

# T-SPOT<sup>®</sup>.TB



Pomoc w diagnostyce zakażenia gruźlicą

## ULOTKA DO OPAKOWANIA

Do użytku diagnostycznego *in vitro*

Niniejsza ulotka dołączona do opakowania obejmuje:

T-SPOT.TB 8 (Wielofunkcyjny format 8-dołkowych płytek paskowych. Numer katalogowy: TB.300)

## Spis treści

Przeznaczenie testu .....	2
Wstęp .....	2
Procedura .....	2
Ograniczenia .....	3
Środki ostrożności dotyczące bezpieczeństwa .....	4
Zawartość zestawu .....	4
Przechowywanie .....	4
Stabilność .....	4
Sprzęt i materiały wymagane, ale niebędące w zestawie .....	5
Przygotowanie odczynników .....	5
Procedura .....	6
Pobieranie i przygotowywanie próbek .....	7
Liczenie i rozcieńczanie komórek .....	8
Przygotowanie płytki i inkubacja .....	8
Wywoływanie plamek i ich zliczanie .....	9
Kontrola jakości .....	10
Interpretacja wyników i kryteria testowe .....	11
Charakterystyka wydajności testu .....	11
Bibliografia .....	11
Słowniczek symboli .....	12

### **Przeznaczenie**

Test T-SPOT®.TB jest testem diagnostycznym in vitro do wykrywania efektorowych limfocytów T, które reagują na stymulację antygenami *Mycobacterium tuberculosis* i jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w diagnostyce zakażenia gruźlicą (TB). Test T-SPOT.TB jest uproszczoną metodą ELISPOT, która polega na zliczeniu poszczególnych aktywowanych efektorowych komórek T swoistych dla gruźlicy.

### **Wstęp**

Światowa Organizacja Zdrowia szacuje, że jedna trzecia światowej populacji jest zakażona prątkiem gruźlicy. Każda osoba z gruźlicą utajoną (LTBI) ma około 10% szans na przejście do aktywnej choroby. Ryzyko wzrasta wśród niektórych grup, w tym osób, które zostały niedawno zakażone i osób z osłabionym układem odpornościowym.

Na infekcję prątkiem gruźlicy układ immunologiczny reaguje poprzez odpowiedź komórkową (Cell Mediated Immune (CMI) response). Częścią tej odpowiedzi są komórki T wrażliwe na antygeny *M.tuberculosis*. Aktywowane komórki efektorowe T, zarówno CD4, jak i CD8, są izolowane z krwi i mogą zostać policzone, dzięki ich zdolnościom do odpowiedzi in vitro na stymulację antygenami<sup>1,2</sup>. Użycie kompleksu wyselekcjonowanych antygenów *M.tuberculosis* (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canetti*) poprawia specyficzność testu na te mikroorganizmy poprzez redukcję reaktywności krzyżowej ze szczepionką tuberkulinową (BCG) oraz większością mykobakterii środowiskowych<sup>3,4</sup>. Test zawiera dwa oddzielne panele, do których dodaje się białka ESAT-6 i CFP10, co gwarantuje optymalną czułość testu.

