

**T-SPOT<sup>®</sup>.TB**



Pomôcka na diagnostiku infekcie tuberkulózy

## PRÍBALOVÝ LETÁK

Na diagnostické použitie *in vitro*

Tento príbalový leták sa týka použitia testu:

T-SPOT.TB 8 (formát platničiek s 8-jamkovými prúžkami na viacnásobné použitie, katalógové číslo: TB.300)

## Obsah

Určené použitie	2
Úvod	2
Zásady postupu	2
Obmedzenia	3
Výstrahy a preventívne opatrenia týkajúce sa bezpečnosti	4
Dodávaný materiál	4
Skladovanie	4
Stabilita	4
Potrebný materiál a vybavenie, ktoré sa nedodávajú	5
Príprava reagensí	5
Postup	6
Odber a príprava vzorky	6
Počítanie buniek a riedenie	8
Príprava platničky a inkubácia	9
Vyvolanie a počítanie škvŕn	10
Kontrola kvality	11
Interpretácia výsledkov a kritériá testu	11
Výkonnostné charakteristiky testu	12
Referencie	12
Použité symboly	12

## Určené použitie

Test T-SPOT®.TB je diagnostický test *in vitro* na detekciu efektorových T-buniek, ktoré odpovedajú na stimuláciu antigénmi *Mycobacterium tuberculosis*. Používa sa ako pomocné vyšetrenie pri diagnostike infekcie tuberkulózy (TB). Test T-SPOT.TB využíva zjednodušenú metódu ELISPOT (enzyme-linked-immunospot), ktorou sa stanovuje počet jednotlivých efektorových T-buniek špecificky aktivovaných infekciou TB.

## Úvod

Podľa odhadov Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) je jedna tretina svetovej populácie infikovaná baktériou *M. tuberculosis*. Každá osoba s latentnou infekciou TB (LTBI) má približne 10 % šancu progresie do aktívneho ochorenia. Táto pravdepodobnosť progresie je zvýšená v niektorých skupinách vrátane ľudí, ktorí boli infikovaní len nedávno, a ľudí s oslabeným imunitným systémom.

Imunitná odpoveď na infekciu *M. tuberculosis* je prevažne bunkami sprostredkovaná imunitná odpoveď (CMI). Pri tejto odpovedi T-bunky získajú citlivosť na antigény *M. tuberculosis*. Aktivované efektorové T-bunky, a to subpopulácie CD4 aj CD8, špecificky oddelené z krvi možno spočítať na základe ich schopnosti byť stimulované *in vitro* týmito antigénmi<sup>1,2</sup>. Použitie vybraných antigénov pre komplex *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. cannetii*) zlepšuje špecifickosť testu na tieto organizmy znížením krížovej reaktivity s vakcínou BCG a väčšinou environmentálnych mykobaktérií<sup>3,4</sup>. Na optimalizáciu citlivosti testu sa používajú dva rôzne panely antigénov, ktoré simulujú dobre charakterizované proteíny ESAT-6 a CFP10.

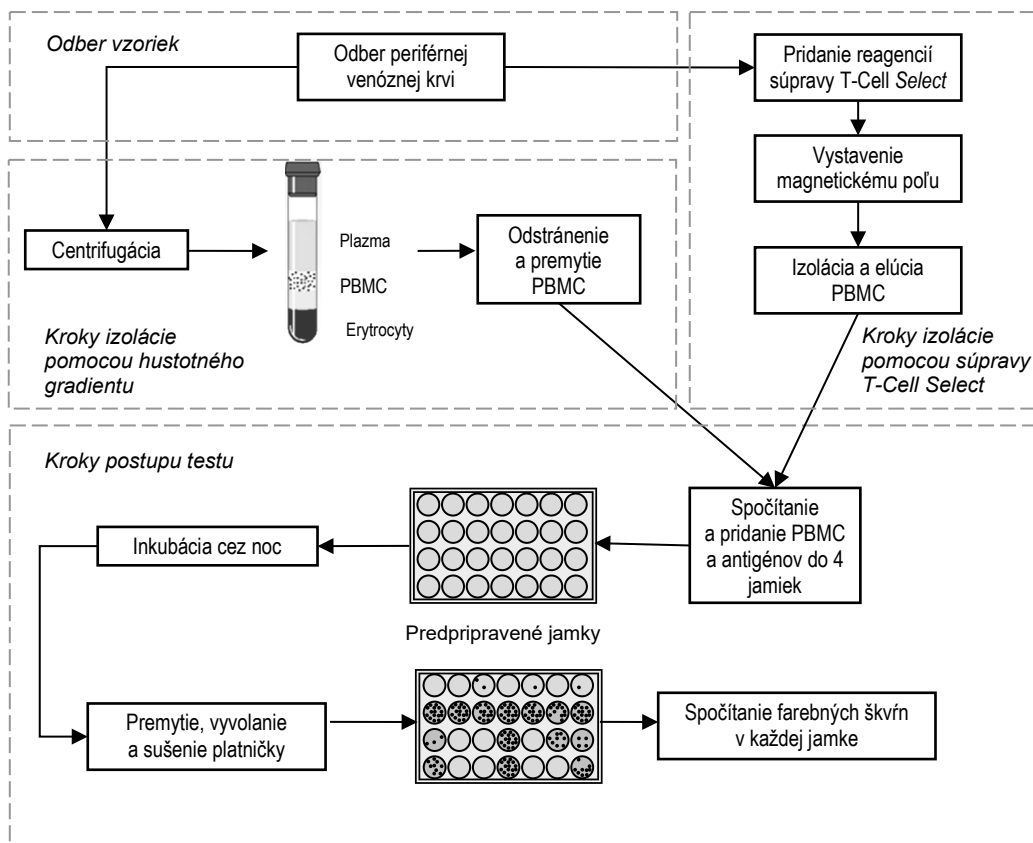
Test T-SPOT.TB je zjednodušeným variantom testovacej metódy ELISPOT. Testy ELISPOT sú mimoriadne citlivé, lebo cieľový cytokín je zachytený priamo v okolí sekretujúcej bunky ešte pred zriedením v supernatante, zachytený receptormi susedných buniek alebo degradáciou. Preto sú testy ELISPOT oveľa citlivejšie ako konvenčné testy ELISA<sup>5</sup>. Test T-SPOT.TB je určený na detekciu efektorových T-buniek, ktoré odpovedajú na stimuláciu antigénmi špecifickými pre *M. tuberculosis*<sup>3,4,6-9</sup>. V teste sa spočítavajú jednotlivé aktivované T-bunky špecifické pre infekciu TB. Hodí sa na použitie u všetkých pacientov s rizikom LTBI alebo s podozrením na ochorenie TB<sup>10,11</sup> bez ohľadu na vek, pohlavie, etnickú príslušnosť, liečbu alebo stav imunitného systému.

