

T-SPOT[®].TB

 Oxford
Immunotec
a PerkinElmer company

Um adjuvante no diagnóstico da infecção por tuberculose

FOLHETO INFORMATIVO

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

Este Folheto Informativo cobre a utilização de:

T-SPOT.TB 8 (Formato de placa de tiras de 8 poços para várias utilizações.
Número do catálogo: TB.300)

Índice	Página
Utilização prevista	2
Introdução	2
Princípios do procedimento	2
Limitações	3
Advertências e precauções de segurança	4
Materiais fornecidos	4
Conservação	4
Estabilidade	4
Equipamento e materiais necessários, mas não fornecidos	5
Preparação do reagente	5
Procedimento	6
Colheita e preparação da amostra	6
Contagem das células e diluição	8
Preparação da placa e incubação	9
Desenvolvimento e contagem de manchas	10
Controlo de qualidade	11
Interpretação dos resultados e critérios de teste	11
Características de desempenho da análise	12
Bibliografia	12
Glossário de símbolos	12

Utilização prevista

O teste T-SPOT®.TB é um teste de diagnóstico *in vitro* para a detecção de células T efectoras que respondem à estimulação por antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* e destina-se a ser utilizado como adjuvante no diagnóstico da infecção por tuberculose (TB). O teste T-SPOT.TB é um método imunoenzimático simplificado (ELISPOT) que enumera células T efectoras individuais activadas específicas da TB.

Introdução

A Organização Mundial de Saúde estima que um terço da população mundial se encontra infectada com *M. tuberculosis*. Cada indivíduo portador da infecção por TB no estado latente (LTBI) tem associada uma probabilidade de cerca de 10% de progredir para a doença activa. Esta taxa de progressão é elevada em certos grupos, incluindo aqueles que foram recentemente infectados e os que possuem um sistema imunitário debilitado.

A resposta imunitária à infecção com *M. tuberculosis* é predominantemente uma resposta imunitária mediada por células (IMC). Como parte desta resposta, as células T são sensibilizadas para os antígenos do *M. tuberculosis*. As células T efectoras activadas, tanto CD4 como CD8, especificamente separadas do sangue podem ser enumeradas pela sua capacidade de serem estimuladas *in vitro* por estes antígenos^{1,2}. A utilização de antígenos seleccionados do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) melhora a especificidade do teste para estes organismos, reduzindo a reactividade cruzada à vacina da BCG e à maior parte das micobactérias ambientais^{3,4}. Para otimizar a sensibilidade do teste utilizam-se dois painéis separados de antígenos, que simulam as bem caracterizadas proteínas ESAT-6 e CFP10.

O teste T-SPOT.TB é uma variante simplificada da técnica de análise ELISPOT. As análises ELISPOT são excepcionalmente sensíveis uma vez que citocina-alvo é directamente captada em volta da célula secretora, antes de ser diluída no sobrenadante, captada pelos receptores de células adjacentes ou degradada. Isto torna as análises ELISPOT muito mais sensíveis do que as análises ELISA convencionais⁵. O teste T-SPOT.TB foi concebido para a detecção de células T efectoras que respondem à estimulação por antígenos específicos do *M. tuberculosis*^{3,4,6-9}. O teste enumera células T individuais activadas específicas da TB, sendo indicado para utilização em todos os doentes em risco de LTBI ou com suspeita de terem contraído a tuberculose^{10,11}, independentemente da idade, sexo, grupo étnico, terapia ou estado imunitário.

Princípios do procedimento

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) são separadas de uma amostra de sangue total e lavadas para remoção de quaisquer fontes de sinais interferentes de fundo. As PBMCs são então contadas, para que um número estandardizado de células seja utilizado no teste. Isto assegura que mesmo no caso de pessoas com baixas titulações de células T devido ao enfraquecimento do seu sistema imunitário (os imunocomprometidos e os imunossuprimidos), o número de células adicionadas aos poços de microtitulação é adequado. As fases de lavagem e de contagem assim como a técnica ELISPOT permitem um desempenho superior na detecção da tuberculose e da infecção latente por tuberculose.

Para cada amostra são necessários quatro poços (ver Figura 1):-

1. Um Controlo Nulo para identificar a activação de células não específicas.
2. Antígenos específicos da TB, Painel A (ESAT-6).
3. Antígenos específicos da TB, Painel B (CFP10).
4. Um Controlo Positivo contendo fitoemaglutinina (PHA, um conhecido activador policlonal¹²), para confirmar a funcionalidade das PBMCs.