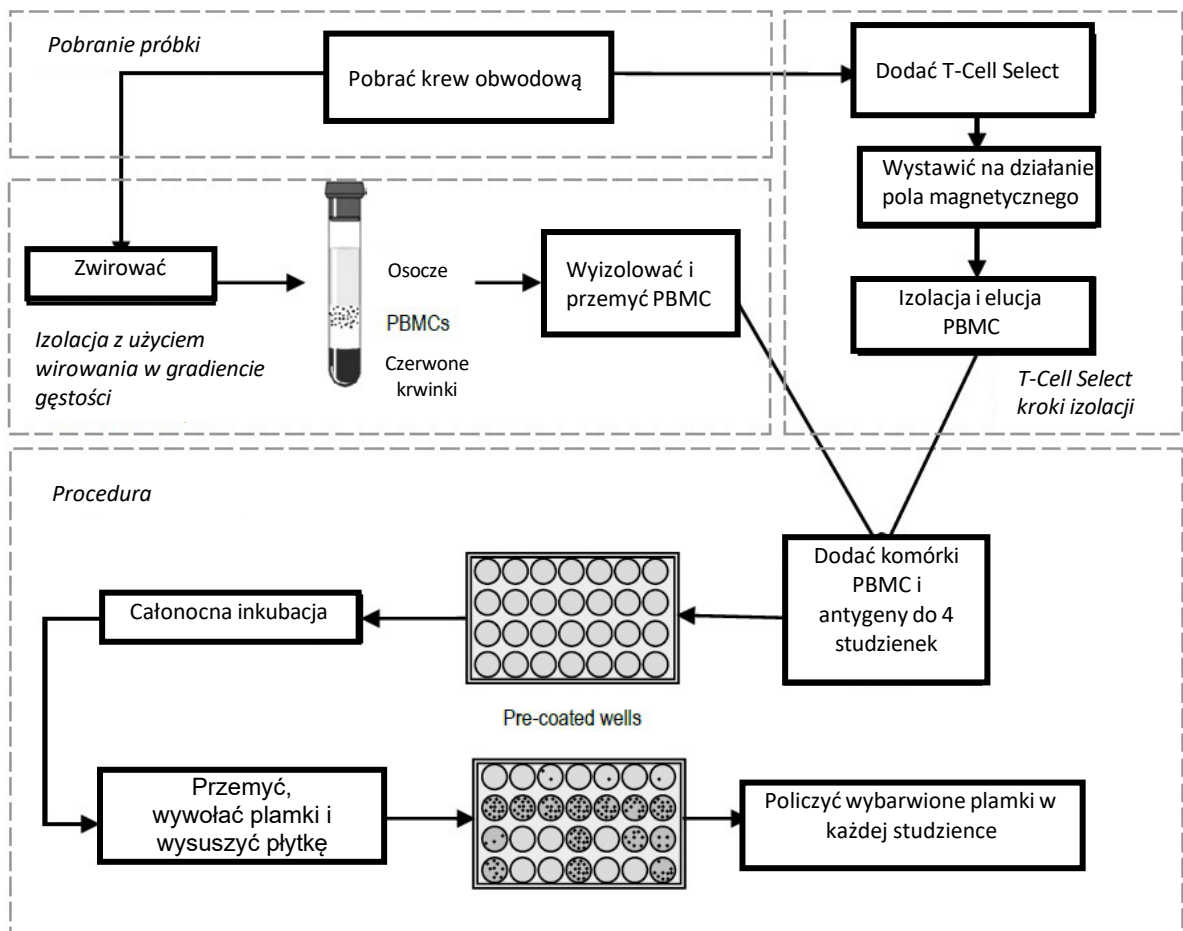
Test T-SPOT.TB jest oparty na technice ELISPOT i jest jego uproszczoną wersją. Testy ELISPOT są wyjątkowo czułe, ponieważ docelowa cytokina jest wychwytywana bezpośrednio wokół komórki wydzielającej, zanim zostanie rozcieńczona w supernatancie, wychwycona przez receptory sąsiednich komórek lub zdegradowana. To sprawia, że testy ELISPOT są znacznie bardziej czułe niż konwencjonalne testy ELISA<sup>5</sup>. Test T-SPOT.TB przeznaczony jest do wykrywania limfocytów T efektorowych, które reagują na stymulację antygenami swoistymi dla *M. tuberculosis*<sup>3,4,6-9</sup>. Test pozwala na zliczenie poszczególnych aktywowanych limfocytów T swoistych dla antygenów prątku gruźlicy. Jest odpowiedni do stosowania u wszystkich pacjentów z podejrzeniem LTBI lub aktywnej formy gruźlicy<sup>10,11</sup>, niezależnie od ich wieku, płci, pochodzenia etnicznego, stosowanych terapii lub stanu układu immunologicznego.

### **Procedura**

Z próbki krwi izoluje się krwinki jednojądrzaste krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells - PBMCs), a następnie przemywa tak, aby pozbyć się czynników mogących spowodować zakłócenia odczytu. Należy policzyć komórki PBMC w celu wystandaryzowania ich liczby w próbce. Pozwala to na dodanie określonej liczby komórek do studzienki, co jest możliwe nawet u osób, które mają małą ilość komórek T, spowodowaną osłabieniem układu immunologicznego (immunosupresja). Etapy przemywania i liczenia komórek, jak i sama technika ELISPOT, zapewnia wysokiej jakości rezultaty w detekcji gruźlicy zarówno aktywnej jak i latentnej.

Dla każdej próbki wymagane są cztery studzienki (patrz rysunek 1):

1. Kontrola Nil (negatywna) do identyfikacji niespecyficznego aktywacji komórek.
2. Antygeny swoiste dla gruźlicy, Panel A (ESAT-6).
3. Antygeny swoiste dla gruźlicy, Panel B (CFP10).
4. Kontrola pozytywna zawierająca fitohemaglutyninę (PHA, znany aktywator poliklonalny<sup>12</sup>) w celu potwierdzenia funkcjonalności PBMC.



Rysunek 1: Główne etapy testu T-SPOT.TB. Należy zauważyć, że każda płytka zawiera 96 studzienki.

Komórki krwi obwodowej PBMC są inkubowane z antygenami, aby wzbudzić każdą wrażliwą komórkę T obecną w studzience. Wydzielona cytokina jest wylapywana przez specyficzne przeciwciała umieszczone na membranie w studzience, a wszystkie komórki oraz inne zanieczyszczenia są wypłukiwane. Następnie dodawane jest drugie przeciwciało, skoniugowane z fosfatazą alkaliczną i skierowane do różnych epitopów na powierzchni cząsteczki cytokiny, które wiąże się z cytokiną na powierzchni membrany. Wszystkie niezwiązane koniugaty usuwa się ze studzienki podczas płukania płytki. Do każdej studzienki dodawany jest rozpuszczalny substrat, który po reakcji ze związanym na powierzchni studzienki enzymem, tworzy w miejscu reakcji nierozpuszczalny precypitat widoczny w postaci pojedynczej plamki. Każda z plamek jest śladem (footprint) jednej komórki T wydzielającej cytokinę. Określenie liczby uzyskanych plamek pozwala na dokładne oszacowanie ilości komórek efektorowych T, wrażliwych na *M. tuberculosis*, znajdujących się w krwi obwodowej.

