



T-SPOT[®] TB 96

Et hjelpemiddel til diagnostisering av tuberkuloseinfeksjoner

96-brønners plate (TB.200)

PAKNINGSVEDLEGG

Brukes til *in vitro*-diagnostikk

T-SPOT.TB 96

96-brønners plate (TB.200)

Innholdsfortegnelse	Side
Bruksområde	2
Innledning	2
Prosedyreprinsipp	2
Begrensninger	3
Advarsler og forholdsregler	4
Medfølgende materiell	4
Oppbevaring	4
Stabilitet	4
Nødvendig utstyr og materiell, som ikke er inkludert	4
Klargjøring av reagens	5
Prosedyre	5
Prøvetaking og -klargjøring	5
Celletelling og fortykning	6
Plateoppsett og inkubasjon	7
Punktutvikling og telling	8
Kvalitetskontroll	8
Tolkning av resultater og analysekriterier	9
Ytelsesegenskapene til analysen	9
Referanseliste	10
Oversikt over symboler	10

Bruksområde

T-SPOT[®].TB -testen er en *in vitro*-diagnostisk test for påvisning av effektor-T-celler som reagerer på stimulering med *Mycobacterium tuberculosis*-antigen, og er beregnet på å brukes som et hjelpemiddel til diagnostisering av tuberkulose (TB) infeksjoner. T-SPOT.TB -testen er en forenklet enzymlinket immunospot (ELISPOT)-metode som brukes for å kvantifisere opp individuelle TB-spesifikke, aktiverte effektor-T-celler.

Innledning

Verdens Helseorganisasjon (WHO) har beregnet at en tredjedel av verdens befolkning er smittet av *M. tuberculosis*. Hver person som bærer en latent TB-infeksjon (LTBI) har omtrent 10% sannsynlighet for å utvikle aktiv sykdom. Denne sannsynligheten øker hos visse grupper, inkludert de som nylig er blitt smittet og de som har nedsatt immunforsvar.

Immunresponsen på infeksjon med *M. tuberculosis* er hovedsakelig en cellemediert immunrespons (CMI). En del av responsen er at T-celler sensibiliseres for *M. tuberculosis*-antigen. Aktiverte effektor-T-celler, både CD4 og CD8, skilles spesifikt fra blodet og kan telles gjennom evnen til å stimuleres *in vitro* av disse antigenene^{1,2}. Bruken av valgte antigen for *M. tuberculosis*-kompleks (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) forbedrer testspesifisiteten for disse organismene ved å redusere kryssreaktivitet for BCG-vaksine og de fleste mykobakteriene som forekommer i miljøet^{3,4}. To separate paneler med antigen, som simulerer de godt karakteriserte proteinene ESAT-6 og CFP10, brukes for å optimalisere sensitiviteten til testen.

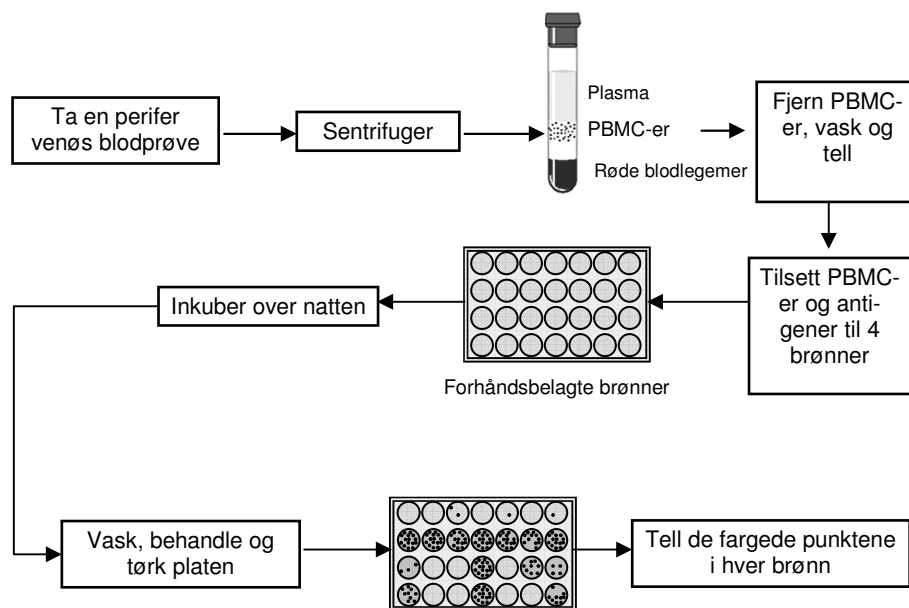
T-SPOT.TB -testen er en forenklet variant av analyseteknikken ELISPOT. ELISPOT-analyser er ekstremt sensitive, fordi målcytokinet fanges opp direkte rundt den utskillende cellen, før den fortyndes i supernatant, fanges den opp av reseptorer på tilstøtende celler eller den nedbrytes. Det gjør ELISPOT-analysene mye mer sensitive enn tradisjonelle ELISA-analyser⁵. T-SPOT.TB -testen er beregnet på påvisning av effektor-T-celler som reagerer på stimulering med antigen som er spesifikke for *M. tuberculosis*^{3,4,6-9}. Testen teller individuelle, aktiverte TB-spesifikke T-celler. Den er egnet for bruk til alle pasienter med risiko for LTBI eller ved mistanke om TB-sykdom^{10,11}, uansett alder, kjønn, etnisk tilhørighet, terapi eller immunstatus.