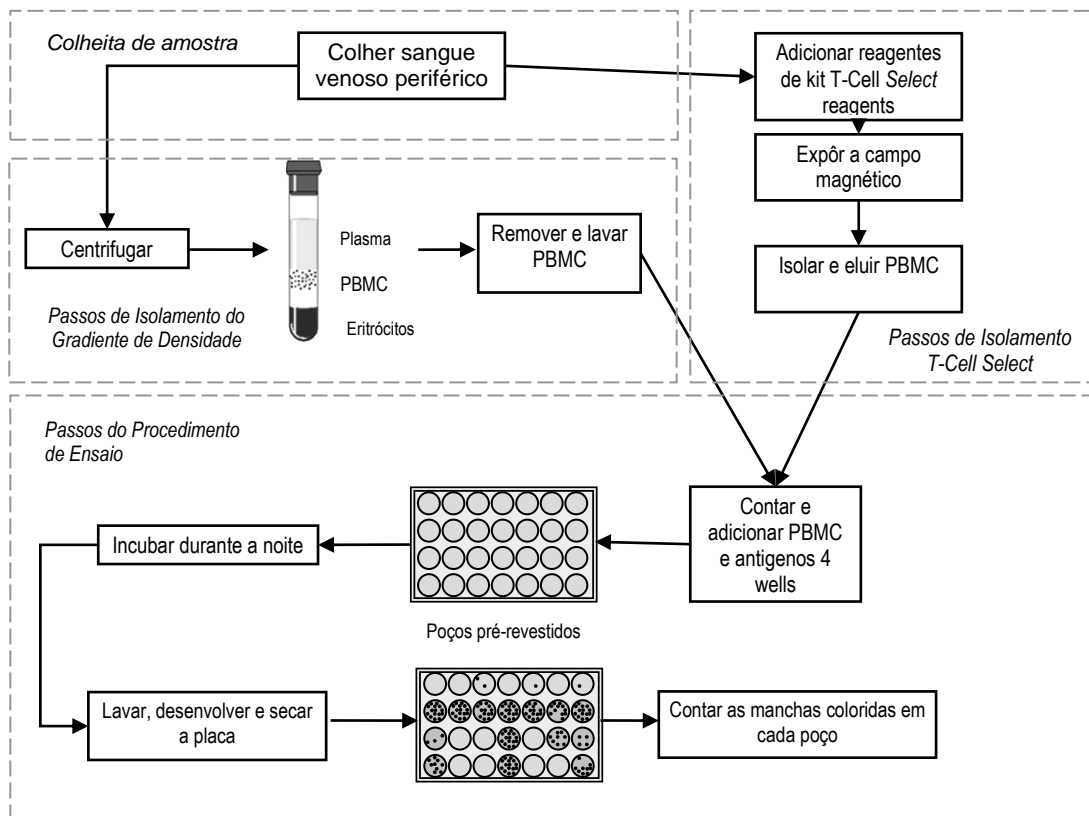


Figura 1: Os principais passos do teste T-SPOT.TB. De notar que cada placa contém 96 poços.

As PBMCs são incubadas com os antígenos para permitir a estimulação de quaisquer células T sensibilizadas presentes. A citocina segregada é captada pelos anticorpos específicos na membrana, que forma a base do poço, e as células e outros materiais indesejados são removidos por meio de lavagem. Um segundo anticorpo, conjugado a fosfatase alcalina e dirigido para um epítipo diferente na molécula da citocina, é adicionado e liga-se à citocina captada na superfície da membrana. Qualquer conjugado não ligado é removido por meio de lavagem. A cada poço é adicionado um substrato solúvel; este é clivado pela enzima ligada para formar uma mancha de precipitado insolúvel no local da reação. Cada mancha representa a zona de assentamento de uma célula T individual que segrega citocina e a avaliação do número de manchas obtidas fornece uma medida da abundância de células T efectoras sensíveis ao *M. tuberculosis* no sangue periférico.

Limitações

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- Apenas para uso profissional.
- Não misturar componentes provenientes de lotes de kits diferentes.
- Ler atentamente as instruções da análise antes de utilizar.
- Utilizar uma técnica asséptica para evitar a contaminação dos reagentes, dos poços de análise, das suspensões de células e dos meios de cultura de células.
- A variação das técnicas de pipetagem e de lavagem indicadas, dos tempos de incubação e/ou das temperaturas pode influenciar os resultados reais obtidos e deverá ser evitada.
- O sangue deve ser colhido e passado para a análise no prazo de 8 horas. Esta limitação temporal pode ser ultrapassada utilizando um kit de reagentes T-Cell *Select*[™] ou o reagente T-Cell *Xtend*[®] (disponível através da Oxford Immunotec). Quando se utiliza o kit de reagentes T-Cell *Select* com o teste T-SPOT.TB, o tempo de armazenagem das amostras é aumentado para 54 horas e o processo de isolamento celular pode ser automatizado. Quando se utiliza o reagente T-Cell *Xtend*, ou outro método de depleção de

granulócitos com o teste T-SPOT.TB, o tempo de armazenagem da amostra é prolongado para 32 horas.