## Zásady postupu

Mononukleárne bunky z periférnej krvi (PBMC) sa oddelia zo vzorky plnej krvi a premyjú, aby sa odstránili prípadné zdroje interferujúcich látok na pozadí. Potom sa spočítajú bunky PBMC, aby sa v teste použil štandardizovaný počet buniek. Tým sa zaistí, aby aj pacienti s nízkym počtom T-buniek pri oslabenom imunitnom systéme (imunokompromitovaní a imunosuprimovaní pacienti) mali dostatočný počet buniek pridaných do mikrotitračných jamiek. Fázy premývania a počítania buniek spolu s metódou ELISPOT poskytujú lepšiu výkonnosť testu pri detekcii ochorenia TB a latentnej infekcie TB.

Pre každú vzorku sú potrebné 4 jamky (pozri obrázok 1):

1. Nulová kontrola na identifikáciu nešpecifickej aktivácie buniek
2. Antigény špecifické pre TB, panel A (ESAT-6)
3. Antigény špecifické pre TB, panel B (CFP10)
4. Pozitívna kontrola obsahujúca fytohemaglutinín (PHA, známy polyklonálny aktivátor<sup>12</sup>) na potvrdenie zachovania funkcie buniek PMBC



Obrázok 1: Hlavné kroky testu T-SPOT.TB. Majte na pamäti, že každá platnička obsahuje 96 jamiek.

Bunky PBMC sa inkubujú s antigénmi, čím dôjde k stimulácii všetkých prítomných citlivých T-buniek. Sekréciou uvoľnený cytokín je zachytávaný špecifickými protilátkami na membráne, ktorá tvorí základňu na dne jamky. Bunky a ostatný nechcený materiál sa odstránia premytím. Pridá sa druhá protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou a namierená proti odlišnému epitopu na molekule cytokínu, ktorá sa naviaže na cytokín zachytený na povrchu membrány. Nenaviazaný konjugát sa odstráni premytím. Do každej jamky sa pridá rozpustný substrát, ktorý po štiepení viazaným enzýmom v mieste reakcie vytvorí škvrnu nerozpustnej zrazeniny. Každá škvrna predstavuje stopu jednotlivej T-bunky sekretujúcej cytokín a stanovenie počtu vytvorených škvŕn poskytne hodnotu množstva efektorových T-buniek citlivých na *M. tuberculosis* v periférnej krvi.

### Obmedzenia

- Určené len na diagnostické použitie *in vitro*.
- Určené len na použitie odborníkmi.
- Nemiešajte zložky súprav s odlišnou šaržou.
- Pre použitím si pozorne prečítajte návod na vykonanie testu.
- Dodržiavajte zásady aseptického práce, aby nedošlo ku kontaminácii reagensí, testovacích jamiek, suspenzií buniek a bunkových kultivačných médií.
- Mali by ste sa vyvarovať odchylok od uvedených metód pipetovania a premývania, odchylok v inkubačnom čase a/alebo teplote, ktoré môžu mať vplyv na získané výsledky.
- Krv by sa mala odobrať a vyšetriť v teste do 8 hodín. Toto časové obmedzenie je možné odstrániť použitím súpravy reagensí T-Cell Select™ alebo reagensie T-Cell Xtend® (dostupnej od spoločnosti Oxford Immunotec). Pri použití súpravy reagensí T-Cell Select spolu s testom T-SPOT.TB sa čas skladovania vzorky zvýši na 54 hodín a proces izolácie buniek možno automatizovať. Pri použití reagensie T-Cell Xtend alebo inej metódy deplécie granulocytov spolu s testom T-SPOT.TB sa čas skladovania vzorky zvýši na 32 hodín od odberu.