Prosedyreprinsipp

Mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) skilles fra en fullblodsprøve og vaskes for å fjerne alle kilder til forstyrrende bakgrunnssignaler. PBMC-ene blir så talt slik at et standardisert celleantall blir brukt i testen. Det sikrer at selv de med lav T-celletiter på grunn av et svekket immunsystem (immunkompromittering og immunsuppresjon) har et tilstrekkelig antall celler som blir tilsatt mikrotiterbrønnene. Vaske- og tellestadiene, samt ELISPOT-teknikken, er svært spesifikke når det gjelder påvisning av TB-sykdom og latent TB-infeksjon.

Fire brønner (se figur 1) er nødvendig for hver prøve:

1. En nullkontroll for å identifisere ikke-spesifikk celleaktivering.
2. TB-spesifikke antigen, panel A (ESAT-6).
3. TB-spesifikke antigen, panel B (CFP10).
4. En positiv kontroll som inneholder fytohemagglutinin (PHA, en kjent polyklonal aktivator¹²) for å bekrefte PBMC-funksjonalitet.



Figur 1: Hovedtrinnene til T-SPOT.TB-testen. NB! Hver plate inneholder 96 brønner.

PBMC-ene inkuberes med antigenene for å tillate stimulering av eventuell tilstedeværelse av sensibiliserte T-celler. Utskilt cytokin fanges opp av spesifikke antistoffer på membranen, som danner grunnlaget for brønnen, og cellene og andre uønskede materialer fjernes ved vasking. Et annet antistoff, konjugert til alkalisk fosfatase og rettet mot et annet epitop på cytokinmolekylet, tilsettes og bindes til cytokinet som er fanget opp på membranoverflaten. Eventuelt ubundet konjugat fjernes ved vasking. Et løselig substrat tilsettes i hver brønn. Dette splittes av bundet enzym og danner et punkt med uløselig presipitat på reaksjonsstedet. Hvert punkt representerer avtrykket av en individuell cytokin-utskillende T-celle, og evalueringen av antall punkter som oppnås, måler overfloden av *M. tuberculosis*-sensitive effektor-T-celler i perifert blod.

Begrensninger

- Skal kun brukes til *in vitro*-diagnostikk.
- Kun til profesjonell bruk.
- Oppbevar settet uåpnet ved 2–8 °C. Settet må ikke brukes etter utløpsdatoen angitt på etiketten.
- Ikke bland komponenter fra sett med ulike batchkoder (lot).
- T-SPOT.TB 96-settet er kun til engangsbruk.
- Les nøye gjennom instruksjonene for analysen før bruk.
- Bruk aseptisk teknikk for å unngå å kontaminere reagensene, analysebrønnene, celsesuspensjonene og cellekulturmediene.
- Variasjon i angitte pipetterings- og vasketeknikker, inkubasjonstider og/eller temperaturer kan påvirke de faktiske resultatene som oppnås, og bør unngås.
- Blodprøvene må tas og behandles med analysen innen 8 timer. Denne tidsbegrensningen kan fravikes ved å bruke T-Cell Xtend™-reagenset (tilgjengelig fra Oxford Immunotec). Når T-Cell Xtend-reagenset brukes med T-SPOT.TB-testen, kan prøvenes oppbevaringstid forlenges til 32 timer.
- Oppbevar og transporter blodprøver til laboratoriet ved romtemperatur (18–25 °C). Dersom T-Cell Xtend-reagenset benyttes kan prøvene transporteres og oppbevares ved 10–25 °C. Fullblodsprøver må ikke avkjøles eller fryses.
- T-SPOT.TB-testen skal bare brukes og fortolkes i kontekst av det generelle kliniske bildet.
- Et negativt testresultat utelukker ikke muligheten for eksponering for eller infeksjon med *M. tuberculosis*.
- ESAT-6- og CFP10-antigen er fraværende fra BCG-stammer, og fra de fleste mykobakteriene i omgivelsene, med unntak av *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} og *M. goodii*.