- Conservar e transportar as amostras de sangue para o laboratório à temperatura ambiente (18-25 °C), incluindo amostras de sangue para utilização com o kit de reagentes T-Cell *Select*. Se utilizar o reagente T-Cell *Xtend*, as amostras podem ser transportadas e armazenadas a temperaturas de 10-25 °C. Não refrigerar nem congelar amostras de sangue total.
- O teste T-SPOT.TB deve ser utilizado e interpretado apenas no contexto do quadro clínico geral.
- Um resultado do teste negativo não exclui a possibilidade de exposição ao *M. tuberculosis* ou de infecção com o mesmo.
- Os antígenos ESAT-6 e CFP10 estão ausentes das estirpes de BCG e da maioria das micobactérias ambientais, com exceção de *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} e *M. goodnae*.

Advertências e precauções de segurança

Devem ser tomadas precauções ao lidar com material de origem humana. Todas as amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente infecciosas.

O manuseamento de amostras de sangue e de componentes de análises, a sua utilização, conservação e eliminação devem estar de acordo com os procedimentos definidos nas directrizes ou regulamentos nacionais apropriados em matéria de segurança contra riscos biológicos.

Devem ser tomadas precauções ao trabalhar com produtos químicos. Todos os produtos químicos devem ser considerados como potencialmente perigosos.

Materiais fornecidos

O kit T-SPOT.TB 8 contém:

1. 1 placa de microtitulação (CW.300): 96 poços, fornecidos como 12 tiras x 8 poços num suporte, revestidos com um anticorpo monoclonal de rato à citocina interferão gama (IFN- γ).
2. 2 frascos (PA.300, 0,8 mL cada) de Painel A: contém antígenos ESAT-6, albumina sérica bovina e agentes antimicrobianos.
3. 2 frascos (PB.300, 0,8 mL cada) de Painel B: contém antígenos CFP10, albumina sérica bovina e agentes antimicrobianos.
4. 2 frascos (CP.300, 0,8 mL cada) de Controlo Positivo: contém fitoemaglutinina (PHA), para utilização como controlo de funcionalidade das células, albumina sérica bovina e agentes antimicrobianos.
5. 1 frasco (CR.300, 50 μ L) 200x de Reagente do Conjugado concentrado: anticorpo monoclonal do rato contra a citocina IFN- γ conjugada a fosfatase alcalina.
6. 1 frasco (SR.300, 25 mL) de Solução de Substrato: solução BCIP/NBT^{plus} pronta para utilizar.
7. Instruções de Utilização, que se encontram no CD juntamente com a Folha dos Dados de Segurança do Material (MSDS), o Guia de Formação, a calculadora T-SPOT de diluições celulares, a calculadora de diluições do conjugado, a calculadora de velocidades da centrífuga e o programa T-SPOT.AutoReporter.

Conservação

Conservar todos os componentes do kit a 2-8 °C.

Evitar a exposição prolongada da Solução de Substrato à luz.

Estabilidade

Não misturar componentes entre lotes de kits diferentes. Conservar o kit não aberto a 2-8 °C. Os componentes do kit são estáveis até ao fim do prazo de validade impresso na embalagem do kit,

quando conservados e manuseados nas condições recomendadas. O kit não deve ser utilizado depois do prazo de validade indicado na respectiva etiqueta.

Conservar os componentes do kit não abertos a 2-8 °C. Os componentes abertos devem ser utilizados no prazo de 8 semanas a contar da abertura.

