



T-SPOT[®].TB



Oxford
Immunotec



En hjælp til diagnosticering af tuberkuloseinfektion

INDLÆGSSEDDEL

Til *In Vitro* diagnostisk anvendelse

Denne indlægsseddel dækker brugen af:

T-SPOT.TB 8 (Pladeformat med strips af 8 brønde, genanvendelig.
Katalognummer: TB.300)

Indholdsfortegnelse	
Tilsligtet anvendelse	2
Introduktion	2
Procedurens principper	2
Begrænsninger	3
Sikkerhedsadvarsler og forholdsregler	4
Medleverede materialer	4
Opbevaring	4
Stabilitet	4
Nødvendigt udstyr og nødvendige materialer der ikke medfølger	4
Klargøring af reagenser	5
Procedure	5
Prøveindsamling og -klargøring	6
Celleoptælling og fortynding	7
Klargøring af plade samt inkubation	8
Frømkaldelse og tælling af pletter	9
Kvalitetskontrol	10
Fortolkning af resultaterne samt testkriterier	10
Testens ydelseskaraktetika	11
Referencer	11
Symbolforklaring	11

Beregnet anvendelse

T-SPOT®.TB-testen er en *in vitro* diagnostisk test til påvisning af effektor T-celler, der reagerer på stimulering af *Mycobacterium tuberculosis*-antigener. Testen er beregnet anvendt som en hjælp i diagnosticeringen af tuberkuloseinfektion (TB-infektion). T-SPOT.TB-testen er en forenklet ELISPOT-metode (enzyme-linked immunospot), der optæller individuelle, TB-specifikke, aktiverede effektor T-celler.

Introduktion

Verdenssundhedsorganisationen (WHO) skønner, at en tredjedel af verdens befolkning er inficeret med *M. tuberculosis*. Hver person, der bærer en latent TB-infektion (LTBI), har cirka 10 % chance for progression til aktiv sygdom. Denne progressionsrate er forhøjet i visse grupper, blandt andet dem, der for nylig er blevet inficeret, og grupper med svækket immunsystem.

Immunresponsen til infektion med *M. tuberculosis* er fortrinsvis en cellemedieret immunrespons (Cell Mediated Immune - CMI). Som del af denne respons er T-cellerne sensibiliserede til *M. tuberculosis*-antigener. Aktiverede effektor T-celler, både CD4 og CD8, specifikt separeret fra blodet, kan optælles ved deres evne til at blive stimuleret *in vitro* af disse antigener^{1,2}. Brugen af udvalgte antigener til *M. tuberculosis*-komplekset (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) forbedrer testspecificiteten for disse organismer ved at reducere krydsreaktiviteten over for BCG-vaccine og over for de fleste mykobakterier^{3,4} i miljøet. Der anvendes to separate paneler af antigener, der simulerer de velbeskrevne proteiner ESAT-6 og CFP10, for at optimere testens følsomhed.

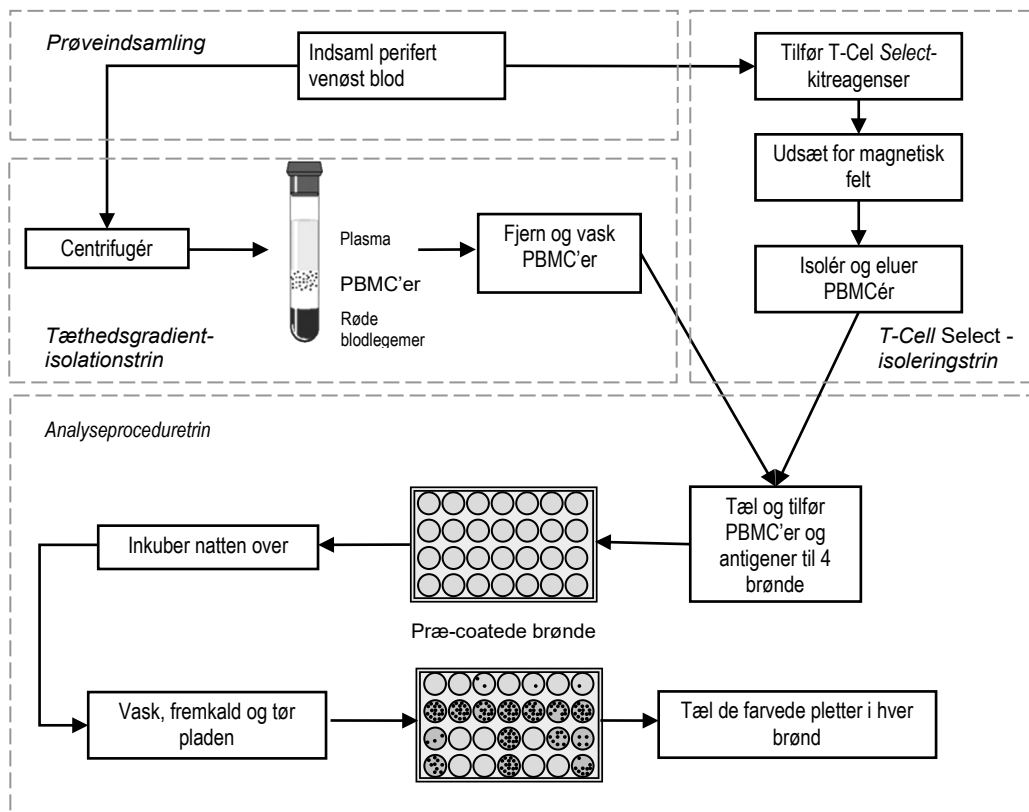
T-SPOT.TB-testen er en forenklet variant af testteknikken ELISPOT. ELISPOT-test er særlig følsomme, fordi det relevante cytokin indfanges direkte rundt om den secernerende celle, inden det fortyndes i supernatant, indfanges af receptorer fra nærliggende celler eller degraderes. Dette gør ELISPOT-test meget mere følsomme end konventionelle ELISA-test⁵. T-SPOT.TB-testen er udviklet til påvisning af effektor T-celler, der reagerer på stimulering fra antigener specifikt for *M. tuberculosis*^{3,4,6-9}. Testen optæller individuelt aktiverede TB-specifikke T-celler. Den er egnet til brug hos alle patienter, der har risiko for at få LTBI, eller hos hvem der er mistanke om tuberkulosesygdom^{10,11}, uanset alder, køn, etnicitet, behandling eller immunstatus.