### Ograniczenia

- Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.
- Test przeznaczony tylko do użytku profesjonalnego.
- Nie mieszać elementów z różnych serii zestawów.
- Przed użyciem przeczytaj uważnie instrukcję testu.
- Należy przestrzegać zasad aseptyczności, aby uniknąć zanieczyszczenia odczynników, studzienek testowych, zawiesin komórkowych i pożywek do hodowli komórkowych.
- Należy unikać odstępstw od opisanych technik pipetowania, przemywania płytek, czasu inkubacji i/lub temperatury, które mogą wpływać na uzyskiwane wyniki.
- Krew należy pobrać i użyć do testu w ciągu 8 godzin. To ograniczenie czasowe można ominąć, stosując zestaw odczynników T-Cell *Select*<sup>™</sup> lub odczynnik T-Cell *Xtend*<sup>®</sup> (dostępny w firmie Oxford Immunotec). Gdy zestaw odczynników T-Cell *Select* jest używany z testem T-SPOT.TB, czas przechowywania próbki wydłuża się do 54 godzin, a proces izolacji komórek można zautomatyzować. W przypadku użycia odczynnika T-Cell *Xtend* lub innej metody usuwania granulocytów z testem T-SPOT.TB czas przechowywania próbki wydłuża się do 32 godzin.
- Przechowuj i transportuj próbki krwi do laboratorium w temperaturze pokojowej (18-25 °C), w tym próbki krwi do użycia z zestawem odczynników T-Cell *Select*. W przypadku stosowania odczynnika T-Cell *Xtend* próbki można transportować i przechowywać w temperaturze 10– 25°C. Nie przechowywać w lodówce ani zamrażać próbek krwi pełnej.
- Test T-SPOT.TB należy stosować i interpretować wyłącznie w kontekście całościowego obrazu klinicznego.
- Ujemny wynik testu nie wyklucza możliwości narażenia lub zakażenia *M. tuberculosis*.
- Antygeny ESAT-6 i CFP10 są nieobecne w szczepach BCG i większości prątków środowiskowych, z wyjątkiem *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*<sup>3,4</sup> i *M. goodnae*.

### Ostrzeżenia i środki ostrożności dotyczące bezpieczeństwa

Należy zachować ostrożność podczas obchodzenia się z materiałem pochodzenia ludzkiego. Wszystkie próbki krwi należy traktować jako potencjalnie zakażne.

W postępowaniu z próbkami krwi oraz składnikami testu, jego użytkowaniem, przechowywaniem oraz utylizacją należy kierować się krajowymi wytycznymi dotyczącymi postępowania z materiałami niebezpiecznymi lub przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa biologicznego.

Podczas pracy z chemikaliami należy zachować ostrożność. Wszystkie chemikalia należy uważać za potencjalnie niebezpieczne.

### Skład zestawu

Zestaw T-SPOT.TB 8 zawiera:

1. 1 mikropłytkę (CW.300): 96 studzienek, dostarczanych jako 12 x 8-dołkowych pasków w ramce, opłaszczonych mysimi przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko interferonowi gamma (IFN- $\gamma$ ).
2. 2 fiołki (PA.300, 0,8 ml każda) Panel A: zawiera antygeny ESAT-6, albuminę surowicy bydlęcej i środki przeciwdrobnoustrojowe.
3. 2 fiołki (PB.300, 0,8 ml każda) Panel B: zawiera antygeny CFP10, albuminę surowicy bydlęcej i środki przeciwdrobnoustrojowe.
4. 2 fiołki (CP.300, 0,8 ml każda) Kontrola pozytywna: zawiera fitohemaglutyninę (PHA) do stosowania jako kontrola funkcjonalności komórek, albuminę surowicy bydlęcej i środki przeciwbakteryjne.
5. 1 fiołka (CR.300, 50  $\mu$ L) 200 x koncentrat koniugatu: mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko IFN- $\gamma$  skoniugowane z fosfatazą alkaliczną.
6. 1 butelka (SR.300, 25 mL) Roztwór substratu: gotowy do użycia roztwór BCIP/NBTplus.

7. Instrukcje użytkowania znajdują się na płycie CD wraz z kartami charakterystyk, podręcznikiem szkoleniowym, kalkulatorem rozcieńczeń komórek T-SPOT, kalkulatorem rozcieńczeń koniugatu, kalkulatorem prędkości wirowania i programem T- SPOT.AutoReporter.

### **Przechowywanie**

Wszystkie elementy zestawu należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Unikać długotrwałej ekspozycji roztworu substratu na światło.

### **Stabilność**

Nie mieszać składników z różnych serii zestawów. Przechowywać nieotwarty zestaw w temperaturze 2-8°C. Składniki zestawu zachowują stabilność do daty ważności wydrukowanej na opakowaniu zestawu, o ile są przechowywane w zalecanych warunkach. Zestawu nie wolno używać po upływie daty ważności podanej na etykiecie.

Otwarte elementy zestawu przechowywać w temperaturze 2-8°C. Należy je zużyć w ciągu 8 tygodni od otwarcia.

