

T-SPOT[®].TB



Tuberkuloosi-infektion diagnosoinnin apuväline

PAKKAUSSELOSTE

In Vitro -diagnostiseen käyttöön

Pakkausseloste kattaa seuraavien käytön:

T-SPOT.TB 8 (Monikäyttöinen 8-kuoppainen liuskalevymuoto. Luettelonumero: TB.300)

Sisällysluettelo

Käyttötarkoitus	3
Johdanto	3
Menettelyn periaatteet	3
Rajoitukset	4
Turvallisuusvaroitukset ja -varotoimenpiteet	5
Mukana toimitetut materiaalit.....	5
Varastointi.....	5
Vakaus	5
Tarvittavat laitteet ja materiaalit, jotka eivät sisälly pakkaukseen	6
Reagenssin valmistelu	6
Menettely	7
Näytteenotto ja valmistelu.....	7
Solujen laskenta ja laimennus	9
Levyn asetus ja inkubointi.....	9
Pisteiden kehitys ja lasku.....	11
Laadunvalvonta	12
Tulosten tulkinta ja testikriteerit	13
Testin suorituskykyominaisuudet.....	13
Viitteet.....	13
Symbolisanasto	15

Käyttötarkoitus

T-SPOT®.TB -testi on *in vitro* -diagnostinen testi sellaisten T-efektorisolujen tunnistamiseen, jotka vastaavat *Mycobacterium tuberculosis* -antigeenien stimulaatioon. Testi on tarkoitettu käytettäväksi tuberkuloosi-infektion (TB) diagnoosin apuna. T-SPOT.TB -testi on yksinkertaistettu entsyymilinkitetyn immuunipisteen (ELISPOT) -menetelmä, joka erittelee yksittäiset TB-spesifit aktivoidut T-efektorisolut.

Johdanto

Maailman terveysjärjestö arvioi, että kolmannes maailman väestöstä kärsii *M. tuberculosis* -infektiosta. Jokaisella henkilöllä, joka kantaa piilevää TB-infektiota (LTBI), on noin 10 % mahdollisuus, että se etenee aktiiviseksi taudiksi. Etenemisaste kasvaa tietyissä ryhmissä, mukaan lukien ne, jotka ovat saaneet tartunnan äskettäin ja ne, joilla on heikentynyt immuunijärjestelmä.

Immuunivaste *M. tuberculosis*-infektioon on pääasiassa soluvälitteinen immunitaatti (CMI). Osana tätä vastetta T-solut herkistetään *M. tuberculosis*-antigeeneille. Aktivoidut T-efektorisolut, sekä CD4 että CD8, jotka on erityisesti erotettu verestä, voidaan eritellä sen perusteella, miten nämä antigeenit pystyvät stimuloimaan niitä *in vitro*^{1,2}. *M. tuberculosis*-kompleksille (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) valittujen antigeenien käyttö parantaa testin tarkkuutta näille organismeille vähentämällä ristireaktiivisuutta BCG-rokotteelle ja useimmille ympäristöllisille mykobakteereille^{3,4}. Kahta erillistä antigeenipaneelia, jotka simuloivat hyvin karakterisoituja proteiineja ESAT-6 ja CFP10, käytetään testin herkkyyden optimointiin.

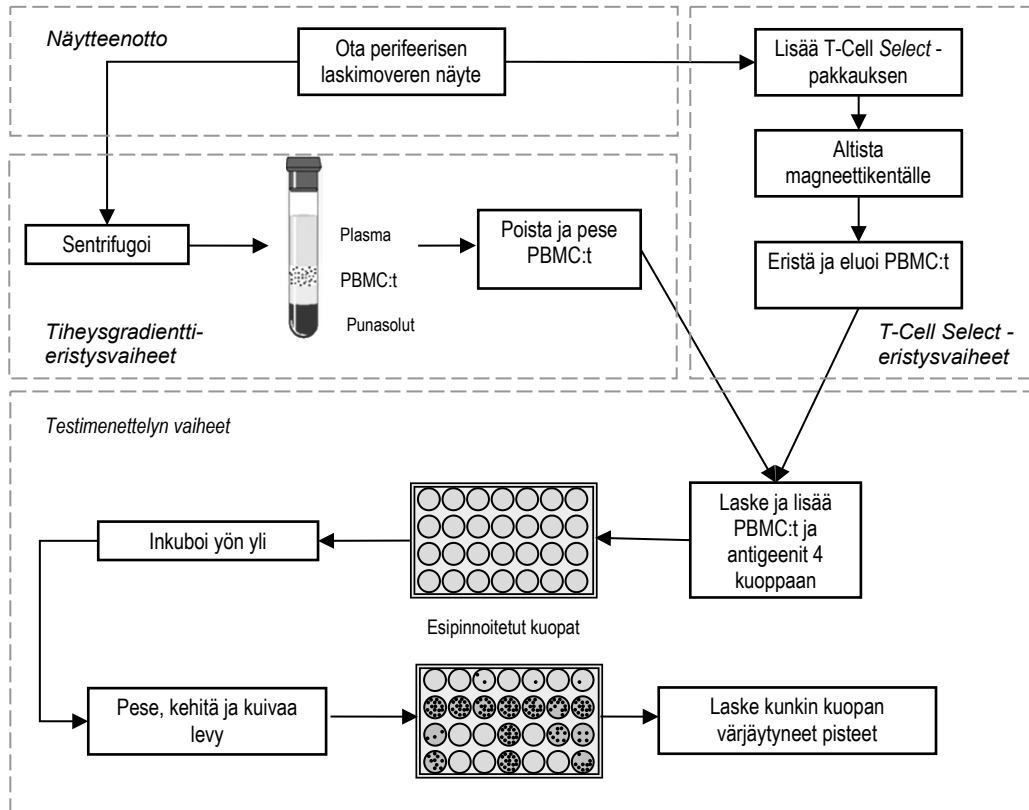
T-SPOT.TB -testi on yksinkertaistettu muunnelma ELISPOT-testitekniikasta. ELISPOT-testit ovat poikkeuksellisen herkkiä, koska kohdesytokiini siepataan suoraan erittävän solun ympäriltä, ennen kuin se laimenee kelluvaan nesteeseen, viereisten solujen reseptorit sieppaavat sen tai se heikkenee. Tämä tekee ELISPOT-testeistä paljon perinteisiä ELISA-testejä herkempiä⁵. T-SPOT.TB -testi on suunniteltu niiden T-efektorisolujen tunnistamiseen, jotka vastaavat *M. tuberculosis*-herkistyneiden antigeenien stimulaatioon^{3,4,6-9}. Testi erittelee yksittäiset, aktivoidut TB-spesifit T-solut. Se sopii käytettäväksi kaikilla potilailla, joilla on LTBI-riski tai joilla epäillään TB-tautia^{10,11}, iästä, sukupuolesta, etnisyydestä, hoidosta tai immuunistatuksesta riippumatta.