Advarsler og forholdsregler

Utvis forsiktighet ved håndtering av materiale av human opprinnelse. Alle blodprøver må anses som potensielt smittefarlige.

Håndtering, bruk, oppbevaring og avhending av blodprøver og analysedeler må samsvare med prosedyrene definert i aktuelle nasjonale retningslinjer eller bestemmelser om biologisk sikkerhet.

Vis aktsomhet ved arbeid med kjemikalier. Alle kjemikalier skal anses som potensielt farlige.

Medfølgende materiell

T-SPOT.TB 96-settet inneholder:

1. 1 mikrotiterplate: 96 brønner belagt med monoklonalt museantistoff for cytokin interferon gamma (IFN-g).
2. 2 glassrør (0,7 ml hver) panel A: inneholder ESAT-6-antigen, bovint serumalbumin og antimikrobielle stoffer.
3. 2 glassrør (0,7 ml hver) panel B: inneholder CFP10-antigen, bovint serumalbumin og antimikrobielle stoffer.
4. 2 glassrør (0,7 ml hver) positiv kontroll: inneholder fytohemagglutinin (PHA) til bruk som cellefunksjonalitetskontroll, bovint serumalbumin og antimikrobielle stoffer.
5. 1 glassrør (50 µl) 200x konsentrert konjugatreakens: monoklonalt museantistoff for cytokin IFN-g konjugert for alkalisk fosfatase.
6. 1 flaske (25 ml) substratløsning: bruksklar BCIP/NBT^{plus}-løsning.
7. Bruksanvisning, som er å finne på den vedlagte CD sammen med HMS-databladet, Teknisk håndbok, Visuell veiledning, T-SPOT cellefortynnings-kalkulator, konjugatfortynnings-kalkulator, kalkulator for sentrifugehastigheter og T-SPOT.AutoReporter programmet.

Oppbevaring

Oppbevar alle komponentene i settet ved 2–8 °C.
Unngå langvarig lyseksponering av substratløsningen.

Stabilitet

Komponentene i settet er stabile frem til utløpsdatoen som er trykt på esken når de oppbevares og håndteres som anbefalt.

Nødvendig utstyr og materiell, som ikke er inkludert

1. Mikrobiologiskap (anbefalt).
2. Blodprøverør, f.eks. Vacutainer[®] CPT[™] (tilgjengelig fra Oxford Immunotec) eller hepariniserte rør.
3. FICOLL-PAQUE* PLUS eller alternative PBMC-separasjonsmaterialer.
4. T-Cell Xtend-reagenset (tilgjengelig fra Oxford Immunotec) kan benyttes med prøver som er tatt mer enn 8 timer tidligere.
5. Leucosep-rør kan brukes for å forenkle separasjonen av PBMC'er ved bruk av FICOLL*-metoden.
6. Sentrifuge for preparering av PBMC-er (med kapasitet på minst 1800xg og som kan holde prøvene ved romtemperatur (18–25 °C)).
7. Utstyr og reagenser som muliggjør telling av PBMC-er, enten manuelt ved bruk av trypanblått og et hemocytometer på et mikroskop eller automatisk bruk av egnet hematologianalysator.
8. En fuktet inkubator med kapasitet på 37 ± 1 °C med 5 % CO₂-tilførsel.
9. En mikrotiterplatevasker eller utstyr for manuell vask av platene.
10. Pipetter og sterile pipettespisser.
11. Steril PBS-løsning: f.eks. GIBCO[®] 1x D-PBS (Invitrogen, katalognummer 14040-091).
12. Destillert eller avionisert vann.
13. Avlesningsmetode, som mikroskop, digitalt mikroskop, lupe eller plate bildeanalysator.