- Vzorky krvi je potrebné uchovávať a prepravovať do laboratória pri izbovej teplote (18 – 25 °C), a to vrátane vzoriek krvi určených na použitie so súpravou reagensí T-Cell *Select*. Pri použití reagensie T-Cell *Xtend* možno vzorky prepravovať a uchovávať pri teplote 10 – 25 °C. Vzorky plnej krvi neuchovávajú v chladničke ani nezmrazujte.
- Test T-SPOT.*TB* by sa mal použiť a interpretovať len v kontexte celkového klinického obrazu.
- Negatívny výsledok testu nevylučuje možnosť expozície baktérii *M. tuberculosis* alebo infekcie touto baktériou.
- Antigény ESAT-6 a CFP10 nie sú prítomné v kmeňoch BCG a vo väčšine environmentálnych mykobaktérií s výnimkou *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*<sup>3,4</sup> a *M. goodii*.

### Výstrahy a preventívne opatrenia týkajúce sa bezpečnosti

Pri spracovaní materiálu ľudského pôvodu je potrebná opatrnosť. Všetky vzorky krvi by sa mali považovať za potenciálne infekčné.

Práca so vzorkami krvi a zložkami testu, ich používanie, skladovanie a likvidovanie musí byť v súlade s postupmi vymedzenými v príslušných vnútroštátnych bezpečnostných usmerneniach alebo predpisoch týkajúcich sa nebezpečenstva biologického pôvodu.

Pri práci s chemikáliami je potrebná opatrnosť. Všetky chemikálie by sa mali považovať za potenciálne nebezpečné.

### Dodávaný materiál

Súprava T-SPOT.*TB* 8 obsahuje:

1. 1 mikrotitračná platnička (CW.300): 96 jamiek, dodávaná ako 12 x 8-jamkové pružky v rámečku potiahnuté myšacou monoklonálnou protilátkou proti cytokínu interferónu gama (IFN- $\gamma$ ).
2. 2 nádobky (PA.300, každá 0,8 mL) s panelom A: obsahujú antigény ESAT-6, bovinný sérový albumín a antimikrobiálne látky.
3. 2 nádobky (PB.300, každá 0,8 mL) s panelom B: obsahujú antigény CFP10, bovinný sérový albumín a antimikrobiálne látky.
4. 2 nádobky (CP.300, každá 0,8 mL) s pozitívnou kontrolou: obsahujú fytohemaglutinín (PHA), na použitie ako kontrola funkčnosti buniek, bovinný sérový albumín a antimikrobiálne látky.
5. 1 nádobka (CR.300, 50  $\mu$ L) s 200-krát koncentrovanou konjugátovou reagensiou: myšacia monoklonálna protilátka proti cytokínu IFN- $\gamma$  konjugovaná s alkalickou fosfatázou.
6. 1 fľaštička (SR.300, 25 mL) s roztokom substrátu: hotový roztok BCIP/NBT<sup>plus</sup>.
7. Návod na použitie na disku CD spolu s MSDS, školiacou príručkou, kalkulačkou riedenia buniek T-SPOT, kalkulačkou riedenia konjugátu, kalkulačkou rýchlosti centrifúgy a programom T-SPOT.*AutoReporter*.

### Skladovanie

Skladujte všetky zložky súpravy pri teplote 2 – 8 °C.

Vyhňte sa dlhšiemu vystaveniu roztoku substrátu svetlu.

### Stabilita

Nemiešajte zložky súprav s odlišnou šaržou. Neotvorenú súpravu skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Zložky súpravy sú stabilné až do dátumu expirácie uvedeného na škatuli súpravy, ak sa skladujú a ak sa s nimi manipuluje za odporúčaných podmienok. Súprava sa nesmie použiť po dátume expirácie na označení súpravy.

Zložky otvorenej súpravy skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Otvorené zložky sa musia použiť do 8 týždňov od otvorenia.