Procedurens principper

Perifere mononukleære blodceller (Peripheral blood mononuclear cells - PBMCs) udskilles fra fuldblodsprøven og vaskes for at fjerne eventuelle kilder til forstyrrende baggrundssignaler. PBMC'erne tælles derefter, således at der bruges et standardiseret antal celler til testen. Herved sikres det, at selv patienter med lave T-celle-titre på grund af svækket immunsystem (immunkompromitterede og immunsupprimerede) får et tilstrækkeligt antal celler tilført mikrotiterbrøndene. Vaske- og optællingsprocedurerne samt ELISPOT-teknikken giver fremragende ydeevne i påvisningen af TB-sygdom og latent TB-infektion.

Der skal anvendes fire brønde (se figur 1) til hver prøve:

1. En nul-kontrol til identificering af ikke-specifik celleaktivering.
2. TB-specifikke antigener, Panel A (ESAT-6).
3. TB-specifikke antigener, Panel B (CFP10).
4. En positiv kontrol indeholdende phytohaemagglutinin (PHA, en kendt polyklonal aktivator¹²) for at kontrollere PBMC-funktionalitet.



Figur 1: De vigtigste trin i T-SPOT.TB-testen. Bemærk, at hver plade indeholder 96 brønde.

PBMC'erne inkuberes med antigenerne for at muliggøre stimulering af tilstedeværende sensibiliserede T-celler. Secerneret cytokin indfanges af specifikke antistoffer på den membran, der danner brøndens bund, og cellerne og andre uønskede materialer fjernes ved vask. Et andet antistof, der er konjugeret til alkalisk fosfatase og rettet mod en anden epitop af cytokin-molekylet, tilføjes og binder sig til det cytokin, der er indfanget på membranens overflade. Eventuelt ubundet konjugat fjernes ved vask. Der tilføres et opløseligt substrat til hver brønd, og dette spaltes af bundet enzym og danner en plet af uopløseligt præcipitat på reaktionsstedet. Hver plet repræsenterer aftrykket af en individuel cytokin-secernerende T-celle, og optælling af antallet af pletter giver et mål for mængden af *M. tuberculosis*-sensitive effektor T-celler i det perifere blod.

Begrænsninger

- Kun til *in vitro* diagnostisk anvendelse.
- Sammenbland ikke komponenter fra sæt fra forskellige lot.
- Læs testens instruktioner omhyggeligt inden brug.
- Brug aseptisk teknik for at undgå at kontaminere reagenserne, testbrøndene, cellesuspensionerne og cellekulturmedierne.
- Afvigelse fra de angivne pipetterings- og vasketeknikker, inkubationstider og/eller temperaturer kan påvirke de opnåede resultater og bør undgås.
- Blodet skal indsamles og testes inden for otte timer. Denne tidsbegrænsning kan overvindes ved at bruge T-Cell Select™-reagentkittet eller T-Cell Xtend®-reagentset (tilgængelig hos Oxford Immunotec). Når T-Cell Select-reagentkittet bruges med T-SPOT.TB-testen, øges opbevaringstiden for prøver til 54 timer, og celleisolationsprocessen kan automatiseres. Når T-Cell Xtend-reagentset eller en anden granulocytdepleteringsmetode bruges sammen med T-SPOT.TB-testen, øges prøveopbevaringstiden til 32 timer.
- Opbevar og transporter blodprøverne til laboratoriet ved stuetemperatur (18-25 °C), herunder blodprøver til brug med T-Cell Select-reagentkittet. Ved brug af T-Cell Xtend-reagentset, kan prøverne transporteres og opbevares ved 10-25 °C. Fuldblodsprøver må ikke nedkøles eller nedfryses.