14. Sterilt cellekulturmedium, som GIBCO AIM V® (Invitrogen, katalognummer 31035-025): bruk av dette serumfrie mediet til inkubering anbefales sterkt. RPMI 1640 (Invitrogen, katalognummer 21875-034) kan kun brukes ved første prøveprepareringstrinn. Vi anbefaler at cellekulturmediet oppbevares i egnede alikvoter, og overflødig materiale kastes etter bruk. Cellekulturmediet bør forhåndsoppvarmes til 37 °C før bruk med T-SPOT.TB-testen.

Klargjøring av reagens

1. Mikrotiterplate. T-SPOT.TB 96 mikrotiterplate leveres klar til bruk. Fjern fra oppbevaring og la den oppnå romtemperatur. Fjern ytre folieemballasje, og kast posen med tørkemiddel.
2. Rørglassene med *M. tuberculosis* ESAT-6-antigen (Panel A) leveres klare til bruk.
3. Rørglassene med *M. tuberculosis* CFP10-antigen (Panel B) leveres klare til bruk.
4. Rørglassene med positiv kontroll leveres klare til bruk.
5. Klargjør en fortykning på 1:200 med konjugatreagensløsning. Beregn volumet med konjugatreagensløsning som er nødvendig (se T-SPOT konjugatfortynnings-kalkulator på CD'en som følger med hvert testsett), og tilbered umiddelbart før bruk.
6. Substratløsningen leveres klar til bruk. Finn fram oppbevaring og la den oppnå romtemperatur.

Prosedyre

Analysen utføres ved å følge prinsippene for god laboratoriepraksis og ved å overholde bruksanvisningen nøye.

Oxford Immunotec Ltd har utarbeidet en visuell prosedyreveiledning og en teknisk håndbok som beskriver prøvetaking og prøvetilberedning, valg av cellekulturmedier og metoder for å telle punkter. Disse er tilgjengelige på CD'en som følger med hvert testsett, ved å ringe +44 (0) 1235 442780 eller de kan lastes ned fra www.oxfordimmunotec.com.

Prøvetaking og -klargjøring

Hver enkelt bruker bør validere sine prosedyrer for prøvetaking av PBMC-er, telling av PBMC-er og valg av egnede medier for å støtte T-cellefunksjonalitet under det primære inkubasjonstrinnet av analysen. For en immunkompetent pasient kan en vanligvis hente tilstrekkelig PBMC til å kunne kjøre analysen fra venøse blodprøver ved å følge disse retningslinjene:

- Voksne og barn over 10 år gamle: ett rør på 8 ml eller to CPT-rør på 4 ml eller ett 6 ml litiumheparin-rør
- Barn 2–9 år: ett CPT- eller litiumheparin-rør på 4 ml
- Barn opptil 2 år: ett pediatrik rør på 2 ml

Blodprøvene oppbevares ved romtemperatur og analyseres innen 8 timer etter blodprøvetakingen eller innen 32 timer og oppbevart ved 10–25 °C dersom prøvene er behandlet med T-Cell *Xtend*-reagenset.

Cellekulturmediet bør forhåndsoppvarmes til 37 °C før bruk med T-SPOT.TB-testen.

Prosedyre	Merknader
1. Ta blodprøven i samsvar med instruksjonene som følger prøvetakingsutstyret. Oppbevar blodprøven i romtemperatur (18–25 °C) eller ved 10–25 °C dersom T-Cell <i>Xtend</i> -reagenset blir brukt. Må ikke oppbevares i kjøleskap eller fryses.	1. Blodprøvene kan tas i en rekke forskjellige rør. På våre laboratorier har vi med hell brukt Vacutainer natriumcitrat-CPT, natriumheparin-CPT og standard litiumheparinrør. Kun litiumheparin-rør kan brukes med T-Cell <i>Xtend</i> -reagenset. EDTA-rør anbefales ikke.

