* 2017 년 6 월 (제 1 판)

T-SPOT®.TB

트레이닝 가이드

체외 진단용 (*In Vitro* Diagnostic) 으로만 사용

본 트레이닝 가이드는 다음 진단시약의 사용에 대한 내용을 담고 있습니다:

T-SPOT®.*TB8* (다용도 8-웰 스트립 플레이트 형식. 카탈로그 번호: TB.300)

T-SPOT.*TB* 첨부문서와 함께 사용하십시오

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

들어가며

본 트레이닝 가이드는 T-SPOT.*TB* 진단검사를 준비하고 진행하는 데 적절한 정보와 지침을 드리기 위해 작성되었습니다. 본 트레이닝 가이드는 검체의 수취, 검사 진행 전의 말초혈액 단핵세포 (Peripheral Blood Mononuclear Cells; 이하 PBMC) 분리, T-SPOT.*TB* 검사 진행, 검사 결과의 해석 및 문제 발생 시의 해결 방법을 설명합니다.

본 문서의 활용

T-SPOT.*TB* 검사의 사용 지침은 각 해당 페이지의 상위에 제공되어 있습니다. 각주, 시각 자료 및 예시와 같은 추가적인 정보는 파란색 글씨로 표시되어 있습니다.

목차 **페이지수**

들어가며	1
시약 및 보관	3
제공되는 구성품	4
보관 및 안정성	4
본 제품에 제공되지 않지만 필요한 장비 및 재료	5
검체 수집 및 처리	6
채혈관	7
채혈 용량	8
T-Cell *Xtend* 절차	8
세포 분리	9
LEUCOSEP 절차	9
일반적 FICOLL 절차	9
세포 분리 튜브(BD VACUTAINER CPT) 절차	9
PBMC 수집	12
세포 세척	13
세포 계수 및 희석	14
PBMC 수기 계수	15
PBMC 자동 계수	17
플레이트 준비 및 배양	19
스팟 형성 및 계수	23
스팟 형성	24
스팟 해석	26
품질 관리	32
음성 대조	33
양성 대조	33
결과 해석	34
결과 해석 및 검사 기준	35
경계값(Borderline) 및 판정불가(Indeterminate)	35
스팟 해석: 패널 A 및 B 항원	36
문제해결 이미지	38

시약 및 보관

사용 지침

제공되는 구성품

T-SPOT.*TB8* (다용도 8-웰 스트립 X12 개)는 다음의 구성품을 포함하고 있습니다:

- 마이크로타이터(Microtiter) 플레이트, 1 개: 96 웰, 8-웰 스트립 12 개와 플레이트 프레임이 제공되며, 각 웰은 사이토카인 인터페론 감마(IFN-ɣ)에 대한 마우스 단일클론항체로 코팅되어 있음.
- 패널 A, 2 병(0.8mL/병): ESAT-6 항원, 소 혈청 알부민, 항미생물제 함유.
- 패널 B, 2 병(0.8mL/병): CFP10 항원, 소 혈청 알부민, 항미생물제 함유.
- 양성 대조, 2 병(0.8mL/병): 피토헤마글루티닌(Phytohaemagglutinin, PHA; 세포의 기능성 확인을 위한 대조), 소 혈청 알부민, 항미생물제 함유.
- 200 배 농축된 접합 시약, 1 병(50μL): 알칼리성 인산가수분해효소에 접합된 사이토카인 IFN-ɣ 마우스 단일클론항체.
- 기질액, 1 병(25mL): 바로 사용 가능한(ready-to-use) BCIP/NBT^{plus} 용액.
- CD: 첨부문서 및 기타 정보 포함

보관 및 안정성

개봉 전의 키트는 2-8°C 에서 보관해주십시오. 권장된 조건 하에서 보관 및 취급되었을 때, 키트의 포장 상자에 기재된 유효기간까지 안정합니다. 레이블에 기재된 유효기간이 경과되면 사용해서는 안됩니다.

개봉 후에는 키트의 구성품을 2-8°C 에서 보관해주십시오. 개봉된 구성품은 개봉 후 8 주 이내에 사용되어야 하며, 8 주 이내라 하더라도 유효기간이 지나면 사용할 수 없습니다. 서로 다른 키트에 속한 구성품들을 섞어서 사용하지 마십시오.

기질액은 빛에 장기간 노출하지 마십시오.

본 제품에 제공되지 않지만 필요한 장비 및 재료

- 8-웰 스트립 플레이트의 프레임 (Oxford Immunotec 사에서 구매 가능)
- 제 2 급 미생물 실험대 (권장되지만 반드시 필요한 것은 아님)
- 채혈튜브 (예: Vacutainer®, CPT™ 또는 Heparin Tubes) (주: CPT 튜브는 Oxford Immunotec 사에서 구매 가능)
- T-Cell *Xtend* (채혈 후 8 시간 이상 보관한 혈액을 처리하는 경우에 해당)
- *FICOLL-PAQUE PLUS, 혹은 CPT 관을 사용하지 않는 경우 대체 PBMC 분리용 채혈튜브 (예: Leucosep 튜브, Oxford Immunotec 사에서 구매 가능)
- PBMC 를 분리하기 위한 원심분리기 (밀도구배 원심분리법을 사용하여 PBMC 를 분리하는 경우, 원심분리기는 최소 1800RCF(g)의 속도를 낼 수 있어야 하며 실온(18-25°C)을 유지할 수 있어야 함)
- 15mL 원심분리튜브
- PBMC 를 계수할 수 있는 장비 및 시약; 수기 계수를 위해 Trypan Blue (혹은 기타 적절한 염색약) 및 현미경 상에서 혈구계를 사용하거나, 자동 계수에 적합한 자동 혈구분석기를 사용하는 것이 가능
- 5% 이산화탄소(CO_2) 공급 및 37±1°C 온도 설정이 가능한 가습 (Humidified) 인큐베이터
- 마이크로타이터(Microtiter) 플레이트 자동세척기, 혹은 플레이트를 손수 세척할 수 있는 8-채널 피펫이나 스테퍼(stepper) 피펫.
- 1-1000μL 범위의 용량을 다룰 수 있는 조절 가능한 피펫 (예: 1-10μL, 2-20μL, 20-200μL, 그리고 100-1000μL 의 용량을 다룰 수 있는 길슨(Gilson) 피펫 4 종) 및 무균 피펫 팁. 적절한 경우, 파스퇴르(Pasteur) 피펫을 사용하는 것도 가능
- 무균 D-PBS 용액 (예: GIBCO® 1x D-PBS (Invitrogen 사 제조; 카탈로그 번호 14040- 091)
- 증류수(Distilled water) 혹은 탈염수(Deionised water)
- 웰을 시각화할 수 있는 수단이나 웰의 디지털 이미지를 캡처할 수 있는 수단. (예: 스팟을 계수할 수 있는 입체현미경, 확대경, 혹은 플레이트 이미지 기기(plate imager))
- 무균 세포 배지. (예: GIBCO AIM V® (Invitrogen 사 제조; 카탈로그 번호 31035-025 연구용 등급). (주: AIM-V 배지는 Oxford Immunotec 사에서 구매 가능). 배양 과정에서는 이 무혈청 배지의 사용을 강력히 권장합니다. RPMI 1640 (Invitrogen 사 제조; 카탈로그 번호 21875-034) 제품은 검체의 초기 준비 과정에서만 사용할 수 있습니다 (그 밖의 배지도 사용 가능하나, 반드시 실험실에서 검증된 후에 사용되어야 합니다). 세포 배양 배지는 1 회 사용에 적절한 양으로 소분하여 보관하시고, 사용이 모두 끝난 후 남은 과량의 용액은 폐기할 것을 권장합니다. 세포 배지는 T-SPOT.*TB* 검사에 사용하기 전에 37°C 온도로 예열 하십시오.

검체 수집 및 처리

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

사용 지침

채혈관

Oxford Immunotec Ltd 사는 세 가지의 FICOLL* 기반 세포 분리법을 검증하였습니다; 일반적 분리법, Leucosep 튜브, 그리고 세포 분리 튜브 (CPT™)의 사용. 개별 실험실에서는 T-SPOT.*TB* 검사에 사용될 PBMC 의 수집 및 분리방법에 대해 사전 검증 절차를 거쳐야 합니다.

혈액 검체는 헤파린(Heparin) 채혈튜브 혹은 시트르산염(Citrate) 채혈튜브에 채혈될 수 있으며, 표준적인 분리 방법에 따라 PBMC 를 분리합니다. 다른 방법으로는, Becton Dickinson (BD) 사의 CPT 에 혈액 검체를 채혈할 수 있습니다.

충분한 양의 세포를 얻기 위하여 여러 개의 튜브에 동시에 채혈하여 처리하는 경우, 환자의 세포를 혼합할 수 있습니다.

주: EDTA 관은 **권장되지 않습니다**.

각주 및 시각 자료

T-SPOT.*TB* 검사에 적합한 채혈관은 그림 1 에 표시되어 있습니다.

BD Heparin & Citrate Vacutainer® CPT™ | BD Vacutainer® Heparin PST™ | Greiner Bio-One Heparin Vacuette® | Sarstedt Heparin Monovette®

그림 1: T-SPOT.*TB* 검사에 적합한 채혈관 예시

주: 이 외의 회사에서 제조된 헤파린 혹은 시트르산염 채혈튜브는 검체 수집에 사용되기 이전에 검증되어야 합니다.

T-SPOT.*TB* 검사에 적합하지 않은 채혈튜브의 종류는 그림 2 에 표시, 강조되어 있습니다.

BD EDTA Vacutainer® | BD CAT Vacutainer® | Greiner Bio-one EDTA Vacuette®

그림 2: T-SPOT.*TB* 검사용으로 부적합한 채혈튜브의 예시

주: 기타 회사에서 제조된 제품 중 헤파린이나 시트르산염을 함유하지 않는 종류의 채혈튜브는 검체 수집에 사용하지 마십시오.

채혈 용량

일반적으로, 정상적인 면역력을 가진 환자의 경우 정맥혈 채혈을 통해 PBMC 를 수집하면 검사를 진행할 수 있는 충분한 양의 세포가 확보됩니다:

- 성인 및 10 세 이상의 소아·청소년: 1 개의 헤파린 채혈관(6mL), 또는 1 개의 CPT(8mL), 또는 2 개의 CPT(각 4mL).
- 2-9 세 사이의 소아: 1 개의 헤파린 채혈관(4mL), 또는 1 개의 CPT(4ml).
- 2 세까지의 영·유아: 1 개의 헤파린 채혈관(2mL).

혈액 검체는 채혈기구의 사용 설명서에 따라 채혈되어야 합니다. 채혈 직후, 항응고제와 혈액이 충분히 섞이도록 채혈관을 8-10 회 전도혼합하십시오. **검체를 냉장, 냉동보관 하지 마십시오.**

세포량이 적을 것으로 예상되는 경우에는 2 개의 8mL CPT, 2 개의 6mL Heparin Vacutainer 채혈튜브에 채혈해주십시오. 검사를 시행하기에 충분한 양의 PBMC 를 확보하기 위한 것입니다.

혈액 검체는 채혈(정맥천자) 후 8 시간 이내에 T-SPOT.*TB* 검사 키트로 처리되어야 합니다. 채혈(정맥천자) 후 최대 32 시간까지 보관된 검체를 사용할 수 있으며, 이 경우 (8-32 시간 사이의 시간)에는 T-SPOT.*TB* 검사를 시작하기에 앞서 T-Cell *Xtend* 시약을 첨가해야 합니다. 검사 개시 전의 검체(전혈)는 18-25°C 의 온도 범위에서 보관되어야 합니다.

그림 3: T-Cell *Xtend* 시약

T-Cell *Xtend* 절차

T-SPOT.*TB* 검사를 보다 탄력적으로 활용하기 위해, T-Cell *Xtend* 시약을 함께 사용하면 검체 사용 시한을 채혈(정맥천자) 후 최대 32 시간까지 연장할 수 있습니다.

T-Cell *Xtend* 시약은 과립구(Granulocyte)에 특이적인 세포표면 표지자인 CD66b 를 인식하는 항체 복합체로써, 과립구와 적혈구 세포를 교차결합 시킵니다. 이를 통해 과립구의 밀도가 증대되어 밀도구배 침전이 이루어지게 됩니다.

T-Cell *Xtend* 시약은 검사개시 직전에 검체에 첨가됩니다. 검체 혈액을 15mL 원심분리관에 부어 혈액량을 측정하십시오. 전혈 1mL 당 T-Cell *Xtend* 시약 25μL 를 첨가한 후, 피펫팅하여 혼합해 주십시오 (그림 4 참조).

원심분리관의 뚜껑을 덮고, 8-10 회 전도혼합해 주십시오 (그림 5).

T-Cell *Xtend* 시약과 혼합된 전혈을 실온(18-25°C)에서 20 분(±5 분) 간 배양해주십시오.

이어서 FICOLL 법이나 Leucosep 밀도구배 원심분리법과 같은 일반적인 세포 분리 절차를 진행해주십시오. (자세한 내용은 본 문서 9 쪽에서 확인할 수 있습니다).

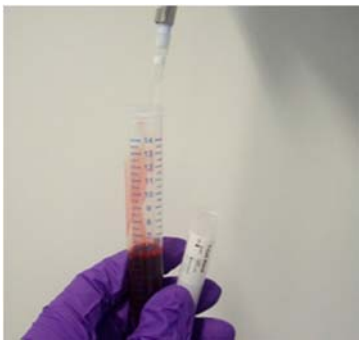


그림 4: 혈액 1mL 당 T-Cell *Xtend* 시약 25 μL 를 첨가하십시오.

그림 5: T-SPOT.*TB* 검사를 개시하기 전에 혈액을 혼합하고, 실온에서 20 분간 배양해주십시오.

세포 분리

LEUCOSEP 절차

Leucosep 튜브 (Oxford Immunotec Ltd 사에서 구매 가능)은 전혈로부터 말초혈액 단핵 세포 (Peripheral Blood Mononuclear Cells; 이하 PBMC) 를 수집, 분리할 수 있도록 합니다. 기존의 FICOLL 밀도구배법에 비해 Leucosep 튜브는 이용하기에 쉽고 편리합니다. Leucosep 튜브는 FICOLL-PAQUE PLUS 위에 프릿(frit; 다공의 고밀도 폴리에틸렌 장벽)을 함유하고 있어, 검체층을 정밀하게 채취하는 과정을 생략할 수 있도록 해 줍니다.

- FICOLL-PAQUE PLUS 가 프릿의 아래에 위치하는지 확인해주십시오. FICOLL-PAQUE PLUS 가 프릿 위에 있는 경우, 350 RCF (g)에서 1 분간 원심분리하십시오.
- 5mL 의 전혈에, 37°C 로 예열된 RPMI 1640 3mL 을 첨가한 후, 튜브를 3 회 전도혼합해 주십시오. 희석된 혈액을 Leucosep 튜브에 부어주십시오.
- 1000 RCF (g)의 속도로 실온(18-25°C) 조건에서, 제동 없이(brake-off) 10 분간 수평로터(swing out rotor) 원심분리를 진행해주십시오.
- 원심분리를 진행하기 전에 에어로졸저항성 버켓(aerosol-resistant bucket)에서 튜브의 균형을 맞추어 주십시오.

