

T-SPOT[®].TB

 **Oxford
Immunotec**

Tüberküloz enfeksiyonu tanısında yardımcı

KULLANIM KILAVUZU

In Vitro Tanıda Kullanım İçin

Bu kılavuz, aşağıdakilerin kullanımını kapsar:
T-SPOT.TB 8 (Çok kullanımlı 8 Kuyucuklu Strip Plaka Formatı. Katalog numarası: TB.300)

İçindekiler

Kullanım amacı	2
Giriş	2
Prosedürün Esasları	2
Sınırlamalar	3
Güvenlik Uyarıları ve Önlemler	4
Sağlanan Malzemeler	4
Saklama	4
Stabilite	4
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Ekipman ve Malzemeler	5
Reaktif Hazırlama	5
Prosedür	6
Numune Toplama ve Hazırlama	6
Hücre Sayımı ve Seyreltme	8
Plaka Kurulumu ve İnkübasyon	8
Nokta Oluşturma ve Sayım	9
Kalite Kontrol	10
Sonuçların Yorumlanması ve Test Kriterleri	11
Test Performans Özellikleri	11
Referanslar	11
Semboller Sözlüğü	12

Kullanım Amacı

T-SPOT®.TB testi, *Mycobacterium tuberculosis* antijenlerinin stimülasyonuna yanıt veren efektör T hücrelerinin saptanmasına yönelik bir in vitro tanı testidir ve tüberküloz (TB) enfeksiyonunun tanısına yardımcı olarak kullanılması amaçlanmıştır. T-SPOT. TB testi, tek tek TB'ye özgü aktive edilmiş efektör T hücrelerinin sayıldığı, basitleştirilmiş bir enzime bağlı immüno-spot (ELISPOT) yöntemidir.

Giriş

Dünya Sağlık Örgütü, dünya nüfusunun üçte birinin *M. tuberculosis* ile enfekte olduğunu tahmin etmektedir. Gizli TB enfeksiyonu (LTBI) taşıyan bir kişinin aktif hastalığa ilerleme olasılığı yaklaşık %10'dur. Bu ilerleme hızı, yakın zamanda enfekte olanlar ve zayıflamış bir bağışıklık sistemi olanlar dahil olmak üzere belirli gruplar arasında yükselir.

M. tuberculosis enfeksiyonuna verilen bağışıklık yanıtı ağırlıklı olarak Hücre Aracılı Bağışıklık (CMI) yanıtıdır. Bu yanıtın bir parçası olarak T hücreleri, *M. tuberculosis* antijenlerine duyarlı hale getirilir. Spesifik olarak kandan ayrıştırılmış ve aktive edilmiş olan efektör T hücreleri, dolayısıyla hem CD4 hem de CD8, bu antijenler tarafından in vitro olarak uyarılma yeteneklerine göre sıralanabilir^{1,2}. *M. tuberculosis* kompleksi (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) için seçilmiş antijenlerin kullanımı, BCG aşısına ve birçok çevresel mikobakteriye karşı çapraz reaktiviteyi azaltarak test özgüllüğünü bu organizmalar açısından geliştirir^{3,4}. İyi tanımlanmış proteinler olan ESAT-6 ve CFP10'u simüle eden iki ayrı antijen paneli, testin duyarlılığını optimize etmek için kullanılır.

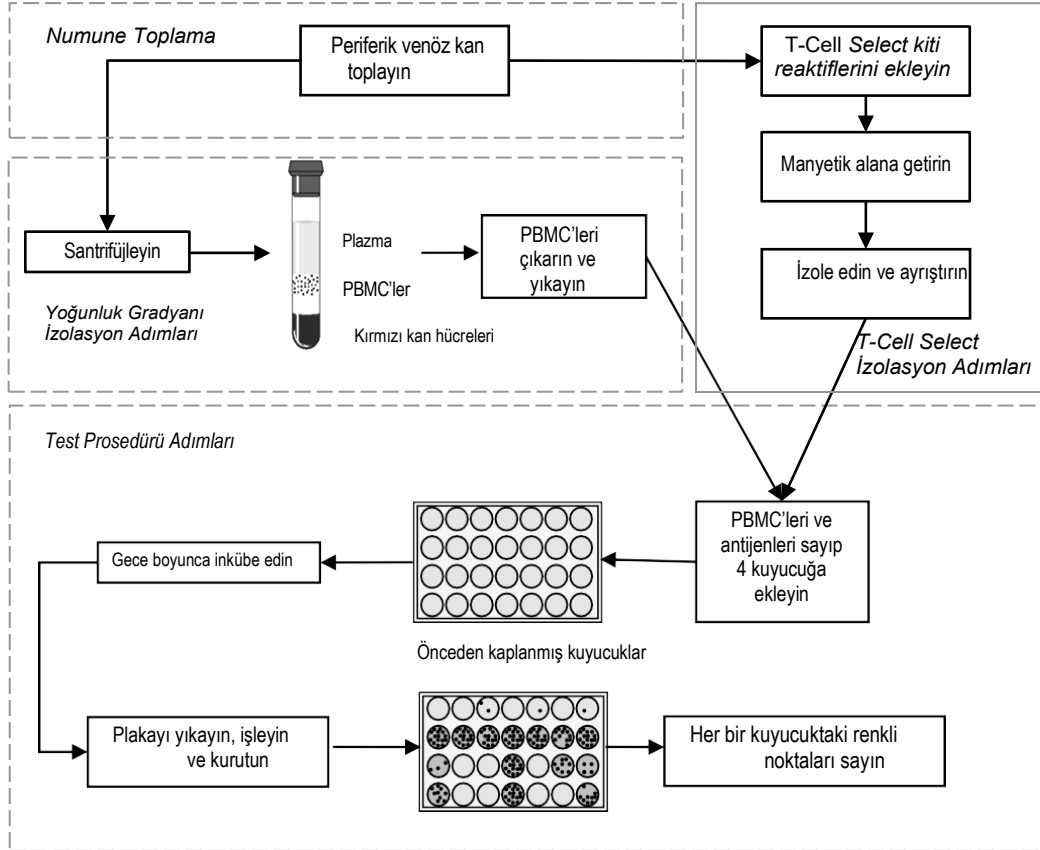
T-SPOT. TB testi, ELISPOT test tekniğinin basitleştirilmiş bir çeşididir. ELISPOT testleri son derece hassastır çünkü hedef sitokin; süpernatanda seyreltilmeden, komşu hücrelerin reseptörleri tarafından yakalanmadan veya parçalanmadan önce, doğrudan salgılandığı hücrenin çevresinde yakalanır. Bu, ELISPOT testlerini geleneksel ELISA testlerinden çok daha hassas hale getirir⁵. T-SPOT. TB testi, *M. Tuberculosis*'e özgü antijenlerin stimülasyonuna yanıt veren efektör T hücrelerinin saptanması için tasarlanmıştır^{3,4,6,9}. Test, bireysel olarak aktive edilmiş TB'ye özgü T hücrelerini tespit eder. Yaş, cinsiyet, etnik köken, tedavi veya bağışıklık durumu ne olursa olsun LTBI riski taşıyan veya TB hastalığına sahip olduğundan şüphelenilen tüm hastalarda kullanıma uygundur^{10,11}.