- T-SPOT.TB-testen bør kun anvendes og fortolkes inden for det overordnede kliniske billedes kontekst.
- Et negativt testresultat udelukker ikke muligheden for eksponering for eller infektion med *M. tuberculosis*.
- ESAT-6 og CFP10 antigener er ikke til stede i BCG-stammer og i de fleste mykobakterier i miljøet med undtagelse af *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} og *M. goodii*.

Sikkerhedsadvarsler og forholdsregler

Der skal udvises forsigtighed, når der håndteres materiale af human oprindelse. Alle blodprøver skal betragtes som potentielt infektiøse.

Håndtering af blodprøver og testkomponenter samt brug, opbevaring og bortskaffelse af disse bør være i overensstemmelse med de procedurer, der er beskrevet i de relevante, nationale retningslinjer eller regulativer vedrørende biologisk farligt materiale.

Der skal udvises forsigtighed, når der arbejdes med kemikalier. Alle kemikalier bør betragtes som potentielt farlige.

Medleverede materialer

T-SPOT.TB 8-sættet indeholder:

1. 1 mikrotiterplade (CW.300): 96 brønde, leveret som strips af 12 x 8 brønde i en ramme, belagt med et monoklonalt museantistof til cytokin interferon gamma (IFN- γ).
2. 2 hætteglas (PA.300 af 0,8 mL) Panel A: indeholder ESAT-6-antigener, bovint serumalbumin og antimikrobielle stoffer.
3. 2 hætteglas (PB.300 af 0,8 mL) Panel B: indeholder CFP10-antigener, bovint serumalbumin og antimikrobielle stoffer.
4. 2 hætteglas (CP.300 af 0,8 mL) positiv kontrol: indeholder phytohaemagglutinin (PHA), til brug som en cellefunktionalitetskontrol, bovint serumalbumin og antimikrobielle stoffer.
5. 1 hætteglas (CR.300 af 50 μ L) 200 x koncentreret konjugatreagens: monoklonalt museantistof til cytokin IFN- γ konjugeret til alkalisk fosfatase.
6. 1 flaske (SR.300 af 25 mL) substratopløsning: brugsklar BCIP/NBT^{plus}-opløsning.
7. Brugsvejledning, som findes på cd'en sammen med MSDS, oplæringsvejledning, T-SPOT-cellefortyndingsberegner, konjugatfortyndingsberegner, centrifugehastighedsberegner og T-SPOT.AutoReporter-programmet.

Opbevaring

Opbevar alle sættets komponenter ved 2-8 °C.

Undgå, at substratopløsningen bliver udsat for lys i længere tid.

Stabilitet

Sammenbland ikke komponenter fra sæt fra forskellige lot. Opbevar de uåbnede sæt ved 2-8 °C. Sættets komponenter er stabile indtil den udløbsdato, der er angivet på sættets æske, når det opbevares og håndteres under de anbefalede forhold. Sættet må ikke anvendes efter den udløbsdato, der er angivet på sættets etikette.

Opbevar komponenter fra åbnede sæt ved 2-8 °C. Komponenterne skal anvendes inden for 8 uger efter åbning.

Nødvendigt udstyr og nødvendige materialer der ikke medfølger

1. Plade med strips a 8 brønde i en ramme (fås hos Oxford Immunotec) til brug sammen med et T-SPOT.TB 8-sæt.
2. Klasse II mikrobiologisk sikkerhedskabinet (anbefalet).
3. Blodopsamlingsrør, såsom Vacutainer® CPT™ (fås hos Oxford Immunotec), hepariniserede rør eller citratindeholdende rør.
4. Ficoll®-Paque* Plus eller alternative PBMC-separationsmaterialer.