Menettelyn periaatteet

Perifeerisen veren mononukleaarisolut (PBMC:t) erotetaan kokoverinäytteestä ja pestään, jotta niistä poistuisi mahdolliset taustalla olevat häiritsevän signaalin lähteet. PBMC:t lasketaan niin, että testissä käytetään vakioitua solumäärää. Tällä varmistetaan, että jopa niillä, joilla on alhaiset T-solujen titterit heikentyneen immuunijärjestelmän vuoksi (immuunipuutteiset ja immunosuppressiiviset), on riittävästi soluja lisättäväksi mikrotitrauskuoppiin. Pesu- ja laskentavaiheet, samoin kuin ELISPOT-tekniikka, tarjoavat yliveraisen suorituskyvyn TB-taudin ja piilevän TB-infektion tunnistamiseen.

Jokaista näytettä varten tarvitaan neljä kuoppaa (katso Kuva 1):-

1. Nollakontrolli ei-spesifisen solun aktivoinnin tunnistamiseen.
2. TB-spesifit antigeenit, Paneeli A (ESAT-6).
3. TB-spesifit antigeenit, Paneeli B (CFP10).
4. Positiivinen kontrolli, joka sisältää fytohemagglutiniinia (PHA, tunnettu polyklonaalinen aktivaattori¹²) PBMC-toimivuuden vahvistamiseksi.



Kuva 1: T-SPOT.TB-testin päävaiheet. Huomaa, että jokaisessa levyssä on 96 kuoppaa.

PBMC:t inkuboidaan antigeenien kanssa, jotta mahdollistetaan mahdollisten läsnä olevien herkistettyjen T-solujen stimuloituminen. Kalvossa olevat erityiset vasta-aineet sieppaavat erittyneen sytokiiniin, jota muodostuu kuopan pohjalle, ja solut ja muut ei-toivotut materiaalit poistetaan pesemällä. Toinen vasta-aine, konjugoitu alkaliseen fosfataasiin ja suunnattu eri epitoppiin sytokiini-molekyylissä, lisätään ja se kiinnittyy sytokiiniin, joka siepattiin kalvon pinnalta. Mahdollinen sitoutumaton konjugaatti poistetaan pesemällä. Jokaiseen kuoppaan lisätään liukoista substraattia. Sitoutunut entsyymi halkaisee tämän muodostaakseen liukenemattoman saostuman pisteen reaktiokohtaan. Jokainen piste edustaa yksittäisen sytokiiniä erittävän T-solun jalanjälkeä, ja syntyneiden pisteiden määrän arviointi tarjoaa mittauksen *M. tuberculosis*-herkkien T-efektorisolujen runsaudesta perifeerisessä veressä.

Rajoitukset

- Vain *in vitro* -diagnostiseen käyttöön.
- Vain ammattikäyttöön.
- Eri pakkauserien komponentteja ei saa sekoittaa.
- Lue testausohjeet huolellisesti ennen käyttöä.
- Noudata aseptista tekniikkaa reagenssien, testikuoppien, soluliuosten ja soluviljelyväliaineiden kontaminoitumisen välttämiseksi.
- Todettujen pipetointi- ja pesutekniikoiden, inkubaatioaikojen ja/tai lämpötilojen vaihtelu voi vaikuttaa saatuihin todellisiin tuloksiin, ja vaihtelua pitäisi välttää.
- Verinäyte pitää ottaa ja testata 8 tunnin sisällä. Tämä aikarajoitus voidaan kumota käyttämällä T-Cell Select™ -reagenssipakkausta tai T-Cell Xtend® -reagenssia (saatavissa Oxford Immunotec -yhtiöltä). Kun T-Cell Select -reagenssipakkausta käytetään T-SPOT.TB -testin kanssa, näytteen varastointiaika nousee 54 tuntiin ja solun eristysprosessi voidaan automatisoida. Kun T-Cell Xtend -reagenssia ja muuta granulosityylin vähentymismenetelmää käytetään T-SPOT.TB -testin kanssa, näytteen varastointiaika nousee 32 tuntiin.
- Varastoi ja kuljeta verinäytteet laboratorioon huoneenlämmössä (18–25 °C), mukaan lukien verinäytteet käytettäväksi T-Cell Select -reagenssipakkauksen kanssa. Mikäli käytetään T-Cell Xtend -reagenssia, näytteet on kuljetettava ja varastoitava lämpötilassa 10–25 °C. Kokoverinäytteitä ei saa laittaa jääkaappiin tai pakastimeen.