### **Sprzęt i materiały wymagane, niedostarczone wraz z zestawem**

1. 8-dołkowa ramka do pasków mikropłytki (dostępna z firmy Oxford Immunotec).
2. Komora do posiewów klasy II (zalecana).
3. Probówki do pobierania krwi, takie jak Vacutainer® CPT™ (dostępne w firmie Oxford Immunotec), probówki heparynizowane lub probówki zawierające cytrynian.
4. Ficoll®-Paque \* Plus lub alternatywne materiały do separacji PBMC.
5. Odczynnik T-Cell Xtend (dostępny w firmie Oxford Immunotec) może być używany z próbkami pobranymi do 32 godzin po nakłuciu żyły. Zestaw odczynników T-Cell Select (dostępny w firmie Oxford Immunotec) może być używany z próbkami pobranymi do 54 godzin po nakłuciu żyły. W przypadku próbek przechowywanych do 32 godzin można zastosować alternatywne metody deplecji granulocytów. Klienci powinni zweryfikować alternatywne metody we własnych laboratoriach.
6. Probówki Leucosep mogą być użyte w celu uproszczenia rozdziału PBMC metodą Ficoll\*.
7. Wirówka do przygotowania PBMC (co najmniej 1800 x g i utrzymująca temperaturę pokojową (18–25 °C)).
8. Do przygotowania i przemywania oddzielonych PBMC można zastosować wirówkę do przemywania komórek, na przykład wirówkę DiaCent-CW (Bio-Rad). Klienci muszą zweryfikować użycie takiego sprzętu we własnym laboratorium.
9. Sprzęt i odczynniki umożliwiające zliczanie PBMC; albo ręcznie przy użyciu błękitu trypanu i hemocytometru na mikroskopie, albo automatycznie przy użyciu odpowiedniego analizatora hematologicznego.
10. Inkubator utrzymujący wilgotność oraz temperaturę  $37 \pm 1$  °C z dopływem 5% CO<sub>2</sub>.
11. Płuczka do płytek mikrotitracyjnych lub inne wyposażenie do ręcznego płukania płytek.
12. Pipety i sterylne końcówki do pipet.
13. Sterylny roztwór D-PBS: taki jak GIBCO® 1 x D-PBS (Invitrogen; numer katalogowy 14040- 091).
14. Woda destylowana lub dejonizowana.
15. Akcesoria do odczytu płytki np. mikroskop, mikroskop cyfrowy, szkło powiększające lub kamera do obrazowania płytek.
16. Sterylna pożywka do hodowli komórkowej, taka jak GIBCO AIM-V® (Invitrogen; numer katalogowy 31035-025): zdecydowanie zaleca się stosowanie tej pożywki wolnej od surowicy na etapie inkubacji. RPMI 1640 (Invitrogen; numer katalogowy 21875-034) może być używany tylko na początkowych etapach przygotowania próbki. Zaleca się przechowywanie pożywek do hodowli komórkowych w odpowiednich porcjach, a nadmiar materiału usuwać po użyciu. Pożywki do hodowli komórkowych należy wstępnie ogrzać do 37°C przed użyciem w teście T- SPOT. TB.

### **Przygotowanie odczynników**

1. Płytki mikrotitracyjna T-SPOT. TB 8 jest gotowa do użycia. Wyjąć wymaganą liczbę 8- dołkowych pasków i doprowadzić do temperatury pokojowej. Zamknąć pozostałe paski w opakowaniu foliowym i dołączyć torebkę ze środkiem pochłaniającym wilgoć.
2. Fiolki z antygenami *M. tuberculosis* ESAT-6 (Panel A) są dostarczane w postaci gotowej do użycia.

3. Fiolki z antygenami *M. tuberculosis* CFP10 (panel B) są dostarczane w postaci gotowej do użycia.
4. Fiolki z kontrolą pozytywną są dostarczane w stanie gotowym do użycia.
5. Przygotować roboczy roztwór odczynnika koniugatu w rozcieńczeniu 1:200. Obliczyć wymaganą objętość roboczego roztworu odczynnika koniugatu (patrz kalkulator rozcieńczenia koniugatu T-SPOT na płycie CD dołączonej do każdego zestawu testowego). Odczynnik można przygotować bezpośrednio przed użyciem lub uzupełnić do stężenia roboczego (1:200) i przechowywać do sześciu tygodni w temperaturze 2°C – 8°C. Nie używać rozcieńczonego odczynnika poza tym okresem ważności.
6. Roztwór substratu jest dostarczany w postaci gotowej do użycia. Należy pozostawić go do osiągnięcia temperatury pokojowej przed rozpoczęciem testu

### **Procedura**

Badanie to należy wykonać zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej ściśle przestrzegając niniejszej Instrukcji obsługi.

Firma Oxford Immunotec Ltd przygotowała Przewodnik szkoleniowy, w którym opisano pobieranie i przygotowanie próbek, dobór pożywek do hodowli komórkowych oraz metody zliczania plamek. Jest on dostępny na płycie CD dołączonej do każdego zestawu testowego, pod numerem +44 (0) 1235 442780 lub do pobrania ze strony [www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com).

### **Pobieranie i przygotowywanie próbek**

Indywidualni użytkownicy powinni zweryfikować swoje procedury pobierania próbek krwi, separacji i liczenia PBMC oraz wyboru odpowiednich pożywek wspierających funkcjonalność limfocytów T podczas pierwotnej fazy inkubacji testu. Zwykle w przypadku pacjenta z prawidłową odpornością wystarczającą liczbę PBMC do przeprowadzenia testu można uzyskać z próbek krwi żyłnej zgodnie z następującymi wytycznymi:

- Dorośli i dzieci w wieku 10 lat i starsze: jedna probówka CPT o pojemności 8 ml lub dwie probówki CPT o pojemności 4 ml lub jedna probówka z heparyną lub cytrynianem o pojemności 6 ml
- Dzieci w wieku 2-9 lat: jedna probówka 4 ml CPT, heparyny lub cytrynianu
- Dzieci do 2 lat: jedna probówka pediatryczna o pojemności 2 ml

Próbki krwi należy przechowywać w temperaturze pokojowej i zbadać w ciągu 8 godzin od pobrania krwi, w ciągu 32 godzin w przypadku przechowywania w temperaturze 10–25°C, jeśli używany jest odczynnik T-Cell *Xtend*, lub w ciągu 54 godzin w przypadku przechowywania w temperaturze 18–25°C jeśli używany jest zestaw odczynników T-Cell *Select*.