<p>2. Ved bruk av CPT-blodprøverør følges produsentens instruksjoner for separasjon av PBMC-er.</p> <p>Ved bruk av alternative blodprøvetakingsmetoder separer PBMC-ene ved sentrifugering på FICOLL-PAQUE PLUS ved bruk av angitte fremgangsmåter.</p>	<p>2. Sentrifuger 8 ml CPT-rør ved 1600xg i 28 min eller 4 ml CPT-rør ved 1800xg i 30 min. ved 18 °C dersom en sentrifuge med kjøling er tilgjengelig. Sørg for å få temperaturen opp til 18 °C dersom sentrifugen tidligere er brukt ved lavere temperatur. Dersom det brukes en sentrifuge uten kjøling, må en forsikre seg om at temperaturen ikke kommer over 25 °C.</p> <p>Alternativt, fortynn blodet med et tilsvarende volum RPMI 1640-medium. Legg forsiktig det fortynnede blodet lagvis (2–3 volumer) på FICOLL-PAQUE PLUS (1 volum) og sentrifuger ved 1000xg i 22 min. mens temperaturen holdes mellom 18 og 25 °C.</p> <p>Kalkulator for sentrifugehastigheter på CD'en som følger med testsettet kan hjelpe til med å regne om hastigheter i xg til omdreininger per minutt (rpm).</p> <p>Dersom prøvene er mellom 8 og 32 timer gamle bør de blandes med T-Cell <i>Xtend</i>-reagenset før det legges lagvis på FICOLL-PAQUE PLUS.</p> <p>Dersom det brukes Leucosep-rør eller T-Cell <i>Xtend</i>-reagenset (tilgjengelig fra Oxford Immunotec), skal veiledningene som er vedlagt disse reagensene følges.</p>
<p>3. Samle opp det hvite, uklare båndet med PBMC-er ved hjelp av en pipette, og overfør til et konisk sentrifugeringsrør på 15 ml. Fyll opp volumet til 10 ml med cellekulturmedium.</p>	<p>3. En rekke medier kan brukes til å vaske cellene under denne prosessen. Våre laboratorier har brukt både AIM V og RPMI 1640 med hell og kan anbefale disse.</p>
<p>4. Sentrifuger ved 600xg i 7 min. Hell av supernatant, og resuspender pelleten i 1 ml medium.</p>	<p>4. Se 3. ovenfor.</p>
<p>5. Fyll opp volumet til 10 ml med ferskt medium, og sentrifuger ved 350xg i 7 min.</p>	<p>5. Se 3. ovenfor.</p>
<p>6. Hell av supernatant og resuspender pelleten i 0,7 ml AIM V kulturmedium.</p>	<p>6. På dette stadiet bør kulturmediet brukes til inkubering over natten for å resuspendere pelleten. Våre laboratorier har brukt det serumfrie mediet AIM V med hell, og anbefaler dette sterkt.</p>

Celletelling og fortynning

T-SPOT. *TB* -testen krever $2,5 \times 10^5$ levedyktige PBMC-er per brønn. Fire brønner er nødvendig for hver pasientprøve. Riktig antall celler må tilsettes hver brønn. Hvis dette ikke gjøres, kan resultatene feiltolkes.

Prosedyre	Merknader
<p>1. Utfør telling av levedyktige celler.</p>	<p>1. Cellene kan telles ved hjelp av en rekke metoder, inkludert manuell telling ved bruk av trypanblått og et hemocytometer eller automatisert telling ved bruk av et egnet instrument.</p>

2. For en rask telling med et Neubauer hemocytometer tilsettes 10 µl av den endelige cellesuspensjonen til 40 µl 0,4 % (w/v) trypanblå løsning. Plasser en egnet alikvot på hemocytometeret, og tell cellene i rutenettet. Følg produsentens instruksjoner ved bruk av andre typer hemocytometere eller automatisk utstyr.	2. Pass på at cellesuspensjonen blir grundig blandet umiddelbart før alikvotene fjernes for fortynning eller telling. Cellene kan utfelles nederst i røret og føre til at celleantallet feiltolkes.
3. Beregn konsentrasjonen av levedyktige celler som er til stede i grunncellesuspensjonen.	3. Pass på at beregningen er riktig for celletellingssystemet som brukes, siden bruk av enten for få eller for mange celler kan føre til at resultatene tolkes feil. T-SPOT cellefortynningskalkulatoren på CD'en som følger med hvert analysesett vil lette denne beregningen.
4. Tilbered 500 µl av den endelige cellesuspensjonen ved en konsentrasjon på $2,5 \times 10^5$ celler/100 µl.	4. Pass på at cellene telles grundig før du fjerner en alikvot til fortynning.

Plateoppsett og inkubasjon

Ved bruk av T-SPOT. TB-testen benyttes fire brønner for hver pasientprøve. En nullkontroll og positiv cellefunksjonalitetskontroll bør kjøres for hver individuelle prøve. Det anbefales at prøvene organiseres vertikalt på platen, som illustrert nedenfor.