Equipamento e materiais necessários, mas não fornecidos

1. Suporte de placas de 8 poços (disponíveis através da Oxford Immunotec) para utilização com um kit T-SPOT. *TB 8*.
2. Hotte microbiológica da classe II (recomendado).
3. Tubos de colheita de sangue, como o Vacutainer® CPT™ (disponíveis através da Oxford Immunotec), tubos heparinizados ou tubos contendo citrato.
4. Ficoll®-Paque* Plus ou materiais alternativos de separação das PBMCs.
5. O reagente T-Cell *Xtend* (disponível através da Oxford Immunotec) pode ser usado com amostras colhidas até 32 horas após venopunção. O kit de reagentes T-Cell *Select* (disponível na Oxford Immunotec) pode ser utilizado com amostras recolhidas até 54 horas após a venopunção. É possível utilizar métodos alternativos de depleção de granulócitos para amostras armazenadas até 32 horas. Os clientes têm de validar métodos alternativos nos respetivos laboratórios.
6. Os tubos Leucosep podem ser usados para simplificar a separação de PBMCs utilizando o método Ficoll*.
7. Centrifugadora para a preparação de PBMCs (com capacidade para, pelo menos, 1800xg e para manter as amostras à temperatura ambiente (18-25 °C)).
8. Pode utilizar-se uma centrifugadora de lavagem de células na preparação e lavagem das PBMCs separadas, por exemplo, uma centrifugadora DiaCent-CW (Bio-Rad). Os clientes têm de validar a utilização do equipamento referido nos respetivos laboratórios.
9. Equipamento e reagentes para permitir a contagem de PBMCs; quer manualmente utilizando Trypan Blue e um hemocítmetro num microscópio quer automaticamente utilizando um analisador hematológico adequado.
10. Um incubador humidificado com capacidade para 37 ± 1 °C com um fornecimento de CO₂ a 5 %.
11. Uma unidade de lavagem de placas de microtitulação ou equipamento para lavagem manual das placas.
12. Pipetas e pontas de pipetas estéreis.
13. Solução D-PBS estéril: como GIBCO® 1 x D-PBS (Invitrogen; número de catálogo 14040-091).
14. Água destilada ou desionizada.
15. Um meio de leitura das placas como, por exemplo, um microscópio, um microscópio digital, uma lupa ou um visualizador de placas.
16. Meio de cultura de células estéril como GIBCO AIM-V® (Invitrogen; número de catálogo 31035-025): a utilização deste meio isento de soro para o passo de incubação é vivamente recomendada. RPMI 1640 (Invitrogen; número de catálogo 21875-034) poderá ser utilizado apenas nos passos iniciais de preparação da amostra. Recomenda-se que os meios de cultura de células sejam conservados em alíquotas apropriadas e que o material excedente seja eliminado após a utilização. Os meios de cultura de células deverão ser previamente aquecidos até 37 °C antes da utilização do teste T-SPOT. *TB*.

Preparação do reagente

1. Placa de microtitulação. A placa de microtitulação T-SPOT. *TB 8* é fornecida pronta para ser utilizada. Retirar o número necessário de tiras de 8 poços do local de armazenamento e deixar equilibrar à temperatura ambiente. Voltar a selar as tiras restantes na embalagem de folha metálica e incluir a bolsa de dessecante.
2. Os frascos de antigénios ESAT-6 do *M. tuberculosis* (Painel A) são fornecidos prontos para serem utilizados.
3. Os frascos de antigénios CFP10 do *M. tuberculosis* (Painel B) são fornecidos prontos para serem utilizados.
4. Os frascos de Controlo Positivo são fornecidos prontos para serem utilizados.

5. Preparar uma diluição de 1:200 de solução de trabalho de Reagente do Conjugado. Calcular o volume necessário de solução de trabalho de Reagente do Conjugado (ver a calculadora T-SPOT de diluições do conjugado no CD fornecido juntamente com cada kit do teste). O reagente pode ser preparado imediatamente antes da utilização ou preparado para perfazer a concentração de trabalho (1:200) e armazenado durante, no máximo, seis semanas a 2 °C-8 °C antes da utilização. Não utilizar o reagente diluído se estiver fora deste prazo de validade.
6. A Solução de Substrato é fornecida pronta para ser utilizada. Retirar do local de armazenamento e deixar equilibrar à temperatura ambiente.

Procedimento

Esta análise deve ser efectuada utilizando os princípios das boas práticas laboratoriais e cumprindo rigorosamente estas Instruções de Utilização.

A Oxford Immunotec Ltd preparou um Guia de Formação que descreve a colheita e preparação de amostras, a selecção de meios de cultura de células e os métodos de contagem de manchas. Este documento encontra-se disponível no CD fornecido juntamente com cada kit do teste, telefonando para o +44 (0) 1235 442780 ou fazendo "download" a partir de www.oxfordimmunotec.com.

Colheita e preparação das amostras

Os utilizadores individuais devem validar os seus procedimentos de colheita de PBMCs, enumeração de PBMCs e escolha de meios adequados para suportar a funcionalidade das células T durante a fase de incubação primária da análise. Geralmente, para um doente imunocompetente, podem obter-se PBMCs suficientes para fazer a análise a partir de amostras de sangue venoso de acordo com as seguintes orientações:

- Adultos e crianças com idade igual ou superior a 10 anos: um tubo CPT de 8 mL, ou dois tubos CPT de 4 mL ou um tubo de heparina ou citrato de 6 mL
- Crianças dos 2 aos 9 anos: um tubo CPT, tubo de heparina ou citrato de 4 mL
- Crianças até aos 2 anos: um tubo pediátrico de 2 mL

As amostras de sangue devem ser conservadas à temperatura ambiente e analisadas num período de 8 horas após a colheita do sangue, num período de 32 horas e armazenadas a 10-25 °C, se for utilizado o reagente T-Cell, ou dentro de 54 horas com armazenagem a 18-25 °C se for utilizado o kit de reagentes T-Cell *Select*.

Os meios de cultura de células deverão ser previamente aquecidos até 37 °C antes da utilização do teste T-SPOT. *TB*.