일반적 FICOLL 절차

- 혈액을 RPMI 1640 (37°C 예열)과 1:1 비율로 희석한 후, 3 회 전도혼합해주십시오.
- 주의를 기울여서, 희석된 혈액 검체가 FICOLL 위에 층을 이루도록 해주십시오. 희석된 혈액 검체와 FICOLL 의 용량 비율이 3:1 을 이루어야 합니다. 층끼리 섞이지 않도록 주의해주십시오.
- 1000 RCF (g)의 속도로 실온(18-25°C) 조건에서, 제동 없이(brake-off) 22 분간 수평로터(swing out rotor) 원심분리를 진행해주십시오.
- 원심분리를 진행하기 전에 에어로졸저항성 버켓(aerosol-resistant bucket)에서 튜브의 균형을 맞추어 주십시오.

세포 분리 튜브(BD VACUTAINER CPT) 절차*

- 제조사의 지침에 따라 4mL CPT 관, 혹은 8mL CPT 관에 채혈해주십시오.
- 8mL CPT 관의 경우, 1600 RCF (g)의 속도로 실온(18-25°C) 조건에서 28 분간 수평로터(swing out rotor) 원심분리를 진행해주십시오.
- 4mL CPT 관의 경우, 1800 RCF (g)의 속도로 실온(18-25°C)조건에서 30 분간 수평로터(swing out rotor) 원심분리를 진행해주십시오.
- 원심분리를 진행하기 전에 에어로졸저항성 버켓(aerosol-resistant bucket)에서 튜브의 균형을 맞추어 주십시오.

*** T-Cell *Xtend* 시약은 Becton Dickenson 사의 CPT 체제에서는 사용 불가합니다.**

각주 및 시각 자료

Leucosep 법 | **일반적 FICOLL 법** | **CPT 법 (8mL)**

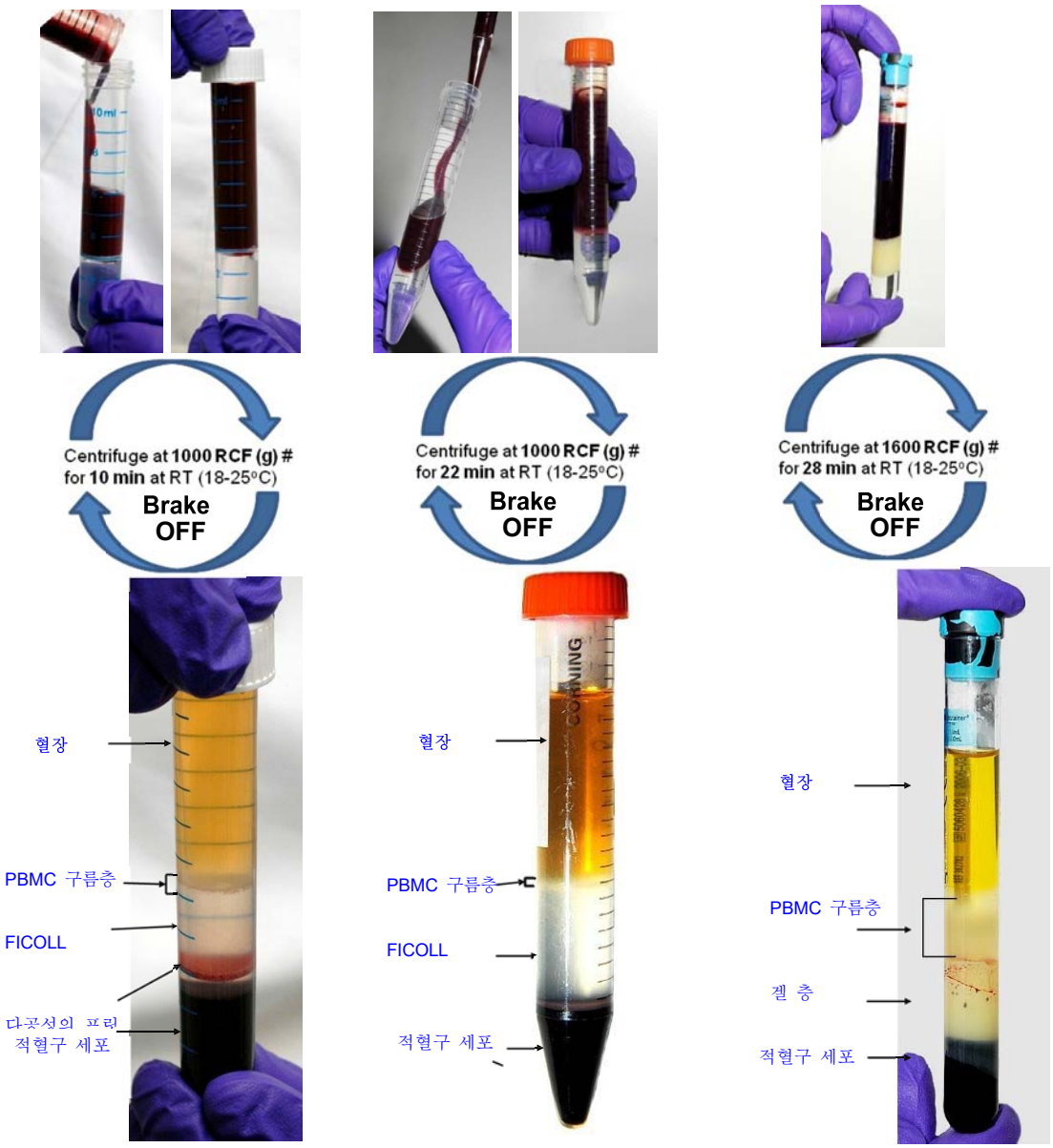


그림 6: 검증된 세포 분리법

주:

RCF (g)= 상대원심력(Relative Centrifugal Force). 본 문서에서는 RPM 이 아닌 RCF 를 사용하고 있습니다

냉각 원심분리기가 필수적인 것은 아닙니다. 냉각 원심분리기가 구비되지 않은 경우에는, 로터의 균형에 특별히 유의해주시기 바랍니다. 미량의 진동도 열을 형성하여, CPT 내 겔 층의 밀도를 변화시킬 수 있으며, 이 경우 PBMC 가 적혈구 층으로 이동하게 됩니다.

세포 분리가 끝난 후, 적혈구 세포 층과 PBMC 층 위의 튜브 상층부에 라벨을 부착하면 환자 식별을 용이하게 할 수 있습니다.

경고: PBMC 분리 단계는 BL II Safety Cabinet 에서 진행할 것을 권장합니다. 실험자를 보호하고, 검체의 오염을 방지하기 위함입니다.

잘못된 분리의 예시

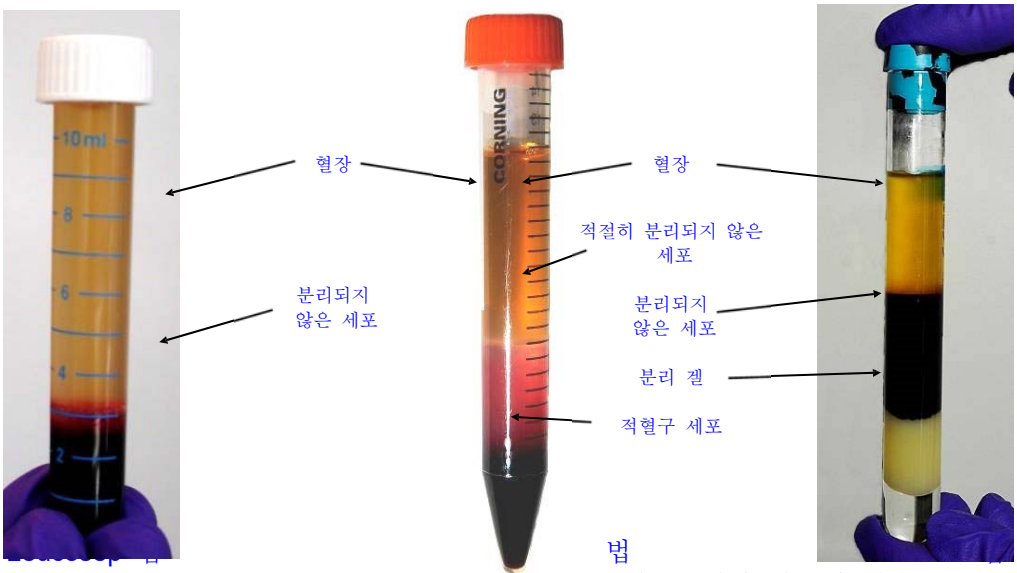


그림 7: Leucosep, FICC 법 | 세포분리가 잘못된 경우

세포분리가 올바르게 이루어지지 않았다면, 원심분리의 속도가 잘못되었기 때문일 수 있습니다. 안내된 원심분리기의 속도는 RCF 단위이므로, 단위가 RPM 으로 잘못 설정되어 있는지 확인해 주십시오. RCF 단위로 교정하여 다시 원심분리를 진행해주십시오. 원심분리기의 설정을 바꾸어 재 실험한 경우에도 세포분리가 잘 되지 않은 경우, 다음의 내용을 확인해주십시오:

- 적절한 종류의 채혈튜브가 사용되었는가? 채혈튜브는 사용 전에 적절한 조건에서 보관되었는가?
- 혈액 검체는 실온 (18-25°C)에 보관되었는가?
- 채혈 직후 채혈관 안의 검체와 항응고제가 충분히 섞였는가(충분히 전도혼합하였는가)?
- 본 문서의 설명에 따라 FICOLL 구배가 설정되었는가?
- 원심분리의 속도는 적절했는가? 원심분리기의 제동 장치는 꺼져 있었는가?
- 혈액 검체는 채혈 후 8 시간 이내에 처리되었는가? T-Cell *Xtend* 시약을 사용한 경우, 채혈 후 32 시간 이내에 처리되었는가?

주: 키트에 포함된 CD 에 T-SPOT.*TB* Centrifuge Speed Calculator 프로그램이 내장 되어 있으므로, 이 프로그램을 활용해주십시오 (그림 8). 또는 요청하시는 경우 Oxford Immunotec 사에서 Manual Slide Calculator 를 제공하고 있습니다 (그림 9).

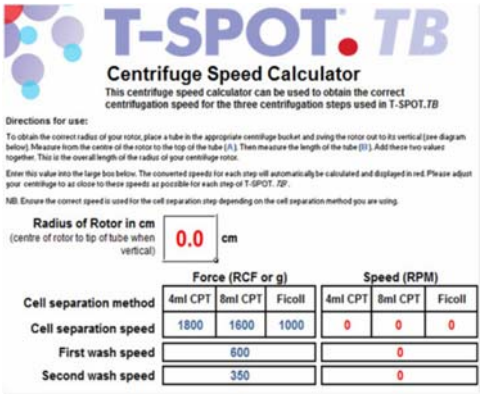


그림 8: T-SPOT.*TB* Centrifuge Speed Calculator

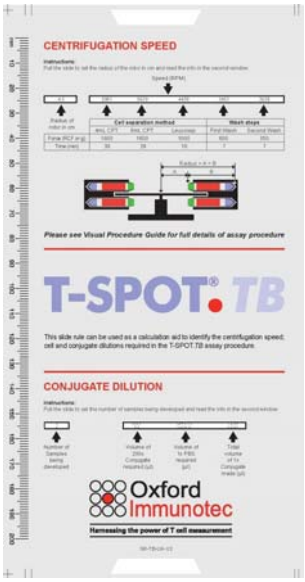


그림 9: T-SPOT.*TB* Manual Slide Calculator

사용 지침

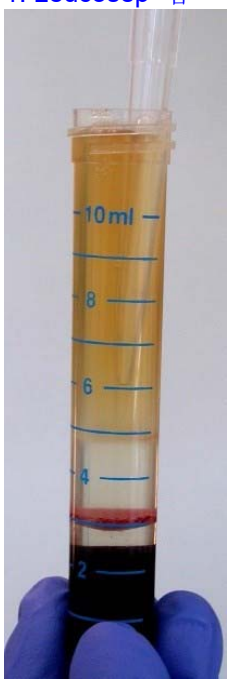
PBMC 수집

혈장에 파스퇴르 팁 또는 피펫 팁을 삽입하여, PBMC 구름층을 빨아들여주십시오 (그림 1,2,3). 수집한 PBMC 층을 15mL 코니칼(Conical) 원심분리튜브로 이동시켜 주십시오. PBMC 층 전부가 수집되었는지 확인해주십시오. 채혈튜브에 PBMC 가 조금이라도 남아있는 것보다, 혈장층 일부를 포함해서라도 PBMC 층을 전부 이동시키는 편이 좋습니다.

다른 방법으로는, 프릿 위의 상층을 모두 부어서 옮겨 담는 (디칸트; decant) 가 있습니다. 이 경우, 프릿 위의 상층 전부를 15mL 코니칼 원심분리튜브로 이동시켜 주십시오.

각주 및 시각 자료

1. Leucosep 법



2. 일반적 FICOLL 법

3. CPT 법 (8mL)

4. 디칸팅 법

그림 10: 원심분리 후 PBMC 수집

주:

1mL 피펫, 혹은 파스퇴르 피펫과 같이 넓은 튜브 피펫을 사용하시는 것을 권장합니다. 세포에 가해질 수 있는 손상을 방지하기 위한 조치입니다.

CPT 튜브를 사용하시는 경우, 분리 겔을 함께 이동시키지 않도록 유의해주십시오. CPT 관의 분리 겔은 피펫 팁을 막을 수 있습니다. 이 경우, 팁 안의 세포를 원심분리튜브에 이동시킨 후 새로운 피펫 팁을 이용해 나머지 PBMC 를 옮겨 주십시오.

Leucosep 튜브를 이용하시는 경우, 검체가 튜브에 꽉 차 있는 상태가 됩니다. 이 경우, 먼저 혈장의 일부를 제거한 후에, 피펫 팁을 삽입하면 넘침 현상을 방지할 수 있습니다.

사용 지침

세포 세척

배지를 이용한 세포 세척은 세포 외부의 사이토카인을 제거하여, 간섭 현상을 줄이기 위해 진행됩니다.

세척 1

- AIM V 또는 RPMI 1640 을 추가하여 10mL 로 용량을 맞추어 주십시오 (그림 11).
- 600x RCF(g)의 속도로 실온(18-25°C) 조건에서, 7 분간 수평로터(swing out rotor) 원심분리 해 주십시오.
- 원심분리 후, 상층액을 조심스레 부어 버리고, 침전물은 1mL AIM V 또는 RPMI 1640 에 부드럽게 재현탁 시켜 주십시오.

그림 11: 15 mL 튜브에 배지를 10 mL 까지 채워 주십시오.