- Nullkontroll
- Panel A
- Panel B
- Positiv kontroll

Prosedyre	Merknader
1. Fjern den forhåndsbelagte mikrotiterplaten fra emballasjen, og la den nå romtemperatur.	1. Mikrotiterplaten har en beskyttende plastbunn. Denne må ikke fjernes på noe tidspunkt.
2. Til hver pasientprøve brukes 4 individuelle brønner. (i) Tilsett 50 µl AIM V kulturmedium til hver nullkontrollbrønn. (ii) Tilsett 50 µl panel A-løsning i hver brønn som skal brukes. (ii) Tilsett 50 µl panel B-løsning i hver brønn som skal brukes. (iv) Tilsett 50 µl positiv kontrolløsning i hver brønn for cellefunksjonalitetskontroll.	2. Ikke la pipetten berøre membranen. Fordypningene som pipettespisser kan gi membranen, kan produsere artefakter i brønnene. Det kan være nødvendig å banke forsiktig på platen for å sikre at løsningene dekker membranen i bunnen av hver brønn. Kraftig risting må unngås, ellers kan det oppstå krysskontaminering av antigenene mellom brønnene.
3. Tilsett 100 µl (med 250 000 levedyktige celler) av pasientens endelige cellesuspensjon i hver av de 4 brønnene som skal brukes til pasientprøven.	3. Pipetter cellesuspensjonen forsiktig opp og ned for å sikre grundig blanding før hver alikvot på 100 µl fjernes. Vi anbefaler bruk av ny spiss hver gang pasientceller tilsettes, slik at krysskontaminering mellom de 4 brønnene unngås.

4. Inkuber platen i en fuktet inkubator ved 37 °C med 5 % CO ₂ i 16–20 timer.	4. Ikke berør platen når den er i inkubatoren. Ikke stable plater oppå hverandre. Det kan føre til ujevn temperaturfordeling og ventilasjon. Hvis ikke anbefalt inkubasjonstid og betingelser overholdes, kan resultatene feiltolkes. Kontroller at inkubatoren har nok vann til å opprettholde fuktigheten i hele inkubasjonstiden.
--	--

Punktutvikling og telling

Når platen vaskes og fremkalles, må en ikke berøre membranen med pipettespissene eller de automatiske brønnvaskerspissene. Fordypninger i membranen som er forårsaket av pipette- eller brønnvaskerspisser kan produseres som artefakter i brønnene, og kan interferere med punkttelling.

Prosedyre	Merknader
1. Fjern platen fra inkubatoren, og kast cellekulturmediet.	1. Fjern substratløsningen og la den nå romtemperatur.
2. Tilsett 200 µl PBS-løsning i hver brønn.	
3. Kast PBS-løsningen. Gjenta brønnvaskingen 3 ganger med ny PBS-løsning for hver vask.	3. Kast all PBS fra siste vasketrinn ved å forsiktig snu platen på absorberende papir før du går videre.
4. Fortynn konsentrert konjugatreagens 200 ganger i PBS for å lage en løsning med bruksstyrke.	4. Ikke bruk PBS som inneholder Tween [®] eller andre rensedmidler, da dette forårsaker høye bakgrunnstillinger. Påse at kun et lite overskudd (for å tillate spill) av løsningen med bruksstyrke tilberedes. Til 96 brønner som hver krever 50 µl, tilberedes 5 ml løsning med bruksstyrke ved å tilsette 25 µl konsentrert konjugatreagens til 4975 µl PBS.
5. Tilsett 50 µl konjugatreagensløsning i bruksstyrke i hver brønn og inkuber ved 2–8 °C i 1 time.	5. Hvis ikke anbefalt inkubasjonstid overholdes, kan resultatene feiltolkes.
6. Kast konjugatet og utfør fire PBS-vaskinger, som forklart i trinn 2 og 3 ovenfor.	
7. Tilsett 50 µl substratløsning i hver brønn, og inkuber ved romtemperatur i 7 min.	7. Hvis ikke anbefalt inkubasjonstid overholdes, kan resultatene feiltolkes.
8. Vask platen grundig med destillert eller avionisert vann for å stanse påvisningsreaksjonen.	
9. Tørk platen ved å sette den i et godt ventilert område eller en ovn ved opptil 37 °C.	9. Punkter blir mer synlige etter som platen tørker. La det tørke i 4 timer ved 37 °C eller over natten i romtemperatur.
10. Tell og registrer antallet tydelige, mørkeblå punkter på membranen til hver brønn. Bruk kriteriene for tolking av resultater og analyse (se nedenfor) for å bestemme om en pasientprøve er "positiv" eller "negativ" for TB-antigen.	10. Punktene kan visualiseres ved hjelp av en rekke metoder, inkludert manuell bruk av håndholdt forstørrelsesglass, ved bruk av et egnet mikroskop, et digitalt mikroskop eller ved bruk av en egen ELISPOT plate bildeanalysator. En opplæringsveiledning for punkttelling (T-SPOT. <i>Tutor</i> -programme) kan lastes ned fra Oxford Immunotec's hjemmeside.