Pożywki do hodowli komórkowych należy wstępnie ogrzać do 37°C przed użyciem w teście T-SPOT.TB.

Procedura	Notatki
<p>1. Pobierz próbkę krwi według Z instrukcją producenta probówek. Pobraną krew przechowuj w temperaturze pokojowej (18-25°C) lub 10-25°C, jeśli używa się T-Cell Xtend. Nie przechowywać w lodówce ani zamrażać.</p>	<p>1. Próbkę krwi można pobierać do różnego rodzaju probówek. W naszych laboratoriach z powodzeniem stosowane są probówki Vacutainer CPT, heparyna CPT i standardowe probówki z heparyną lub cytrynianem. Probówki CPT nie nadają się do użytku z odczynnikami T-Cell Xtend. Probówki EDTA nie są zalecane.</p>
<p>2. Aby odseparować z próbki krwi komórki PBMC przy pomocy probówek CPT należy odnieść się do instrukcji producenta tych probówek. Podczas korzystania z probówek Vacutainer z heparyną lub cytrynianem PBMC należy odseparować przez wirowanie metodą Ficoll-Paque Plus z wykorzystaniem opublikowanych procedur.</p> <p>W przypadku probówek Leucosep można używać zestawu T-Cell Select lub odczynnika T-Cell Xtend (dostępny od Oxford Immunotec) i postępować zgodnie z protokołami dostarczonych z tymi odczynnikami.</p>	<p>2. Wirować 8 ml probówki CPT przy 1600 x g przez 28 min lub 4 ml probówki CPT przy 1800 x g przez 30 min w temperaturze 18°C, przy wykorzystaniu wirówki z funkcją chłodzenia. Należy doprowadzić wirówkę do 18°C, jeśli poprzednio zastosowano niższe temperatury. Jeśli wirówka nie posiada funkcji chłodzenia Należy upewnić się, że temperatura nie przekracza 25°C.</p> <p>Alternatywnie należy rozcieńczyć próbkę krwi taką samą objętością pożywki RPMI 1640 medium. Ostrożnie wlewać rozcieńczoną krew (2-3 objętości) na powierzchnię odczynnika Ficoll Paque Plus (1 objętość) i wirować przez 22 minuty przy 1000xg utrzymując wewnątrz wirówki temperaturę 18-25°C.</p> <p>Do próbek krwi pobranych 8-32 godziny wcześniej należy dodać odczynnik T-Cell Xtend™ zanim umieścimy je na powierzchni odczynnika Ficoll Paque Plus.</p> <p>Dla próbek przechowywanych do 54 godzin po pobraniu krwi należy zastosować protokół dołączony do zestawu T-Cell Select.</p> <p>Kalkulator umieszczony na płycie CD dołączonej do zestawu pozwala przeliczyć obroty wirówki z xg na rpm.</p> <p>Jeśli stosowane są inne metody separacji PBMC, muszą one zostać zatwierdzone przez klienta przed użyciem testu T-SPOT.TB.</p>
<p>3a. Zbierz białe, mętne pasmo PBMC za pomocą pipety i przenieś do probówki wirówkowej o pojemności 15 ml. Uzupelnij objętość do 10 ml używając pożywki do hodowli komórkowych.</p> <p>3b. Alternatywnie, może być użyta wirówka do płukania komórek, np. DiaCent-CW (Bio-Rad), która ułatwia etapy przemywania komórek. Jeśli ten system jest używany, wówczas do przemywania komórek należy użyć DPBS.</p>	<p>3a. Do przemywania komórek można stosować różne pożywki hodowlane. W naszych laboratoriach zaleca się stosowanie zarówno AIM- V, jak i RPMI 1640.</p> <p>3b. Metodologia wykorzystania przemywania komórek przy użyciu wirówki podczas przygotowywania PBMC będzie dostępna w Oxford Immunotec. Jednak klienci muszą zweryfikować tę metodę samodzielnie w swoich laboratoriach.</p>
<p>4. Wirować przy 600 x g przez 7 min. Odrzucić supernatant i ponownie zawiesić osad w 1 ml pożywki.</p>	<p>4. Patrz 3a. powyżej.</p>
<p>5. Uzupelnąć świeżą objętością pożywki do 10 ml i wirować przy 350 x g przez 7 min.</p>	<p>5. Patrz 3a. powyżej.</p>
<p>6. Odrzucić supernatant i ponownie zawiesić osad w 0,7 ml pożywki hodowlanej AIM-V.</p>	<p>6. Na tym etapie należy zastosować podłoże hodowlane w celu zawieszenia osadu i jego inkubacji przez całą noc. W naszych laboratoriach stosuje się pożywkę bez surowicy AIM-V</p>



Limfocyty T uzyskane z innych płynów ustrojowych, takich jak popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL), wysięk opłucnowy (PE) lub płyn mózgowo-rdzeniowy (CSF), były z powodzeniem stosowane w teście T-SPOT.TB do identyfikacji zakażenia i choroby gruźlicy (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). W przypadku korzystania z próbek innych niż próbki krwi użytkownicy muszą zweryfikować procedury pobierania wystarczającej liczby komórek jednojądrzastych. Sposoby przetwarzania próbek BAL opisano w publikacjach, do których odniesiono się powyżej.