- T-SPOT.TB -testiä pitää käyttää ja tulkita vain kliinisen kokonaiskuvan kontekstissa.
- Negatiivinen testituloks ei poissulje *M. tuberculosis*-altistuksen tai -infektion mahdollisuutta.
- ESAT-6- ja CFP10-antigeenejä ei ole BCG-kannoissa eikä useimmissa ympäristöllisissä mykobakteereissa, poikkeuksena *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} ja *M. goodii*.

Turvallisuusvaroitukset ja -varotoimenpiteet

Ihmistä peräisin olevan materiaalin käsittelyssä on noudatettava huolellisuutta. Kaikkia verinäytteitä on pidettävä mahdollisesti tartuttavina.

Verinäytteiden ja testikomponenttien käsittely, niiden käyttö, varastointi ja hävittäminen on tehtävä asianmukaisissa kansallisissa biologisia vaaroja koskeissa turvallisuusohjeissa tai -määräyksissä määritettyjen menettelyjen mukaisesti.

Kemikaalien kanssa työskennellessä on noudatettava huolellisuutta. Kaikkia kemikaaleja on pidettävä mahdollisesti vaarallisina.

Mukana toimitetut materiaalit

T-SPOT.TB 8 -pakkauksen sisältö:

1. 1 mikrotitrauslevy (CW.300): 96 kuoppaa, toimitettu 12 x 8-kuoppaisina liuskoina kehikossa, pinnoitettu hiiren monoklonalisella vasta-aineella sytokiini interferoni gammalle (IFN- γ).
2. 2 injektiopulloa (PA.300, 0,8 mL kukin) Paneeli A: sisältää ESAT-6-antigeenejä, naudan seerumialbumiinia ja mikrobeja tuhoavia aineita.
3. 2 injektiopulloa (PB.300, 0,8 mL kukin) Paneeli B: sisältää CFP10-antigeenejä, naudan seerumialbumiinia ja mikrobeja tuhoavia aineita.
4. 2 injektiopulloa (CP.300, 0,8 mL kukin) Positiivinen kontrolli: sisältää fytohemagglutiniinia (PHA) käytettäväksi solun toimivuuden kontrollina, naudan seerumialbumiinia ja mikrobeja tuhoavia aineita.
5. 1 injektiopullo (CR.300, 50 μ L) 200 x tiivistettyä konjugaattireagenssia: hiiren monoklonaalinen vasta-aine sytokiini IFN- γ :lle konjugoituna alkaliseen fosfataasiin.
6. 1 pullo (SR.300, 25 mL) substraattiliuosta: käyttövalmis BCIP/NBT^{plus} -liuos.
7. Käyttöohjeet, jotka löytyvät CD:itä yhdessä käyttöturvallisuustiedotteen kanssa, koulutusopas, T-SPOT solunlaimennuslaskuri, konjugaatin laimennuslaskuri, sentrifugin nopeuslaskuri ja T-SPOT.AutoReporter-ohjelma.

Varastointi

Säilytä kaikkia pakkauksen komponentteja lämpötilassa 2–8 °C.
Vältä substraattiliuoksen pitkäaikaista altistumista valolle.

Vakaus

Eri pakkauserien komponentteja ei saa sekoittaa. Säilytä avaamattomana lämpötilassa 2–8 °C. Pakkauksen komponentit ovat vakaita pakkauslaatikkoon painettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka, kun niitä varastoidaan ja käsitellään suositelluissa olosuhteissa. Pakkausta ei saa käyttää pakkauksen etikettiin merkityn viimeisen käyttöpäivän jälkeen.

Säilytä avattuja pakkauskomponentteja lämpötilassa 2–8 °C. Komponentit on käytettävä 8 viikon sisällä avaamisesta.

Tarvittavat laitteet ja materiaalit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

1. 8-kuoppainen liuskalevykehikko (saatavissa Oxford Immunotec -yhtiöltä).
2. Luokan II mikrobiologinen kaappi (suositeltu).
3. Verinäyteputket, kuten Vacutainer® CPT™ (saatavissa Oxford Immunotec -yhtiöltä), heparinisoidut putket tai sitraattia sisältävät putket.
4. Ficoll®-Paque * Plus tai vaihtoehtoiset PBMC-erotusmateriaalit.
5. T-Cell *Xtend* -reagenssia (saatavissa Oxford Immunotec -yhtiöltä) voidaan käyttää näytteille, jotka on otettu enintään 32 tuntia suonipistoksen jälkeen. T-Cell *Select* -reagenssipakkausta (saatavissa Oxford Immunotec -yhtiöltä) voidaan käyttää näytteille, jotka on otettu enintään 54 tuntia suonipistoksen jälkeen. Vaihtoehtoisia granulosityin vähennyksen menetelmiä voidaan käyttää näytteille, joita on varastoitu enintään 32 tuntia. Asiakkaiden on validoitava vaihtoehtoiset menetelmät omilla laboratorioissaan.
6. Leucosep-putkia voidaan käyttää yksinkertaistamaan PBMC-solujen erottamista Ficoll*-menetelmää käyttämällä.
7. Sentrifugi PBMC-solujen valmisteluun (kapasiteetti vähintään 1800 x g ja pystyy ylläpitämään näytteitä huoneenlämmössä (18–25 °C)).
8. Soluja pesevää sentrifugia voidaan käyttää erotettujen PBMC-solujen valmisteluun ja pesuun, esimerkiksi DiaCent-CW-sentrifugi (Bio-Rad). Asiakkaiden on validoitava tällaisen laitteiston käyttö omassa laboratorioissaan.
9. Laitteisto ja reagenssit, jotka mahdollistavat PBMC-solujen laskennan joko käsin käyttämällä Trypan Blue -ainetta ja hemosytometriä mikroskoopissa tai automaattisesti käyttämällä sopivaa hematologian analyysilaitetta.
10. Kostutettu inkubaattori, jonka kapasiteetti on 37 ± 1 °C 5 % CO₂-syötöllä.
11. Mikrotitrauslevyn pesuri tai laitteisto levyjen käsinpesuun.
12. Pipetit ja steriilit pipettikärjet.
13. Steriili D-PBS-liuos: kuten GIBCO® 1 x D-PBS (Invitrogen; luettelonumero 14040-091).
14. Tislattu tai deionisoitu vesi.
15. Väline levyn lukemiseen, kuten mikroskooppi, digitaalinen mikroskooppi, suurennuslasi tai levykuvaaja.
16. Steriili soluviljelyväliaine, kuten GIBCO AIM-V® (Invitrogen; luettelonumero 31035-025): suosittelemme voimakkaasti tämän seerumittoman väliaineen käyttöä inkubointivaiheessa. RPMI 1640 (Invitrogen; luettelonumero 21875-034) voidaan käyttää vain näytteen ensimmäisissä valmisteluvaiheissa. Suosittelemme, että soluviljelyväliainetta säilytetään sopivina alikvootteina ja ylimääräinen materiaali hävitetään käytön jälkeen. Soluviljelyväliaine pitää esilämmittää lämpötilaan 37 °C ennen käyttöä T-SPOT.TB -testin kanssa.