Kvalitetskontroll

Et typisk resultat forventes å ha få eller ingen punkter i nullkontrollen og over 20 punkter i positiv kontroll.

En nullkontroll-punkttelling over 10 punkter bør anses som "ubestemmelig". Se den tekniske håndboken for T-SPOT. *TB* for mulige årsaker (last ned fra www.oxfordimmunotec.com). En ny prøve bør tas fra personen og testes.

Punkttellingen for den positive cellefunksjonalitetskontrollen skal være ≥ 20 eller vise metning (for mange punkter å telle). En liten andel av pasientene kan ha T-celler som viser kun begrenset respons på PHA^{13,14}. Der punkttellingen for den positive kontrollen er < 20 punkter, bør den anses som "ubestemmelig", med mindre enten panel A eller B er "positiv", som beskrevet under Tolkning av resultater og analysekriterier (se nedenfor). Da er resultatene ugyldige.

På grunn av potensielle biologiske og systematiske variasjoner, der høyeste av (panel A minus nullkontroll) og (panel B minus nullkontroll) er 5, 6 eller 7 punkter, kan resultatene betraktes å være i en "gråson" (usikre). "Gråson" (usikre)-resultater er, selv om de er gyldige, mindre pålitelige enn resultater der punkttallet er lengre fra gyldighetsgrensen. Ny testing av pasienten ved å bruke en ny prøve er derfor anbefalt. Dersom resultatet fremdeles er i "gråsonen" (usikker) etter ny testing bør en bruke andre diagnostiske tester og/eller epidemiologisk informasjon til hjelp for å bestemme TB-infeksjonstatus hos pasienten.

Mens ESAT-6- og CFP10-antigen er fraværende fra BCG-stammer av *M. bovis* og fra de fleste mikobakterier i omgivelsene, er det mulig at et "positiv" T-SPOT.TB-resultat kan skyldes infeksjon med *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* eller *M. goodii*. Alternative tester er nødvendig ved mistanke om disse infeksjonene.

Tolkning av resultater og analysekriterier

Se informasjonen under Kvalitetskontroll før bruk av følgende kriterier.

T-SPOT.TB-resultater blir tolket ved å trekke antall punkter i nullkontrollbrønnen fra antall punkter i hvert av panelene etter følgende regel:

- Testresultatet er "positiv" dersom (panel A minus nullkontroll) og/eller (panel B minus nullkontroll) ≥ 6 punkter.
- Testresultatet er "negativt" dersom både (panel A minus nullkontroll og (panel B minus nullkontroll) ≤ 5 punkter. Dette inkluderer verdier mindre enn null.

Et "positiv" resultat angir at prøven inneholder effektor-T-celler som er reaktive for *M. tuberculosis*.

Et "negativt" resultat angir at prøven trolig ikke inneholder effektor-T-celler som er reaktive for *M. tuberculosis*.

Ytelsesegenskapene til analysen

Spesifisitet ble vurdert ved å analysere 93 prøver fra donorer som på grunnlag av medisinsk bakgrunn og personlig informasjon ble ansett å ha lav risiko for infeksjon med *M. tuberculosis*. Spesifisiteten til T-SPOT.TB-testen ble beregnet som 100 % (93/93) (95 % konfidensgrenser 95,8 %–100 %).










Sensitivitet ble vurdert ved å analysere 87 prøver fra kulturbekreftede tilfeller av *M. tuberculosis*-infeksjon, inkludert immunkompromitterte grupper. Sensitiviteten til T-SPOT.TB-testen ble beregnet som 98,8 % (86/87) (95 % konfidensgrenser 90,8 %–99,9 %).