Procedimento	Notas
1. Colher uma amostra de sangue de acordo com as instruções que acompanham o dispositivo de colheita. Conservar o sangue colhido à temperatura ambiente (18-25 °C) ou a 10-25 °C, se for usado o reagente T-Cell <i>Xtend</i> . Não refrigerar ou congelar.	1. As amostras de sangue podem ser colhidas numa variedade de tubos. Nos nossos laboratórios, utilizámos com sucesso citrato CPT Vacutainer, heparina CPT e tubos standard de heparina ou citrato. Os tubos CPT não são adequados para utilizar com o reagente T-Cell <i>Xtend</i> . Os tubos EDTA não são recomendados.

Procedimento	Notas
<p>2. Quando utilizar tubos de colheita de sangue CPT, seguir as instruções do fabricante para a separação das PBMCs.</p> <p>Quando utilizar os Vacutainer de colheita de sangue contendo heparina ou citrato, separar as PBMCs por centrifugação através de Ficoll-Paque Plus, recorrendo a procedimentos publicados.</p> <p>Se forem utilizados tubos Leucosep, o kit de reagentes T-Cell <i>Select</i> ou o reagente T-Cell <i>Xtend</i> (disponíveis através da Oxford Immunotec), seguir os protocolos fornecidos com estes reagentes.</p>	<p>2. Centrifugar os tubos CPT de 8 mL a 1600 x g durante 28 min ou os tubos CPT de 4 mL a 1800 x g durante 30 min a 18 °C, se a centrifugadora for refrigerada. Aguardar que a centrifugadora atinja uma temperatura de 18 °C, se antes tiverem sido usadas temperaturas inferiores. Se for usada uma centrifugadora não refrigerada, a temperatura não poderá exceder os 25 °C.</p> <p>Em alternativa, diluir o sangue com um volume igual de meio RPMI 1640. Colocar cuidadosamente o sangue diluído (2-3 volumes) sobre Ficoll-Paque Plus (1 volume) e centrifugar a 1000 x g durante 22 min, mantendo a temperatura entre os 18 e os 25 °C.</p> <p>Para amostras com 8 a 32 horas pós venepunção, utilize o reagente T-Cell <i>Xtend</i> antes da colocação da amostra sobre Ficoll-Paque-Plus.</p> <p>Para amostras armazenadas até 54 horas pós-venepunção, utilizar o protocolo fornecido com o kit de reagentes T-Cell <i>Select</i>.</p> <p>A calculadora de velocidades da centrifugadora disponível no CD incluído no kit do teste pode ajudar a converter as velocidades em xg para velocidades em rpm.</p> <p>Se forem utilizados outros métodos de separação PBMC, estes terão de ser validados pelo cliente para utilização com o teste T-SPOT.TB.</p>
<p>3a. Colher a faixa branca e turva de PBMCs utilizando uma pipeta e transferir para um tubo de centrifugação cónico de 15 mL. Perfazer o volume até 10 mL com meio de cultura de células.</p> <p>3b. Em alternativa, poderá utilizar-se uma centrifugadora de lavagem de células, por exemplo, DiaCent-CW (Bio-Rad), para facilitar as fases de lavagem das células. Se se utilizar este sistema, deve-se utilizar DPBS para lavar as células.</p>	<p>3a. Durante este processo, podem ser utilizados vários meios para a lavagem das células. Nos nossos laboratórios, tanto o AIM-V como o RPMI 1640 foram utilizados com sucesso e são recomendados.</p> <p>3b. A metodologia para a utilização da centrifugadora de lavagem de células durante a preparação das PBMCs está disponível na Oxford Immunotec. No entanto, os clientes têm de validar estes métodos nos respetivos laboratórios.</p>
<p>4. Centrifugar a 600 x g durante 7 min. Retirar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 1 mL de meio.</p>	<p>4. Ver 3a. acima.</p>
<p>5. Perfazer o volume até 10 mL com meio fresco e centrifugar a 350 x g durante 7 min.</p>	<p>5. Ver 3a. acima.</p>

Procedimento	Notas
6. Retirar o sobrenadante e ressuspender o concentrado em 0,7 mL de meio de cultura AIM-V .	6. Nesta fase, o meio de cultura para a incubação de um dia para o outro deverá ser utilizado para ressuspender o pellet. Nos nossos laboratórios, o meio isento de soro AIM-V foi utilizado com sucesso e é vivamente recomendado.

As células T obtidas de outros fluidos corporais, como a lavagem broncoalveolar (BAL), a efusão pleural (PE) ou o fluido cerebrospinal (CSF) foram utilizadas com sucesso com o teste T-SPOT.TB para identificar a infecção por tuberculose e a tuberculose (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 e Patel *et al* (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77). Se estiverem a utilizar amostras sem ser de sangue, os utilizadores têm de validar os procedimentos para a recolha de células mononucleares suficientes. Os métodos para o processamento de amostras de BAL são descritos nas publicações indicadas acima.