Reagenssin valmistelu

1. Mikrotitrauslevy. T-SPOT.TB 8 -mikrotitrauslevy toimitetaan käyttövalmiina. Irrota tarvittava määrä 8-kuoppaisia liuskoja säilytyksestä ja anna niiden tasaantua huoneenlämpöön. Sulje jäljellä olevat liuskat takaisin ulompaan foliopakkaukseen ja laita kuivausainepussi sisään pakkaukseen.
2. *M. tuberculosis* ESAT-6 -antigeenien (Paneeli A) injektiopullot toimitetaan käyttövalmiina.
3. *M. tuberculosis* CFP10 -antigeenien (Paneeli B) injektiopullot toimitetaan käyttövalmiina.
4. Positiivisen kontrollin injektiopullot toimitetaan käyttövalmiina.
5. Valmistele 1:200-laimenne työkonjugaattireagenssiliuosta. Laske tarvittavan työkonjugaattireagenssiliuoksen tilavuus (katso T-SPOT-konjugaattilaimenteen laskin jokaisen testipakkauksen mukana toimitetulta CD:ltä). Reagenssi voidaan valmistaa välittömästi ennen käyttöä tai valmistaa työskentelypitoisuuteen (1:200) ja varastoida enintään kuusi viikkoa lämpötilassa 2–8 °C ennen käyttöä. Laimennettua reagenssia ei saa käyttää säilyvyysajan ulkopuolella.
6. Substraattiliuos toimitetaan käyttövalmiina. Ota pois säilytyksestä ja anna tasaantua huoneenlämpöön.

Menettely

Tämä testi tulisi suorittaa käyttämällä hyvän laboratorioikäytännön periaatteita ja noudattamalla tarkasti näitä käyttöohjeita.

Oxford Immunotec Ltd on valmistellut koulutusoppaan, joka kuvaa näytteiden ottamisen ja valmistelun, soluviljelyväliaineen valinnan ja pisteiden laskentamenetelmät. Opas on saatavissa jokaisen testipakkauksen mukana toimitetulla CD:llä, soittamalla numeroon +44 (0) 1235 442780 tai lataamalla se osoitteesta www.oxfordimmunotec.com.

Näytteenotto ja valmistelu

Yksittäisten käyttäjien tulisi validoida menettelynsä verinäytteiden ottoa, PBMC-solujen erotusta ja laskemista varten sekä sopivan väliaineen valintaa varten T-solun toimivuuden tukemiseksi testin ensimmäisen inkubaatiovaiheen aikana. Tyypillisesti immunokompetentille potilaalle riittävä määrä PBMC-soluja testin suorittamiseksi voidaan saada laskimoverinäytteistä seuraavien ohjeiden mukaisesti:

- Aikuiset ja 10-vuotiaat ja sitä vanhemmat lapset: yksi 8 mL:n tai kaksi 4 mL:n CPT-putkea tai yksi 6 mL:n hepariini- tai sitraattiputki
- Lapset 2–9-vuotiaat: yksi 4 mL:n CPT-, hepariini- tai sitraattiputki
- Lapset 2 ikävuoteen saakka: yksi 2 mL:n pediatriinen putki

Verinäytteitä on säilytettävä huoneenlämmössä ja testattava 8 tunnin sisällä näytteenotosta, 32 tunnin sisällä säilytettäessä lämpötilassa 10–25 °C, mikäli käytetään T-Cell *Xtend* -reagenssipakkausta, tai 54 tunnin sisällä säilytettäessä lämpötilassa 18–25 °C, mikäli käytetään T-Cell *Select* -reagenssipakkausta.

Soluviljelyväliaine pitää esilämmittää lämpötilaan 37 °C ennen käyttöä T-SPOT.TB -testin kanssa.