세척 2

- AIM V 또는 RPMI 1640 을 추가하여, 다시 10mL 로 용량을 맞추어 주십시오.
- 350x RCF (g) 의 속도로 실온(18-25°C) 조건에서, 7 분간 수평로터(swing out rotor) 원심분리 해 주십시오.
- 원심분리 후, 상층액을 조심스레 부어 버리고, 침전물은 0.7mL AIM V 에 부드럽게 재현탁 시켜 주십시오. (**이번 단계에서는 RPMI 1640 을 사용하지 마십시오.**)

주: 면역 저하 환자의 경우, 수집할 세포의 농도를 높이기 위해, 0.5mL AIM V 로 세포를 재현탁 하는 것이 가능합니다.

각주 및 시각 자료

PBMC 세척에서 유의할 점

- 세척 단계에서 사용하는 배지는 PBMC 와 혼합되기 최소 1 시간 전에 37°C 에서 예열 되어야 합니다.
- RPMI 1640 는 AIM V 보다 저렴하므로, PBMC 세척 단계에서 비용을 절감하는 데 도움이 될 수 있습니다.
- 하루 밤 동안 배양(overnight incubation)을 진행하는 경우, AIM V 을 이용한 세포의 재현탁을 강력히 권장합니다. (주: RPMI 1640 은 PBMC 의 세척에는 적합하지만, 밤샘 배양에 사용되어서는 안 됩니다).
- 부드럽게 피펫팅을 반복하여, 세포를 재현탁해 주십시오. 이를 통해 세포가 고르게 분포됩니다.
- 본 단계에서는 여타의 배지가 이용될 수 있지만, T-SPOT.*TB* 검사에 적합한지는 각 실험실에서 검증하셔야 합니다.

주:
배지의 오염을 방지하기 위해, 무균 조건 하에서 500mL 병에 담긴 AIM-V 또는 RPMI 1640 을 사용할 양 만큼 소분(Aliquot)하여 주십시오.
원하시는 경우, 원심분리 단계에서 플레이트의 준비를 시작할 수도 있습니다. (18 페이지의 플레이트 준비 및 배양 참조).
원심분리 이후, 튜브 하층부의 세포 침전물을 확인해 주십시오. 침전물이 형성되지 않았다면, 원심분리 속도가 적절했는지 확인한 후 원심분리를 반복해 주십시오. (원심분리 속도 계산에 관해서는 11 페이지에 상세한 정보가 다뤄지고 있습니다).
세포 재현탁에는 1mL 피펫을 사용하십시오. 배지 1mL 를 힘주어 내보내십시오.

이때 피펫 팁은 침전물 근처의 튜브벽을 향해야 합니다. 이 과정은 소용돌이(vortex)를 일으켜 침전물을 분해하는 것입니다. 그럼에도 불구하고 침전물이 분해되지 않는다면, 사용했던 피펫 팁으로 배지를 흡인한 후 다시금 배출시켜 주십시오.

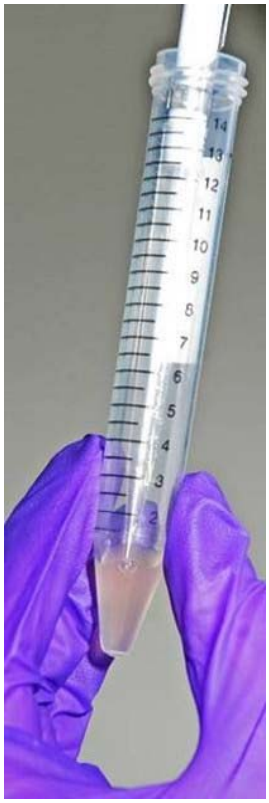


그림 12: 세포침전물을 AIM V 에 재현탁시키는 과정

세포 계수 및 희석

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

사용 지침

T-SPOT.*TB* 검사는 웰당 PBMC 250,000±50,000 개를 필요로 합니다. 각 환자의 검체 당, 총 4 개 웰이 필요하므로, 환자당 1 x 10^6 개의 PBMC 세포가 필요합니다. 검체 내의 결핵균 반응성 T 세포(*M. Tuberculosis* responsive T-cells)를 일정한 수의 PBMC 로 정규화 시킵니다.

- PBMC 계수를 진행하십시오. 세포는 다양한 방법을 통해 계수될 수 있습니다: Trypan Blue (혹은 기타 적절한 염색법) 및 혈구계산기를 활용한 수기 계수, 또는 자동화된 혈구분석기를 활용할 수 있습니다.
- 간략히 설명하면, Trypan Blue 및 Neubauer 혈구계산기를 이용한 수기 계수를 진행하는 경우, 10µL 의 최종 세포 부유액을 40µL 의 0.4%(w/v) Trypan Blue 용액에 첨가해주십시오. 혈구계산기에 적당량의 소분(Aliquot)을 위치 시키고, 눈금 위의 세포를 계수해주십시오. 다른 종류의 혈구계산기나 자동화된 기기를 사용하는 경우, 제조사의 설명서를 따르십시오.

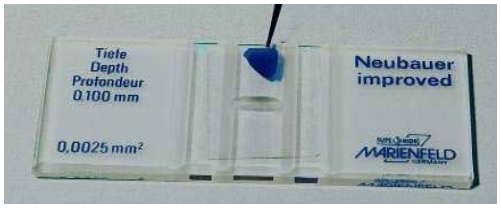
각주 및 시각 자료

PBMC 수기 계수

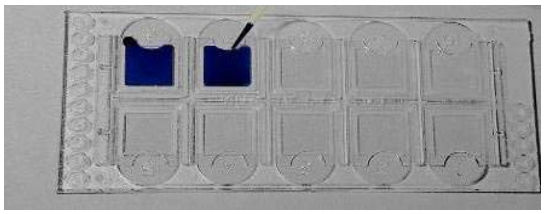
정해진 부피 내의 세포를 계수하면 세포의 농도를 파악할 수 있습니다. Neubauer 혈구계산기는 2 개의 챔버(혈구계산반)로 구성되며, 각각의 챔버는 크게 9 개의 정사각형 구역으로 나누어져 있습니다 (그림 13(a)). 두 개의 챔버는 각각 0.1mm³ 또는 1 x 10^{-4}mL 의 부피로 되어 있습니다. 일회용 계수 슬라이드는 투명한 플라스틱 재질로써, 커버유리가 붙어 있으며, 10 개의 분리된 계수 챔버 형식입니다. 10 개 챔버의 계수 구역은 각각 0.1mm³ 또는 1 x 10^{-4}mL 의 부피로 되어 있습니다 (그림 13 (b)).

계수 눈금의 큰 정사각형 1 개(그림 13 에서 붉은색으로 표시된 구역) 안에 있는 세포를 계수해주십시오. 이 때 지정된 구역 안의 세포 수를 세기 위해 저배율 대물렌즈(x10)를 사용해 주십시오. 경계선에 접한 세포를 계수할 때에는, 세포를 기준으로 왼쪽과 위쪽선에 접하고 있는 세포만을 계수하고, 아래쪽과 오른쪽 경계선을 접하고 있는 세포는 세지 마십시오. 중복 계수를 방지하기 위한 것입니다. 그림 13(c)는 Trypan Blue 로 염색된 세포의 예시입니다.

Neubauer 혈구계산기 (a)



(b) 일회용 계수 슬라이드(FAST-READ)



(c)

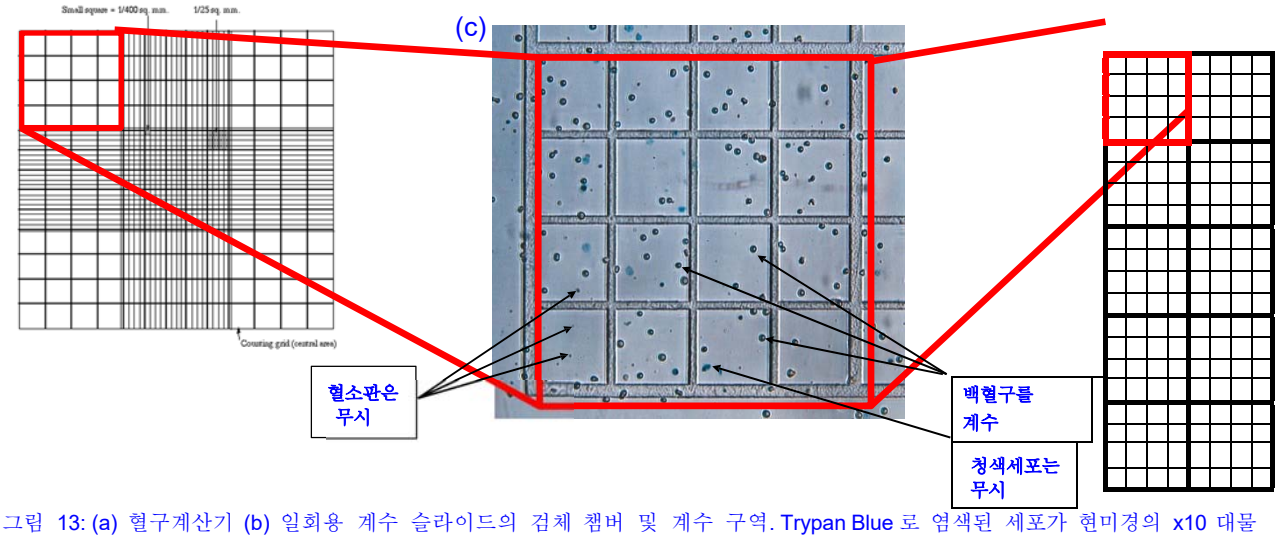


그림 13: (a) 혈구계산기 (b) 일회용 계수 슬라이드의 검체 챔버 및 계수 구역. Trypan Blue 로 염색된 세포가 현미경의 x10 대물렌즈를 통해 확인됩니다. (c) 주의: 계수 구역은 실제 축척과 다릅니다.

사용 지침

- 수집한 세포 부유액 속의 PBMC 농도를 계산하십시오.
- 500µL 용량의 최종 세포 부유액을 준비해 주십시오 (세포의 농도: 2.5 x 10^6cells/mL)

희석이나 계수에 사용될 소분(aliquot)을 채취하기 직전에 세포 부유액이 충분히 혼합되었는지 확인해 주십시오. 세포가 튜브 하부에 침전되어 있을 경우, 실제 세포 수와 다르게 해석될 수 있습니다. 세포 부유액을 손으로 부드럽게 흔들거나, 부유액을 위아래로 여러 번 피펫팅하여 혼합해 주십시오.

세포 계수 체계에 맞은 계산법을 사용하고 있는지 확인해 주십시오. 불충분한 양이나 과도한 양의 세포를 사용하는 경우 결과 해석이 왜곡될 수 있습니다.

웰당 200,000~300,000 개의 PBMC 가 사용되면, T-SPOT.*TB* 검사 결과의 일관성이 확보되는 것으로 나타났습니다.

각주 및 시각 자료

수기 계수 예시

아래의 계산식을 통해 수집한 세포 부유액 내의 PBMC 농도를 계산해주십시오.

$$\text{수집된 세포 부유액 중, 희석에 필요한 용량(mL)} = \frac{25}{\text{계수된 세포 수}}$$

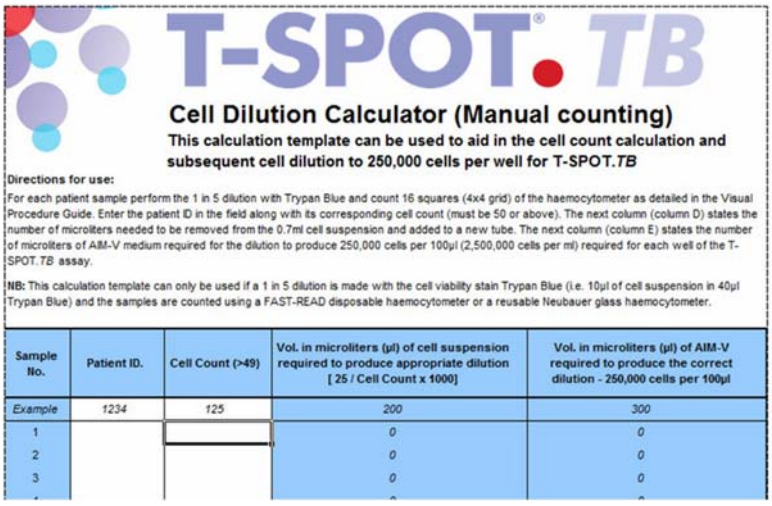
이 계산식은 희석 배수가 5 이면서, 계수된 구역의 부피가 0.1µL 일 때에만 사용할 수 있습니다.

예시:

$$\text{세포 계수치가 125 일 때:} \quad \frac{25}{125} = \text{희석에 필요한 세포 부유액은 200µL}$$

이 용량의 세포 부유액에 AIM V 배지 또는 기타 무혈청 세포 배양 배지 300µL 를 첨가하여, 최종 용량 500µL 을 맞추십시오. 이를 통해, 검사에 사용할 수 있는 농도의 세포 부유액 (250,000 개/100 µL)가 준비됩니다.

주: 각 키트 내 CD 에 제공되는 T-SPOT.*TB* 세포 희석 계산기 (수기용)를 활용하십시오 (그림 14). 혹은 Oxford Immunotec 사에 요청하여 수기용 슬라이드 계산기를 제공 받아 활용할 수 있습니다 (그림 15).



T-SPOT.*TB*

Cell Dilution Calculator (Manual counting)

This calculation template can be used to aid in the cell count calculation and subsequent cell dilution to 250,000 cells per well for T-SPOT.*TB*

Directions for use:

For each patient sample perform the 1 in 5 dilution with Trypan Blue and count 16 squares (4x4 grid) of the haemocytometer as detailed in the Visual Procedure Guide. Enter the patient ID in the field along with its corresponding cell count (must be 50 or above). The next column (column D) states the number of microliters needed to be removed from the 0.7ml cell suspension and added to a new tube. The next column (column E) states the number of microliters of AIM-V medium required for the dilution to produce 250,000 cells per 100µl (2,500,000 cells per ml) required for each well of the T-SPOT.*TB* assay.

NB: This calculation template can only be used if a 1 in 5 dilution is made with the cell viability stain Trypan Blue (i.e. 10µl of cell suspension in 40µl Trypan Blue) and the samples are counted using a FAST-READ disposable haemocytometer or a reusable Neubauer glass haemocytometer.

Sample No.	Patient ID.	Cell Count (>49)	Vol. in microliters (µl) of cell suspension required to produce appropriate dilution [25 / Cell Count x 1000]	Vol. in microliters (µl) of AIM-V required to produce the correct dilution - 250,000 cells per 100µl
Example	*1234*	*125*	*200*	*300*
1			*0*	*0*
2			*0*	*0*
3			*0*	*0*

CELL DILUTION

Product Support.

Oxford Immunotec provides industry leading customer support including full product training and in-depth technical advice. We aim to exceed customer expectations via experienced and knowledgeable personnel who are available to answer product and technical enquiries.