Nota 1: O número referente ao valor-limiar para um resultado positivo e controlos válidos para o teste, utilizando amostras sem ser de sangue, não foram extensivamente avaliados e podem diferir do teste de sangue. Os utilizadores devem definir os seus critérios de interpretação do teste. Os médicos devem fazer uso da sua capacidade crítica ao avaliar os resultados.

Nota 2: O período de tempo entre a obtenção da amostra e o início da análise não foi extensivamente estudado.

Contagem das células e diluição

O teste T-SPOT.TB requer $2,5 \times 10^5$ PBMCs viáveis por poço. Para cada amostra do doente são necessários, no total, quatro poços. É necessário adicionar a cada poço o número correcto de células. Se tal não for feito, poderá obter-se uma interpretação incorrecta do resultado.

Procedimento	Notas
1. Fazer uma contagem de células viáveis.	1. As células podem ser contadas por vários métodos, incluindo a contagem manual utilizando Trypan Blue e um hemocitómetro ou contagem automatizada utilizando um instrumento apropriado.
2. Resumidamente, para a contagem manual com um hemocitómetro Neubauer, adicionar 10 µL da suspensão de células final a 40 µL de solução Trypan Blue a 0,4% (p/v). Colocar uma alíquota apropriada no hemocitómetro e contar as células na grelha. Para outros tipos de hemocitómetro e para os dispositivos automatizados, seguir as instruções dos fabricantes.	2. Devem ser tomadas precauções para assegurar que a suspensão de células se encontra completamente misturada imediatamente antes da remoção das alíquotas para diluição ou para contagem. As células podem assentar no fundo do tubo levando a uma interpretação errada do verdadeiro número de células.
3. Calcular a concentração de células viáveis presentes na suspensão de células de reserva.	3. Assegurar que o cálculo está correcto para o sistema de contagem de células utilizado uma vez que a utilização de um número insuficiente ou excessivo de células pode conduzir a uma interpretação errada do resultado. A calculadora T-SPOT de diluições celulares disponível no CD fornecido juntamente com cada kit do teste facilita este cálculo.
4. Preparar 500 µL da suspensão de células final a uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células / 100 µL.	4. Assegurar que as células estão bem misturadas antes da remoção de uma alíquota para diluição.

Preparação das placas e incubação

O teste T-SPOT.TB requer a utilização de quatro poços para cada amostra do doente. Com cada amostra separada deverá ser processado um Controlo Nulo e um Controlo Positivo de funcionalidade das células. Recomenda-se que as amostras sejam dispostas verticalmente sobre a placa como ilustrado a seguir.

- Controlo Nulo
- Painel A
- Painel B
- Controlo Positivo

Procedimento	Notas
1. No caso do T-SPOT.TB 8, retirar da embalagem as tiras de 8 poços pré-revestidas, prender num suporte de placas e deixar equilibrar à temperatura ambiente.	1. Retirar apenas o número pretendido de tiras. Voltar a colocar as restantes no local de armazenamento. Prender as tiras a utilizar num suporte de placas vazio com uma cobertura inferior e uma tampa. Os suportes, coberturas e tampas devem ser guardados e reutilizados.
2. Cada amostra do doente requer a utilização de 4 poços individuais; (i) Adicionar 50 µL de meio de cultura de células AIM-V a cada poço de Controlo Nulo. (ii) Adicionar 50 µL de solução do Painel A a cada poço pretendido. (iii) Adicionar 50 µL de solução do Painel B a cada poço pretendido. (iv) Adicionar 50 µL de solução de Controlo Positivo a cada poço de controlo da funcionalidade das células.	2. Não deixar a ponta da pipeta tocar na membrana. Os entalhes na membrana feitos pelas pontas das pipetas podem criar artefactos nos poços. Pode ser necessário bater suavemente na placa para assegurar que as soluções cobrem a membrana na base de cada poço. Deverá ser evitada uma agitação vigorosa para minimizar a contaminação cruzada dos antígenos entre os poços.
3. A cada um dos 4 poços a utilizar para uma amostra do doente, adicionar 100 µL da suspensão de células final do doente (contendo 250.000 células viáveis).	3. Pipetar a suspensão de células suavemente para cima e para baixo a fim de assegurar uma boa mistura antes da remoção de cada alíquota de 100 µL. Recomenda-se a utilização de uma ponta nova para cada adição de células de cada doente a fim de evitar a contaminação cruzada entre os 4 poços.
4. Incubar a placa num incubador humidificado a 37 °C com CO ₂ a 5 % durante 16-20 horas.	4. Evitar perturbar a placa depois de colocada no incubador. Não empilhar as placas uma vez que tal pode provocar uma distribuição de temperatura e uma ventilação irregulares. A falta de cumprimento do tempo e das condições de incubação recomendados pode conduzir a uma interpretação incorrecta do resultado. Verifique se a incubadora contém água suficiente para manter a humidade durante o período de incubação.