### Potrebný materiál a vybavenie, ktoré sa nedodávajú

1. Rámček na platničku s 8-jamkovým prúžkom (dostupný od spoločnosti Oxford Immunotec).
2. Mikrobiologická skrinka triedy II (odporúčané).
3. Skúmavky na odber krvi, napr. Vacutainer® CPT™ (dostupné od spoločnosti Oxford Immunotec), heparinizované skúmavky alebo skúmavky obsahujúce citrát.
4. Ficoll®-Paque\* Plus alebo alternatívny materiál na oddelenie buniek PBMC.
5. Reagenciu T-Cell *Xtend* (dostupnú od spoločnosti Oxford Immunotec) možno použiť so vzorkami odobratými do 32 hodín po venepunkcii. Súpravu reagensov T-Cell *Select* (dostupnú od spoločnosti Oxford Immunotec) možno použiť so vzorkami odobratými do 54 hodín po venepunkcii. Alternatívne metódy deplécie granulocytov možno použiť so vzorkami uchovávanými maximálne 32 hodín. Zákazníci musia validovať alternatívne metódy vo vlastnom laboratóriu.
6. Skúmavky Leucosep na uľahčenie oddelenia buniek PBMC pri použití metódy Ficoll\*.
7. Centrifúga na prípravu buniek PBMC (s možnosťou nastavenia rýchlosti aspoň 1 800 x g a schopná udržať vzorky pri izbovej teplote (18 – 25 °C)).
8. Na prípravu a premývanie oddelených buniek PBMC možno použiť centrifúgu na premývanie buniek, napríklad centrifúgu DiaCent-CW (Bio-Rad). Zákazníci musia validovať použitie takého vybavenia vo vlastnom laboratóriu.
9. Vybavenie a reagenty na počítanie buniek PBMC, a to manuálne pomocou Trypanovej modrej a hemocytometra na mikroskope alebo automaticky s použitím vhodného hematologického analyzátoru.
10. Humidifikovaný inkubátor schopný udržiavať teplotu 37 ±1 °C a prívod 5 % CO<sub>2</sub>.
11. Premývačka mikrotitračných platničiek alebo vybavenie na manuálne premývanie platničiek.
12. Pipety a sterilné špičky pipiet.
13. Sterilný roztok D-PBS: napr. GIBCO® 1 x D-PBS (Invitrogen, katalógové číslo 14040-091).
14. Destilovaná alebo deionizovaná voda.
15. Prostriedok na odčítanie platničky, napr. mikroskop, digitálny mikroskop, ručná lupa alebo zobrazovač mikroplatničiek.
16. Sterilné bunkové kultivačné médium, napr. GIBCO AIM-V® (Invitrogen, katalógové číslo 31035-025): toto bezsérové médium sa dôrazne odporúča použiť na inkubáciu. Médium RPMI 1640 (Invitrogen, katalógové číslo 21875-034) možno použiť len v úvodnej fáze prípravy vzorky. Odporúčame skladovať bunkové kultivačné médium vo vhodných alikvotných množstvách a nadbytočný materiál po použití zlikvidovať. Bunkové kultivačné médiá by sa pred použitím v teste T-SPOT.TB mali predhriať na teplotu 37 °C.

### Príprava reagensov

1. Mikrotitračná platnička. Mikrotitračná platnička testu T-SPOT.TB 8 sa dodáva pripravená na použitie. Vyberte požadovaný počet 8-jamkových prúžkov zo zásoby a nechajte ich vytemperovať na izbovú teplotu. Zvyšné prúžky znova zabalte do vonkajšieho fóliového obalu a do vrečka vložte vysušadlo.
2. Nádobky s antigénmi *M. Tuberculosis* ESAT-6 (panel A) sa dodávajú pripravené na použitie.
3. Nádobky s antigénmi *M. Tuberculosis* CFP10 (panel B) sa dodávajú pripravené na použitie.
4. Nádobky s pozitívnou kontrolou sa dodávajú pripravené na použitie.
5. Pripravte pracovný roztok konjugátovej reagensie v riedení 1:200. Vypočítajte potrebný objem pracovného roztoku konjugátovej reagensie (pozri kalkulačku riedenia konjugátu T-SPOT na disku CD, ktorý sa dodáva s každou súpravou testu). Reagenciu možno pripraviť bezprostredne pred použitím alebo zriediť na pracovnú koncentráciu (1:200) a pred použitím uchovávať maximálne šesť týždňov pri teplote 2 °C – 8 °C. Nepoužívajte zriedenú reagenciu po uplynutí času použiteľnosti.
6. Rostok substrátu sa dodáva pripravený na použitie. Vyberte ho zo zásoby a nechajte vytemperovať na izbovú teplotu.

## Postup

Tento test by sa mal vykonať v súlade so zásadami správnej laboratórnej praxe a presne podľa pokynov v tomto návode na použitie.

Spoločnosť Oxford Immunotec Ltd. pripravila školiacu príručku, ktorá opisuje odber a prípravu vzoriek, výber bunkového kultivačného média a metód počítania škvŕn. Nachádza sa na disku CD, ktorý je súčasťou každej súpravy testu, prípadne si ju možno objednať telefonicky na číslo +44(0)1235 442780 alebo prevziať z webovej stránky [www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com).

## Odber a príprava vzorky

Individuálni používatelia by mali validovať svoje postupy odberu buniek PBMC, ich počítania a výberu vhodného média, ktoré zabezpečí funkčnosť T-buniek počas primárnej inkubačnej fázy testu. U imunokompetentného pacienta možno dostatočný počet buniek PBMC na vykonanie testu zvyčajne získať zo vzoriek venóznej krvi podľa týchto pokynov:

- dospelí a deti vo veku 10 rokov a staršie: jedna 8 mL alebo dve 4 mL skúmavky CPT alebo jedna 6 mL heparínová alebo citrátová skúmavka,
- deti vo veku 2 – 9 rokov: jedna 4 mL skúmavka CPT, heparínová alebo citrátová skúmavka,
- deti do veku 2 roky: jedna 2 mL pediatrická skúmavka.

Vzorky krvi sa musia uchovať pri izbovej teplote a použiť na test do 8 hodín od odberu krvi. V prípade, že sa použije reagentia T-Cell *Xtend* a uchováva sa pri teplote 10 – 25 °C, môže sa použiť na test do 32 hodín od odberu krvi a v prípade, že sa použije súprava reagentií T-Cell *Select* a uchováva sa pri teplote 18 – 25 °C, môže sa použiť na test do 54 hodín od odberu krvi.

Bunkové kultivačné médiá je potrebné pred použitím v teste T-SPOT.TB predhriať na teplotu 37 °C.