5. T-Cell *Xtend*-reagenset (fås hos Oxford Immunotec) kan bruges til prøver, der er indsamlet op til 32 timer efter venepunktur. T-Cell *Select*-reagenskittet (fås hos Oxford Immunotec) kan bruges med prøver, der er indsamlet op til 54 timer efter venepunktur. Der kan anvendes andre granulocytdepleteringsmetoder til prøver, der opbevares op til 32 timer. Kunden skal validere andre metoder i eget laboratorium.
6. Leucosep-rør kan bruges til at forenkle separationen af PBMC'er med anvendelse af Ficoll*-metoden.
7. Centrifuge til klargøring af PBMC'er (i stand til mindst 1800 x g og i stand til at opbevare prøverne ved stuetemperatur (18-25 °C).
8. Der kan anvendes en centrifuge til cellevask under forberedelse og vask af separerede PBMC'er, f.eks. DiaDent-CW centrifuge (Bio-Rad). Kunden skal validere brug af sådant udstyr i eget laboratorium.
9. Udstyr og reagenser til optælling af PBMC'er; enten manuelt ved brug af Trypan Blue og et hæmocytmeter på et mikroskop eller automatisk ved brug af en egnet hæmatologianalysator.
10. En inkubator med justerbar fugt, for inkubation ved 37 ± 1 °C med en 5 % CO₂-tilførsel.
11. En mikrotiterpladevasker eller udstyr til manuel vask af plader.
12. Pipetter og sterile pipettespidser.
13. Steril D-PBS-opløsning (fosfatbufferjusteret saltvandsopløsning): såsom GIBCO® 1x D-PBS (Invitrogen; katalognummer 14040-091).
14. Destilleret eller deioniseret vand.
15. Udstyr til at læse pladen med som for eksempel et mikroskop, et digitalt mikroskop, et forstørrelsesglas eller en pladelæser.
16. Sterilt cellekulturmedium som for eksempel GIBCO AIM-V® (Invitrogen; katalognummer 31035-025): Det anbefales på det kraftigste at anvende dette serumfri medium til inkubationstrinnene. RPMI 1640 (Invitrogen; katalognummer 21875-034) må kun anvendes til de indledende trin i prøveklargøringen. Det anbefales at opbevare cellekulturmediet i passende alikvotter, og resterende materiale bortskaffes efter brug. Cellekulturmediet bør forvarmes til 37 °C inden brug sammen med T-SPOT.TB-testen.

Klargøring af reagenser

1. Mikrotiterplade. T-SPOT.TB 8 mikrotiterpladen leveres klar til brug. Tag det ønskede antal strips af 8 brønde ud fra opbevaringsstedet, og lad dem komme op i stuetemperatur. Forsegl igen de resterende strips i den ydre folieemballage med posen med tørrende middel.
2. Hætteglassene med *M. tuberculosis* ESAT-6-antigener (Panel A) leveres klar til brug.
3. Hætteglassene med *M. tuberculosis* CFP10-antigener (Panel B) leveres klar til brug.
4. Hætteglassene med positiv kontrol leveres klar til brug.
5. Klargør en 1:200 fortyndet konjugatreagensopløsning i arbejdskoncentration. Beregn det nødvendige volumen konjugatreagensopløsning i arbejdskoncentration (se T-SPOT konjugatfortyndingsberegneren på cd'en, der leveres sammen med hvert testsæt). Reagenset kan klargøres umiddelbart inden brug, eller fremstilles til arbejdskoncentrationen (1:200) og opbevares i op til 6 uger ved 2-8 °C inden brug. Det fortyndede reagens må ikke anvendes efter denne opbevaringstid.
6. Substratopløsningen leveres klar til brug. Find den frem og lad den komme op i stuetemperatur.

Procedure

Denne test bør udføres i overensstemmelse med principperne for god laboratoriepraksis, og denne brugsvejledning skal følges nøje.

Oxford Immunotec Ltd har udfærdiget en oplæringsvejledning, der beskriver indsamling og klargøring af prøver, valg af cellekulturmedier samt metoder til optælling af pletter. Denne vejledning findes på cd'en, der leveres sammen med hvert testsæt, eller kan rekvireres ved telefonisk kontakt til +44 (0) 1235 442780, eller de kan downloades fra www.oxfordimmunotec.com.

Prøveindsamling og -klargøring

Individuelle brugere bør validere deres procedurer til indsamling af PBMC'er, separering og optælling af PBMC'er og valg af egnede medier til support af T-celle-funktionaliteten under testens primære inkubationstrin. Normalt kan der fra en immunkompetent patient fremskaffes tilstrækkelige PBMC'er til at foretage testen fra venøse blodprøver ifølge følgende retningslinjer:

- Voksne og børn i alderen 10 år og derover: ét 8 mL eller to 4 mL CPT-rør eller ét 6 mL heparin- eller citratrør
- Børn i alderen 2-9 år: ét 4 mL CPT-, heparin- eller citratrør
- Børn i alderen op til to år: ét 2 mL pædiatrisk rør

Blodprøverne skal opbevares ved stuetemperatur og testes inden for 8 timer eller inden for 32 timer og opbevares ved 10-25 °C, hvis T-Cell *Xtend*-reagenset bruges, eller inden for 54 timer med opbevaring ved 18-25 °C, hvis T-Cell *Select*-reagenskittet bruges.

Cellekulturmedierne bør forvarmes til 37 °C inden brugen sammen med T-SPOT.TB-testen.