Desenvolvimento e contagem de manchas

Durante as fases de lavagem e de desenvolvimento da placa, não toque na membrana com as pontas das pipetas ou com as pontas da unidade de lavagem automática dos poços. Os entalhes na membrana feitos pelas pontas das pipetas ou da unidade de lavagem dos poços podem criar artefactos nos poços os quais podem interferir com a contagem de manchas.

Procedimento	Notas
1. Retirar a placa do incubador.	1. No caso de um atraso inevitável no processamento devido a, por exemplo, problemas de recursos durante o fim de semana, as placas podem ser retiradas do incubador e armazenadas a 2 °C-8 °C. O tempo máximo recomendado de armazenamento é 72 horas e as placas devem permanecer tapadas durante o armazenamento. O cliente deve validar este processo no respetivo laboratório.
2. Deitar fora o meio de cultura das células e adicionar 200 µL de solução D-PBS a cada poço.	2. Nesta altura, retirar a Solução de Substrato do kit e deixar equilibrar à temperatura ambiente.
3. Deitar fora a solução D-PBS. Repetir a lavagem dos poços mais 3 vezes com solução D-PBS fresca para cada lavagem.	3. Deitar fora toda a solução D-PBS do passo de lavagem final invertendo a placa sobre papel absorvente antes de prosseguir.
4. Diluir o Reagente do Conjugado concentrado 200 vezes em D-PBS para criar a solução com a concentração de trabalho.	4. Não utilizar solução D-PBS contendo Tween® ou outros detergentes, uma vez que isso causa elevadas contagens de fundo. Assegurar que é apenas preparado um pequeno excedente (para ter em conta o desperdício) de solução com a concentração de trabalho. Para o T-SPOT.TB 8 e para cada tira de 8 poços (requerendo cada poço 50 µL), perfazer 500 µL de solução com a concentração de trabalho adicionando 2,5 µL de Reagente do Conjugado concentrado a 497,5 µL de D-PBS. A calculadora de diluições do conjugado disponível no CD incluído no kit de teste pode ser utilizada para efectuar este cálculo.
5. Adicionar 50 µL de solução com a concentração de trabalho de Reagente do Conjugado a cada poço e incubar a 2-8 °C durante 1 hora.	5. A falta de cumprimento do tempo de incubação recomendado pode conduzir a uma interpretação incorrecta do resultado.
6. Deitar fora o conjugado e fazer quatro lavagens com D-PBS conforme descrito nos passos 2. e 3. acima.	
7. Adicionar 50 µL de Solução do Substrato a cada poço e incubar à temperatura ambiente durante 7 min.	7. A falta de cumprimento do tempo de incubação recomendado pode conduzir a uma interpretação incorrecta do resultado.
8. Lavar cuidadosamente a placa com água destilada ou desionizada para parar a reacção de detecção.	
9. Deixar a placa secar, colocando-a numa zona bem ventilada ou num forno até 37 °C.	9. As manchas tornam-se mais visíveis à medida que a placa seca. Permitir um tempo de secagem de 4 horas a 37 °C ou de um dia para o outro à temperatura ambiente.

Procedimento	Notas
10. Contar e registar o número de manchas azuis escuras distintas na membrana de cada poço. Aplicar Interpretação dos Resultados e Critérios de Análise (ver abaixo) para determinar se uma amostra de um doente é "Positiva" ou "Negativa" aos antígenos da TB.	10. As manchas podem ser visualizadas por vários métodos, incluindo a utilização manual de uma lupa, de um microscópio adequado, de um microscópio digital ou de um visualizador de placas dedicado ELISPOT. Pode solicitar-se um guia de treino para contagem de manchas (o programa T-SPOT. <i>Tutor</i>) através do website da Oxford Immunotec.

Controlo de qualidade

Num resultado típico seria de prever poucas ou nenhuma manchas no Controlo Nulo e mais de 20 manchas no Controlo Positivo.

Uma contagem do Controlo Nulo superior a 10 manchas deve ser considerada "Indeterminada". Consultar o Guia de Formação do T-SPOT.*TB* quanto às causas possíveis (fazer "download" de www.oxfordimmunotec.com). Deve-se colher outra amostra do indivíduo e fazer nova análise.

Geralmente, a contagem de manchas do Controlo Positivo da funcionalidade das células deveria ser ≥ 20 ou revelar saturação (demasiadas manchas para contar). Uma pequena percentagem de doentes pode ter células T que apresentam apenas uma resposta limitada à PHA^{13,14}. Nos casos em que a contagem de manchas do Controlo Positivo é < 20 manchas, deverá ser considerada como "Indeterminada", a não ser que o Painel A ou o Painel B seja "Positivo", conforme descrito em Interpretação dos Resultados e Critérios de Análise (ver abaixo), e nesse caso o resultado é válido.