Postup	Poznámky
1. Odoberte vzorku krvi podľa pokynov dodaných s odberovou pomôckou. Odobratú krv uchovajte pri izbovej teplote (18 – 25 °C) alebo pri teplote 10 – 25 °C v prípade použitia reagentie T-Cell <i>Xtend</i> . Vzorky neuchovávajte v chladničke ani nezmrazujte.	1. Vzorky krvi možno odobrať do rôznych skúmaviek. V našich laboratóriách úspešne používame citrátové a heparínové skúmavky CPT Vacutainer a štandardné heparínové alebo citrátové skúmavky. Skúmavky CPT nie sú vhodné na použitie s reagentiou T-Cell <i>Xtend</i> .  Skúmavky s EDTA sa neodporúčajú.

Postup	Poznámky
<p>2. Pri používaní skúmaviek na odber krvi CPT dodržiavajte pokyny výrobcu na oddelenie buniek PBMC.</p> <p>Ak používate vakutainery na odber krvi obsahujúce heparín alebo citrát, bunky PBMC oddelíte centrifugáciou pomocou média Ficoll-Paque Plus podľa publikovaných postupov.</p> <p>Ak používate skúmavky Leucosep, súpravu reagensí T-Cell <i>Select</i> alebo reagensiu T-Cell <i>Xtend</i> (dostupné od spoločnosti Oxford Immunotec), postupujte podľa protokolov dodaných s týmito reagensiami.</p>	<p>2. Centrifugujte 8 mL skúmavky CPT pri rýchlosti 1 600 x g počas 28 minút alebo 4 mL skúmavky CPT pri rýchlosti 1 800 xg 30 minút pri teplote 18 °C, ak je dostupná chladená centrifúga. Ak sa predtým použili nižšie teploty, nechajte centrifúgu dosiahnuť teplotu 18 °C. Ak sa používa nechladená centrifúga, zabezpečte, aby teplota neprekročila 25 °C.</p> <p>Alternatívne nariedte krv rovnakým objemom média RPMI 1640. Opatrne navrstvite zriedenú krv (2 – 3 objemy) na povrch média Ficoll-Paque Plus (1 objem) a centrifugujte pri rýchlosti 1 000 x g 22 minút pri teplote 18 – 25 °C.</p> <p>V prípade vzoriek uchovávaných 8 až 32 hodín po venepunkcii použite pred navrstvením vzorky na médium Ficoll-Paque-Plus reagensiu T-Cell Xtend.</p> <p>V prípade vzoriek uchovávaných do 54 hodín po venepunkcii použite protokol dodaný so súpravou reagensí T-Cell <i>Select</i>.</p> <p>Kalkulačka rýchlosti centrifúgy na disku CD priloženom k súprave testu je určená na prepočet rýchlostí z x g na otáčky/min. (rpm).</p> <p>Ak používate iné metódy oddelenia buniek PBMC, zákazník ich musí validovať na použitie s testom T-SPOT. <i>TB</i>.</p>
<p>3a. Pipetou odoberte biely, zakalený prstenec buniek PBMC a preneste ho do kónickej 15 mL centrifugačnej skúmavky. Doplňte objem na 10 mL bunkovým kultivačným médiom.</p> <p>3b. Alternatívne možno na uľahčenie fáz premývania buniek použiť centrifúgu na premývanie buniek, napr. DiaCent-CW (Bio-Rad). Ak sa používa tento systém, na premytie buniek treba použiť roztok D-PBS.</p>	<p>3a. Na premývanie buniek možno v tomto procese použiť rôzne kultivačné médiá. Odporúčame médiá AIM-V a RPMI 1640, ktoré sa úspešne používajú v našich laboratóriách.</p> <p>3b. Metodika na použitie centrifúgy na premývanie buniek pri príprave buniek PBMC je dostupná od spoločnosti Oxford Immunotec. Zákazníci však musia túto metódu validovať vo vlastných laboratóriách.</p>
<p>4. Centrifugujte pri rýchlosti 600 x g 7 minút. Odstráňte supernatant a resuspendujte peletu v 1 mL média.</p>	<p>4. Pozri bod 3a vyššie.</p>
<p>5. Doplňte čerstvým médiom do objemu 10 mL a centrifugujte pri rýchlosti 350 x g 7 minút.</p>	<p>5. Pozri bod 3a vyššie.</p>



Postup	Poznámky
6. Odstráňte supernatant a resuspendujte peletu v 0,7 mL kultivačného média AIM-V.	6. V tejto fáze by sa na resuspendovanie pelety malo použiť kultivačné médium určené na inkubáciu cez noc. Dôrazne odporúčame bezsérové médium AIM-V, ktoré sa úspešne používa v našich laboratóriách.

S testom T-SPOT.*TB* sa na identifikáciu infekcie a ochorenia TB úspešne použili T-bunky získané z iných telesných tekutín, napr. z bronchoalveolárnej laváže (BAL), pohrudnicového výpotku (PE) alebo mozgovomiechového moku (CSF) (Jafari *et al* (2006) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **174** 1048-1054, Jafari *et al* (2008) Eur. Resp. J. **31** 261-265, Strassburg *et al* (2008) Eur. Resp. J. **31** 1132-1135, Jafari *et al* (2009) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **180**(7) 666-673, Dheda *et al* (2009) Thorax **64**(10) 847-853 and Patel *et al* (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77). Ak sa používajú iné vzorky ako vzorky krvi, používatelia musia validovať postupy na odber dostatočného množstva mononukleárných buniek. Metódy spracovania vzoriek BAL sú opísané v publikáciách uvedených vyššie.