Menettely	Huomautukset
<p>1. Ota verinäyte näytteenottolaitteen mukana toimitettujen ohjeiden mukaisesti. Säilytä verinäytettä huoneenlämmössä (18–25 °C) tai lämpötilassa 10–25 °C, mikäli T-Cell <i>Xtend</i> -reagenssia käytetään. Ei saa laittaa jääkaappiin tai pakastimeen.</p>	<p>1. Verinäytteet voidaan ottaa erilaisiin putkiin. Olemme laboratorioissamme käyttäneet menestyksekkäästi Vacutainer sitraatti CPT-, hepariini CPT- ja vakiohepariini- tai sitraattiputkia. CPT-putket eivät sovellu käytettäväksi T-Cell <i>Xtend</i> -reagenssin kanssa. EDTA-putkia ei suositella.</p>
<p>2. Noudata valmistajan ohjeita PBMC-solujen erottamiseksi CPT-verinäyteputkia käytettäessä.</p> <p>Kun käytetään verinäyteputkien pidikkeitä, jotka sisältävät hepariinia tai sitraatteja, erota PBMC-solut sentrifugoimalla Ficoll-Paque Plus -levyn läpi käyttämällä julkaistuja menettelyitä.</p> <p>Jos käytetään Leucosep-putkia, T-Cell <i>Select</i> -reagenssipakkausta tai T-Cell <i>Xtend</i> -reagenssia (saatavissa Oxford Immunotec -yhtiöltä), noudata näiden reagenssien kanssa toimitettuja protokollia.</p>	<p>2. Sentrifugoi 8 mL:n CPT-putkia nopeudella 1600 x g 28 minuutin ajan tai 4 mL:n CPT-putkia nopeudella 1800 x g 30 minuutin ajan lämpötilassa 18 °C, kun jäähdyttävä sentrifugi on käytettävissä. Anna sentrifugin lämpötilan nousta lämpötilaan 18 °C, jos alempia lämpötiloja on käytetty aiemmin. Jos ei-jäähdyttävää sentrifugia käytetään, varmista, että lämpötila ei nouse yli 25 °C.</p> <p>Laimenna veri vaihtoehtoisesti yhtä suurella tilavuudella RPMI 1640 -väliainetta. Kerrosta laimennettu veri (2–3 tilavuutta) varovaisesti Ficoll-Paque Plus -levylle (1 tilavuus) ja sentrifugoi nopeudella 1000 x g 22 minuutin ajan samalla ylläpitäen lämpötilaa alueella 18–25 °C.</p> <p>Käytä T-Cell <i>Xtend</i> -reagenssia näytteille 8–32 tuntia suonipistoksen jälkeen ennen näytteen kerrostamista Ficoll-Paque Plus -levylle.</p> <p>Käytä näytteille, joita on varastoitu enintään 54 tuntia suonipistoksen jälkeen, T-Cell <i>Select</i> -reagenssipakkauksen mukana toimitettua protokollaa.</p> <p>Sentrifugin nopeuslaskin testipakkaukseen sisältyvällä CD:llä voi auttaa muuntamaan nopeuksia arvosta x g arvoon rpm.</p> <p>Mikäli muita PBMC-erotusmenetelmiä käytetään, asiakkaan on validoitava ne ennen käyttöä T-SPOT.TB -testin kanssa.</p>
<p>3a. Kerää valkoinen, samea PBMC-solujen nauha käyttämällä pipettiä ja siirrä 15 mL:n kartiomaiseen sentrifugiputkeen. Täytä 10 mL:n tilavuus soluviljelyväliaineen kanssa.</p> <p>3b. Vaihtoehtoisesti soluja pesevää sentrifugia, esim. DiaCent-CW (Bio-Rad), voidaan käyttää solujen pesuvaiheen apuna. Jos tätä järjestelmää käytetään, niin DPBS:ää pitää käyttää solujen pesemiseen.</p>	<p>3a. Useita erilaisia väliaineita voidaan käyttää solujen pesuun tässä prosessissa. Olemme käyttäneet laboratorioissamme menestyksekkäästi sekä AIM-V- että RPMI 1640 -väliainetta ja suosittelimme niitä.</p> <p>3b. Soluja pesevän sentrifugin käytön metodologia PBMC-solujen valmistelun aikana on saatavissa Oxford Immunotec -yhtiöltä. Asiakkaiden on kuitenkin validoitava tämä menetelmä omissa laboratorioissaan.</p>
<p>4. Sentrifugoi nopeudella 600 x g 7 minuutin ajan. Kaada kelluva neste pois ja suspensoi sakka uudestaan 1 mL:n väliaineella.</p>	<p>4. Katso kohta 3a. yltä.</p>
<p>5. Täytä 10 mL:n tilavuus tuoreella väliaineella ja sentrifugoi nopeudella 350 x g 7 minuutin ajan.</p>	<p>5. Katso kohta 3a. yltä.</p>

6. Kaada kelluva neste pois ja suspensoi sakka uudestaan 0,7 mL:ssa AIM-V-viljelyväliainetta.	6. Tässä vaiheessa pitäisi käyttää viljelyväliaineen inkubointia yön yli sakan suspensoimiseksi uudestaan. Olemme käyttäneet laboratorioissamme seerumitonta väliainetta AIM-V menestyksekkäästi ja suosittelimme sitä voimakkaasti.
---	--

Muista ruumiinnesteistä, kuten bronkoalveolaarisesta huuhtelusta (BAL), pleuraeffuusiosta (PE) tai aivoselkäydinnesteestä (CSF), saatuja T-soluja on menestyksekkäästi käytetty T-SPOT.TB -testin kanssa TB-infektion ja -taudin tunnistamisessa (Jafari *et al* (2006) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **174** 1048-1054, Jafari *et al* (2008) Eur. Resp. J. **31** 261-265, Strassburg *et al* (2008) Eur. Resp. J. **31** 1132-1135, Jafari *et al* (2009) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **180**(7) 666-673, Dheda *et al* (2009) Thorax **64**(10) 847-853 and Patel *et al* (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77). Jos käytetään muita kuin verinäytteitä, käyttäjien on validoitava menettelyt riittävän mononukleaarisolujen määrän keräykseen. Menetelmät BAL-näytteiden käsittelyyn kuvataan yllä viitatuissa julkaisuissa.

