).

Reprodukálhatóság: a vizsgálaton belüli variáció helyettesítő markereként mértük fel: ugyanazon a lemezen duplikátumokban teszteltük a vérmintákat. A T-SPOT.TB teszt alkalmazásával 140 donortól összesen 145 duplikált vérmintát (két lyuk az "A" Panel és "B" Panel számára egyaránt) vizsgáltunk. A 145 duplikált analízis közül 142 esetben (97,9%) klinikai egyezést figyeltünk meg. Két duplikátum analízisnél határérték disszonancia jelentkezett, és a 145 közül csupán 1 mintánál tért el a két eredmény.

Irodalomjegyzék

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. See 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.

Szimbólumok jegyzéke

	Felhasználható/Lejárat dátum (Év-Hó-Nap)
	Tételszám
	Katalógusszám
	Figyelem, lásd az alkalmazási előírást
	Gyártó
	Elegendő "n" vizsgálatához
	<i>In vitro</i> diagnosztikus eszköz
	Hőmérséklet-korlátozás/Tárolás között
	Lásd az alkalmazási előírást
	EU meghatalmazott képviselő

Elérhetőségek

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

Letölthető terméktámogatási anyagokért és további technikai információkért kérjük, keresse fel weboldalunkat:

www.oxfordimmunotec.com

A T-SPOT, a T-Cell *Xtend* és az Oxford Immunotec logó az Oxford Immunotec Limited bejegyzett védjegye.

T-Cell *Select* az Oxford Immunotec Limited védjegye.

Az AIM-V és GIBCO a Life Technologies Corporation védjegye.

A CPT és Vacutainer a Becton Dickinson védjegye.

A Ficoll és a Ficoll-Paque a Cytiva, a Global Life Sciences Solutions USA LLC társult vállalkozása bejegyzett védjegye A Tween a Croda Americas LLC bejegyzett védjegye.

A T-Cell *Xtend* reagens használatát az alábbi szabadalmak és folyamatban lévő szabadalmak védik: EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Felülvizsgálat száma: 4 Kiadás időpontja: 2022. Július

© 2022, Oxford Immunotec. Minden jog fenntartva.

■ Gyártó:

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

 Európai Unió meghatalmazott képviselő:

Oxford Immunotec (Írország)
Unit 3d North Point House,
North Point Business Park,
New Mallow Road,
Cork, T23 AT2P
Ír Köztársaság



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

www.oxfordimmunotec.com