Uwaga 1: Punkt odcięcia dla wyniku dodatniego i ważne kontrole do testu, w przypadku wykorzystania próbek innych niż krew, nie zostały szczegółowo ocenione i mogą różnić się od badania krwi. Użytkownicy powinni zdefiniować swoje kryteria interpretacji testu. Podczas przeglądania wyników klinicyści powinni kierować się własnym osądem.

Uwaga 2: Długość czasu od pobrania próbki do rozpoczęcia testu nie była dokładnie badana.

### Liczenie i rozcieńczanie komórek

Test T-SPOT.TB wymaga  $2,5 \times 10^5$  komórek PBMC na studzienkę. Dla każdej próbki pacjenta wymagane są łącznie cztery studzienki. Do każdej studzienki należy dodać odpowiednią liczbę komórek. Niezastosowanie się do tego zalecenia może prowadzić do błędnej interpretacji wyniku.

Procedura	Notatki
1. Przygotowanie komórek do zliczenia.	1. Liczbę komórek można określać na wiele sposobów, włączając manualne liczenie przy pomocy barwnika Trypan Blue i hemocytometru lub metodami automatycznymi przy pomocy odpowiednich urządzeń.
2. Aby policzyć komórki przy pomocy hemocytometru Neubauera należy dodać 10µL rozcieńczenia ostatecznego komórek do 40µL 0.4%(w/v) roztworu Trypan Blue. Umieścić odpowiednią objętość w hemocytometrze i policzyć komórki w kratce. Dla innych rodzajów hemocytometrów należy odnieść się do instrukcji producenta.	2. Należy bardzo uważnie przygotować roztwór komórek do liczenia upewniając się, że pobieramy roztwór z komórkami do liczenia, czy rozcieńczania bezpośrednio po jego wymieszaniu. Komórki mogą osiąść na dnie próbki, co może prowadzić do błędnego określenia ich liczby.
3. Obliczenie stężenia żywych komórek obecnych w zawiesinie.	3. Należy upewnić się czy przyjęty system liczenia komórek do liczenia jest wiarygodny i przeprowadzony w sposób prawidłowy. Użycie większej lub mniejszej liczby komórek może prowadzić do nieprawidłowej interpretacji wyniku. Kalkulator rozcieńczeń jest dostępny na płycie CD dołączonej do zestawu i jest bardzo pomocny przy ich przeliczaniu.
4. Przygotowanie 500µl zawiesiny końcowej o gęstości $2.5 \times 10^5$ komórek / 100µl.	4. Należy upewnić się czy zawiesina komórek została dokładnie wymieszana przed wykonaniem ostatecznego rozcieńczenia.

### Przygotowanie płytki i inkubacja

Test T-SPOT.TB wymaga użycia czterech studzienek dla każdej próbki pacjenta. Z każdą pojedynczą próbką należy przeprowadzić kontrolę zerową (Nil Control) i kontrolę dodatnią. Zaleca się, aby próbki były ułożone pionowo na płytce, jak pokazano poniżej.

- Kontrola zerowa (Nil Control)
- Panel A
- Panel B
- Kontrola pozytywna

Procedura	Notatki
1. Wyjąć odpowiednią ilość pasków z opakowanie płytki, wpiąć w ramkę i doprowadzić do osiągnięcia temperatury pokojowej.	1. Wyjąć tylko wymaganą liczbę pasków, resztę włożyć z powrotem do opakowania. Wpiąć paski do ramki wyposażonej w osłonę dolną i pokrywę. Ramki, pokrywy należy zachować i ponownie wykorzystać.
2. Każda próbka wymaga czterech osobnych studzienek, do których należy dodać: (i) 50µl pożywki AIM V do każdej studzienki z kontrolą Nil (ii) 50µl roztworu Panel A do każdej studzienki oznaczonej jako Panel A (iii) 50µl roztworu Panel B do każdej studzienki oznaczonej jako Panel B 50µl roztworu Kontroli Dodatniej do każdej studzienki oznaczonej jako Kontrola Dodatnia	2. Nie należy dotykać końcówką pipety do membrany na dnie studzienki. Wgniecenia membrany mogą powodować artefakty w studzienkach. Może być konieczne delikatne postukanie płytką o podłoże w celu upewnienia się, że odczynniki pokryły dokładnie dno studzienki. Należy unikać gwałtownego mieszania, aby zapobiec krzyżowej kontaminacji pomiędzy studzienkami.
3. Do każdej z czterech studzienek należy dodać po 100 µl próbki pochodzącej z końcowego rozcieńczenia (zawierającej 250 000 żywych komórek).	3. Należy delikatnie wymieszać roztwór komórek poprzez kilkukrotne zaciąganie pipetą, a następnie pobrać 100µl. Zaleca się zmieniać końcówkę pipety przy każdej studzience, tak aby uniknąć krzyżowej kontaminacji pomiędzy studzienkami
4. Inkubacja płytki przez 16-20 godzin w temperaturze 37°C i wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO <sub>2</sub> .	4. Unikać poruszania płytką w inkubatorze. Nie układać płytek jedna na drugiej, ponieważ może to zakłócić wentylację i równomierne rozłożenie temperatury. Niedotrzymanie warunków inkubacji, zarówno dotyczących czasu, jak i temperatury, może prowadzić do nieprawidłowej interpretacji wyników. Należy sprawdzić, czy w inkubatorze znajduje się wystarczająca ilość wody, tak aby utrzymać wilgotność w trakcie inkubacji.