Prosedürün Esasları

Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC'ler) tam kan numunesinden ayrılır ve arka planda parazit yapan sinyal kaynaklarını ortadan kaldırmak için yıkanır. PBMC'ler daha sonra testte standart sayıda hücre kullanılmasını sağlamak amacıyla sayılır. Bu, bağışıklık sistemlerinin zayıflaması nedeniyle T hücresi titreleri düşük olan kişilerde bile (bağışıklığı baskılanmış olanlar) mikrotitre kuyucuklarına yeterli sayıda hücre eklenmesini sağlar. ELISPOT tekniğinin yanısıra yıkama ve sayım aşamaları, TB hastalığı ve latent TB enfeksiyonunun saptanmasında üstün performans sağlar.

Her numune için dört kuyucuk (bkz. Şekil 1) gereklidir:

1. Spesifik olmayan hücre aktivasyonunu belirlemek için bir Nil Kontrol.
2. TB'ye özgü antijenler, Panel A (ESAT-6).
3. TB'ye özgü antijenler, Panel B (CFP10).
4. PBMC işlevselliğini doğrulamak için fitohemaglutinin (PHA, bilinen bir poliklonal aktivatör¹²) içeren bir Pozitif Kontrol.



Şekil 1: T-SPOT.TB testinin ana adımları. Her plakanın 96 kuyucuk içerdiğine dikkat edin.

PBMC'ler, duyarlı hale getirilen mevcut T hücrelerinin uyarılmasına izin vermek için antijenlerle inkübe edilir. Salgılanan sitokin, kuyucuğun tabanını oluşturan membran üzerindeki spesifik antikorlar tarafından yakalanır. Hücreler ve diğer istenmeyen maddeler yıkama ile uzaklaştırılır. Alkalen fosfataza konjüge edilen ve sitokin molekülü üzerindeki farklı bir epitopa yönlendirilen ikinci bir antikor eklenir ve membran yüzeyinde yakalanan sitokine bağlanır. Bağlanmamış konjugatlar yıkama ile uzaklaştırılır. Her kuyucuğa çözünür bir substrat eklenir; bu, reaksiyon bölgesinde çözünmeyen bir çökelti noktası oluşturmak için bağlı enzim tarafından bölünür. Her nokta, ayrı bir sitokin salgılayan T hücrelerinin ayak izini temsil eder ve elde edilen noktaların sayısının değerlendirilmesi, *M. tuberculosis*'e duyarlı efektör T hücrelerinin periferik kandaki miktarının ölçülmesini sağlar.

Sınırlamalar

- Yalnızca in vitro tanıda kullanım içindir.
- Sadece profesyonel kullanım içindir.
- Farklı kit lotlarından bileşenleri karıştırmayın.
- Kullanmadan önce test talimatlarını dikkatlice okuyun.
- Reaktifleri, test kuyucuklarını, hücre süspansiyonlarını ve hücre kültürü ortamını kontaminasyondan korumak için aseptik teknik kullanın.
- Belirtilen pipetleme ve yıkama teknikleri, inkübasyon süreleri ve/veya sıcaklıklarındaki değişiklikler, elde edilen sonuçları etkileyebileceğinden bu tür değişikliklerden kaçınılmalıdır.
- Kan alındıktan sonra 8 saat içinde teste alınmalıdır. Bu zaman sınırlaması, T-Cell Select™ reaktif kiti veya T-Cell Xtend® reaktif (Oxford Immunotec'ten temin edilebilir) kullanılarak aşılabilir. T-Cell Select reaktif kiti T-SPOT.TB testi ile birlikte kullanıldığında numune saklama süresi 54 saate çıkar ve hücre izolasyon işlemi otomatize edilebilir. T-SPOT.TB testi ile T-Cell Xtend reaktif veya başka bir granülosit azaltma yöntemi kullanıldığında numune saklama süresi 32 saate çıkar.
- T-Cell Select reaktif kitiyle kullanılacaklar da dahil olmak üzere, tüm kan numuneleri saklanırken ve laboratuvara nakledilirken oda sıcaklığında (18-25 °C) tutulmalıdır. T-Cell Xtend reaktif kullanılıyorsa, numuneler 10-25 °C'de taşınabilir ve saklanabilir. Tam kan numunelerini soğutmayın veya dondurmayın.