Should you have any queries, please telephone our support hotline on:

+44 (0) 1235 433168

or e-mail:

technicalsupport@oxfordimmunotec.com

T-SPOT and the Oxford Immunotec logo are registered Trademarks of Oxford Immunotec Ltd.

© Oxford Immunotec 2013. All rights reserved.

Oxford Immunotec Limited, 94C Innovation Drive, Milton Park, Abingdon, Oxfordshire, OX14 4RZ, UK
Tel: +44 (0) 1235 442780 Fax: +44 (0) 1235 442781
E-mail: info@oxfordimmunotec.com
Web: www.oxfordimmunotec.com

그림 14: (왼쪽) T-SPOT.*TB* 세포 희석 계산기 (수기 계수용)
그림 15: (오른쪽) T-SPOT.*TB* 수기용 슬라이드 계산기

PBMC 자동 계수

수집한 세포 부유액 속의 세포 농도(백혈구 수(cell)/세포 부유액 (mL))를 파악하기 위해 혈구분석기(자동세포계수기)를 사용할 수 있습니다.

혈구분석기를 사용할 때에는 다음의 계산식을 사용해야 합니다.

$$\frac{\text{수집된 세포 부유액 중}}{\text{희석에 필요한 용량(mL)}} = \frac{1.25}{N}$$

이때 N 은 1ml 당, 백만개 세포의 단위로 표현된 초기 세포 농도입니다.

예시:

1mL 당, 세포 수가 10,000,000 개(10x 백만개)의 경우

$$\frac{1.25}{10} = \text{희석에 필요한 세포 부유액은 125μL}$$

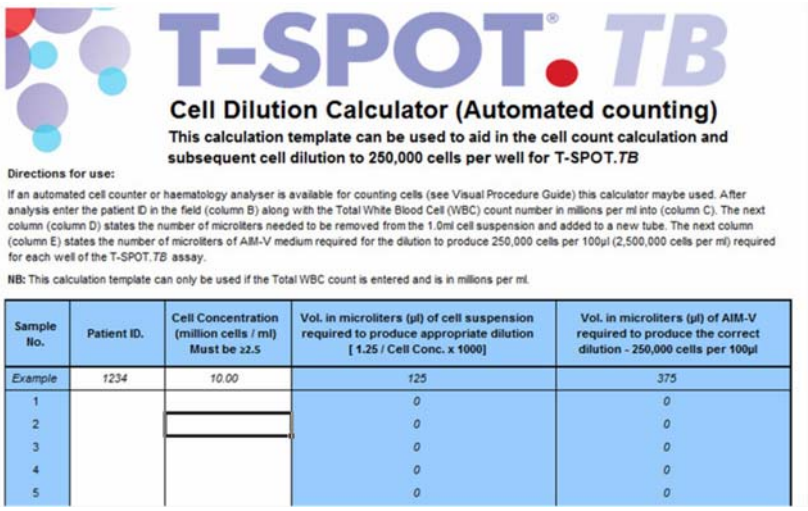
이 용량의 세포 부유액에 AIM V 배지 또는 기타 무혈청 세포 배양 배지 375μL 를 첨가하여, 최종 용량 500μL 을 맞추십시오. 이를 통해, 검사에 사용할 수 있는 농도의 최종 세포 부유액 (250,000 개/100 μL)이 준비됩니다.

주:

혈구분석기를 사용할 때에는 프로브(probe)의 길이를 확인해주십시오. 프로브가 짧으면 15ml 원심분리관 안에 있는 세포 부유액에 닿지 않을 수 있습니다. 이런 경우, 작은 병(이상적으로는 2-5mL 용량의 병)에 세포 부유액 일부를 옮겨 담고, 분석기에서 샘플링 될 수 있도록 해 주십시오. 분석기가 백혈구만을 계수하도록 프로그램되어 있는지 반드시 확인하십시오.

혈구분석기에 필요한 검체의 용량를 확인하십시오. 일반적인 혈구분석기의 필요 용량은 100μL-400μL 입니다. 검사를 진행할 때, 4 개의 마이크로타이터 웰에 각 100μL 의 세포 부유액이 첨가되어야 합니다. 따라서, 혈구 분석기에서 400μL 의 용량을 필요로 하는 경우, 버려지는 용량(dead volume)을고려하여 최소한 900μL 의 세포 부유액이 필요합니다. 이러한 경우 최종 세포 부유액의 용량은 0.7mL 이 아닌 1mL 가 되어야 합니다.

주: 각 키트 내 CD 에 제공되는 T-SPOT.*TB* 세포 희석 계산기(자동계수용)를 활용하십시오 (그림 16). 혹은 Oxford Immunotec 사에 요청하여 수기용 슬라이드 계산기를 제공받아 활용할 수 있습니다 (그림 17).



T-SPOT.*TB*

Cell Dilution Calculator (Automated counting)

This calculation template can be used to aid in the cell count calculation and subsequent cell dilution to 250,000 cells per well for T-SPOT.*TB*

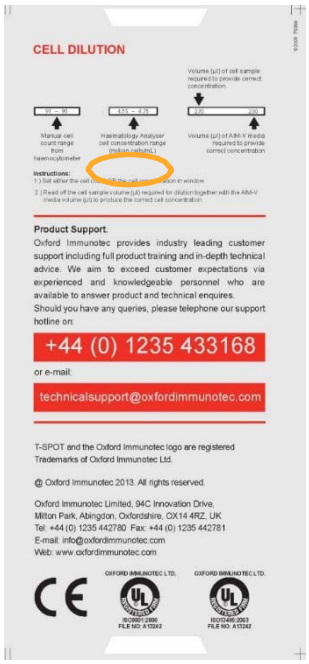
Directions for use:

If an automated cell counter or haematology analyser is available for counting cells (see Visual Procedure Guide) this calculator maybe used. After analysis enter the patient ID in the field (column B) along with the Total White Blood Cell (WBC) count number in millions per ml into (column C). The next column (column D) states the number of microliters needed to be removed from the 1.0ml cell suspension and added to a new tube. The next column (column E) states the number of microliters of AIM-V medium required for the dilution to produce 250,000 cells per 100µl (2,500,000 cells per ml) required for each well of the T-SPOT.*TB* assay.

NB: This calculation template can only be used if the Total WBC count is entered and is in millions per ml.

Sample No.	Patient ID.	Cell Concentration (million cells / ml) Must be ≥2.5	Vol. in microliters (µl) of cell suspension required to produce appropriate dilution [1.25 / Cell Conc. x 1000]	Vol. in microliters (µl) of AIM-V required to produce the correct dilution - 250,000 cells per 100µl
Example	*1234*	*10.00*	*125*	*375*
1			0	0
2			0	0
3			0	0
4			0	0
5			0	0

그림 16: T-SPOT.*TB* 세포 희석 계산기 (자동계수용)



CELL DILUTION

Product Support.

Oxford Immunotec provides industry leading customer support including full product training and in-depth technical advice. We aim to exceed customer expectations via experienced and knowledgeable personnel who are available to answer product and technical enquires.

Should you have any queries, please telephone our support hotline on:

+44 (0) 1235 433168

or e-mail:

technicalsupport@oxfordimmunotec.com

T-SPOT and the Oxford Immunotec logo are registered Trademarks of Oxford Immunotec Ltd.

© Oxford Immunotec 2013. All rights reserved.

Oxford Immunotec Limited, 94C Innovation Drive, Milton Park, Abingdon, Oxfordshire, OX14 4RZ, UK
Tel: +44 (0) 1235 442780 Fax: +44 (0) 1235 442781
E-mail: info@oxfordimmunotec.com
Web: www.oxfordimmunotec.com

그림 17: T-SPOT.*TB* 수기용 슬라이드 계산기

범위 외의 세포 계수치인 경우 다음의 표를 참고해 주십시오.

범위 외의 세포 계수치

수기 계수치 [세포 개수]	자동 계수치 [1mL 당 세포 개수]	방법	원심분리 및 희석을 반복한 후의 세포 계수치
40-50	2-2.5 x 10^6	플레이트 준비	해당사항 없음
<40	<2.0 x 10^6	마지막 원심분리 조건으로 검체를 다시 원심분리 시켜 주십시오. 최소 부피(400mL)로 재현탁 시켜 주십시오. 세포계수기에서, 또는 현미경에서 (수기계수의 경우) 세포 개수를 다시 확인 하십시오. 재차 원심분리 이후 세포 계 수치가 1mL 당 <2x10^6 개로 도출되는 경우, 검체를 폐기하십시오. '세포 양이 불충분하여 보고 불가'로 결과를 보고하고, 적절한 설명을 추가 하십시오.	**>60** 개 (수기계수의 경우), 또는 **>2.5 x 10^6** cells/mL (자동계수의 경우): 필요한 만큼 희석하십시오 **40-50** 개 (수기계수의 경우), 또는 **2.0-2.5 x10^6** cells/mL (자동계수의 경우): 플레이트 준비 **<40** 개 (수기계수의 경우), 또는 **<2.0x10^6** cells/mL (자동계수의 경우): 검체를 폐기한 후, 적절한 설명과 함께 '세포 양이 불충분하여 보고 불가'로 결과를 보고하십시오.
세포계수기 상 >20x10^6 cells/mL 인 경우, 검체를 추가 희석하여 다시 계수하십시오. 현미경 상 세포계수치가 >200 개인 경우, 세포계수치 <200 개의 결과를 얻을 때까지 검체를 500μL 단위로 증가시키며 희석해주십시오.	세포계수기에서 검체를 다시 계수해주십시오. 재 계수치가 >3.0x10^6 cells/mL 인 경우, 추가 희석하여 다시 계수해 주십시오. 재 계수치가 2.0-2.5x10^6 cells/mL 인 경우, 플레이트에 세포를 분주할 준비를 해 주십시오. 검체가 과도하게 희석된 경우(즉, 재 계수치가 <2x10^6 cells/ml 경우), 분리된 세포를 500μL 의 AIM-V 배지에 초도 희석하고, 지정된 세포 계수치를 얻을 때까지 희석 용량을 증가시켜 나가십시오.		

플레이트 준비 및 배양

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

사용 지침

플레이트 준비 및 배양

T-SPOT.*TB* 검사는 각 검체 당 4 개의 웰이 필요합니다. 각 검체에 대해 음성 대조와 양성 대조 검사가 진행되어야 합니다. 아래의 순서에 따라 검체를 세로로 배열하는 것을 권장합니다.

- 음성 대조
- 패널 A (ESAT-6)
- 패널 B (CFP10)
- 양성 대조

하나의 96-웰 플레이트로 24 명의 환자 검체를 검사할 수 있습니다. 처리할 검체 수에 필요한 만큼의 플레이트를 사용하십시오. 각 8-웰 스트립은 검체 2 개를 처리할 수 있으므로, 필요한 개수의 스트립만을 이용하십시오.

T-SPOT.*TB* 검사는 T 세포의 기능을 측정하므로, 스탠다드 커브의 사용은 불필요합니다. 따라서 환자 1 명으로부터 얻은 1 개의 검체 당, 웰 4 개를 준비할 수 있으면 충분합니다. 24 개의 검체를 플레이트에 배치할 때에는 다음의 레이아웃을 권장합니다.

Row	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	3N	5N	7N	9N	11N	13N	15N	17N	19N	21N	23N
B	1A	3A	5A	7A	9A	11A	13A	15A	17A	19A	21A	23A
C	1B	3B	5B	7B	9B	11B	13B	15B	17B	19B	21B	23B
D	1M	3M	5M	7M	9M	11M	13M	15M	17M	19M	21M	23M
E	2N	4N	6N	8N	10N	12N	14N	16N	18N	20N	22N	24N
F	2A	4A	6A	8A	10A	12A	14A	16A	18A	20A	22A	24A
G	2B	4B	6B	8B	10B	12B	14B	16B	18B	20B	22B	24B
H	2M	4M	6M	8M	10M	12M	14M	16M	18M	20M	22M	24M

기호:
N=음성대조,
A=패널 A,
B=패널 B,
M=Mitogen 양성대조

- 포장재에서 프리 코팅된 (pre-coated) 8-웰 스트립을 꺼내어, 플레이트 프레임에 끼워 넣은 후 (플레이트 프레임은 Oxford Immunotec 사에서 구매 가능), 실온 상태가 되도록 둡니다. 필요량의 스트립만 꺼내고, 사용하지 않는 나머지 스트립과 습기 제거제는 호일 포장재 안에 재 밀봉하여 2-8°C 의 온도 조건에 보관하십시오. 패널들과 대조군들은 스트립에 첨가하십시오.
- 각 음성대조 웰에 AIM V 세포 배양 배지 50μL 를 첨가하십시오.
- 패널 A 용액이 필요한 웰마다, 패널 A 용액 50μL 를 첨가하십시오.
- 패널 B 용액이 필요한 웰마다, 패널 B 용액 50μL 를 첨가하십시오.
- 막에 피펫 팁이 닿지 않도록 주의하십시오. 막에 피펫 팁 함입 흔적이 생기면 웰 상의 스팟 해석에 영향을 줄 수 있습니다 (38 면의 예시 5 참조).

각주 및 시각 자료

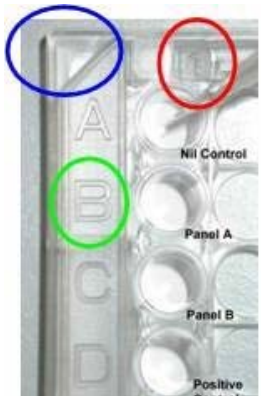


그림 18: 한 명의 환자에 대해 사용되는 4 개의 웰. A1 칸부터 D1 칸까지의 순서대로, 음성 대조, 패널 A, 패널 B, 양성 대조

플레이트 방향은 그림에 나타난 것과 동일해야 합니다 (그림 18). A1 웰을 좌측 상단 코너에 위치시키십시오. 좌측 상단 코너는 그림에서 청색 원으로 표시된 것과 같이 납작한 부분이므로 쉽게 구별할 수 있습니다. 붉은색 원으로 표시된 세로단의 번호는 플레이트의 상단 모서리에 표기되어 있습니다. 녹색 원으로 표시된 가로단의 문자는 플레이트의 좌측 모서리에 표기되어 있습니다.

그림 18 은 한 명의 환자 검체에 대해 사용되는 4 개의 웰을 나타내고 있습니다. 이 4 개의 웰은, 8-웰 스트립 플레이트 상에서, 첫 번째 스트립의 가장 상단 4 개의 웰에 위치하고 있습니다. 권장되는 방향은 A1 칸에 음성대조, B1 칸에 패널 A, C1 칸에 패널 B, 그리고 D1 칸에 양성 대조입니다. 양성 대조 및 환자 세포 첨가 시에 발생할 수 있는 교차오염을 방지하기 위해 이와 같은 순서로 배치되어야 합니다.

주: 개봉된 제품에는 개봉 일자를 표시하십시오. 개봉일로부터 8 주가 지나면, 남은 구성품은 폐기되어야 합니다.