Huomautus 1: Rajaa positiiviselle tulokselle ja kelvollisille kontrolleille testiä varten, käyttämällä muita kuin verinäytteitä, ei ole laajasti arvioitu ja se voi erota veritestistä. Käyttäjien on määritettävä omat testin tulkintakriteerinsä. Lääkäreiden on käytettävä harkintaansa tuloksia tarkasteltaessa.

Huomautus 2: Ajan pituutta näytteen ottamisesta testin aloittamiseen ei ole laajasti tutkittu.

Solujen laskenta ja laimennus

T-SPOT.TB -testi edellyttää $2,5 \times 10^5$ elinkykyisiä PBMC-soluja kuoppaa kohti. Yhteensä neljä kuoppaa vaaditaan kullekin potilasnäytteelle. Jokaiseen kuoppaan on lisättävä oikea määrä soluja. Tämän laiminlyönti voi aiheuttaa tuloksen virheellisen tulkinnan.

Menettely	Huomautukset
1. Laske elinkykyiset solut.	1. Solut voidaan laskea useilla eri menetelmillä, mukaan lukien käsinlaskenta käyttämällä Trypan Blue -ainetta ja hemosytometriä tai automatisoitu laskenta käyttämällä asianmukaista instrumenttia.
2. Lyhyesti, käsinlaskentaa varten Neubauer-hemosytometrillä, lisää 10 µl lopullista solususpensiota 40 µl:aan 0,4 % (w/v) Trypan Blue -liuosta. Aseta sopiva alikvootti hemosytometriin ja laske solut ristikolta. Noudata valmistajan ohjeita muuntotyypisille hemosytometreille ja automatisoiduille laitteille.	2. Huolellisuutta on käytettävä varmistamaan, että solususpensio on perusteellisesti sekoitettu välittömästi ennen alikvoottien poistamista laimennusta tai laskentaa varten. Solut voivat laskeutua putken pohjaa kohti, mikä aiheuttaa todellisen solumäärän väärintulkinnan.
3. Laske varastosolususpensiosta läsnä olevien elinkykyisten solujen pitoisuus.	3. Varmista, että laskutulos on oikein käytetylle solujen laskentajärjestelmälle, koska joko puutteellisen tai liian suuren solumäärän käyttö voi aiheuttaa tuloksen virheellisen tulkinnan. T-SPOT-solulaimennuslaskin jokaisen testipakkauksen mukana toimitetulla CD:llä auttaa tätä laskentaa.
4. Valmistele 500 µl:aa lopullista solususpensiota pitoisuudella $2,5 \times 10^5$ solua / 100 µl.	4. Varmista, että solut ovat perusteellisesti sekoittuneet ennen alikvoottien poistamista laimennusta varten.

Levyn asetus ja inkubointi

T-SPOT.TB -testi edellyttää neljä kuoppaa käytettäväksi kullekin potilasnäytteelle. Nollakontrolli ja solun toimivuuden positiivinen kontrolli on suoritettava jokaisen yksittäisen näytteen kanssa. Suosittelemme, että näytteet järjestetään pystysuuntaisesti levyille alla olevan kuvan mukaisesti.

- Nollakontrolli
- Paneeli A
- Paneeli B
- Positiivinen kontrolli

Menettely	Huomautukset
1. Ota esipinnoitetut 8-kuoppaiset liuskat pois pakkauksesta, kiinnitä levykehikkoon ja anna tasaantua huoneenlämpöön.	1. Ota vain tarvittava määrä liuskoja ja jätä loput varastoon. Kiinnitä käytettävät liuskat tyhjään levykehikkoon, johon on asennettu alasuojus ja kansi. Rungot, suojukset ja kannet on säilytettävä ja käytettävä uudelleen.
2. Kukin potilasnäyte vaatii 4 yksittäisen kuopan käyttöä; (i) Lisää 50 µl:aa AIM-V-viljelyväliaineita kuhunkin nollakontrolli-kuoppaan. (ii) Lisää 50 µl:aa Paneeli A -liuosta kuhunkin vaadittuun kuoppaan. (iii) Lisää 50 µl:aa Paneeli B -liuosta kuhunkin vaadittuun kuoppaan. (iv) Lisää 50 µl:aa positiivista kontrolliliuosta kuhunkin solun toimivuuden kontrollikuoppaan.	2. Älä päästä pipetin kärkeä kosketuksiin kalvon kanssa. Pipetin kärkien aiheuttamat painaumat kalvossa voivat aiheuttaa kuoppiin artefakteja. Levyä on ehkä napautettava varovaisesti, jotta varmistetaan, että liuokset peittävät kalvon kunkin kuopan pohjalla. Voimakasta sekoittamista on vältettävä antigeenien ristikontaminaation minimoimiseksi kuoppien välillä.
3. Lisää kuhunkin potilasnäytteelle käytettävästä 4 kuopasta 100 µl:aa potilaan lopullista solususpensiota (sisältää 250 000 elinkykyistä solua).	3. Pipetöi solususpensiota varovaisesti ylös ja alas varmistaaksesi huolellinen sekoittuminen ennen kunkin 100 µl:n alikvootin poistamista. Suosittelemme, että uutta kärkeä käytetään kunkin potilaan solujen jokaiseen lisäykseen ristikontaminaation välttämiseksi 4 kuopan välillä.
4. Inkuboi levyä kostutetussa inkubaattorissa lämpötilassa 37 °C yhdessä 5 % CO ₂ kanssa 16–20 tunnin ajan.	4. Vältä levyyn koskemista inkubaattoriin asettamisen jälkeen. Älä pinota levyjä päällekkäin, koska tämä voi aiheuttaa epätasaisen lämpötilan jakautumisen ja ilmanvaihdon. Suositellun inkubointiajan ja -olosuhteiden noudattamisen laiminlyönti voi aiheuttaa tuloksen virheellisen tulkinnan. Tarkasta, että inkubaattori sisältää riittävästi vettä kosteuden ylläpitämiseksi inkubaatiojakson ajan.