### Wywoływanie plamek i ich interpretacja

Podczas etapów płukania nie należy dotykać końcówką pipety lub płuczki membrany na dnie. Wgniecenia w membranie spowodowane pipetą lub płuczką mogą powodować artefakty w studzienkach, które mogą zakłócać proces liczenia plamek.

Procedura	Notatki
1. Wyjąć płytkę z inkubatora.	1. W przypadku problemów z przeprowadzeniem interpretacji wyników natychmiast po zakończeniu inkubacji, płytki mogą być usunięte z inkubatora i przechowywane w temperaturze 2-8°C. Maksymalny zalecany czas przechowywania to 72 godziny, podczas których płytki powinny być przykryte. Klient powinien zweryfikować ten proces w swoim laboratorium.
2. Usunąć pożywkę do hodowli komórkowej z płytki i dodać 200 µl roztworu D-PBS do każdej studzienki.	2. Wyjąć roztwór substratu i pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej.
3. Odrzucić roztwór D-PBS. Przemyć każdą studzienkę 3 razy świeżym roztworem D-PBS.	3. Odrzucić D-PBS z ostatniego przemywania odwracając płytkę na chłonnym papierze.

4. Rozcieńczyć stężony odczynnik koniugatu używając D-PBS, aby uzyskać siłę tzw. koniugat roboczy.	4. Nie stosować D-PBS zawierającego Tween® lub inne detergenty, które mogą powodować duże tło. Upewnić się, że przygotowana jest tylko wystarczająca ilość roztworu roboczego (tak, aby uniknąć marnowania). Dla każdego paska 8-dółkowego (każdy dołek wymaga 50 µl), uzupełnić 500 µl roztworu o stężeniu roboczym przez dodanie 2,5 µl stężonego koniugatu do 497,5 µl D-PBS. Kalkulator rozcieńczeń koniugatu znajduje się na płycie CD dołączonej do każdego zestawu testowego.
5. Dodać po 50µl roztworu roboczego koniugatu do każdej studzienki i inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 2-8°C.	5. Niedotrzymanie czasu inkubacji może prowadzić do nieprawidłowej interpretacji wyników.
6. Usunąć koniugat i wykonać czterokrotne przemywanie D-PBS jak opisano w krokach 2 i 3 powyżej.	
7. Dodać po 50µl roztworu substratu do każdej studzienki i inkubować w temperaturze pokojowej przez 7 minut.	7. Niedotrzymanie czasu inkubacji może prowadzić do nieprawidłowej interpretacji wyników.
8. Przepłukać ostrożnie płytkę destylowaną lub dejonizowaną wodą, aby zatrzymać reakcję .	
9. Pozostawić płytkę do wyschnięcia w przewiewnym miejscu lub w ciepłarnie ustawionej na 37°C.	9. Plamki są lepiej widoczne, gdy płytka wyschnie. Suszyć w 37°C przez 4 godziny lub zostawić na noc w temperaturze pokojowej.
10. Policzyć wyraźne, ciemnoniebieskie plamki na membranie każdej studzienki. Na podstawie Interpretacji wyników i Kryteriów ocen stwierdzić, czy próbka pobrana od pacjenta jest dodatnia czy ujemna na obecność antygenów gruźlicy.	10. Plamki można obejrzyć wieloma metodami np. przy pomocy szkła powiększającego, mikroskopu tradycyjnego lub elektronicznego, czytnika płytek ELISPOT. Przewodnik do nauki liczenia plamek (program T-SPOT.Tutor ) można uzyskać poprzez stronę internetową Oxford Immunotec.

### Kontrola jakości

W typowej reakcji należy spodziewać się braku lub kilku plamek w kontroli zerowej (Nil Control) oraz więcej niż 20 plamek w Kontroli Dodatniej.

10 lub więcej plamek w kontroli zerowej (Nil Control) powinno zostać przyjęte jako wynik "nieokreślony". Należy odnieść się do Podręcznika Technicznego, aby stwierdzić możliwe powody takiego wyniku. (Dostępny na stronie [www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)). Należy ponownie pobrać i przebadать próbkę od pacjenta.

Typowa Kontrola Dodatnia (Positive Control) funkcji komórek, powinna posiadać więcej niż 20 plamek lub wykazywać wysycenie (niepoliczalna liczba plamek). Niewielka liczba pacjentów może mieć limfocyty T, które mają ograniczoną odpowiedź na PHA<sup>13,14</sup>. Jeśli w Kontroli Dodatniej (Positive Control) liczba plamek jest niższa niż 20, wynik należy przyjąć jako "nieokreślony", chyba, że wynik w studzience Panel A lub Panel B jest dodatni, tak jak to opisano w Interpretacji wyników i Kryteriach oceny (patrz poniżej), wtedy wynik testu możemy uznać za ważny.