- T-SPOT.TB testi yalnızca genel klinik durum bağlamında kullanılmalı ve yorumlanmalıdır.
- Negatif test sonucu, enfeksiyona maruz kalmış olma veya *M. Tuberculosis* enfeksiyonu olasılığını ortadan kaldırmaz.
- ESAT-6 ve CFP10 antijenleri, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. Marinum*^{3,4} ve *M. gordonae* hariç, BCG suşlarında ve çevresel mikobakterilerin çoğunda yoktur.

Güvenlik Uyarıları ve Önlemler

İnsan kaynaklı malzemelerle çalışırken dikkatli olunmalıdır. Tüm kan numuneleri potansiyel olarak enfeksiyöz kabul edilmelidir.

Kan numunelerinin ve test bileşenlerinin işlenmesi, bunların kullanımı, saklanması ve imhası, ilgili ulusal biyolojik tehlike güvenlik yönergeleri veya yönetmeliklerinde belirlenen prosedürlere uygun olmalıdır.

Kimyasallarla çalışırken dikkatli olunmalıdır. Tüm kimyasallar potansiyel olarak tehlikeli kabul edilmelidir.

Sağlanan Malzemeler

T- SPOT.TB 8 kiti şunları içerir:

1. 1 mikrotitre plakası (CVV.300): 96 kuyucuklu. Sitokin interferon gama'yı (IFN- γ) hedefleyen bir fare monoklonal antikoru ile kaplanmış olarak 12 x 8 kuyucuklu stripler halinde bir çerçeve içinde sağlanır.
2. 2 şişe (PA.300, her biri 0.8 mL) Panel A: ESAT-6 antijenleri, sığır serum albümini ve antimikrobiyal maddeler içerir.
3. 2 şişe (PB.300, her biri 0.8 mL) Panel B: CFP10 antijenleri, sığır serum albümini ve antimikrobiyal maddeler içerir.
4. 2 şişe (CP.300, her biri 0.8 mL) Pozitif Kontrol: Hücre işlevsellik kontrolü olarak kullanım için fitohemaglutinin (PHA), sığır serum albümini ve antimikrobiyal maddeler içerir.
5. 1 şişe (CR.300, 50 μ L) 200 x konsantre Konjugat Reaktifi: alkalın fosfataza konjuge IFN- γ sitokin fare monoklonal antikoru.
6. 1 şişe (SR.300, 25 mL) Substrat Solüsyonu: kullanıma hazır BCIP/NBTplus solüsyonu.
7. MSDS, Eğitim Kılavuzu, T-SPOT hücre seyreltme hesaplayıcısı, konjugat seyreltme hesaplayıcısı, santrifüj hızı hesaplayıcısı ve T-SPOT. AutoReporter programı ile birlikte CD'de bulunan Kullanım Talimatları.

Saklama

Kitin tüm bileşenlerini 2-8 °C'de saklayın.

Substrat Solüsyonunu uzun süre ışığa maruz bırakmaktan kaçının.

Stabilite

Farklı kit lotlarının bileşenlerini karıştırmayın. Açılmamış kiti 2-8 °C'de saklayın. Kitin bileşenleri, önerilen koşullarda saklandığında ve kullanıldığında, kit kutusu üzerinde yazılı olan son kullanma tarihine kadar stabildir. Kit, kit etiketindeki son kullanma tarihinden sonra kullanılmamalıdır.

Açılan kit bileşenlerini 2-8 °C'de saklayın. Bileşenler açıldıktan sonra 8 hafta içinde kullanılmalıdır.

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Ekipman ve Malzemeler

1. 8 kuyucuklu strip plakası çerçevesi (Oxford Immunotec'ten temin edilebilir).
2. Sınıf II mikrobiyoloji kabini (önerilen).
3. Vacutainer® CPT™ (Oxford Immunotec'ten temin edilebilir), heparinize veya sitrat içeren tüpler vb. kan alma tüpleri.
4. Ficoll®-Paque * Plus veya alternatif PBMC ayırma malzemeleri.
5. T-Cell *Xtend* reaktifi (Oxford Immunotec'ten temin edilebilir), toplanan numunelerle venepunkturdan 32 saat sonraya kadar kullanılabilir. T-Cell *Select* reaktif kiti (Oxford Immunotec'ten temin edilebilir), toplanan numunelerle venepunkturdan 54 saat sonraya kadar kullanılabilir. 32 saate kadar saklanan numuneler için alternatif granülosit azaltma yöntemleri kullanılabilir. Müşteriler alternatif yöntemleri kendi laboratuvarlarında valide etmelidir.
6. Lökosep tüpleri, PBMC'lerin Ficoll* yöntemiyle ayrılmasını kolaylaştırmak için kullanılabilir.
7. PBMC'lerin hazırlanması için en az 1800 xg kapasiteli ve numuneleri oda sıcaklığında (18-25°C) muhafaza edebilen santrifüj []
8. Ayrılan PBMC'nin hazırlanmasında ve yıkanmasında bir hücre yıkama santrifüjü, örneğin bir DiaCent-CW santrifüjü (Bio-Rad) kullanılabilir. Müşteriler, bu tür ekipmanların kullanımını kendi laboratuvarlarında valide etmelidir.
9. PBMC'lerin sayımını sağlamak için ekipman ve reaktifler: Trypan Blue ve mikroskopta bir hemositometre kullanarak manuel veya uygun bir hematoloji analizörü kullanarak otomatik sayım yapanlar.
10. %5 CO₂ kaynağı ile 37 ± 1 °C kapasiteli, nemlendirilmiş bir inkübatör.
11. Plakaları manuel olarak yıkamak için bir mikrotitre plaka yıkayıcı veya ekipman.
12. Pipetler ve steril pipet uçları.
13. Steril D-PBS solüsyonu: GIBCO® 1 x D-PBS vb. (Invitrogen; katalog numarası 14040 091).
14. Distile veya deiyonize su.
15. Mikroskop, dijital mikroskop, büyüteç veya plaka görüntüleyici vb. bir plaka okuma aracı.
16. GIBCO AIM-V® (Invitrogen; katalog numarası 31035-025) gibi steril hücre kültürü ortamı: inkübasyon adımı için bu serumsuz ortamın kullanılması şiddetle tavsiye edilir. RPMI 1640 (Invitrogen; katalog numarası 21875-034) sadece ilk numune hazırlama adımlarında kullanılabilir. Hücre kültürü ortamının uygun alikotlarda saklanması ve kullanımdan sonra fazla materyalin atılması önerilir. Hücre kültürü ortamı, T-SPOT. *TB* testi ile kullanılmadan önce ısıtılarak 37 °C'ye getirilmelidir.