Procedure	Bemærkninger
1. Indsamlet en blodprøve ifølge de anvisninger, der følger med indsamlingsanordningen. Indsamlet blod skal opbevares ved stuetemperatur (18-25 °C) eller ved 10-25 °C, hvis T-Cell <i>Xtend</i> -reagenset skal bruges. Må ikke nedkøles eller nedfryses.	1. Blodprøver kan indsamles i flere forskellige rør. I vore laboratorier anvender vi med godt resultat Vacutainer citrat CPT-rør, heparin CPT-rør og standard heparin- eller citratrør. CPT-rør er ikke egnede til brug med T-Cell <i>Xtend</i> -reagenset. Det frarådes at anvende EDTA-rør.
2. Hvis der anvendes CPT-rør til blodindsamlingen, følges fremstillers anvisninger vedrørende separation af PBMC'er. Hvis der anvendes vacutainer-rør med heparin eller citrat, skal PBMC'erne separeres ved centrifugering gennem Ficoll-Paque Plus ifølge de publicerede procedurer. Hvis der anvendes Leucosep-rør, T-Cell <i>Select</i> -reagenskittet eller T-Cell <i>Xtend</i> -reagens (fås hos Oxford Immunotec) anvendes, følges protokollerne til disse reagenser.	2. Centrifuger 8 mL CPT-rør ved 1600 x g i 28 minutter eller 4 mL CPT-rør ved 1800 x g i 30 minutter ved 18 °C, hvis en nedkølet centrifuge er til rådighed. Lad centrifugen komme op på 18 °C, hvis der tidligere er brugt lavere temperaturer. Hvis en ikke-nedkølet centrifuge anvendes, skal det sikres, at temperaturen ikke overstiger 25 °C. Alternativt fortyndes blodet med et lige så stort volumen RPMI 1640-medium. Læg omhyggeligt det fortyndede blod (2-3 volumener) oven på Ficoll-Paque Plus (1 volumen), og centrifuger ved 1000 x g i 22 minutter, mens temperaturen opretholdes mellem 18 °C og 25 °C. Ved brug af prøver 8 til 32 timer efter venepunktur skal T-Cell <i>Xtend</i> -reagenset bruges, inden prøven lægges på Ficoll-Paque-Plus. . I forbindelse med prøver, der opbevares op til 54 timer efter venepunktur, følges protokollen til T-Cell <i>Select</i> -reagenskittet. Centrifugehastighedsberegneren på cd'en, der følger med testsættet, kan bruges til omregning af hastigheder fra x g til rpm. Hvis der anvendes andre PBMC-separationsmetoder, skal disse valideres af kunden til brug med T-SPOT.TB-testen.

Procedure	Bemærkninger
3a. Indsamlet det hvide, uklare bånd af PBMC'er ved brug af en pipette, og overfør det til et 15 mL konisk centrifugerør. Tilføj cellekulturmedium, indtil totalvolumenet er 10 mL.	3a. Der kan anvendes flere forskellige medier til vask af celler i denne proces. I vore laboratorier har vi anvendt både AIM-V og RPMI 1640 med godt resultat, og disse anbefales.
3b. Alternativt kan der anvendes en centrifuge til cellevask, f.eks. DiaCent-CW (Bio-Rad) til at lette cellevask. Hvis dette system bruges, skal der anvendes DPBS til cellevask.	3b. Metoden til brug af cellevask-centrifugen under forberedelse af PBMC'er fås hos Oxford Immunotec. Kunden skal imidlertid validere metoden i eget laboratorium.
4. Centrifuger ved 600 x g i 7 minutter. Hæld supernatanten ud, og resuspender pelletet i 1 mL medium.	4. Se 3a. ovenfor.
5. Øg volumenet til 10 mL med frisk medium, og centrifuger ved 350 x g i 7 minutter.	5. Se 3a. ovenfor.
6. Hæld supernatanten ud, og resuspender pelletet i 0,7 mL AIM-V kulturmedium.	6. I dette trin bør det kulturmedium, der anvendes til inkubation natten over, anvendes til resuspendering af pelletet. I vore laboratorier har det serumfri medium AIM-V været anvendt med godt resultat, og dette anbefales på det kraftigste.

T-celler, der er indsamlet fra andre kropsvæsker såsom bronkoalveolær lavage (BAL), pleural effusion (PE) eller cerebrospinalvæske (CSF), har været vellykket anvendt med T-SPOT.TB-testen til identifikation af TB-infektion og -sygdom (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 og Patel *et al* (2010) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**(4) 569-77). Hvis der anvendes prøver, der ikke er blodbaserede, skal brugerne validere procedurer til indsamling af et tilstrækkeligt antal mononukleare celler. Metoder til forarbejdning af BAL-prøver er beskrevet i publikationerne nævnt ovenfor.

Obs. 1: Cut-off til et positivt resultat og gyldige kontroller til testen, ved brug af ikke-blodbaserede prøver, er ikke blevet udførligt undersøgt og kan afvige fra blodprøven. Brugerne bør definere deres kriterier for fortolkning af tests. Klinikerne bør bruge deres dømmekraft, når de gennemgår resultaterne.