W związku z potencjalną zmiennością biologiczną i systematyczną, wynik (Panel A minus Nil Control) i (Panel B minus Nil Control) równy 5, 6 lub 7 plamek, może być określony jako graniczny (dwuznaczny). Wynik graniczny mimo że, ważny, jest mniej wiarygodny od wyniku, gdzie liczba plamek jest powyżej linii odcięcia. W takim przypadku zaleca się ponowne przeprowadzenie testu na nowo pobranej próbce. Jeśli po ponownym teście, wynik jest nadal graniczny (dwuznaczny) należy sięgnąć do innych testów diagnostycznych lub danych epidemiologicznych pacjenta, tak aby móc określić jego prawdopodobieństwo zakażenia gruźlicą.

Mimo, że antygeny ESAT-6 i CFP10 nie są obecne w szczepach BCG *M. bovis* oraz w większości środowiskowych mykobakterii, jest możliwe, że dodatni wynik testu T-SPOT.TB może być wynikiem infekcji *M.kansasii*, *M.szulgai*, *M.marinum* lub *M.gordonae*. Jeśli zachodzi podejrzenie infekcji tymi szczepami wymagane są dodatkowe testy.

### **Interpretacja wyników i kryteria oceny**

Należy odnieść się do Kontroli Jakości przed zastosowaniem poniższych kryteriów.

Wyniki T-SPOT.TB należy odczytywać poprzez odejmowanie liczby plamek w kontroli zerowej (Nil Control) od liczby plamek w poszczególnych Panelach, zgodnie z zasadą:

- Wynik możemy uznać za dodatni jeśli liczba plamek (Panel A minus Nil Control) i / lub (Panel B minus Nil Control) jest  $\geq 6$ .
- Wynik możemy uznać za ujemny jeśli liczba plamek (Panel A minus Nil Control) i / lub (Panel B minus Nil Control) jest  $\leq 5$ . Dotyczy to również wyniku mniejszego od zera.

**„Dodatni wynik” wskazuje na to, że próbka zawiera efektorowe limfocyty T wrażliwe na *M.tuberculosis*.**

**„Ujemny wynik” wskazuje na to, że próbka prawdopodobnie nie zawiera efektorowych limfocytów T wrażliwych na *M.tuberculosis*.**

### **Charakterystyka wydajności testu Specyficzność**

Została określona na podstawie 93 próbek pobranych od osób, które na podstawie wywiadu zostały określone jako „osoby niskiego ryzyka” infekcji na *M.tuberculosis*. Specyficzność testu T-SPOT.TB określono na 100% (93/93) (95% przedział ufności 95.8% - 100%).

### **Czułość**

Została określona na podstawie 87 próbek pobranych od osób z potwierdzoną infekcją *M.tuberculosis*, w tym od osób z obniżoną odpornością układu immunologicznego. Czułość testu T-SPOT.TB określono na 98.8% (86/87) (95% przedział ufności 90.8% - 99.9%).











### **Powtarzalność**

Została określona jako zastępczy wskaźnik zmienności wewnątrz testu, poprzez analizę podwójnych próbek testowanych na jednej płytce. Całkowita liczba 145 próbek od 140 pacjentów została przetestowana dwukrotnie (dwie studzienki na każdy Panel A i Panel B). 142/145 (97.9%) podwójnie przebadanych próbek, wykazało zgodność kliniczną. Dwie podwójne próbki dały wynik graniczny i tylko 1/145 próbek dała wynik sprzeczny.

### **Bibliografia**

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. Commun., **4**(5): 453-463.

## Słowniczek symboli

	Zużyć do/data ważności (rok-miesiąc-dzień)
	Numer partii
	Numer katalogowy
	Uwaga, patrz instrukcja użytkownika
	Producent
	Wystarczające dla „n” testów
	Urządzenie do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Temperatura przechowywania
	Zapoznać się z instrukcją
	Autoryzowany przedstawiciel UE

## Informacje kontaktowe


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


Aby uzyskać pomoc dotyczącą produktów do pobrania i dalsze informacje techniczne, odwiedź naszą witrynę internetową: [www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

T-SPOT, T-Cell *Xtend* i logo Oxford Immunotec są zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Oxford Immunotec spółka z ograniczoną odpowiedzialnością  
T-Cell *Select* jest znakiem towarowym firmy Oxford Immunotec Limited.  
AIM-V i GIBCO są znakami towarowymi firmy Life Technologies Corporation.  
CPT i Vacutainer są znakami towarowymi firmy Becton, Dickinson and Company.  
Ficoll i Ficoll-Paque są zastrzeżonymi znakami towarowymi Cytiva, podmiotu stowarzyszonego Global Life Sciences Solutions USA LLC.  
Tween jest zarejestrowanym znakiem towarowym firmy Croda Americas LLC.

Stosowanie odczynnika T-Cell *Xtend* jest chronione następującymi patentami i patentami w toku:  
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Numer wersji: 4 Data wydania: Marzec 2023  
© 2023 Oxford Immunotec. Wszelkie prawa zastrzeżone.

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

 Autoryzowany przedstawiciel UE  
Oxford Immunotec (Irlandia) Unit 3d North Point House,  
North Point Business Park, New Mallow Road, Cork, T23 AT2P Irlandia

Numer wersji	Data wydania	Modyfikacje
1-3	Szczegóły dostępne	na życzenie w Oxford Immunotec.
4	Marzec 2023	Pierwsze tłumaczenie j PI-TB-IVD-UK-V4