Reaktif Hazırlama

1. Mikrotitre Plakası. T-SPOT. *TB* 8 mikrotitre plakası kullanıma hazır olarak sağlanır. Gerekli sayıda 8 kuyucuklu stripi saklama alanından çıkarın ve oda sıcaklığına gelmesini bekleyin. Kalan stripleri folyo ambalaja alarak nem alıcı torbayı ekleyin ve ağzını tekrar kapatın.
2. *M. tuberculosis* ESAT-6 antijen şişeleri (Panel A) kullanıma hazırdır.
3. *M. tuberculosis* CFP10 antijen şişeleri (Panel B) kullanıma hazırdır.
4. Pozitif Kontrol şişeleri kullanıma hazırdır.
5. 1:200 dilüsyonlu kullanıma hazırlanmış Konjugat Reaktif solüsyonu hazırlayın. Çalışma için gerekli olan Konjugat Reaktif solüsyonunun hacmini hesaplayın (her test kitiyle birlikte verilen CD'deki T-SPOT konjugat seyreltme hesaplayıcısına bakın). Reaktif kullanımdan hemen önce hazırlanabilir veya çalışma konsantrasyonuna (1:200) kadar seyreltilerek hazırlanabilir. Ayrıca kullanımdan önce 2 °C - 8 °C'de altı haftaya kadar saklanabilir. Seyreltilmiş reaktif bu raf ömrü dışında kullanmayın.
6. Substrat Solüsyonu kullanıma hazırdır. Saklama alanından çıkarın ve oda sıcaklığına getirin.

Prosedür

Bu test, İyi Laboratuvar Uygulamaları ilkeleri kullanılarak ve bu Kullanım Talimatlarına sıkı sıkıya bağlı kalınarak yapılmalıdır.

Oxford Immunotec Ltd, numunelerin toplanmasını ve hazırlanmasını, hücre kültürü ortamının seçimini ve noktaları sayma yöntemlerini açıklayan bir Eğitim Kılavuzu hazırlamıştır. Bu kılavuz, her test kitiyle birlikte verilen CD'de mevcuttur. Ayrıca +44 (0) 1235 442780 numaralı telefondan talep edilebilir veya www.oxfordimmunotec.com adresinden indirilebilir.

Numune Toplama ve Hazırlama

Bireysel kullanıcılar, testin birincil inkübasyon aşaması sırasında kan numunelerinin toplanması, PBMC'lerin ayrılması ve sayılması ve T hücresi işlevselliğini desteklemek için uygun ortam seçimi prosedürlerini valide etmelidir. Tipik olarak, bağıışıklığı yeterli hastalarda testi çalıştırmaya yetecek miktarda PBMC, venöz kan örneklerinden aşağıdaki yönergelere göre elde edilebilir:

- Yetişkinlerle 10 yaş ve üzeri çocuklarda: bir adet 8 mL veya iki adet 4 mL'lik CPT tüpü veya bir adet 6 mL'lik heparin veya sitrat tüpü
- 2-9 yaş arası çocuklarda: bir adet 4 mL'lik CPT, heparin veya sitrat tüpü
- 2 yaş altı çocuklarda: bir adet 2 mL'lik pediatrik tüp

Kan numuneleri oda sıcaklığında saklanmalı ve kan alındıktan sonra 8 saat içinde, T-Cell *Xtend* reaktifi kullanılıyorsa 10-25°C'de saklandığı takdirde 32 saat içinde veya T-Cell *Select* reaktif kiti kullanılıyorsa 18-25°C'de saklandığı takdirde 54 saat içinde test edilmelidir

Hücre kültürü ortamı, T-SPOT.*TB* testi ile kullanılmadan önce ısıtılarak 37°C'ye getirilmelidir.