Poznámka 1: Hraničné hodnoty pre pozitívny výsledok a platné kontroly testu s použitím iných vzoriek ako vzoriek krvi neboli rozsiahlo vyhodnocované a môžu sa líšiť od krvného testu. Používatelia musia definovať vlastné kritériá interpretácie testu. Klinickí pracovníci musia pri skúmaní výsledkov použiť vlastný úsudok.

Poznámka 2: Dĺžka trvania času od získania vzorky po začiatok testu nebola podrobne skúmaná.

#### Počítanie buniek a riedenie

V teste T-SPOT.*TB* je potrebných  $2,5 \times 10^5$  živých buniek PBMC na jednu jamku. Pre každú vzorku pacienta sú potrebné štyri jamky. Do každej jamky sa musí pridať správny počet buniek. V opačnom prípade môže dôjsť k nesprávnej interpretácii výsledku.

Postup	Poznámky
1. Stanovte počet živých buniek.	1. Bunky možno počítať rôznymi metódami vrátane manuálneho počítania s použitím Trypanovej modrej a hemocytometra alebo automatického počítania s použitím vhodného nástroja.
2. Stručne: pri manuálnom počítaní pomocou hemocytometra Neubauer pridajte 10 $\mu$ L finálnej bunkovej suspenzie do 40 $\mu$ L 0,4 % (w/v) roztoku Trypanovej modrej. Príslušné alikvotné množstvo vložte do hemocytometra a spočítajte bunky v mriežke. Pri iných typoch hemocytometrov a pri automatizovaných zariadeniach dodržiavajte pokyny výrobcu.	2. Bezprostredne pred odobratím alikvotných množstiev na riedenie alebo počítanie bunkovú suspenziu dôkladne premiešajte. Bunky sa môžu usadzovať na dne skúmavky, čo môže viesť k nesprávnej interpretácii skutočného počtu buniek.
3. Vypočítajte koncentráciu živých buniek prítomných v zásobnej bunkovej suspenzii.	3. Overte, že výpočet je správny pre použitý systém počítania buniek. Nedostatok či nadbytok buniek môže viesť k nesprávnej interpretácii výsledku. Tento výpočet vám uľahčí kalkulačka riedenia buniek T-SPOT na disku CD dodanom s každou súpravou testu.
4. Pripravte 500 $\mu$ L finálnej bunkovej suspenzie s koncentráciou $2,5 \times 10^5$ buniek/100 $\mu$ L.	4. Pred odobratím alikvotného množstva na riedenie si overte, že bunky sú dobre premiešané.

### Príprava platničky a inkubácia

V teste T-SPOT.TB sú potrebné štyri jamky na každú vzorku pacienta. Súčasťou vyšetrenia každej jednotlivej vzorky musí byť nulová kontrola a pozitívna kontrola na overenie funkčného stavu buniek. Odporúča sa usporiadať vzorky na platničke vertikálne, ako je to zobrazené na nasledujúcom obrázku:

- Nulová kontrola
- Panel A
- Panel B
- Pozitívna kontrola

Postup	Poznámky
1. Vyberte predpripravené 8-jamkové prúžky z balenia, pripevnite k rámčeku platničky a nechajte vytemperovať na izbovú teplotu.	1. Vyberte len požadovaný počet prúžkov, ostatné nechajte v zásobe. Vybrané prúžky pripevnite k prázdnemu rámčeku platničky, ktorý je vybavený spodným krytom a viečkom. Rámčeky, spodné kryty a viečka je možné použiť opakovane.
2. Každá vzorka pacienta vyžaduje použitie 4 samostatných jamiek: i) Pridajte 50 µL kultivačného média AIM-V do každej jamky s nulovou kontrolou. ii) Pridajte 50 µL roztoku s panelom A do každej požadovanej jamky. iii) Pridajte 50 µL roztoku s panelom B do každej požadovanej jamky. iv) Pridajte 50 µL roztoku s pozitívnou kontrolou do každej jamky na kontrolu funkčnosti buniek.	2. Nedotýkajte sa membrány špičkou pipety. Preliachiny v membráne spôsobené špičkou pipety môžu mať za následok artefakty v jamkách.  Môže byť potrebné jemne poklepať po platničke, aby roztoky pokryli membránu na dne každej jamky. Vyhnite sa silnému pretrepávaniu platničky, aby sa minimalizovala krížová kontaminácia antigénov medzi jamkami.
3. Do každej zo 4 jamiek určených pre vzorku pacienta pridajte 100 µL finálnej bunkovej suspenzie (obsahujúcej 250 000 živých buniek).	3. Pred odobratím každej 100 µL alikvotnej časti pipetovaním hore a dole jemne premiešajte bunkovú suspenziu.  Odporúčame na každé pridanie buniek každého pacienta použiť novú špičku, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii medzi 4 jamkami.
4. Inkubujte platničku v humidifikovanom inkubátore pri teplote 37 °C s 5 % CO <sub>2</sub> počas 16 – 20 hodín.	4. Keď je už platnička v inkubátore, nemanipulujte s ňou. Platničky nestavajte na seba, môže to viesť k nesprávnemu rozloženiu teploty a vetrania. Nedodržanie odporúčaného inkubačného času a podmienok môže viesť k nesprávnej interpretácii výsledku. Skontrolujte, či je v inkubátore dostatok vody na udržanie vlhkosti počas inkubačného času.