Reproduserbarhet ble vurdert, som en surrogatmarkør av intraanalysevariasjon, ved analyse av blodprøver i duplikat på samme plate. Til sammen 145 blodprøver fra 140 individuelle donorer ble analysert i duplikat (to brønner hver for panel A og B) ved bruk av T-SPOT.TB-testen. Ved 142/145 (97,9 %) duplikate analyser ble det observert klinisk samsvar. To duplikatanalyser gav uoverensstemmende grenselinjerresultater og bare 1/145 prøver gav avvikende resultater.

Referanseliste

1. Janeway and Travers (1996) *Immunobiology* 2. utg.
2. Staines *et al* (1999) *Introducing Immunology* 2. utg.
3. Chapman *et al* (2002) *AIDS*, **16** (17): 2285-2293.
4. Ewer *et al* (2003) *Lancet*, **361**: 1168-1173.
5. Se www.elispot-analyzers.de/english/science-elispot-assays.html
6. Pathan *et al* (2001) *J. Immunol.*, **167**: 5217-5225.
7. Lalvani *et al* (2001) *Lancet*, **357**: 2017-2021.
8. Lalvani *et al* (2001) *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **163**: 824-828.
9. Lalvani *et al* (2001) *J. Infect. Dis.*, **183**: 469-477.
10. Meier *et al* (2005) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **24**: 529-536.
11. Zellweger *et al* (2005) *Int. J. Tuberculosis and Lung Dis.*, **9**(11): 1242-1247.
12. NCCLS Approved Guideline. *Performance of single Cell Immune Response Assays, I/LA26-A*
13. Koller *et al* (2003) *Clin. Exp. Immunol.*, **132**(2): 225-231.
14. Apollonj *et al* (1975) *Immunol. Commum.*, **4**(5): 453-463.

Oversikt over symboler

	Brukes innen/utløpsdato (år-måned-dag)
	Batchkode
	Katalognummer
	Advarsel, se bruksanvisningen
	Produsent
	Tilstrekkelig til "n" tester
	Utstyr til <i>In vitro</i> -diagnostikk
	Temperaturbegrensning/lagres mellom
	Se bruksanvisningen

T-SPOT, T-Cell *Xtend* og Oxford Immunotec-logoen er varemerker for Oxford Immunotec Limited.
AIM V og GIBCO er varemerker for Invitrogen.
CPT og Vacutainer er varemerker for Becton Dickinson.
* FICOLL og FICOLL-PAQUE er varemerker for GE-bedrifter.
Tween er et varemerke for Uniqema Americas LLC.

T-SPOT. *TB*-testen er beskyttet av følgende patenter og patentsøknader:

US 09/308,725, EP 941478, JP 1998-524410, AU 728357, CA 2272881, EP 1152012, AU 765013, US 7115361, US 09/830,839, EP 99952697.3, JP 2000-579635, ZA 2001-3356, US 7135280, EP 02726998.4, JP 2002-554719, AU 2002-219338, CA 2483236, CZ 2003/001866, IN 0105/DELNP/2003, NZ 526807, US 6290969, US 6338852, US 6350456, US 6458366, US 6962710, EP 850305, EP 851927, EP 1203817, JP 2001-517069, AU 727602, AU 756833, AU 753995, BR 9610262, BR 9610268, CA 2230885, CA 2230927, CN 1200146, CN 1200147, CZ 9800628, HU 9900902, IL 123506, NO 9800883, PL 325373, TR 9800411, ZA 9607394, ZA 9607395, US 5955077, EP 706571, JP 2001-515359, AU 682879, CA 2165949, NZ 267984, US 1999/132505, EP 928851, JP 2000-615041, AU 773268, CA 2372583

T-Cell *Xtend*- reagenset er beskyttet av følgende patenter og patentsøknader:
WO 2008/041004

T-SPOT. *TB*-testen benytter patentert teknologi under lisens fra Statens Serum Institut, København, Danmark og Isis Innovation Limited, Oxford, Storbritannia.

T-SPOT. *TB*-testen selges på lisens fra Public Health Research Institute og kan brukes i henhold til PHRI-patentrettigheter til human *in vitro*-diagnostikk.

© Oxford Immunotec Limited, 2009. Forbeholdt alle rettigheter.

Produsent
Oxford Immunotec Ltd
94C Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4RY, Storbritannia
www.oxfordimmunotec.com



Oxford Immunotec Limited, 94C Milton Park,
Abingdon, Oxon OX14 4RY, UK
Tel: +44 (0)1235 442780 Fax: +44 (0)1235 442781
E-mail: info@oxfordimmunotec.com

www.oxfordimmunotec.com