Prosedür 1.	Notlar
<p>Toplama cihazının talimatlarına uygun olarak bir kan numunesi alın.</p> <p>Toplanan kanı oda sıcaklığında (18-25 °C) veya T-Cell <i>Xtend</i> reaktifi kullanılacaksa 10-25°C'de saklayın. Soğutmayın veya dondurmayın.</p>	<p>1. Kan numuneleri çeşitli tüplerde toplanabilir. Laboratuvarlarımızda Vacutainer sitrat CPT, heparin CPT, standart heparin ve standart sitrat tüplerin başarıyla kullanılmıştır. CPT tüpleri, T-Cell <i>Xtend</i> reaktifi ile kullanıma uygun değildir.</p> <p>EDTA tüpleri tavsiye edilmez.</p>
<p>2. CPT kan alma tüplerini kullanırken, üreticinin PBMC'lerin ayrılmasıyla ilgili talimatlarına uyun.</p> <p>Heparin veya sitrat içeren kan alma vakutainer'lerini kullanırken, PBMC'leri yayınlanmış prosedürlere uygun olarak Ficoll-Paque Plus aracılığıyla santrifüjleyerek ayırın.</p> <p>Leucosep tüpleri, T-Cell <i>Select</i> reaktif kiti veya T-Cell <i>Xtend</i> reaktifi (Oxford Immunotec'ten temin edilebilir) kullanılıyorsa bu reaktiflerle sağlanan protokolleri izleyin.</p>	<p>2. 8 mL'lik CPT tüplerini 1600 xg'de 28 dakika veya 4 mL'lik CPT tüplerini 1800 xg'de 30 dakika 18 °C'de, soğutmalı bir santrifüjün mevcut olduğu yerlerde santrifüjleyin. Daha önce daha düşük sıcaklıklar kullanılmışsa santrifüjün 18°C'ye ulaşmasını bekleyin. Soğutmasız bir santrifüj kullanılıyorsa, sıcaklığın 25°C'nin üzerine çıkmadığından emin olun.</p> <p>Alternatif olarak, kanı eşit hacimde RPMI 1640 ortamı ile seyreltin. Seyreltilmiş kanı (2-3 hacim) dikkatlice Ficoll Paque Plus (1 hacim) üzerine bir katman oluşturacak şekilde ekleyin ve sıcaklığı 18 ila 25°C arasında tutmak kaydıyla 1000 xg'de 22 dakika santrifüjleyin.</p> <p>Venepunkturdan sonra 8 ila 32 saat saklanan numuneler için, numuneyi Ficoll-Paque Plus üzerine yerleştirmeden önce T-Cell <i>Xtend</i> reaktifini kullanın.</p> <p>Venepunkturdan sonra 54 saate kadar saklanan numuneler için, T-Cell <i>Select</i> reaktif kiti ile sağlanan protokolü kullanın.</p> <p>Test kitiyle birlikte verilen CD'deki santrifüj hızı hesaplayıcısı, hızları xg'den rpm'ye dönüştürmeye yardımcı olabilir.</p> <p>Diğer PBMC ayırma yöntemleri kullanılıyorsa, bunların T-SPOT.TB testiyle kullanılmadan önce müşteri tarafından valide edilmesi gerekir.</p>
<p>3a. Bir pipet kullanarak beyaz, bulanık PBMC bandını toplayın ve 15 mL'lik konik santrifüj tüpüne aktarın. Hücre kültürü ortamı ile hacmi 10 mL'ye tamamlayın.</p>	<p>3a. Bu işlem sırasında hücrelerin yıkanması için çeşitli ortamlar kullanılabilir. Laboratuvarlarımızda hem AIM-V hem de RPMI 1640 başarıyla kullanılmıştır ve tavsiye edilmektedir.</p>
<p>3b. Alternatif olarak, hücre yıkama aşamalarını kolaylaştırmak için DiaCent-CVV (Bio-Rad) gibi bir hücre yıkama santrifüjü kullanılabilir. Bu sistem kullanılıyorsa hücreleri yıkamak için DPBS kullanılmalıdır.</p>	<p>3b. PBMC'nin hazırlanması sırasında hücre yıkama santrifüjünün kullanımına ilişkin metodoloji Oxford Immunotec'ten temin edilecektir.</p> <p>Ancak müşteriler bu yöntemi kendi laboratuvarlarında valide etmelidir.</p>
<p>4. 600 xg'de 7 dakika santrifüjleyin. Süpernatantı dökün ve peleti 1 mL ortam içinde yeniden süspans edin.</p>	<p>4. Bkz. 3a.</p>
<p>5. Taze ortam ile hacmi 10 mL'ye tamamlayın ve 350 xg'de 7 dakika santrifüjleyin.</p>	<p>5. Bkz. 3a.</p>
<p>6. Süpernatantı boşaltın ve peleti 0.7 mL AIM-V kültür ortamı içinde yeniden süspans edin.</p>	<p>6. Bu aşamada, peleti yeniden süspans etmek amacıyla gece boyu inkübasyon için kültür ortamı kullanılmalıdır. Laboratuvarlarımızda serumsuz ortam AIM-V başarıyla kullanılmıştır ve şiddetle tavsiye edilmektedir.</p>

Bronkoalveoler lavaj (BAL), plevral efüzyon (PE) veya beyin omurilik sıvısı (BOS) gibi diğer vücut sıvılarından elde edilen T hücreleri, T-SPOT.TB testi ile TB enfeksiyonunu ve hastalığını tanımlamada başarıyla kullanılmıştır [Jafari ve diğerleri (2006) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **174** 1048-1054, Jafari ve diğerleri (2008) Eur. Resp. J. **31** 261-265, Strassburg ve diğerleri (2008) Eur. Resp. J. **31** 1132-1135, Jafari ve diğerleri (2009) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **180**(7) 666-673, Dheda ve diğerleri (2009) Thorax **64**(10) 847-853 ve Patel ve diğerleri (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77]. Kan dışı numuneler söz konusuysa kullanıcıların yeterli miktarda mononükleer hücre toplanmasına yönelik prosedürleri valide etmesi gerekir. BAL numunelerinin işlenmesine yönelik yöntemler, yukarıda atıfta bulunulan yayınlarda açıklanmaktadır.