### Vyvolanie a počítanie škvŕn

Počas fáz premývania a vyvolávania platničky sa nedotýkajte membrány špičkou pipety ani špičkou automatizovanej premývačky jamiek. Preliachiny v membráne spôsobené špičkou pipety alebo automatizovanej premývačky jamiek môžu mať za následok artefakty v jamkách, ktoré môžu ovplyvniť počítanie škvŕn.

Postup	Poznámky
1. Vyberte platničku z inkubátora.	V prípade odloženia spracovania, ktorému sa nedá vyhnúť, napríklad pre problémy so zdrojmi cez víkend, možno platničky vybrať z inkubátora a skladovať pri teplote 2 °C – 8 °C. Maximálny odporúčaný čas skladovania je 72 hodín a platničky musia byť počas skladovania zakryté. Zákazník musí validovať tento proces vo vlastnom laboratóriu.
2. Zlikvidujte bunkové kultivačné médium a do každej jamky pridajte 200 µL roztoku D-PBS.	2. V tomto čase vyberte roztok substrátu zo súpravy a nechajte ho vytemperovať na izbovú teplotu.
3. Zlikvidujte roztok D-PBS. Opakujte premytie každej jamky ešte 3-krát s novým roztokom D-PBS.	3. Po poslednom kroku premývania odstráňte všetok roztok D-PBS prevrátením platničky na absorpčný papier a až potom pokračujte.
4. 200-krát zriedte koncentrovanú konjugátovú reagensiu v roztoku D-PBS na vytvorenie roztoku s pracovnou koncentráciou.	4. Nepoužívajte roztok D-PBS obsahujúci Tween® ani iné detergenty, lebo to má za následok zvýšené počty na pozadí. Pripravte len malý prebytok roztoku s pracovnou koncentráciou (na prípadné straty).  Pre každý 8-jamkový prúžok (50 µL na jamku) pripravte 500 µL roztoku s pracovnou koncentráciou pridaním 2,5 µL koncentrovanej konjugátovej reagensie do 497,5 µL roztoku D-PBS. Na tento výpočet možno použiť kalkulačku riedenia konjugátu na disku CD dodanom s každou súpravou testu.
5. Do každej jamky pridajte 50 µL roztoku konjugátovej reagensie s pracovnou koncentráciou a inkubujte pri teplote 2 – 8 °C 1 hodinu.	5. Nedodržanie odporúčaného inkubačného času môže viesť k nesprávnej interpretácii výsledku.
6. Zlikvidujte konjugát z jamiek a premyte jamky roztokom D-PBS podľa postupu opísaného v bodoch 2 a 3 vyššie.	
7. Do každej jamky pridajte 50 µL roztoku substrátu a inkubujte pri izbovej teplote 7 minút.	7. Nedodržanie odporúčaného inkubačného času môže viesť k nesprávnej interpretácii výsledku.
8. Dôkladne premyte platničku destilovanou alebo deionizovanou vodou na zastavenie detekčnej reakcie.	
9. Nechajte platničku vysušiť na dobre vetranom mieste alebo v sušičke pri teplote maximálne 37 °C.	9. Sušením platničky sa škvŕny stávajú viditeľnejšími. Nechajte platničku sušiť 4 hodiny pri teplote 37 °C alebo cez noc pri izbovej teplote.
10. Spočítajte a zaznamenajte počet zreteľných tmavomodrých škvŕn na membráne každej jamky. Na posúdenie, či je vzorka pacienta „pozitívna“ alebo „negatívna“ na antigény TB, postupujte podľa časti Interpretácia výsledkov a kritériá testu (pozri ďalej).	10. Škvŕny možno vizualizovať rozličnými metódami vrátane ručnej lupy, vhodného mikroskopu, digitálneho mikroskopu, alebo špecializovaného zobrazovača platničiek ELISPOT. Školiacu pomôcku na počítanie škvŕn (program T-SPOT.Tutor) možno získať prostredníctvom webovej lokality spoločnosti Oxford Immunotec.

### **Kontrola kvality**

V prípade typického výsledku sa očakáva len málo škvŕn alebo žiadne škvŕny v nulovej kontrole a viac ako 20 škvŕn v pozitívnej kontrole.

Viac ako 10 škvŕn v nulovej kontrole by sa malo považovať za „neurčitý“ výsledok. Možné príčiny nájdete v školiacej príručke k testu T-SPOT.TB (možno prevziať z [www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)). Pacientovi je potrebné odobrať novú vzorku a otestovať ju.

V prípade pozitívnej kontroly, ktorá slúži na overenie funkčnosti buniek, by počet škvŕn mal byť štandardne  $\geq 20$  alebo by malo dôjsť k saturácii (príliš veľa škvŕn na to, aby sa dali spočítať). Malá časť pacientov môže mať T-bunky s len malou reaktívnosťou na PHA<sup>13,14</sup>. Ak je počet škvŕn v pozitívnej kontrole  $< 20$ , výsledok by sa mal považovať za „neurčitý“, pokiaľ panel A alebo panel B nie je „pozitívny“ podľa opisu v časti Interpretácia výsledkov a kritériá testu (pozri nižšie) – v takom prípade je výsledok platný.