Pisteiden kehitys ja lasku

Älä koske kalvoon pipetin kärjillä tai automatisoiduilla kuoppapesurin kärjillä levyn pesun ja kehitysvaiheiden aikana. Pipetin tai kuoppapesurin kärkien aiheuttamat painaumat kalvossa saattavat kehittyä artefakteiksi kalvossa, mikä voisi häiritä pisteiden laskua.

Menettely	Huomautukset
1. Ota levy pois inkubaattorista.	1. Mikäli prosessissa on viive, jota ei pystytä välttämään, esim. resurssiongelmia viikonloppuna, levyt voidaan poistaa inkubaattorista ja varastoida lämpötilaan 2–8 °C. Suurin suositeltu säilytysaika on 72 tuntia, ja levyt pitää peittää varastoinnin ajaksi. Asiakkaan on validoitava tämä prosessi omassa laboratoriossaan.
2. Heitä soluviljelyväliaine pois ja lisää 200 µl:aa D-PBS-liuosta kuhunkin kuoppaan.	2. Poista nyt substraattiliuos pakkauksesta ja anna tasaantua huoneenlämpöön.
3. Heitä D-PBS-liuos pois. Toista kuopan pesu vielä 3 kertaa tuoreella D-PBS-liuoksella kullekin kuopalle.	3. Heitä kaikki D-PBS pois viimeisestä pesuvaiheesta kääntämällä levy ylösalaisin imukykyiselle paperille ennen jatkamista eteenpäin.
4. Laimenna tiivistetty konjugaattireagenssi 200-kertaisesti D-PBS:ssä luodaksesi työskentelyvahvuisen liuoksen.	4. Ei saa käyttää D-PBS:ää, joka sisältää Tween®- tai muita puhdistusaineita, koska tämä aiheuttaa korkeita taustalukuja. Varmista, että vain pieni ylimääräinen määrä (hävikin sallimiseksi) työvahvuista liuosta valmistellaan. Valmistele jokaiselle 8-kuoppaiselle liuskalle (kukin kuoppa vaatii 50 µl:aa) 500 µl työvahvuista liuosta lisäämällä 2,5 µl:aa tiivistettyä konjugaattireagenssia 497,5 µl:aan D-PBS:ää. Jokaiseen testipakkaukseen sisältyvän CD:n konjugaatin laimennuslaskinta voidaan käyttää tähän laskentaan.
5. Lisää 50 µl:aa työskentelyvahvuista konjugaattireagenssiliuosta jokaiseen kuoppaan ja inkuboi lämpötilassa 2–8 °C 1 tunnin ajan.	5. Suositellun inkubointiajan noudattamisen laiminlyönti voi aiheuttaa tuloksen virheellisen tulkinnan.
6. Heitä konjugaatti pois ja suorita neljä D-PBS-pesua vaiheissa 2 ja 3 yllä kuvatulla tavalla.	
7. Lisää 50 µl:aa substraattiliuosta kuhunkin kuoppaan ja inkuboi huoneenlämmössä 7 minuutin ajan.	7. Suositellun inkubointiajan noudattamisen laiminlyönti voi aiheuttaa tuloksen virheellisen tulkinnan.
8. Pese levy huolellisesti tislattulla tai deionisoidulla vedellä tunnistusreaktion pysäyttämiseksi.	
9. Anna levyn kuivua seisottamalla sitä hyvin ilmastoidulla alueella tai uunissa enintään 37 °C lämpötilassa.	9. Pisteistä tulee näkyvämpiä, kun levy kuivuu. Anna kuivua 4 tuntia lämpötilassa 37 °C tai yön yli huoneenlämmössä.
10. Laske ja kirjaa muistiin erottuvien, tummansinisten pisteiden määrä kunkin kuopan kalvossa. Käytä Tulosten tulkinta ja testikriteerit -osaa (katso alta) määrittääksesi, onko potilasnäyte ”positiivinen” vai ”negatiivinen” TB-antigeeneille.	10. Pisteet voidaan visualisoida useilla eri menetelmillä, mukaan lukien manuaalisesti käyttämällä kädessä pidettävää suurennuslasia, sopivaa mikroskooppia, digitaalista mikroskooppia tai erityistä ELISPOT-levykuvaajaa. Pisteiden laskun koulutusopas (T-SPOT. <i>Tutor</i> -ohjelma) on saatavissa Oxford Immunotec - verkkosivustolta.

Laadunvalvonta

Tyypillisessä tuloksessa odotetaan olevan vähän tai ei lainkaan pisteitä nollakontrollissa ja enemmän kuin 20 pistettä positiivisessa kontrollissa.

Nollakontrollin pistemäärän, joka ylittää 10 pistettä, pitäisi katsoa olevan "määrittämätön". Katso mahdolliset syyt T-SPOT.TB -koulutusoppaasta (lataus osoitteesta www.oxfordimmunotec.com). Uusi näyte pitää ottaa henkilöltä ja testata.

Tyypillisesti solun toimivuuden positiivisessa kontrollissa pisteiden määrän pitäisi olla ≥ 20 tai osoittaa saturaatiota (liian monta pistettä laskettavaksi). Pienellä osuudella potilaista voi olla T-soluja, jotka näyttävät vain rajallisen vasteen PHA:lle^{13,14}. Mikäli positiivisen kontrollin pistemäärä on < 20 pistettä, sitä pitäisi pitää "määrittämättömänä", ellei jompikumpi Paneeli A tai Paneeli B ole "positiivinen" kuten on kuvattu Tulosten tulkinta ja testikriteerit -osassa (katso alta), jolloin tulos on kelvollinen.