Not 1: Kan dışı numunelerde pozitif sonuca ilişkin cut-off ve test için geçerli kontroller kapsamlı bir şekilde değerlendirilmemiştir, bu nedenle kan testinden farklı olabilirler. Kullanıcılar, kendi test yorumlama kriterlerini belirlemelidir. Klinisyenler, sonuçları incelerken kendi muhakemelerinden de yararlanmalıdır. Not 2: Numunenin alınmasından testin başlamasına kadar geçen süre kapsamlı bir şekilde incelenmemiştir.

Hücre Sayımı ve Seyreltme

T-SPOT.TB testi kuyucuk başına 2.5×10^5 canlı PBMC gerektirir. Her hasta numunesi için toplam dört kuyucuk gereklidir. Her kuyucuğa doğru sayıda hücre eklenmelidir. Bunun yapılmaması, sonucun yanlış yorumlanmasına yol açabilir.

Prosedür 1.	Notlar
Canlı hücre sayımı gerçekleştirin.	1. Hücreler, Trypan Blue ve bir hemositometre kullanılarak manuel sayım veya uygun bir alet kullanılarak otomatik sayım dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerle sayılabilir.
2. Kısaca, Neubauer hemasiyometre ile manuel sayım için, 40 µL %0.4'e (w/v) Trypan Blue solüsyonuna nihai hücre süspansiyonundan 10 µL ekleyin. Hemositometreye uygun bir alikot yerleştirin ve hücreleri sayın. Diğer hemositometre türleri ve otomatik cihazlar için üreticinin talimatlarına uyun.	2. Alikotlar seyreltme veya sayım için çıkarılmadan hemen önce hücre süspansiyonunun iyice karıştırıldığından emin olunmalıdır. Hücreler tüpün dibine doğru çökerek gerçek hücre sayısının yanlış yorumlanmasına neden olabilir.
3. Stok hücre süspansiyonunda bulunan canlı hücrelerin konsantrasyonunu hesaplayın.	3. Yetersiz veya fazla sayıda hücre kullanılması sonucun yanlış yorumlanmasına yol açabileceğinden, kullanılan hücre sayma sistemi hesaplamasının doğruluğunu teyit edin. Her test kitiyle birlikte verilen CD'deki T-SPOT hücre seyreltme hesaplayıcısı bu hesaplamayı kolaylaştıracaktır.
4. 2.5×10^5 hücre /100 µL konsantrasyonda 500 µL nihai hücre süspansiyonu hazırlayın.	4. Bir alikot seyreltme için çıkarmadan önce hücrelerin iyice karıştırıldığından emin olun.

Plaka Kurulumu ve İnkübasyon

T- SPOT.TB testi, her hasta numunesi için kullanılacak dört kuyucuk gerektirir. Her bir numune ile bir Nil Kontrol ve bir hücre işlevselliği Pozitif Kontrolü çalıştırılmalıdır. Numunelerin aşağıda gösterildiği gibi plaka üzerinde dikey olarak düzenlenmesi önerilir.

- Nil Kontrol
- A Paneli
- B Paneli
- Pozitif kontrol

Prosedür 1.	Notlar
Önceden kaplanmış 8 kuyucuklu stripleri ambalajından çıkarın, bir plaka çerçevesine klipsleyin ve oda sıcaklığına gelmesine izin verin.	1. Yalnızca gerekli sayıda stripi çıkarın, kalanını saklama alanına geri koyun. Kullanılacak stripleri, iç ve dış kapakla donatılmış boş bir plaka çerçevesine klipsleyin. Çerçeveler ile iç ve dış kapaklar muhafaza edilerek yeniden kullanılmalıdır.
2. Her hasta numunesi, 4 ayrı kuyucuğun kullanılmasını gerektirir; (i) Her bir Nil Kontrol kuyucuğuna 50 µL AIM V kültür ortamı ekleyin, (ii) Gerekli her kuyucuğa 50 µL Panel A solüsyonu ekleyin. (iii) Gerekli her kuyucuğa 50 µL Panel B solüsyonu ekleyin. (iv) Her bir hücre işlevsellik kontrol kuyucuğuna 50 µL Pozitif Kontrol solüsyonu ekleyin.	2. Pipet ucunun membrana temas etmesine izin vermeyin. Pipet uçlarının membranlarda oluşturduğu girintiler, kuyucuklarda artefaktlara neden olabilir. Solüsyonların her kuyucuğun tabanındaki membranı kaplamasını sağlamak için plakaya hafifçe vurmak gerekebilir. Kuyucuklar arasında çapraz antijen kontaminasyonunu en aza indirmek için şiddetli ajitasyondan kaçınılmalıdır.
3. Bir hasta numunesi için kullanılacak 4 kuyucuğun her birine, hastanın nihai hücre süspansiyonundan (250.000 canlı hücre içeren) 100 µL ekleyin.	3. Her 100 µL'lik alikot çıkarmadan önce iyice karışmasını sağlamak için hücre süspansiyonunu yavaşça yukarı ve aşağı pipetleyin. 4 kuyucuk arasında çapraz kontaminasyon gelişmesini önlemek için hasta hücresi eklerken her defasında yeni bir ucun kullanılması önerilir.
4. Plakayı nemlendirilmiş bir inkübatörde 37 °C'de %5 CO ₂ ile 16-20 saat inkübe edin.	4. Inkübatöre bırakıldıktan sonra plakaları hareket ettirmekten kaçının. Eşit olmayan sıcaklık dağılımına ve havalandırmaya yol açabileceğinden plakaları istiflemeyin. Önerilen inkübasyon süresine ve koşullarına uyulmaması, sonucun yanlış yorumlanmasına neden olabilir. Inkübatörün, inkübasyon boyunca nemi korumaya yetecek düzeyde su içermesini sağlayın.