Z dôvodu potenciálnej biologickej a systematickej variability, keď vyššia z hodnôt (panel A mínus nulová kontrola) a (panel B mínus nulová kontrola) je 5, 6 alebo 7 škvŕn, výsledok sa môže považovať za hraničný (dvojznačný). Hraničné (dvojznačné) výsledky sú síce platné, ale sú menej spoľahlivé ako výsledky, v ktorých je počet škvŕn vzdialenejší od hraničnej hodnoty. Preto sa odporúča znova otestovať pacienta s novou vzorkou. Ak je aj po zopakovaní testu výsledok hraničný (dvojznačný), je potrebné použiť iné diagnostické testy a/alebo epidemiologické informácie na stanovenie stavu infekcie TB pacienta.

Keďže antigény ESAT-6 a CFP10 nie sú prítomné v kmeňoch BCG *M. bovis* a vo väčšine environmentálnych baktérií, je možné, že „pozitívny“ výsledok testu T-SPOT.TB je spôsobený infekciou *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* alebo *M. goodii*. Ak existuje podozrenie na takú infekciu, je potrebné použiť alternatívne testy.

### **Interpretácia výsledkov a kritériá testu**

Pred použitím týchto kritérií si prečítajte časť Kontrola kvality.

Výsledky testu T-SPOT.TB sa interpretujú ako rozdiel počtu škvŕn v každom z panelov a počtu škvŕn v nulovej kontrole podľa nasledujúceho algoritmu:

- výsledok testu je „pozitívny“, ak hodnota (panel A mínus nulová kontrola) a/alebo (panel B mínus nulová kontrola)  $\geq 6$  škvŕn,
- výsledok testu je „negatívny“, ak obe hodnoty (panel A mínus nulová kontrola) a (panel B mínus nulová kontrola)  $\leq 5$  škvŕn vrátane hodnôt nižších ako nula.

**„Pozitívny“ výsledok znamená, že vzorka obsahuje efektorové T-bunky reaktívne na *M. tuberculosis*.**

**„Negatívny“ výsledok znamená, že vzorka pravdepodobne neobsahuje efektorové T-bunky reaktívne na *M. tuberculosis*.**

### Výkonnostné charakteristiky testu

**Špecifickosť** testu bola vyhodnotená otestovaním 93 vzoriek od darcov, u ktorých sa na základe anamnézy a osobných informácií stanovilo nízke riziko infekcie *M. tuberculosis*. Špecifickosť testu T-SPOT.TB sa vypočítala ako 100 % (93/93) (95 % hranice významnosti 95,8 % – 100 %).











**Citlivosť** bola vyhodnotená otestovaním 87 vzoriek od pacientov s kultiváciou potvrdenou infekciou *M. tuberculosis* vrátane imunokompromitovaných skupín. Citlivosť testu T-SPOT.TB sa vypočítala ako 98,8 % (86/87) (95 % hranice významnosti 90,8 % – 99,9 %).

**Reprodukovateľnosť** bola vyhodnotená ako náhradný ukazovateľ variability v rámci testu analýzou duplikátov vzoriek krvi testovaných na rovnakej platničke. Celkovo 145 vzoriek krvi od 140 jednotlivých darcov sa testovalo v duplikátoch (dve jamky pre panel A i panel B) pomocou testu T-SPOT.TB. V 142/145 (97,9 %) analýz duplikátov sa pozorovala klinická zhoda. Dve analýzy duplikátov poskytli nesúhlasné hraničné výsledky a len 1/145 vzoriek viedla k rozdielnym výsledkom.

### Referencie

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.

### Použité symboly

-  Použiť do/Dátum expirácie (Rok-Mesiac-Deň)
-  Číslo Šarže
-  Katalógové číslo
-  Pozor, pozrieť pracovný návod
-  Výrobca
-  (Postačujúce) Určené na „n“ testov
-  IVD Určené pre in vitro diagnostiku
-  Teplotné obmedzenie/Skladujte do (medzi)
-  Pozrieť (obrátiť sa na) pracovný návod
-  Oprávnený zástupca v EÚ

## Kontaktné údaje

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

Podporné súbory na stiahnutie a ďalšie technické informácie nájdete na našej webovej lokalite:  
[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

T-SPOT, T-Cell *Xtend* a logo Oxford Immunotec sú registrované ochranné známky spoločnosti Oxford Immunotec Limited.

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

AIM-V a GIBCO sú ochranné známky spoločnosti Life Technologies Corporation.

CPT a Vacutainer sú ochranné známky spoločnosti Becton, Dickinson and Company.

Ficoll a Ficoll-Paque sú registrované ochranné známky spoločnosti Cytiva, čo je pridružená spoločnosť spoločnosti Global Life Sciences Solutions USA LLC.

Tween je registrovaná ochranná známka spoločnosti Croda Americas LLC.

Použitie reagentov T-Cell *Xtend* je chránené týmito patentmi a patentovými prihláškami:  
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117,  
CA2665205.

Číslo revízie: 5 Dátum vydania: november 2023

© 2023, Oxford Immunotec. Všetky práva vyhradené.

### 🏭 Výrobca

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

 Oprávnený zástupca v EÚ

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



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



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