Potentiaalisten mikrobiologisten ja systemaattisten vaihteluiden vuoksi, joissa suurempi seuraavista (Paneeli A miinus nollakontrolli) ja (Paneeli B miinus nollakontrolli) on 5, 6 tai 7 pistettä, tulosta voidaan pitää rajaa lähellä olevana (moniselitteinen). Rajaa lähellä olevat tulokset (moniselitteiset), vaikkakin kelvolliset, ovat vähemmän luotettavia kuin tulokset, joissa pisteiden määrä on kauempana rajasta. Tästä syystä suosittelemme testaamaan potilaan uudelleen käyttämällä uutta näytettä. Jos tulos on edelleen lähellä rajaa (moniselitteinen) uudelleentestattaessa, muita diagnostisia testejä ja/tai epidemiologisia tietoja on käytettävä potilaan TB-infektiosatutuksen määrittämisen apuna.

Vaikka ESAT-6- ja CFP10-antigeenejä ei ole *M. bovis* BCG-kannoissa ja useimmissa ympäristöllisissä mykobakteereissa, on mahdollista, että "positiivinen" T-SPOT.TB -testituloksella voi johtua *M. kansasii*-, *M. szulgai*-, *M. marinum*- tai *M. gordonae* -infektioista. Vaihtoehtoisia testejä on tehtävä, jos näitä infektioita epäillään.

Tulosten tulkinta ja testikriteerit

Katso Laadunvalvonta-osa ennen seuraavien kriteereiden soveltamista.

T-SPOT.TB -testituloksia tulkitaan vähentämällä pistemäärä nollakontrollikuopassa kunkin paneelin pistemäärästä seuraavan algoritmin mukaisesti:

- Testituloksella on "positiivinen", jos (Paneeli A miinus nollakontrolli) ja / tai (Paneeli B miinus nollakontrolli) ≥ 6 pistettä.
- Testituloksella on "negatiivinen", jos sekä (Paneeli A miinus nollakontrolli) että (Paneeli B miinus nollakontrolli) ≤ 5 pistettä. Tähän sisältyvät nolaa pienemmät arvot.

"Positiivinen" tulos merkitsee, että näyte sisältää T-efektorisoluja, jotka reagoivat *M. tuberculosis*in.

"Negatiivinen" tulos merkitsee, että näyte todennäköisesti ei sisällä T-efektorisoluja, jotka reagoivat *M. tuberculosis*in.

Testin suorituskykyominaisuudet

Tarkkuus arvioitiin testaamalla 93 näytettä luovuttajilta, joilla arvioitiin lääketieteellisen historian ja henkilökohtaisten tietojen perusteella olevan vähäinen riski *M. tuberculosis*-infektioille. T-SPOT.TB -testin tarkkuus laskettiin tulokseksi 100 % (93/93) (95 % luotettavuusrajoilla 95,8–100 %).

Herkyys arvioitiin testaamalla 87 näytettä viljelystä vahvistetuista *M. tuberculosis*-infektion tapauksista, mukaan lukien immuunijärjestelmän häiriöistä kärsivät ryhmät. T-SPOT.TB -testin herkkyys laskettiin tulokseksi 98,8 % (86/87) (95 % luotettavuusrajoilla 90,8–99,9 %).











Uusittavuus arvioitiin testinsisäisen vaihtelun surrogaattimarkkerina analysoimalla kaksoisnäyte verinäytteestä suoritettuna samalla levyllä. Yhteensä 145 verinäytettä 140 yksittäiseltä luovuttajalta testattiin kaksoisnäytteenä (kaksi kuoppaa kullekin Paneelille A ja Paneelille B) käyttämällä T-SPOT.TB -testiä. 142/145 (97,9 %) kaksoisnäyteanalyysistä havaittiin kliininen yksimielisyys. Kaksi kaksoisnäyteanalyysia antoi ristiriitaisia lähellä rajaa olevia tuloksia ja vain 1/145 näytteestä antoi poikkeavia testituloksia.

Viitteet

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. Katso 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.

Symbolisanasto

	Viimeinen käyttöpäivä/Vanhentumispäivä (Vuosi-Kuukausi-Päivä)
	Eränumero
	Luettelonumero
	Huomio, lue käyttöohjeet
	Valmistaja
	Sisältö riittää "n" testiin
	<i>In vitro</i> -diagnostinen laite
	Lämpötilaraja/Varastointilämpötila-alue
	Lue käyttöohjeet
	EU Valtuutettu edustaja

Yhteystiedot

Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Yhdistynyt
kuningaskunta
Puh.: +44 (0) 1235 442780
Sähköposti: info@oxfordimmunotec.com

Saat tuotteiden tukilataukset ja tekniset lisätiedot verkkosivustoltamme:

www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT, T-Cell *Xtend* ja Oxford Immunotec -logo ovat Oxford Immunotec Limited -yhtiön rekisteröityjä tavaramerkkejä.

T-Cell *Select* on Oxford Immunotec Limited -yhtiön tavaramerkki.

AIM-V ja GIBCO ovat Life Technologies Corporation -yhtiön tavaramerkkejä.

CPT ja Vacutainer ovat Becton, Dickinson and Company -yhtiön tavaramerkkejä.

Ficoll ja Ficoll-Paque ovat Cytiva-yhtiön, joka on Global Life Sciences Solutions USA LLC:n tytäryhtiö, rekisteröityjä tavaramerkkejä.

Tween on Croda Americas LLC:n rekisteröity tavaramerkki.

T-Cell *Xtend* -reagenssin käyttö on suojattu seuraavilla patenteilla ja vireillä olevilla patenteilla: EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Versionumero: 5 Julkaisupäivä: Marraskuu 2023
© 2023 Oxford Immunotec. Kaikki oikeudet pidätetään.

Valmistaja

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

EU Valtuutettu edustaja

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