Obs. 2: Tidsrummet fra indsamling af prøver til påbegyndelse af testen er ikke blevet udførligt undersøgt.

Celleoptælling og fortynding

T-SPOT.TB-testen kræver $2,5 \times 10^5$ levedygtige PBMC'er per brønd. Der skal bruges i alt fire brønde til hver patientprøve. Der skal tilføres det korrekte antal celler til hver brønd. Hvis dette ikke sker, kan det resultere i ukorrekt fortolkning af resultatet.

Procedure	Bemærkninger
1. Foretag optælling af levedygtige celler.	1. Celler kan optælles på forskellige måder, herunder manuelt ved brug af Trypan Blue og et hæmocytometer eller automatisk ved brug af et egnet optællingsapparat.
2. Til manuel optælling med et Neubauer hæmocytometer tilføres 10 µL af den endelige celleduspension til 40 µL 0,4 % (w/v) Trypan Blue-opløsning. Placer en passende alikvot på hæmocytometeret, og tæl cellerne i gitteret. For andre typer hæmocytometer og automatiske instrumenter følges fremstillerens anvisninger.	2. Der skal udvises omhyggelighed for at sikre, at celleduspensionen er grundigt blandet, umiddelbart inden der udtages alikvotter til fortynding eller tælling. Cellerne kan synke mod bunden af røret, hvilket vil føre til fejltolkning af det faktiske antal celler.

Procedure	Bemærkninger
3. Beregn koncentrationen af levedygtige celler i denne cellesuspension.	3. Vær sikker på, at beregningen foretages korrekt ifølge det celletællingssystem, der anvendes, da både for mange eller for få celler kan føre til fejltolkning af resultatet. T-SPOT cellefortyndingsberegneren på cd'en, der følger med hvert testsæt, gør denne beregning nemmere.
4. Klargør 500 µL af den endelige cellesuspension ved en koncentration på 2,5 x 10 ⁵ celler / 100 µL.	4. Sørg for, at cellerne er grundigt blandet, inden der udtages en alikvot til fortynding.

Klargøring af plade samt inkubation

Der skal til T-SPOT.TB-testen anvendes fire brønde til hver patientprøve. Der skal køres en nul-kontrol samt en positiv kontrol til test af cellefunktionalitet med hver patientprøve. Det anbefales, at prøverne arrangeres vertikalt på pladen som vist nedenfor.

- Nul-kontrol
- Panel A
- Panel B
- Positiv kontrol

Procedure	Bemærkninger
1. Tag de præ-coatede 8-brønds-strips ud af emballagen, fastgør dem på en pladeramme, og lad dem antage stuetemperatur.	1. Tag kun det ønskede antal strips ud af emballagen, og læg de resterende tilbage. Fastgør de strips, der skal bruges, på en tom ramme, der er udstyret med en bund og et låg. Rammer, bunde og låg bør gemmes og genbruges.
2. Til hver patientprøve skal der anvendes fire individuelle brønde; (i) Tilfør 50 µL AIM-V kulturmedium til hver nul-kontrol brønd. (ii) Tilfør 50 µL Panel A-opløsning til hver brønd, der skal anvendes. (iii) Tilfør 50 µL Panel B-opløsning til hver brønd, der skal anvendes. (iv) Tilfør 50 µL positiv kontrol-opløsning til hver brønd, der skal bruges til kontrol af cellefunktionalitet.	2. Sørg for, at pipettespidsen aldrig rører ved membranen. Fordybninger i membranen fra pipettespidsen kan forårsage artefakter i brøndene. Det kan være nødvendigt at banke let på pladen for at sikre, at opløsningerne dækker membranen i bunden af hver brønd. Man bør undgå voldsomme bevægelser, så der ikke sker krydskontamination af antigener mellem brøndene indbyrdes.
3. Til hver af de fire brønde, der skal anvendes til en patientprøve, tilføres 100 µL af patientens endelige cellesuspension (der indeholder 250.000 levedygtige celler).	3. Pipetter cellesuspensionen forsigtigt op og ned for at sikre grundig blanding, inden hver udtagning af 100 µL alikvot. Det anbefales at anvende en ny spids til hver tilførsel af patientens celler for at undgå krydskontamination mellem de fire brønde.
4. Inkuber pladen i en inkubator med justerbar fugt ved 37 °C med 5 % CO ₂ i 16-20 timer.	4. Undgå at forstyrre pladen, når den først er i inkubatoren. Pladerne må ikke lægges oven på hinanden, da dette kan medføre ujævn temperaturfordeling og ventilation. Manglende overholdelse af de anbefalede inkubationstider og -betingelser kan føre til fejltolkning af resultatet. Kontrollér, at inkubatoren indeholder tilstrækkeligt vand til at opretholde fugtigheden i inkubationsperioden.