사용 지침

- 한 명의 환자 검체에 사용될 4 개의 웰에, 최종 세포 부유액 100μL(250,000 세포가 포함되어 있음)을 각각 첨가하십시오. 환자 간의 교차 오염을 방지하기 위하여, 서로 다른 환자의 세포를 첨가할 때는 새로운 팁을 사용해 주십시오.

주: 하나의 피펫 팁을 사용하여 여러 개의 웰에 용액을 분주하는 경우, 인접한 웰을 오염시키지 않도록 주의하십시오.

각주 및 시각 자료

사용할 스트립을 비어 있는 프레임에 고정시켜 주십시오. 플레이트 프레임에는 하단부 플레이트와 덮개를 끼울 수 있습니다. 그림 19(왼쪽)는 2 개의 스트립과 8-웰 스트립 플레이트(TB.300)가 분해된 모습을 보여줍니다: 플레이트 프레임(A), 덮개(B), 하단부 플레이트(C), 8 웰 스트립 2 개(D). 그림 19(오른쪽)은 4 명의 환자 검체를 처리하기에 충분한 양의 스트립 2 개(16 웰)가 완전이 조립된 프레임의 모습입니다. 프레임, 하단부 플레이트, 뚜껑은 계속 보관하며 재사용할 수 있습니다.

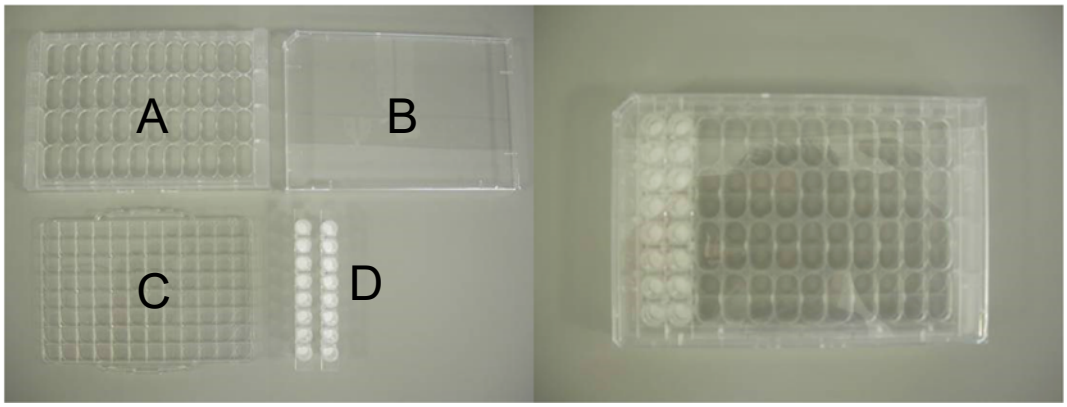


그림 19: 왼쪽: 8-웰 스트립 플레이트의 분해된 모습. 오른쪽: 2 개의 스트립과 플레이트가 최종적으로 조립된 모습. 4 명의 환자 검체를 다루기에 충분한 웰이 조립됨 (16 웰).

플레이트, 패널 A, 패널 B, 양성 대조(PHA)는 실온(18-25°C)에 보관되어야 하며, AIM V 는 사용 전에 37°C 에서 예열해야 합니다.

세포 분주 전에는, 세포 부유액을 부드럽게 흔들거나 피펫을 사용하여 부드럽게 위아래로 혼합하여, 세포가 고르게 분포되도록 합니다.

피펫 팁으로 바닥의 막을 건드리지 마십시오. 피펫에 찍혀 막 위에 자국이 생기면 웰이 손상될 수 있습니다. 피펫 팁을 웰의 안쪽 벽에 기대는 것은 괜찮습니다.

시약을 바꿀 때에는 피펫 팁을 교체하십시오.

사용 지침

플레이트의 뚜껑을 덮고, 가습 인큐베이터를 37°C ±1°C 의 온도, 5% CO^2 공급 조건으로 설정하여 16-20 시간 동안 배양하십시오. 인큐베이터에 플레이트를 넣은 이후에는 플레이트의 배양이 방해 받지 않도록 하십시오. 플레이트를 쌓아 (stacking) 넣지 마십시오. 플레이트가 여러 겹으로 배양되는 경우, 온도 분포 및 환기 조건이 플레이트 별로 상이해져 결과에 영향을 미칠 수 있습니다.

각주 및 시각 자료

그림 20: 16-20 시간 동안 인큐베이터 안에서 플레이트를 배양하십시오.

37°C ±1°C 의 온도, 5% CO^2 공급 조건에 설정된 가습 인큐베이터에서 플레이트를 배양해 주십시오(그림 20). 배양 도중 습도를 유지해야 하므로, 인큐베이터 내의 물 그릇에 충분한 양의 물을 채워져 있는지 확인해 주십시오.

스팟 형성 및 계수

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

사용 지침

스팟 형성

인큐베이터에서 플레이트를 꺼낸 후, 세포 배양배지를 적절한 폐기 용기에 가볍게 털어내어 제거해 주십시오.

주: 이 단계를 진행할 때, 키트에서 기질액을 꺼내어 1 시간 동안 실온과 평형을 이루도록 해주십시오.

- 각 웰에 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) 용액 200µL 를 힘주어 분주하십시오. Tween® 또는 기타 세정액을 함유하는 PBS 를 사용하지 마십시오. 다른 세정액을 사용하는 경우 백그라운드 계수치가 높아지게 됩니다.
- D-PBS 용액을 폐기하십시오. 추가로 3 회 간, 웰을 반복 세척해 주십시오. 매회 새로운 D-PBS 용액을 분주하십시오.

각주 및 시각 자료

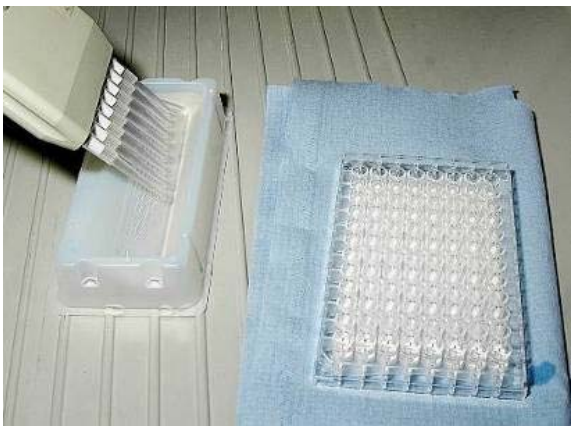


그림 21: 저장 용기에서 D-PBS 200µL 를 흡인하십시오

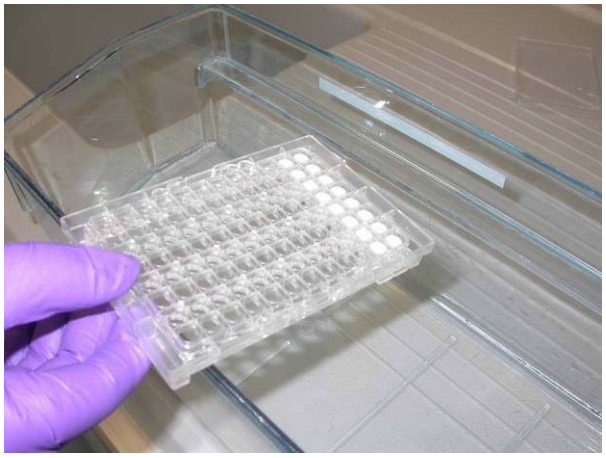
주: 그림 21 에서 보이는 것과 같이, 8-채널 혹은 스테퍼(stepper) 피펫과 D-PBS 를 담을 수 있는 플라스틱 저장용기(reservoir)가 사용될 수 있습니다.

그림 22: 각 웰에 D-PBS 200µL 를 담아 주십시오

주: 각 웰을 충분히 세척하기 위해 200 µL 를 힘주어 분주하십시오 (그림 22).

플레이트 세척기를 사용하는 경우, 팁이 막을 건드리지 않도록 높이가 조절되어 있는지 확인해 주십시오. 마지막 회차의 세척 후, 보푸라기 없는 헝겊이나 흡습지에 플레이트를 가볍게 두드려서 D-PBS 를 모두 털어내 주십시오. 과량 용액이 남게 되면 접합 시약이 더욱 희석되므로 주의하십시오.

매 세척 시, 웰이 세척액으로 채워져 있는지 확인하십시오.



주:

D-PBS 를 제거할 때에는 피펫을 사용하지 마십시오. 피펫 사용 시, 막 손상의 위험이 커집니다.

매 세척 후에는, 폐기 용기 위에서 플레이트를 뒤집어 D-PBS 를 제거해 주십시오. (그림 23).

그림 23: 폐기 용기에서 플레이트를 뒤집어 주십시오.

사용 지침

- 접합 시약(Conjugate Reagent)병을 열기 전에, 모든 액체가 병의 하단에 있는지 확인해 주십시오. 필요한 경우에는 원심분리 해 주십시오.
- 200 배로 고농축된 접합 시약을 D-PBS 에 희석시켜, 1 배 농도의 작업 용액으로 만들어주십시오.
- 각 웰에 작업 용액 50μL 를 첨가한 후, 1 시간 동안 2-8°C 의 온도에서 배양해 주십시오.
- 접합 시약을 버리고, 앞 페이지의 기술된 대로 D-PBS 세척액 200μL 를 이용해 총 4 회 세척해 주십시오.
- 각 웰에 기질액(Substrate Solution) 50μL 을 첨가한 후, 7 분 동안 실온에서 배양해 주십시오.
- 증류수 혹은 탈염수로 플레이트를 충분히 세척해주십시오. 이는 검출 반응을 멈추기 위한 것입니다.
- 환기가 잘 되는 공간, 또는 최대 37°C 조건의 오븐에서 플레이트를 말려 주십시오. 플레이트가 건조될수록 스팟이 뚜렷이 보이게 됩니다. 따라서 결과를 해석 하기 전에 플레이트가 충분히 건조되었는지 확인해 주십시오. 37°C 의 온도에서 최대 4 시간까지, 또는 실온에서 밤새 건조되도록 시간을 두십시오.

주: 웰에 분주를 빠르게 진행하기 위해서는, 다채널 피펫 및 플라스틱 저장용기(reservoir) 사용을 권장합니다. 기질액을 첨가하기 전에, 잔류 D-PBS 가 전부 제거되었는지 확인하십시오. 오염을 방지하기 위해, 사용하고 남은 기질액의 분취량(aliquot)은 폐기하는 것을 권장합니다.

각주 및 시각 자료

그림 24: 접합 시약을 희석해 주십시오 (희석배율 1:200)

희석 예시:
각각의 환자 검체는 4 웰을 사용합니다. 각 웰에는 희석된 접합시약 50μL 이 첨가됩니다. 그러므로 한 개의 스트립(2 개의 검체을 검사할 수 있는 8 개의 웰)을 사용할 경우, 작업 용액 500μL 를 준비해주십시오. 접합 시약 농축액 2.5μL(1-20 μL 피펫 사용)을 D-PBS 497.5μL 에 첨가하여 만들 수 있습니다. 만들어진 작업 용액을 5-6 회 전도혼합하십시오.
96-웰 플레이트 1 개 (24 개의 검체 처리 가능)를 사용할 경우, 희석된 작업 용액 5mL 를 준비해 주십시오. 농축된 접합 시약 25 μL 를 D-PBS 4975 μL 에 첨가하여 만듭니다.
주의: 각 키트에는 필요한 기준량보다 2 배 많은 양의 접합 시약이 들어 있습니다. 그러나, 과량의 용액을 준비하게 되면 시약이 모자라질 수 있으므로, 사용량에 주의해 주십시오.
용액은 투명하고 무색을 띠므로, 접합 시약이 각 웰에 첨가되었는지 확인하여 주십시오.

그림 25: 기질액을 첨가한 후, 18-25°C 에서 7 분 간 배양하십시오.

주: 기질액의 분주에는 8-채널 혹은 스테퍼 피펫의 사용이 권장됩니다 (그림 25).
기질액은 실온에서 사용되어야 하며, 바로 사용할 수 있는 상태(ready to use)로 공급됩니다.

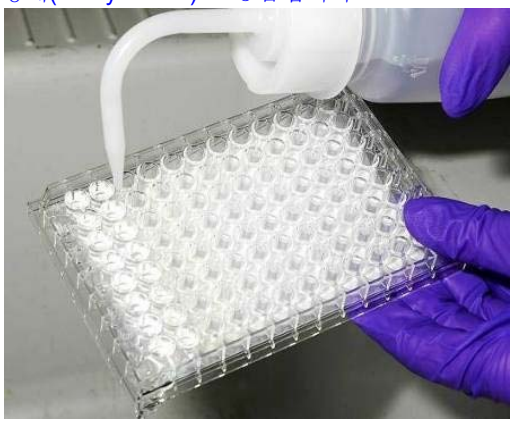


그림 26: 증류수 혹은 탈염수로 웰을 세척해주십시오.

증류수 또는 탈염수로 플레이트를 세척한 후(그림 26), 흡습지에 플레이트를 가볍게 두드려 잔류액을 모두 제거해 주십시오. 웰이 건조될수록 백그라운드는 줄어들고 스팟은 더욱 또렷하게 보이므로, 계수가 용이해집니다. 결과 해석 전에 플레이트가 완전히 건조되었는지 확인해 주십시오.

스팟 해석

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

- 각 웰의 막 위에 뚜렷하게 나타나는 어두운 보라색 스팟의 숫자를 계수하여 기록하십시오. 환자 검체의 '양성'/'음성' 여부의 판단을 위해서는 본 문서의 결과해석 부분을 참조하십시오.
- 스팟 계수 트레이닝 가이드인 T-SPOT®.*Tutor*(그림 27)는 Oxford Immunotec 사의 웹사이트에서 받을 수 있습니다. http://www.oxfordimmunotec.com/international/resources.

스팟 형성이 완료된 플레이트는 안정적이므로, 즉시 결과를 해석할 필요는 없습니다. 과거의 검사 결과에 대한 품질 관리를 실시하거나, 재 관찰 및 해석을 수행하는 경우, 최대 12 개월까지 보관된 플레이트를 사용할 수 있습니다. 단, 이때 플레이트는 실온의 건조하고 어두운 환경에서 보관되어야 합니다.