Nokta Oluşturma ve Sayım

Plaka yıkama ve geliştirme aşamaları sırasında, membrana pipet uçları veya otomatik kuyucuk yıkayıcı uçları ile dokunmayın. Pipet veya kuyucuk yıkayıcı uçlarının membranda oluşturduğu girintiler, kuyucuklarda nokta sayımına etki etme ihtimali bulunan artefakt gelişimine yol açabilir.

Prosedür 1.	Notlar
Plakayı inkübatörden çıkarın.	1. Çalışmada bir hafta sonu boyunca süren kaynak sorunu gibi kaçınılmaz bir gecikme olması durumunda, plakalar inkübatörden çıkarılabilir ve 2-8°C'de saklanabilir. Önerilen maksimum saklama süresi 72 saattir ve saklama sırasında plakaların üzeri örtülmelidir. Müşteri, bu süreci kendi laboratuvarında valide etmelidir.
2. Hücre kültürü ortamını imha edin ve her kuyucuğa 200 µL D-PBS solüsyonu ekleyin.	2. Bu sırada Substrat Solüsyonunu kitten çıkarın ve oda sıcaklığına gelmesine izin verin.
3. D-PBS solüsyonunu imha edin. Her yıkama için taze D- PBS solüsyonu ile kuyucuk yıkama işlemini 3 kez daha tekrarlayın.	3. Devam etmeden önce plakayı emici kağıt üzerinde ters çevirerek son yıkama adımıdaki tüm D-PBS'yi imha edin.

4. Kullanıma hazırlanmış bir solüsyon oluşturmak için konsantre Konjugat Reaktifini D-PBS içinde 200 kat seyreltin.	4. Tween® içeren D-PBS veya diğer deterjanları kullanmayın çünkü bu yüksek arka plan sayımlarına neden olur. Kullanıma hazırlanmış solüsyonunun yalnızca gerekenden biraz fazlasının (kullanım sırasında verilebilecek fire dolayısıyla) hazırlandığından emin olun. Her 8 kuyucuklu strip için (her kuyucuk 50 µL gerektirir), 497.5 µL D-PBS'ye 2.5 µL konsantre Konjugat Reaktifini ekleyerek kullanıma hazırlanmış 500 µL solüsyon hazırlayın. Bu hesaplama için her test kitiyle birlikte verilen CD'deki konjugat seyreltme hesaplayıcısı kullanılabilir.
5. Her kuyucuğa 50 µL kullanıma hazırlanmış Konjugat Reaktif solüsyonu ekleyin ve 2-8 °C'de 1 saat inkübe edin.	5. Önerilen inkübasyon süresine uyulmaması sonucun yanlış yorumlanmasına neden olabilir.
6. Konjugatı imha edin ve yukarıdaki 2. ve 3. adımlarda açıklandığı gibi dört kez D-PBS yıkama işlemi gerçekleştirin.	
7. Her kuyucuğa 50 µL Substrat Solüsyonu ekleyin ve oda sıcaklığında 7 dakika inkübe edin.	7. Önerilen inkübasyon süresine uyulmaması, sonucun yanlış yorumlanmasına neden olabilir.
8. Saptama reaksiyonunu durdurmak için plakayı distile veya deiyonize suyla iyice yıkayın.	
9. Plakayı iyi havalandırılan bir alanda veya 37 °C'ye kadar bir fırında bekleterek kurumaya bırakın.	9. Plaka kurudukça lekeler daha görünür hale gelir. 37 °C'de 4 saat veya oda sıcaklığında gece boyunca kurumaya bırakın.
10. Her kuyucuğun membranı üzerindeki farklı, koyu mavi noktaları sayın ve kaydedin. Bir hasta numunesinin TB antijenleri açısından 'Pozitif' veya 'Negatif' olup olmadığını belirlemek için Sonuçların Yorumlanması ve Test Kriterlerini (aşağıya bakın) uygulayın.	10. Noktalar; el tipi bir büyüteç, uygun bir mikroskop, bir dijital mikroskop veya özel bir ELISPOT plaka görüntüleyici kullanmak dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerle görselleştirilebilir. Nokta sayımı eğitim kılavuzu (T- SPOT.Tutor programı) Oxford Immunotec web sitesinden edinilebilir.

Kalite Kontrol

Tipik bir sonuca ait Nil Kontrol'de çok az nokta olması veya hiç nokta olmaması, Pozitif Kontrol'deyse 20'den fazla nokta olması beklenir.

10'uaşan bir Nil Kontrol nokta sayısı 'Belirsiz' olarak kabul edilmelidir. Olası nedenler için T-SPOT.TB Eğitim Kılavuzuna bakın (www.oxfordimmunotec.com adresinden indirin).

Bu durumda, hastadan başka bir numune alınmalı ve test edilmelidir.

Tipik olarak, hücre işlevselliği Pozitif Kontrol nokta sayısı ≥ 20 olmalı veya doyumluk (sayılamayacak kadar çok nokta) göstermelidir. Hastaların küçük bir kısmında PHA'ya yalnızca sınırlı bir yanıt gösteren T hücreleri olabilir^{13,14}. Pozitif Kontrol nokta sayısı < 20 nokta olduğunda, Panel A veya Panel B; Sonuçların Yorumlanması ve Test Kriterlerinde (aşağıya bakın) açıklandığı gibi 'Pozitif' dolayısıyla geçerli olmadığı sürece, 'Belirsiz' olarak kabul edilmelidir.