Fremkaldelse og tælling af pletter

Lad ikke pipettespidser eller spidser fra automatiske brøndvaskere berøre membranen under pladevask og fremkaldelsestrinnene. Fordybninger i membranen fra pipette- eller brøndvaskerspidser kan udvikle sig som artefakter i brøndene, hvilket kunne gribe forstyrrende ind i plet-tællingen.

Procedure	Bemærkninger
1. Tag pladen ud af inkubatoren.	1. I tilfælde af uundgåelig forsinkelse af behandlingen, f.eks. problemer med ressourcer i weekenden, skal pladerne tages ud af inkubatoren og opbevares ved 2-8 °C. Pladerne må maksimalt opbevares i 72 timer og skal være tildækkede under opbevaring. Kunden skal validere processen i eget laboratorium.
2. Kassér celledyrkningsmediet og tilsæt 200 µL D-PBS-opløsning til hver brønd.	2. Tag på dette tidspunkt substratopløsningen ud af sættet og lad den nå stuetemperatur.
3. Kassér D-PBS-opløsningen. Gentag vask af brønden yderligere tre gange med frisk D-PBS-opløsning til hver vask.	3. Kassér al D-PBS-opløsning fra det afsluttende vasketrin ved at lægge pladen på hovedet på absorberende papir, inden der fortsættes.
4. Fortynd koncentreret konjugatreagens 200 gange i D-PBS-opløsning for at danne en opløsning i arbejdskoncentration.	4. Brug ikke en D-PBS-opløsning, der indeholder Tween® eller andre rensedmidler, da dette ville medføre høje baggrundstal. Sørg for, at der kun klargøres en lille mængde overskydende (så der tages højde for spild) opløsning i arbejdskoncentration. Til T-SPOT.TB 8 og til hver 8-brønds strip (hvortil der til hver skal bruges 50 µL), klargøres 500 µL opløsning i arbejdskoncentration ved at tilføje 2,5 µL koncentreret konjugatreagens til 497,5 µL D-PBS. Konjugatfortyndingsberegneren på cd'en, der leveres sammen med hvert testsæt, kan anvendes til denne beregning.
5. Tilføj 50 µL konjugatreagensopløsning i arbejdskoncentration til hver brønd, og inkuber ved 2-8 °C i én time.	5. Manglende overholdelse af de anbefalede inkubationstider kan føre til ukorrekt fortolkning af resultatet.
6. Kassér konjugatet, og udfør fire D-PBS-vaske som beskrevet i trin 2. og 3. ovenfor.	
7. Tilføj 50 µL substratopløsning til hver brønd, og inkuber ved stuetemperatur i 7 minutter.	7. Manglende overholdelse af de anbefalede inkubationstider kan føre til ukorrekt fortolkning af resultatet.
8. Vask pladen grundigt med destilleret eller deioniseret vand for at standse detekteringsreaktionen.	
9. Lad pladen tørre ved at stille den på et velventileret sted eller i en ovn ved op til 37 °C.	9. Pletterne bliver tydeligere, i takt med at pladen tørrer. Giv pladen 4 timers tørretid ved 37 °C, eller lad den stå natten over ved stuetemperatur.
10. Tæl og registrer antallet af distinkte, mørkeblå pletter på membranen i hver brønd. Anvend resultatsfortolkningerne og testkriterierne (se nedenfor) til at bestemme, hvorvidt en patientprøve er 'positiv' eller 'negativ' over for TB-antigener.	10. Pletterne kan visualiseres på forskellige måder, herunder manuelt ved brug af et håndholdt forstørrelsesglas, et egnet mikroskop, et digitalt mikroskop eller ved brug af et dedikeret ELISPOT-pladelæser. En vejledning til plet-tælling (programmet T-SPOT.Tutor) kan fås på Oxford Immunotecs webside.

Kvalitetskontrol

Et typisk resultat ville forventes at have få eller ingen pletter i nul-kontrollen og flere end 20 pletter i den positive kontrol.

Et antal pletter på over 10 pletter i nul-kontrollen bør betragtes som 'ubestemmeligt'. Se oplæringsvejledningen for T-SPOT.TB for mulige årsager (downloades fra www.oxfordimmunotec.com). Yderligere en prøve skal indsamles for personen og testes.

For den positive kontrol til test af cellefunktionalitet bør antallet af pletter typisk være ≥ 20 eller vise mætning (for mange pletter til at de kan tælles). En lille del af patienterne kan have T-celler, der kun viser en begrænset respons til PHA^{13,14}. Hvor antallet af pletter i den positive kontrol er < 20 pletter, bør det betragtes som 'ubestemmeligt', medmindre enten Panel A eller Panel B er 'positivt', som beskrevet i nedenstående afsnit "Fortolkning af resultaterne samt testkriterier", i hvilket tilfælde resultatet er gyldigt.