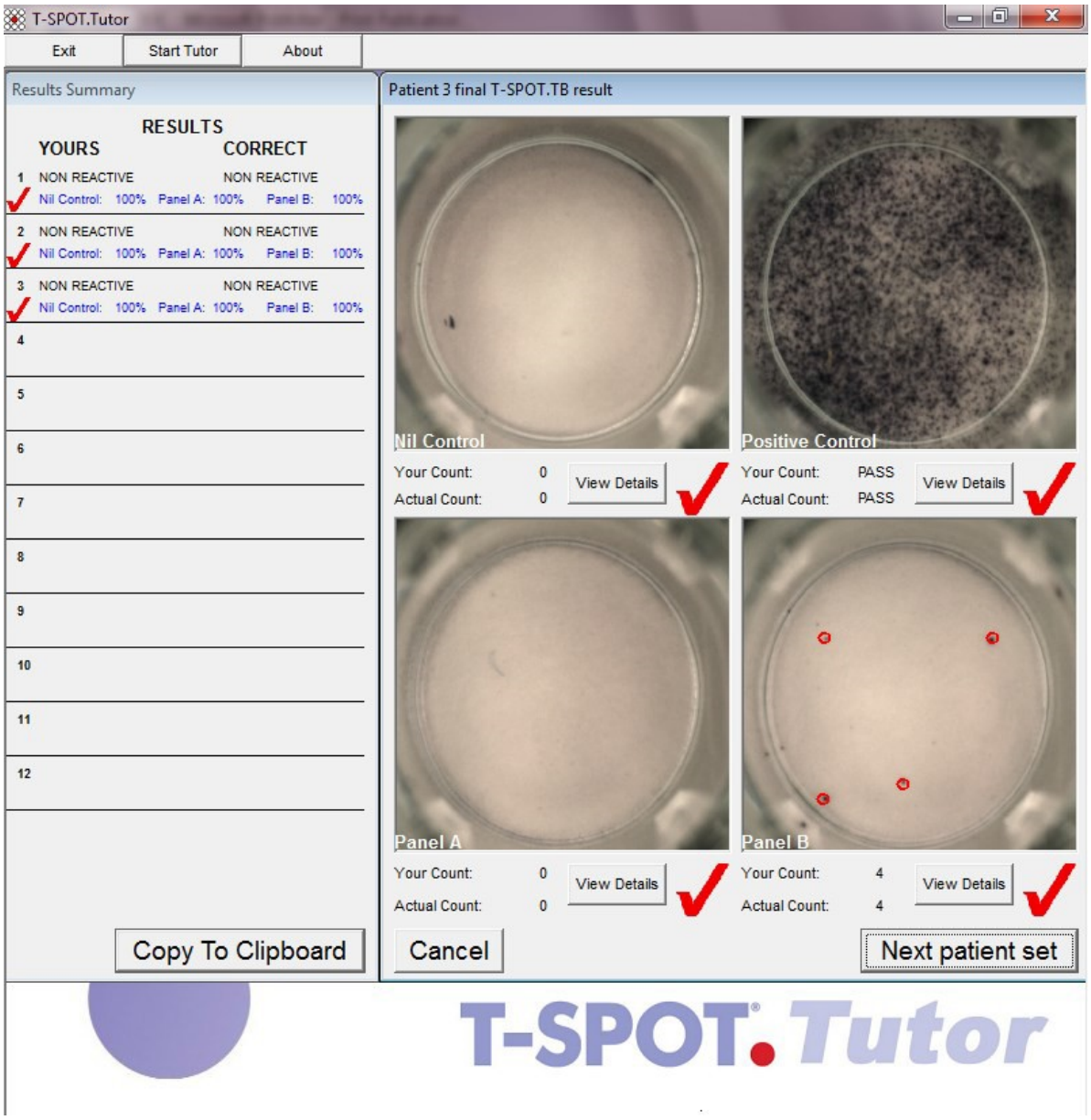


그림 27: T-SPOT.*Tutor* 캡처 화면

T-SPOT.*TB* 검사 결과의 해석에 있어서 권장되는 방법은 어떤 것이 있나요?

USB Microscope 사용은 T-SPOT.*TB* 검사로 형성된 스팟의 시각화에 매우 유용한 방법입니다. 하지만 검증된 다른 방법들을 사용하실 수도 있습니다. 가령, 확대경 또는 입체 현미경을 사용해도 무방합니다. 가능한 경우, 자동화된 ELISPOT 플레이트 이미지 분석기를 사용하여 스팟을 시각화할 수 있습니다. T-SPOT.*TB* 검사의 스팟 계수에 도움을 주는 자동 이미지 기기는 여러 종류가 있습니다. 이들 기기의 제조사로는 BIO-SYS, AID, CTL™, Zeiss™ 등이 있습니다. 모든 플레이트 이미지 기기는 진단 용도로 사용되기 전에 검증되어야 하며, 조정 절차(calibration routine)가 마련되어 있어야 합니다.

모든 스팟을 계수 해야 하나요?

충분한 양의 스팟이 형성된 웰이나 스팟이 전혀 형성되지 않는 웰의 경우, 즉 검사 결과를 신뢰성 있게 판정할 수 있는 경우에는 스팟을 정확하게 계수할 필요는 없습니다. 본 진단 키트의 임상 데이터 결과에 의하면, 대부분의 실험 결과가 명백하게 양성('패널-음성 대조' 값이 스팟 10 개를 초과)이거나 음성('패널-음성 대조' 값 이 2 개 이하)으로 나타났습니다. 이러한 경우, 스팟을 일일이 헤아리지 않고도 실험 결과를 양성 또는 음성으로 보고할 수 있습니다. 양성 대조 웰은, 품질 관리 기준(본 문서 31 면의 품질 관리 부분 참조)을 통과하는 한, 스팟을 일일이 계수하지 않아도 됩니다.

웰에 나타나는 유효한 스팟과 비특이적 물질(artefact)을 어떻게 구분하나요?

항원자극의 결과로 생성되는 스팟은 크고, 둥글고, 진한 스팟으로 나타나며, 종종 중심부가 더욱 어둡고 주변부로 갈수록 분산된 색깔(광륜)을 보이는 그라디언트 효과가 관찰됩니다. 이들이 유효한 스팟이며, 이에 비해 비특이적 물질(artefact)은 더 작거나, 흐릿하고, 불규칙한 형태를 보입니다.

스팟은 어떻게 계수하나요?

결과 해석을 시작하기 전에 플레이트가 건조한지 확인해 주십시오. 플레이트가 건조해질수록 스팟이 더욱 뚜렷해 지기 때문입니다. 건조 과정은 최대 37°C 오븐에서 이루어지거나, 실온의 환기가 잘 되는 환경에서 이루어질 수 있습니다. 37°C 에서는 최대 4 시간, 실온에서는 밤샘 건조하십시오.

각 웰의 막 위에 나타나는 크고 둥글고 진한 스팟의 개수를 계수하고 기록해주십시오. 이 과정은 블라인드 테스트로 이루어져야 합니다 (즉, 환자의 구체적인 정보를 모른 채 진행되어야 합니다). 총 4 개의 웰(즉, 음성 대조, 패널 A, 패널 B, 그리고 양성 대조)의 결과 모두를 기록해야 합니다. 기록 방법은 T-SPOT.*TB* 첨부문서에 제시된 지침에 따라 주십시오. 수기계수를 진행하는 경우, T-SPOT®.*Reporter* 사용을 권장합니다. 해당 프로그램은 T-SPOT.*TB* 키트 부속품으로 제공되는 CD 에서 확인하실 수 있습니다. 이 소프트웨어는 T-SPOT.*TB* 검사의 결과를 판정할 때 사용되는 알고리즘이 포함되어 있습니다.

아래의 그림은, 음성 대조, 패널 A, 패널 B 웰에서 계수되어야 하는 스팟을 보여주고 있습니다. 그림은 USB Microscope 와 자동화 플레이트 이미지 기기를 이용해 얻은 것입니다.

유효한 스팟은 검은색 원으로, 무효 처리되는 스팟은 붉은색 원으로 표시되어 있습니다.

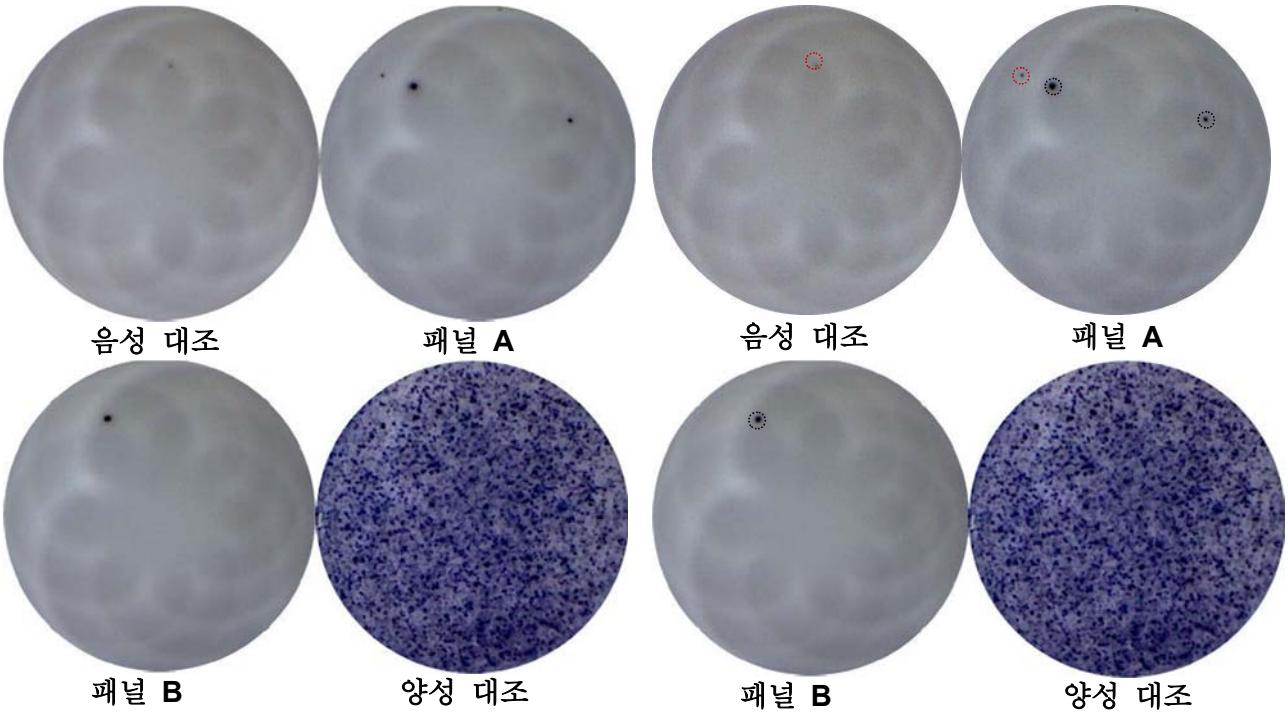


그림 28: USB Microscope 으로 관찰한 환자 1 의 검체 (무효 처리하는 스팟은 붉은색으로 표시됨)

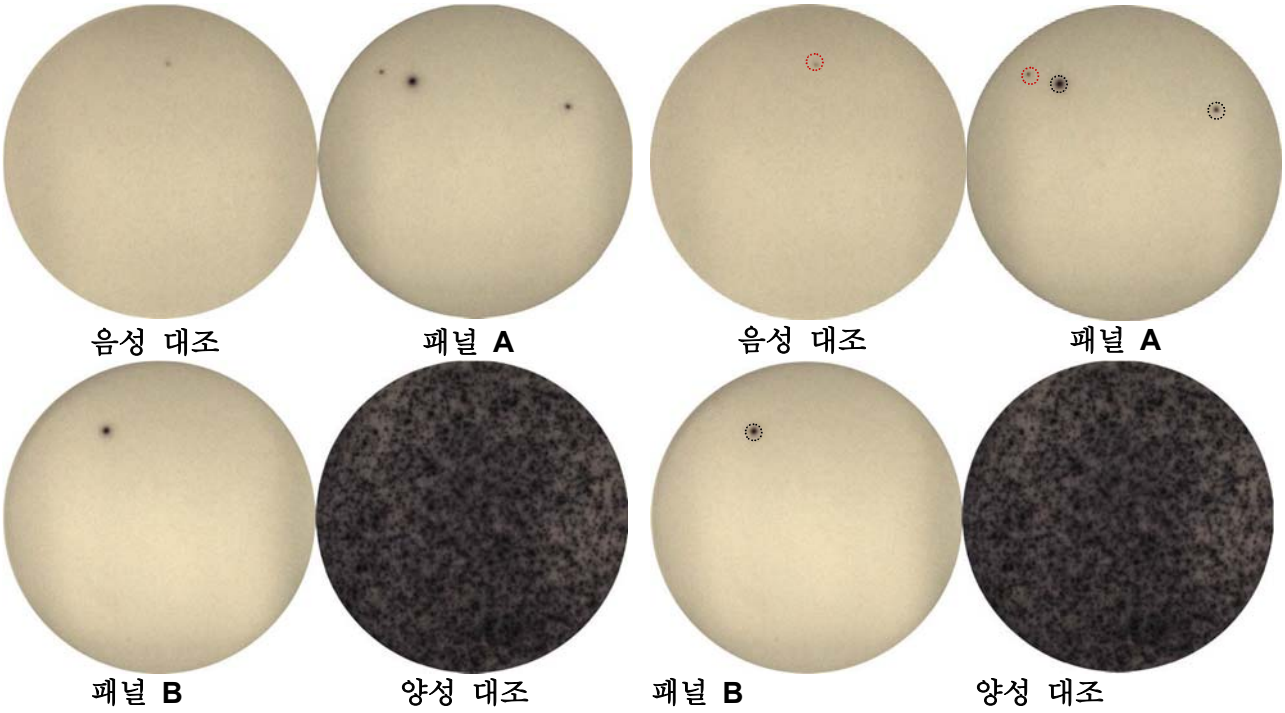


그림 29: AID 플레이트 리더기로 관찰한 환자 1 의 검체 (무효 처리하는 스팟은 붉은색으로 표시됨)