Potansiyel biyolojik ve sistematik varyasyonlar nedeniyle, (Panel A eksi Nil Kontrol) ve (Panel B eksi Nil Kontrol) için yüksek olan 5, 6 veya 7 noktaysa sonuç sınırda (şüpheli) olarak kabul edilebilir. Sınırdaki (şüpheli) sonuçlar, geçerli olmalarına rağmen nokta sayımının cut off'a daha uzak olduğu sonuçlardan daha az güvenilirdir. Bu nedenle, yeni bir numune kullanılarak hastanın yeniden test edilmesi önerilir. Yeniden test edildiğinde sonuç hala sınırda (şüpheli) ise hastanın TB enfeksiyon durumunu belirlemeye yardımcı olmak için diğer tanısal testler ve/veya epidemiyolojik bilgiler kullanılmalıdır.

M. bovis'in BCG suşlarında ve çevresel mikobakterilerin çoğunda ESAT-6 ve CFP10 antijenleri bulunmamasıyla birlikte, 'Pozitif bir T-SPOT. *TB* test sonucunun *M. kansasii*, *M. Szulgai*, *M. marinum* veya *M. gordonae* enfeksiyonuna bağlı olması mümkündür. Bu enfeksiyonlardan şüpheleniliyorsa alternatif testler gereklidir.

Sonuçların Yorumlanması ve Test Kriterleri

Aşağıdaki kriterleri uygulamadan önce Kalite Kontrol bölümüne bakın.

T-SPOT. *TB* test sonuçları, aşağıdaki algoritmaya göre Nil Kontrol kuyucuğundaki nokta sayısının Panellerin her birindeki nokta sayısından çıkarılmasıyla yorumlanır:

- (Panel A eksi Nil Kontrol) ve / veya (Panel B eksi Nil Kontrol) ≥ 6 nokta ise test sonucu pozitifdir.
- Hem (Panel A eksi Nil Kontrol) hem de (Panel B eksi Nil Kontrol) ≤ 5 nokta ise test sonucu negatiftir. Bu, sıfırdan küçük değerleri içerir.

"Pozitif" bir sonuç, numunenin *M. tuberculosis*'e reaktif, efektör T hücreleri içerdiğini gösterir.

"Negatif" bir sonuç, numunenin muhtemelen *M. tuberculosis*'e reaktif, efektör T hücreleri içermediğini gösterir.

Test Performans Özellikleri

Özgüllük, tıbbi geçmiş ve kişisel bilgilerinden yola çıkılarak *M. tuberculosis* enfeksiyonu riskinin düşük olduğu sonucuna varılan donörlerden alınan 93 numunenin test edilmesiyle değerlendirilmiştir. T-SPOT. *TB* testinin özgüllüğü %100 (93/93) (%95 güven sınırları %95.8 - %100) olarak hesaplanmıştır.











Duyarlılık, bağışıklığı baskılanmış gruplar da dahil olmak üzere, kültürle doğrulanmış *M. tuberculosis* enfeksiyonu vakalarından alınan 87 numune test edilerek değerlendirilmiştir. T-SPOT. *TB* testinin duyarlılığı %98.8 (86/87) (%95 güven limitleri %90.8 - %99.9) olarak hesaplanmıştır.

Tekrarlanabilirlik, test içi varyasyonun vekil bir belirteci olarak, eşdeğer kan numunelerinin aynı plaka üzerinde gerçekleştirilen analizi ile değerlendirilmiştir. 140 bireysel donörden alınan toplam 145 kan numunesi, T-SPOT. *TB* testi kullanılarak çift çalışılarak test edilmiştir (Panel A ve Panel B'nin her biri için iki kuyucuk). 145 çift çalışılan analizin 142'sinde (%97.9) klinik uyum gözlenmiştir. Çift çalışılan analizlerin 2'si uyumsuz sınırdaki sonuç verirken 145 numunenin yalnızca 1'i tutarsız sonuç vermiştir.

Referanslar

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. Comm., 4(5): 453-463.

Semboller Sözlüğü

	Son kullanma tarihi (Yıl-Ay-Gün)
	Lot numarası
	Katalog numarası
	Dikkat, kullanım talimatlarına bakın
	Üretici firma
	"n" sayıda test için yeterli
	In vitro tanı cihazı
	Sıcaklık sınırlaması / Bu sıcaklık aralığında saklayın
	Kullanım talimatlarına bakın
	AB Yetkili Temsilcisi

İletişim Bilgileri

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

Ürün desteği yüklemeleri ve daha fazla teknik bilgi için lütfen web sitemizi ziyaret edin:
www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT, T-Cell *Xtend* ve Oxford Immunotec logosu, Oxford Immunotec Limited'in tescilli ticari markalarıdır.

T-Cell *Select*, Oxford Immunotec Limited'in ticari markasıdır.

AIM-V ve GIBCO, Life Technologies Corporation'ın ticari markalarıdır.

CPT ve Vacutainer, Becton, Dickinson and Company'nin ticari markalarıdır.

Ficoll ve Ficoll-Paque, Global Life Sciences Solutions USA LLC'nin bir iştiraki olan Cytiva'nın tescilli ticari markalarıdır.

Tween, Croda Americas LLC'nin tescilli ticari markasıdır.

T-Cell *Xtend* reaktifinin kullanımı aşağıdaki patentler ve bekleyen patentlerle korunmaktadır:
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Revizyon numarası: 4 Yayın Tarihi: Ağustos 2023

© 2023 Oxford Immunotec. Her hakkı saklıdır.

Üretici

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

 AB Yetkili Temsilcisi

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



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



www.oxfordimmunotec.com