Devido a potenciais variações biológicas e sistemáticas, no caso em que o máximo de (Painel A menos Controlo Nulo) e (Painel B menos Controlo Nulo) for 5, 6 ou 7 manchas, o resultado pode ser considerado *Borderline* (duvidoso). Os resultados *Borderline* (duvidosos), embora válidos, são menos fiáveis que os resultados em que a contagem de manchas se afasta mais do valor-limiar (*cut-off*). É, portanto, aconselhável testar novamente o doente, utilizando uma nova amostra. Se o resultado continuar a ser *Borderline* (duvidoso) após a repetição da análise, deverão ser utilizados outros testes de diagnóstico e/ou informação epidemiológica que ajude a determinar o estado da infecção do doente pela TB.

Enquanto os antígenos ESAT-6 e CFP10 estão ausentes das estirpes de BCG de *M. bovis* e da maioria das micobactérias ambientais, é possível que um resultado "Positivo" do teste T-SPOT.*TB* se deva a infecção por *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* ou *M. goodii*. No caso de suspeita destas infecções, são necessários testes alternativos.

Interpretação dos resultados e critérios de análise

Consultar a secção de Controlo de Qualidade antes de aplicar os critérios seguintes.

Os resultados do teste T-SPOT.*TB* são interpretados subtraindo a contagem de manchas no poço do Controlo Nulo à contagem de manchas em cada um dos Painéis, de acordo com o seguinte algoritmo:

- O resultado do teste é "Positivo" se (Painel A menos Controlo Nulo) e/ou (Painel B menos Controlo Nulo) ≥ 6 manchas.
- O resultado do teste é "Negativo" se ambos os valores de (Painel A menos Controlo Nulo) e (Painel B menos Controlo Nulo) ≤ 5 manchas. Isto inclui valores inferiores a zero.

Um resultado "Positivo" indica que a amostra contém células T efectoras reactivas ao *M. tuberculosis*.

Um resultado "Negativo" indica que a amostra provavelmente não contém células T efectoras reactivas ao *M. tuberculosis*.

Características de desempenho da análise

A **especificidade** foi avaliada analisando 93 amostras de dadores considerados com base no historial médico e na informação pessoal com baixo risco de infecção com *M. tuberculosis*. A especificidade do teste T-SPOT.TB foi calculada como 100 % (93/93) (limites de confiança de 95 % 95,8 % - 100 %).











A **sensibilidade** foi avaliada analisando 87 amostras de casos confirmados por cultura de infecção por *M. tuberculosis*, incluindo grupos imunocomprometidos. A sensibilidade do teste T-SPOT.TB foi calculada como 98,8 % (86/87) (limites de confiança de 95 % 90,8 % - 99,9 %).

A **reprodutibilidade** foi avaliada, como um “surrogate marker” (marcador substituto) da variação intra-análises, por meio de análise de amostras de sangue duplicadas processadas na mesma placa. Um total de 145 amostras de sangue de 140 dadores individuais foram analisadas em duplicado (dois poços para cada um dos painéis, Painel A e Painel B) utilizando o teste T-SPOT.TB. Em 142/145 (97,9 %) análises duplicadas, foi observada concordância clínica. Duas análises duplicadas produziram resultados discordantes *borderline* e apenas 1/145 amostras produziu resultados discrepantes.

Bibliografia

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.

Glossário de símbolos

	Prazo de validade (ano-mês-dia)
	Número de lote
	Número de catálogo
	Atenção, ver as instruções de utilização
	Fabricante
	Suficiente para “n” testes
	Produto para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Limite de temperatura/Conservar entre
	Consultar as instruções de utilização
	Representante Autorizado da UE

Informações de contacto

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

Para downloads de apoio ao produto e mais informações técnicas, visite o nosso website:
www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT, T-Cell *Xtend* e o logótipo da Oxford Immunotec são marcas comerciais da Oxford Immunotec Limited.
T-Cell *Select* é uma marca comercial da Oxford Immunotec Limited.
AIM-V e GIBCO são marcas comerciais da Life Technologies Corporation.
CPT e Vacutainer são marcas comerciais da Becton, Dickinson and Company.
Ficoll e Ficoll-Paque são marcas comerciais da Cytiva, uma filial da Global Life Sciences Solutions USA LLC.
Tween é uma marca commercial da Croda Americas LLC.

A utilização do reagente T-Cell *Xtend* está protegida pelas seguintes patentes ou patentes pendentes:
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Número da revisão: 4 Data de emissão: Julho 2022
© 2022 Oxford Immunotec. Todos os direitos reservados.

🏭 Fabricante:

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

🇪🇺 REP Representante Autorizado da União Europeia:

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



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

www.oxfordimmunotec.com