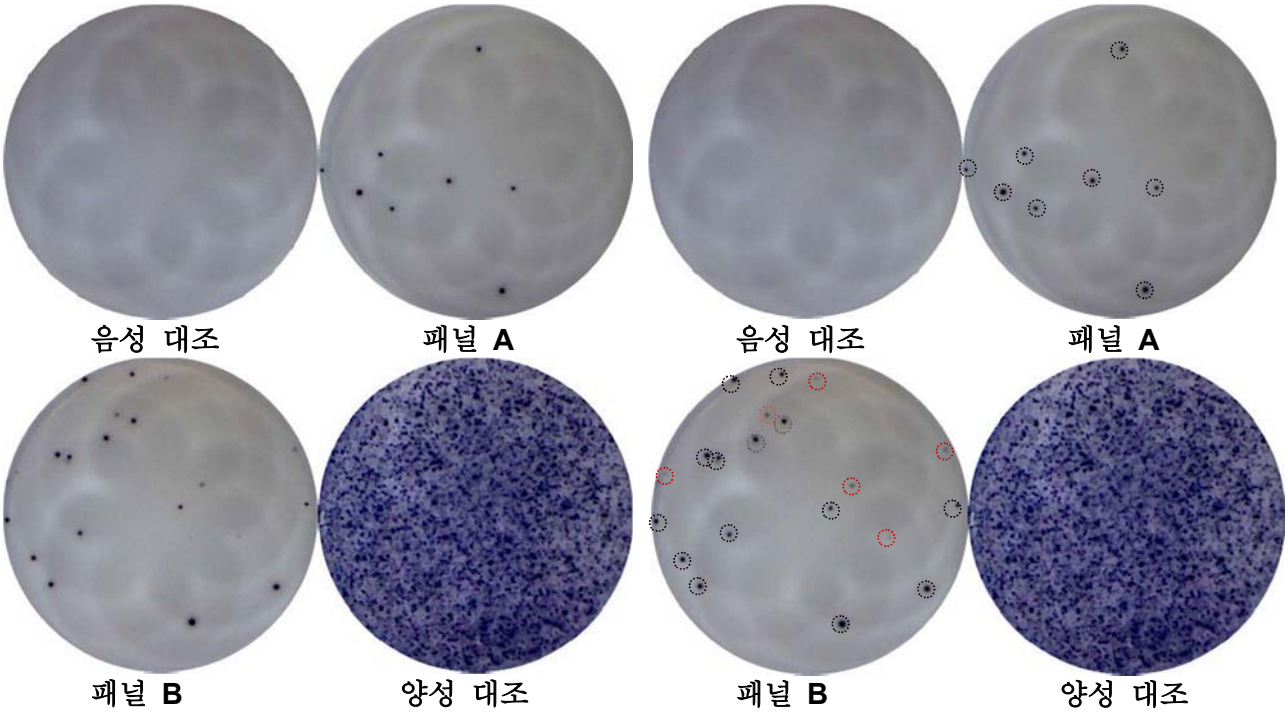


그림 30: USB Microscope 로 관찰한 환자 2 의 검체 (무효 처리하는 스팟은 붉은색으로 표시됨)

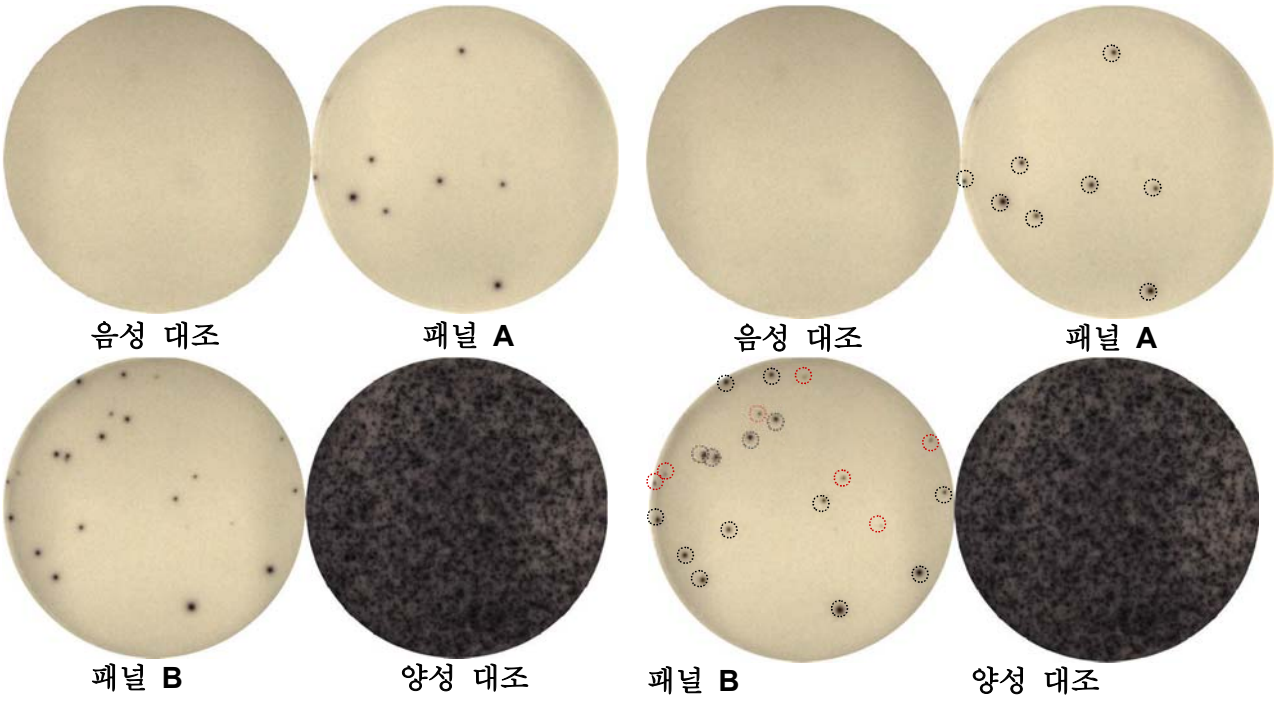


그림 31: AID 플레이트 리더기로 관찰한 환자 2 의 검체 (무효 처리하는 스팟은 붉은색으로 표시됨)

그림 32: USB Microscope 로 찍은 사진. 유효한 스팟 7 개(검은색 원으로 표시) 및 무효 처리되는 3 개의 약한 스팟(붉은색 원으로 표시)을 보이는 웰.

그림 33: USB Microscope 로 찍은 사진. 유효한 스팟 26 개(검은색 고리로 표시) 및 무효 처리되는 15 개의 약한 스팟(붉은색 고리로 표시)을 보이는 웰.

품질 관리

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

사용 지침

품질 관리

일반적으로 기대되는 결과는 다음과 같습니다: 음성 대조의 결과에서 스팟이 거의 없거나 아예 없을 것. 양성 대조에서 20 개 이상의 스팟이 나타날 것.

음성 대조

음성 대조에서 다량의 스팟이 나타날 수 있습니다. 또한, 한 개 이상의 웰에서 백그라운드 염색이 지나치게 짙게 나타나, 스팟 계수가 어려울 수 있습니다. 백그라운드 염색이 짙게 나타나 백그라운드와 스팟을 구분하기 어렵다면, 결과는 "판정불가"로 판단하셔야 합니다. 이러한 결과의 대부분은 실험 상의 문제에 기인합니다. 가령, 플레이트 세척이 적당하지 않았거나, 배지가 오염되었거나, 검체 처리가 적절하지 않았거나, PBMC 분리법이 적절하지 않았을 수 있습니다. 하지만, 몇몇 증례에서는 환자의 건강 상태가 이러한 결과에 영향을 미치기도 합니다.

음성 대조에서 10 개를 초과하는 스팟이 계수된다면, 해당 검사는 "판정불가"로 판단해야 합니다.

양성 대조

일반적으로, 세포의 기능성을 확인하는 양성 대조 스팟의 수는 ≥ 20 개, 또는 포화(즉, 계수하기에 너무 많은 수의 스팟) 상태를 나타내야 합니다. 일부 적은 비율의 환자에게서는 PHA 에 제한적인 감수성을 보이는 T 세포가 존재할 수 있습니다[1]. 양성 대조의 스팟 계수치가 < 20 개인 경우에는, 패널 A 또는 패널 B 의 결과가 '양성'으로 나타나지 않는 한 해당 검사는 "판정불가"로 판단해야 합니다. 양성 대조의 스팟 계수치가 <20 개인 경우일지라도 패널 A 또는 패널 B 의 결과가 '양성'으로 나타난다면 결과는 유효합니다. 자세한 내용은 하기의 결과 해석 및 검사 기준 부분의 설명을 참조해 주십시오.

각주 및 시각 자료

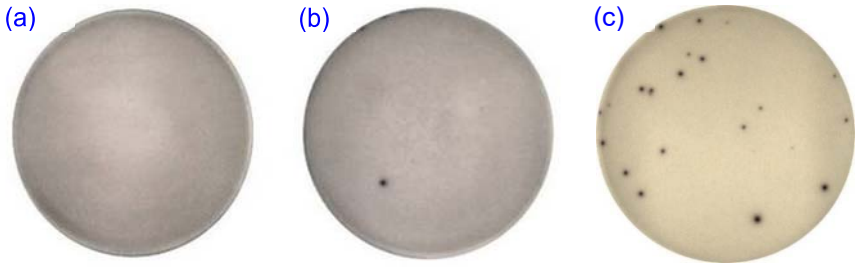


그림 34: 일반적인 음성 대조 웰의 이미지: (a) 스팟 0 개인 웰의 경우 (b) 스팟 1 개인 웰의 경우 (c) 음성 대조 웰에 >10 개의 스팟이 있어 무효 처리되는 경우

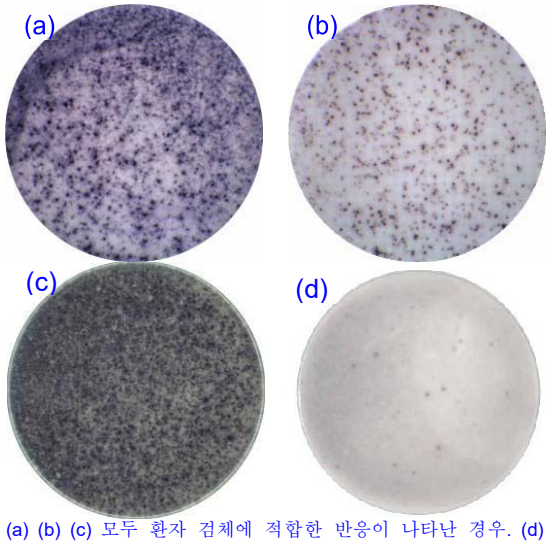


그림 35: 일반적인 양성 대조 웰의 이미지 (a) (b) (c) 모두 환자 검체에 적합한 반응이 나타난 경우. (d) 양성 대조 웰에 <20 개의 스팟이 나타나 무효 처리되는 경우

결과 해석

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

결과 해석 및 검사 기준

다음의 기준을 적용하기 전에 품질 관리 부분을 참고해주시기 바랍니다.

주의: 결핵 질환 여부를 진단하거나, 잠복 결핵 (LTBI) 감염의 가능성을 판단하는 경우, T-SPOT.*TB* 검사 결과를 해석할 때 역학적 요인, 병력, 임상학적, 그리고 진단학적 소견을 모두 종합적으로 고려해야 합니다. 결핵균의 감염(결핵 질환을 포함)을 진단하고 검사 대상을 선정할 때, 국내 진료 및 치료지침 상의 권장사항을 참조해 주십시오.

T-SPOT.*TB* 검사의 결과는 두 개의 패널 각각에서 나타나는 스팟 개수에서 음성 대조 웰의 스팟 개수를 빼는 다음의 알고리즘에 따라 해석됩니다.

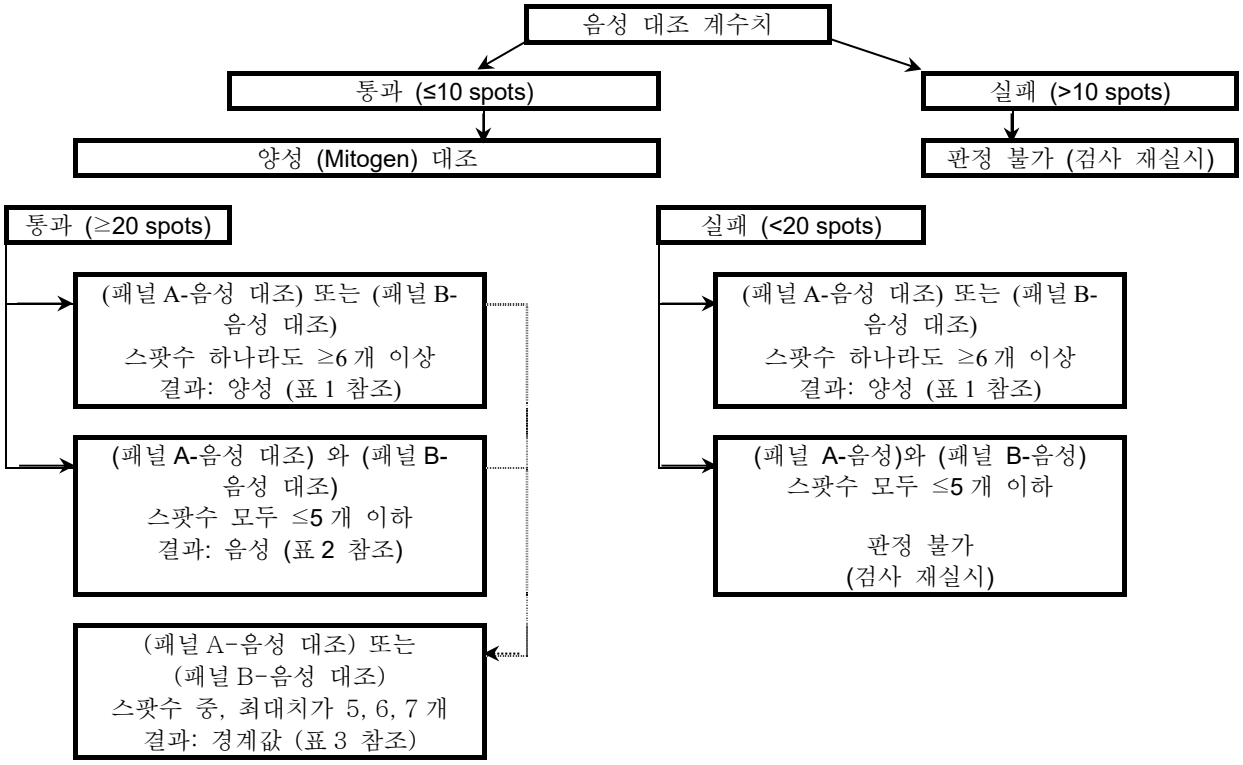
양성: (패널 A-음성 대조)또는 (패널 B-음성 대조) 스팟수가 둘 중 하나라도 ≥ 6 개 이상

음성: (패널 A-음성 대조)와 (패널 B-음성 대조) 스팟수가 모두 ≤ 5 개 이하 (0 이하 포함)

경계값(Borderline) 및 판정불가(Indeterminate)

패널 A, 혹은 패널 B 의 스팟 계수치 (패널-음성 대조) 중 높은 값의 스팟수가 5, 6 또는 7 인 경우 경계값(Borderline)으로 판단하셔야 합니다. 환자로부터 새로운 검체를 수집하여 재검사할 것을 권장합니다.

재검사 결과가 여전히 경계값(borderline)인 경우, 다른 진단검사학 및 역학적 정보를 활용하여 환자의 결핵 감염 상태를 판단해야 합니다



스팟 해석
패널 **A** 및 패널 **B** 항원

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

표 1: 양성: (패널 A-음성 대조) 또는 (패널B-음성 대조) 스팟수가 둘 중 하나라도 ≥6 개 이상

음성 대조 웰의 계수치	패널 A 또는 B 의 스팟수가 둘 중 하나라도 다음의 수치인 경우†	결과 해석
0	≥6	**양성**
1	≥7	**양성**
2	≥8	**양성**
3	≥9	**양성**
4	≥10	**양성**
5	≥11	**양성**
6	≥12	**양성**
7	≥13	**양성**
8	≥14	**양성**
9	≥15	**양성**
10	≥16	**양성**
>10 spots	n/a	**판정불가****

†주: 높은 스팟수가 나타난 패널의 계수치를 사용함.