På grund af potentielle biologiske og systematiske variationer, hvor den højeste af (Panel A minus nul-kontrol) og (Panel B minus nul-kontrol) er 5, 6 eller 7 pletter, kan resultatet betragtes som en "gråzone" (tvetydig). Resultater i gråzonen (tvetydige) er godt nok gyldige, men dog mindre pålidelige end resultater, hvor plet-antallet er længere væk fra afskæringsværdien. Fornytest af patienten med anvendelse af en ny prøve anbefales derfor. Hvis resultatet stadig er i gråzonen (tvetydigt) efter den nye test, bør der bruges andre diagnostiske test og/eller epidemiologisk information til at fastlægge patientens TB-infektionsstatus.

Mens ESAT-6 og CFP10 antigener ikke findes i BCG-stammer af *M. bovis* eller i de fleste mykobakterier i miljøet, er det muligt, at et 'positivt' test-resultat fra T-SPOT.TB kan skyldes en infektion med *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* eller *M. goodii*. Hvis der er mistanke om disse infektioner, er alternative test nødvendige.

Fortolkning af resultaterne samt testkriterier

Se afsnittet "Kvalitetskontrol", inden følgende kriterier anvendes.

T-SPOT.TB-test-resultaterne fortolkes ved at trække plet-tallet i brønden med nul-kontrollen fra plet-tallet i hvert af panelerne i henhold til følgende algoritme:

- Testresultatet er 'positivt', hvis (Panel A minus nul-kontrol) og/eller (Panel B minus nul-kontrol) ≥ 6 pletter.
- Testresultatet er 'negativt', hvis både (Panel A minus nul-kontrol) og (Panel B minus nul-kontrol) ≤ 5 pletter. Dette omfatter også værdier under nul.

Et 'positivt' resultat indikerer, at prøven indeholder effektor T-celler, der er reaktive over for *M. tuberculosis*.

Et 'negativt' resultat indikerer, at prøven sandsynligvis ikke indeholder effektor T-celler, der er reaktive over for *M. tuberculosis*.

Testens ydelseskarakteristika

Specificiteten blev vurderet ved test af 93 prøver fra donorer, der efter vurdering af anamnese og personlige oplysninger blev vurderet som kun havende ringe risiko for infektion med *M. tuberculosis*. Specificiteten af T-SPOT.TB-testen blev beregnet til 100 % (93/93) (95 % konfidensgrænser 95,8 % - 100 %).











Sensitiviteten blev vurderet ved test af 87 prøver fra kulturbekræftede tilfælde af *M. tuberculosis*-infektion, herunder immunkompromitterede grupper. Sensitiviteten af T-SPOT.TB-testen blev beregnet til 98,8 % (86/87) (95 % konfidensgrænser 90,8 % - 99,9 %).

Reproducerbarheden blev som en surrogat-markør af intra-assay variation vurderet ved test af duplikater af blodprøver kørt på samme plade. I alt 145 blodprøver fra 140 individuelle donorer blev testet in duplo (to brønde for hvert Panel A og Panel B) ved brug af T-SPOT.TB-testen. I 142/145 (97,9 %) analyser in duplo blev der observeret klinisk overensstemmelse. To analyser in duplo gav grænseresultater, der ikke harmonerede, og kun 1/145 prøver gav modstridende resultater.

Referencer

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

Symbolforklaring

	Anvendes inden/udløbsdato (år-måned-dag)
	Lotnummer
	Katalognummer
	OBS: se brugsvejledningen
	Fremstiller
	Tilstrækkelig til "n" tests
	<i>In vitro</i> diagnostisk anordning
	Temperaturbegrænsninger/opbevares mellem
	Se brugsvejledningen
	Autoriseret repræsentant i EU

Kontaktoplysninger

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

For download af produktsupport og yderligere teknisk information henvises til vores website:
www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT, T-Cell *Xtend* og Oxford Immunotec-logoet er registrerede varemærker tilhørende Oxford Immunotec Limited.

T-Cell *Select* er et varemærke tilhørende Oxford Immunotec Limited.

AIM-V og GIBCO er varemærker tilhørende Life Technologies Corporation.

CPT og Vacutainer er varemærker tilhørende Becton, Dickinson and Company.

Ficoll og Ficoll-Paque er registrerede varemærker tilhørende Cytiva, et associeret selskab til Global Life Sciences Solutions USA LLC.

Tween er et registreret varemærke tilhørende Croda Americas LLC.

Brugen af T-Cell *Xtend*-reagens er beskyttet af følgende patenter og anmeldte patenter:
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Revisionsnummer: 5 Udstedelsesdato: November 2023
© 2023 Oxford Immunotec. Alle rettigheder forbeholdes.

Producent

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

 Autoriseret repræsentant i EU

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



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



www.oxfordimmunotec.com