표 2: 음성: (패널 A-음성 대조) 와 (패널B-음성 대조) 스팟수가 모두 ≤5 개 이하

음성 대조 웰 계수치	패널 A 와 B 의 스팟수가 모두 다음의 수치인 경우	결과 해석
0	≤5	**음성**
1	≤6	**음성**
2	≤7	**음성**
3	≤8	**음성**
4	≤9	**음성**
5	≤10	**음성**
6	≤11	**음성**
7	≤12	**음성**
8	≤13	**음성**
9	≤14	**음성**
10	≤15	**음성**
>10 spots	n/a	**판정불가****

표 3: 경계값(Borderline): (패널 A-음성 대조) 또는 (패널 B-음성 대조) 스팟수 중 최대치가 5, 6, 7 개인 경우

음성 대조 웰 계수치	패널A 또는 B 의 스팟수 중 최대치가 다음의 수치인 경우	결과 해석
0	5, 6 or 7	**경계값 (Borderline)***
1	6, 7 or 8	**경계값 (Borderline)***
2	7, 8 or 9	**경계값 (Borderline)***
3	8, 9 or 10	**경계값 (Borderline)***
4	9, 10 or 11	**경계값 (Borderline)***
5	10, 11 or 12	**경계값 (Borderline)***
6	11, 12 or 13	**경계값 (Borderline)***
7	12, 13 or 14	**경계값 (Borderline)***
8	13, 14 or 15	**경계값 (Borderline)***
9	14, 15 or 16	**경계값 (Borderline)***
10	15, 16 or 17	**경계값 (Borderline)***
>10 spots	n/a	**판정불가****

* 패널 A 혹은 B 의 스팟 계수치 (패널-음성 대조) 중 높은 값의 스팟수가 5, 6, 또는 7 개의 경우 경계값(Borderline)으로 고려해야 하며, 환자로부터 새로운 검체를 수집하여 재검사를 실시할 것을 권장합니다.

** 결과가 "판정불가"인 경우, "판정불가"로 보고 되어야 하며, 해당 환자로부터 새로운 검체를 수집하여 재검사를 실시할 것을 권장합니다.

문제해결 이미지

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

문제 해결

이 검사는 Good Laboratory Practice 의 원칙에 따라서, 본 사용 지침을 준수하며 수행되어야 합니다.

경계값 (borderline) 결과

경계값(borderline)은 두 개의 (패널-음성 대조) 스팟 계수 결과 중 최댓값이 (ROC 로 판단된 검사의 한계점인) ≥6 개의 스팟으로부터 ±1 개의 스팟 범위를 지닐 때입니다. 경계값(Borderlinel)은 유효한 결과이기는 하지만, 한계점으로부터 더 큰 차이를 보이는 스팟 계수치보다는 낮은 신뢰도를 지닙니다. 따라서 해당 환자로부터 새로운 검체를 채혈하여 재검사하도록 권장합니다. 재검사 결과가 여전히 경계값(Borderline)으로 나온다면, 다른 종류의 진단검사 그리고/또는 역학적 정보를 종합적으로 고려하여 환자의 결핵 감염 상태를 판단해 주십시오.

판정불가 결과

판정불가는 드물게 나타나며, 검사받은 개인의 면역 상태와 관련된 결과일 수 있습니다 [2&3]. 또한 아래에 기술된 다양한 기술적인 요인들로 인해 "짙은 백그라운드," "낮은 양성 대조값," 그리고 "높은 음성 대조값" 이 발생할 수 있습니다:

- 부적절한 채혈튜브 사용
- 검사 개시 전, 8 시간 이상 보관한 혈액 사용 (혹은 T-Cell *Xtend* 시약을 사용한 경우 32 시간 이상 보관한 혈액 사용)
- 검사 개시 전, 권장된 온도 범위(18-25ºC) 외에서 혈액 검체를 보관
- 세포 배양 배지의 오염
- 불완전한 플레이트 세척

판정불가 결과가 나온 경우에는 환자로부터 새로운 검체를 채혈하여 재 검사하는 것을 권장합니다. 주요한 문제해결 방법들을 다루고 있는 기술 문서가 필요한 경우, Oxford Immunotec 사에 연락해 주십시오.

제품 지원 연락처: (02) 2015 7710

스팟 해석 — 추가 정보

패널 A 및 B 항원

항원 웰 내, 스팟의 개수는 0 개부터 수백 개까지의 범위를 지닐 수 있습니다. 스팟 개수가 높게 나타나면 계수가 어렵고, 계수에 드는 시간이 길어지므로 >20 개 이상으로 기록하시면 됩니다. 전형적으로 나타날 수 있는 웰의 예시는 다음의 그림 34-36 과 같습니다.

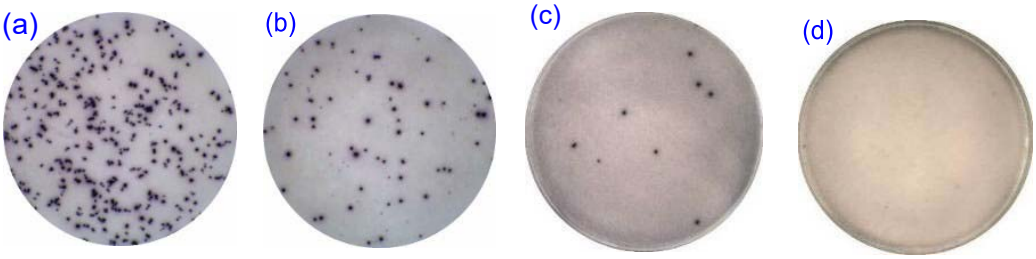


그림 36: 패널 A 및 B 항원 웰의 전형적인 그림. (a) 양성 검체 (>20 spots); (b) 양성 검체 (>20 spots); (c) 양성 검체 (8 spots) (d) 음성 검체 (0 spots)

검사 해석 예시:

	웰		스팟 계수치	유효?
환자 1.	음성 대조	=	2	✓
	패널 A	=	11	✓
	패널 B	=	1	✓
	양성 대조	=	>20	✓

패널 A 값 빼기 음성 대조값 = 9 (9 ≥6). 그러므로: **결과 = 양성**

환자 2.	음성 대조	=	1	✓
	패널 A	=	0	✓
	패널 B	=	2	✓
	양성 대조	=	>20	✓

패널 B 값 빼기 음성 대조값 = 1 (1 ≤5). 그러므로: **결과 = 음성**

환자 3.	음성 대조	=	11	X
	패널 A	=	13	✓
	패널 B	=	12	✓
	양성 대조	=	>20	✓

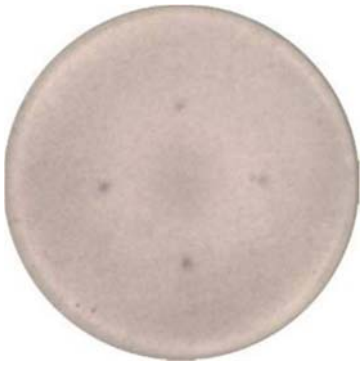
음성 대조값 >10. 그러므로: **결과 = 판정 불가 (재 검사 필요)**

환자 4.	음성 대조	=	0	✓
	패널 A	=	13	✓
	패널 B	=	12	✓
	양성 대조	=	18	X

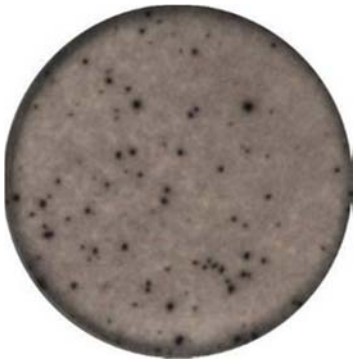
양성 대조값은 실패하였으나, 패널 A 와 B (빼기 음성대조값 0) = 13 & 12 (>6) 그러므로: **결과 = 양성**

스팟 해석 — 문제해결

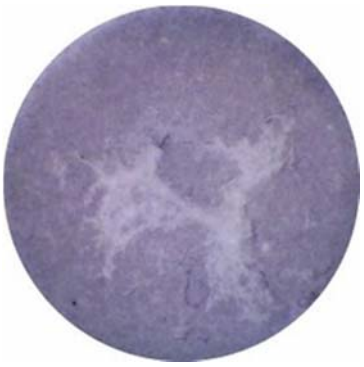
웰이 잔해물을 함유하거나 짙은 백그라운드를 보이는 경우, 스팟을 계수할 때 특별히 유의하시기 바랍니다. 아래의 예시를 참조해 주십시오.



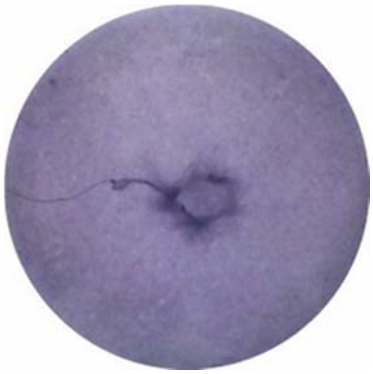
예시 1: 4 개의 표식(Mark) 효과. 이 표시들은, 세척 단계에서 플레이트를 두드려 털어낼 때 플레이트의 후면에 과한 압력이 가해져 형성될 수 있음 [이 경우 스팟 계수치 = 0]



예시 2: 패널 웰 안의 백그라운드가 짙은 경우. T-SPOT.*TB* 검사에서 짙은 백그라운드가 나타나는 경우는 드물지만, 백그라운드 위에서 스팟을 확인할 수 있음 [이 경우 스팟 계수치 ≥20].



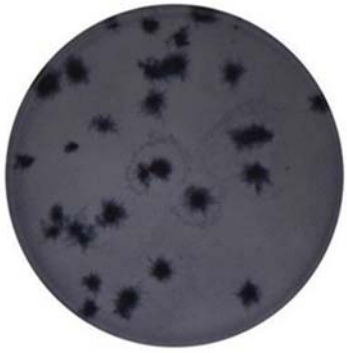
예시 3: 과도하게 짙은 백그라운드는 다음의 원인으로 발생할 수 있음: 적절하지 않은 플레이트 세척, 배지 오염, 또는 부적절한 검체 처리 및 PBMC 분리. 환자의 건강 상태가 이러한 결과를 가져왔을 가능성 또한 배제할 수 없음 [이 경우, 이 음성 대조 웰의 결과는 무효]



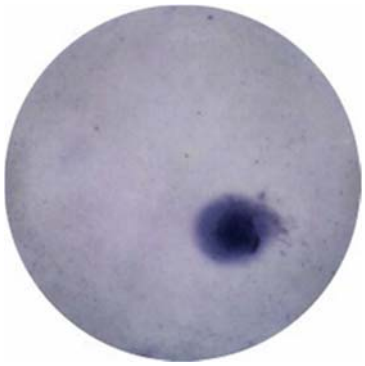
예시 4: 웰 안에 머리카락과 같은 잔해물이 보일 수 있음. 그러나 스팟을 여전히 확인할 수 있음. [이 경우 스팟 계수치= 0]. 세포와 시약을 피펫팅 할 때는 검사 웰에 잔해물이 들어가지 않도록 주의

예시 5: 피펫 팁이 막에 닿으면 어두운 흔적을 남길 수 있음. 그러나 스팟을 여전히 확인할 수 있음. [이 경우 스팟 계수 치 = 0]. 세포와 시약을 피펫팅 할 때는 피펫 팁으로 막을 건드리지 않도록 주의

예시 6: 자동 세척 팁(Automated Washer tips) 역시 막에 어두운 흔적을 남길 수 있음. 그러나 스팟을 여전히 확인할 수 있음. [이 경우 스팟 계수치= 0]. 실험을 진행하는 중에는 팁이 막을 건드리지 않도록 주의



예시 7: 웰(배지)에 균류(fungal) 오염이 발생한 경우. 형태상 균류의 증식 모습은 둥글지 않으며, 불규칙하고 섬유질 모양의 가장자리를 보임. 또한 균류는 ELISPOT 스팟보다 크기가 큼. [이 경우 스팟 계수치= 0]. 오염이 발생하지 않도록 주의



예시 8: 웰 내의 잔해물. 스팟을 확인할 수 있다면 유효함 [이 경우 스팟 계수치 = 0]. 세포와 시약을 피펫팅 할 때는 검사 웰에 외부 잔해물이 들어가지 않도록 주의

예시 9: 손상된 막. 이 웰에서 스팟이 여전히 확인됨 피펫팅하여 웰에 분주할 때, 막이 손상되지 않도록 주의

References

1. Köller MD *et al*., Functional and molecular aspects of transient T cell unresponsiveness: role of selective Interleukin-2 deficiency. *Clin Exp Immunol*. 2003 May;132(2):225-31.
2. NCCLS. Performance of single cell immune response assays; approved guideline. NCCLS document I/LA26-A.
3. Meier T *et al*. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-*TB*) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*., 2005; 24: 529-536.

T-SPOT, T-Cell *Xtend* and the Oxford Immunotec logo are trademarks of Oxford Immunotec Limited

AIM V and GIBCO are trademarks of Invitrogen
PST, CPT and Vacutainer are trademarks of Becton Dickinson
*FICOLL and FICOLL-PAQUE are trademarks of GE companies
Tween is a trademark of Uniqema Americas LLC
Vacuette is a trademark of Greiner Bio-One
CTL is a trademark of Cellular Technologies Limited
Zeiss is a trademark of Carl Zeiss AG
Monovette is a trademark of Sarstedt

Fast-Read Disposable Counting Slides are supplied by Immune Systems Limited The T-SPOT.*TB* assay is protected by the following patents and patents pending:

US7575870, US12/510,594, EP941478, JP4094674, AU728357, CA2272881; US7115361; US7632646, EP1144447, JP4633931, ZA2001-3356; US7901898, US8216795; US13/489,621; US6290969, US6338852, US11/801,112, EP1203817, JP2006-034593, AU727602, CA2653566, CN1200147, CZ300953, HU0900047, NO9800883, TR2009/01109, ZA9607394, ZW10496; US5955077, EP0706571, AU682879, CA2165949, NZ267984; US7579141, US8021832, EP1214088, JP4820489, AU773268, CA2372583.

The use of the T-Cell *Xtend* Reagent is protected by the following patents and patents pending; EP2084508; US13/253,598, CN101529221, AU2007-303994, JP2009-530943, IN2165/DELNP/2009, CA2665205.

T-SPOT.*TB* incorporates patented technology under license from the Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark and Isis Innovation Limited, Oxford, UK.

© Oxford Immunotec Limited, 2015. All rights reserved.

Oxford Immunotec, Ltd.
94C Innovation Drive, Milton Park,
Abingdon, Oxfordshire, OX14 4RZ, UK
Tel: +44 (0) 1235 442780
Fax: +44 (0) 1235 442781
Email: info@oxfordimmunotec.com
www.oxfordimmunotec.com

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement