



T-SPOT[®].TB



Oxford
Immunotec



Een hulpmiddel bij de diagnose van tuberculose-infectie

VERPAKKINGSBIJSLUITER

Voor *in-vitro*-diagnostisch gebruik

In deze bijsluiter wordt het gebruik behandeld van
T-SPOT.TB 8 (8-wellsstripplaatformaat voor meervoudig gebruik.
Catalogusnummer: TB.300)

Inhoudsopgave	Pagina
Beoogd gebruik	2
Inleiding	2
Principes van de procedure	2
Beperkingen	3
Veiligheidswaarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	4
Geleverde materialen	4
Bewaring	4
Stabiliteit	4
Benodigde maar niet geleverde apparatuur en materialen	5
Bereiding van reagens	5
Procedure	6
Monsterafname en -bereiding	6
Celtelling en -verduunning	8
Plaatconfiguratie en incubatie	9
Spotontwikkeling en -telling	10
Kwaliteitscontrole	11
Interpretatie van resultaten en testcriteria	11
Kenmerken testuitvoering	12
Referenties	12
Verklaring van de symbolen	12

Beoogd gebruik

De T-SPOT®.TB-test is een *in-vitro*-diagnostische test voor het opsporen van effector-T-cellen die reageren op stimulatie door *Mycobacterium tuberculosis*-antigenen en is bedoeld voor gebruik als hulpmiddel bij de diagnose van tuberculose-infectie (TB-infectie). De T-SPOT.TB-test is een vereenvoudigde *enzyme-linked immunospot* (ELISPOT) methode waarmee afzonderlijke TB-specifieke, geactiveerde effector-T-cellen worden geteld.

Inleiding

De wereldgezondheidsorganisatie WHO schat dat een derde van de wereldbevolking geïnfecteerd is met *M. tuberculosis*. Iedereen die drager is van een latente TB-infectie (LTBI) heeft ongeveer 10% kans om de actieve ziekte te ontwikkelen. Dit progressiepercentage is verhoogd bij bepaalde groepen mensen, waaronder personen die pas geïnfecteerd zijn en personen met een verzwakt afweersysteem.

De immuunrespons op infectie met *M. tuberculosis* is voornamelijk een celgedieerde immuunrespons (CMI). Als onderdeel van deze respons worden T-cellen gesensibiliseerd voor *M. tuberculosis*-antigenen. Geactiveerde effector-T-cellen, zowel CD4 als CD8, die specifiek zijn gescheiden uit bloed, kunnen worden geteld doordat ze *in vitro* door deze antigenen kunnen worden gestimuleerd^{1,2}. Het gebruik van geselecteerde antigenen voor het *M. tuberculosis*-complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) verbetert de specificiteit van de test voor deze organismen, doordat de kruisreactiviteit op het BCG-vaccin en op de meeste omgevingsmycobacteriën wordt verzwakt^{3,4}. Er worden twee afzonderlijke panels antigenen gebruikt, die de goed gekarakteriseerde eiwitten ESAT-6 en CFP10 simuleren, om de sensitiviteit van de test te optimaliseren.

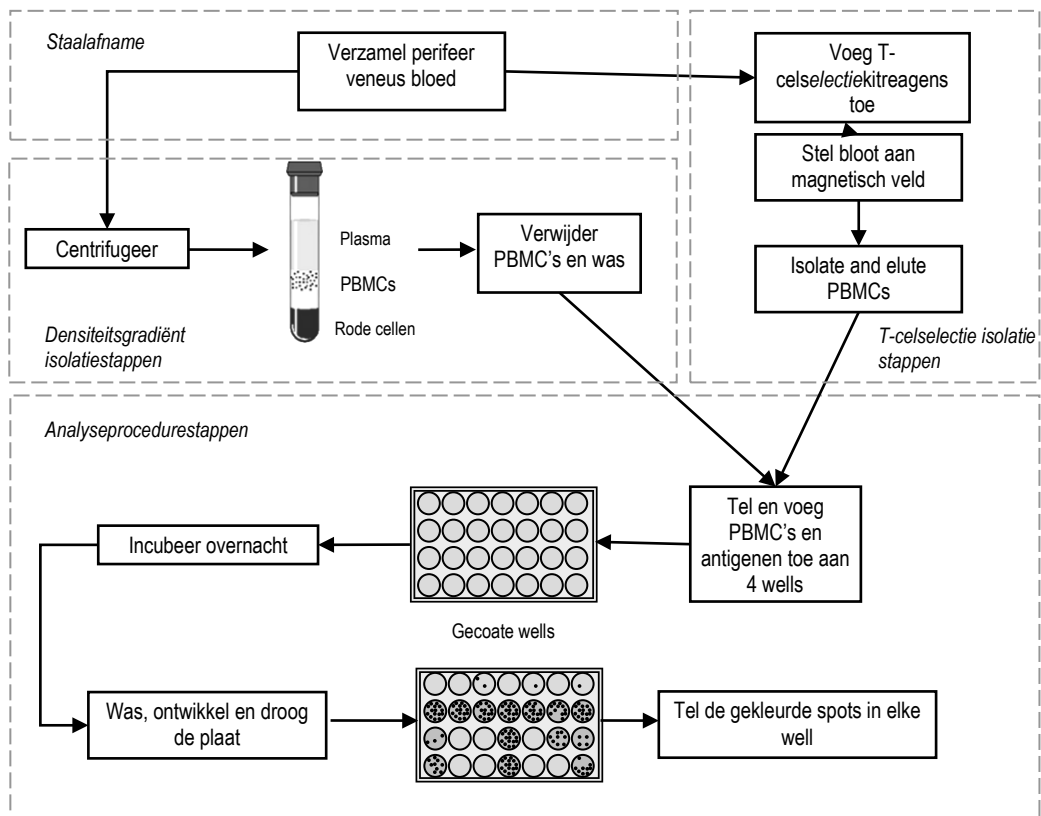
De T-SPOT.TB-test is een vereenvoudigde variant van de ELISPOT-testtechniek. ELISPOT-tests zijn uitzonderlijk gevoelig doordat het beoogde cytokine direct rond de afscheidende cel, vóór verdunning in de bovendrijvende laag, wordt gevangen door receptoren van naastgelegen cellen of wordt afgebroken. Dit maakt ELISPOT-tests veel gevoeliger dan conventionele ELISA-tests⁵. De T-SPOT.TB-test is ontworpen voor het opsporen van effector-T-cellen die reageren op stimulatie door voor *M. tuberculosis* specifieke antigenen^{3,4,6-9}. Met de test worden afzonderlijke, geactiveerde TB-specifieke T-cellen geteld. De test is geschikt voor gebruik bij alle patiënten met het risico van LTBI of vermoede of aangetoonde tuberculose^{10,11}, ongeacht leeftijd, geslacht, etnische groep, behandeling of immuunstatus.

Principes van de procedure

Perifere bloed mononucleaire cellen (PBMC's) worden gescheiden uit een volbloedmonster en gespoeld om eventuele bronnen van versturende achtergrondsignalen te verwijderen. De PBMC's worden vervolgens geteld, zodat een gestandaardiseerd celaantal in de test wordt gebruikt. Hierdoor worden zelfs bij degenen met lage T-celtiters als gevolg van een verzwakt immuunsysteem (immunogecompromitteerden en immunogesupprimeerden) voldoende aantallen cellen aan de microtiterwells toegevoegd. De spoel- en telfasen en de ELISPOT-techniek bieden uitstekende resultaten voor de detectie van TB en latente TB-infectie.

Voor elk monster zijn vier wells (zie Figuur 1) vereist:

1. Een nulcontrole om niet-specifieke celactivering te identificeren.
2. TB-specifieke antigenen, panel A (ESAT-6).
3. TB-specifieke antigenen, panel B (CFP10).
4. Een positieve controle met fytohemagglutinine (PHA, een bekende polyklonale activator¹²) om PBMC-functionaliteit te bevestigen.



Figuur 1: De hoofdstappen van T-SPOT.TB-test. Merk op dat elke plaat 96 wells bevat.

De PBMC's worden geïncubeerd met de antigenen om stimulatie van eventueel aanwezige gesensibiliseerde T-cellen mogelijk te maken. Afgescheiden cytokine wordt gevangen door specifieke antilichamen op de membraan, die de basis vormt van de well, en de cellen en andere ongewenste deeltjes worden verwijderd door spoelen. Een tweede antilichaam, geconjugeerd met alkalinefosfatase en gericht tegen een ander epitoom op het cytokinemolecuul, wordt toegevoegd en bindt zich aan het cytokine dat op het membraanoppervlak is gevangen. Eventueel ongebonden conjugaat wordt verwijderd door wassen. Een oplosbaar substraat wordt toegevoegd aan elke well; dit wordt gespleten door gebonden enzym en vormt dan een spot van onoplosbaar precipitaat op de plaats van de reactie. Elke spot vertegenwoordigt de voetafdruk van een afzonderlijke cytokineafscheidende T-cel en het bepalen van het aantal verkregen spots biedt een maat voor het gehalte aan *M. tuberculosis*-sensitieve effector-T-cellen in het perifere bloed.

Beperkingen

- Alleen voor *in-vitro*-diagnostisch gebruik.
- Alleen voor professioneel gebruik.
- Meng geen componenten die uit verschillende kitpartijen afkomstig zijn.
- Lees de testinstructies zorgvuldig voor gebruik.
- Neem aseptische techniek in acht om te vermijden dat de reagentia, testwells, celsuspensies en celkweekmedia worden besmet.
- Variaties op de voorgeschreven pipetteer- en spoeltechnieken, incubatietijden en/of temperaturen kunnen van invloed zijn op de uiteindelijk verkregen resultaten en moeten worden vermeden.
- Bloed moet binnen 8 uur worden verzameld en getest. Deze tijdsbeperking kan worden opgeheven door gebruik te maken van de T-Cell *Select*[™]-reagenskit of de *Xtend*[®]-reagens (leverbaar via Oxford Immunotec). Wanneer de T-Cell *Select*-reagenskit wordt gebruikt met de T-SPOT.TB-test, wordt de bewaartijd van het monster verlengd tot 54 uur en kan het celisolatieproces worden geautomatiseerd. Wanneer T-Cell *Xtend*-reagens, of een andere granulocytendepletie methode wordt gebruikt bij de T-SPOT.TB-test, wordt de bewaartijd van het monster verlengd tot 32 uur.

- Bewaar en vervoer bloedmonsters naar het laboratorium bij kamertemperatuur (18-25 °C), inclusief bloedmonsters voor gebruik met de T-Cell-*Select*-reagenskit. Als gebruik wordt gemaakt van T-Cell *Xtend*-reagens, kunnen de monsters worden vervoerd en bewaard bij 10-25°C. Bewaar volbloedmonsters niet in koelkast of vriezer.
- De T-SPOT.*TB*-test moet alleen binnen de context van het algehele klinische beeld worden gebruikt en geïnterpreteerd.
- Een negatief testresultaat sluit de mogelijkheid van blootstelling aan of infectie met *M. tuberculosis* niet uit.
- ESAT-6- en CFP10-antigenen zijn afwezig in BCG-stammen en in de meeste omgevingsmycobacteriën, met uitzondering van *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} en *M. goodii*.

Veiligheidswaarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voorzichtigheid moet worden betracht bij het hanteren van materiaal van menselijke oorsprong. Alle bloedmonsters moeten worden beschouwd als potentieel infectieus.

Het hanteren van bloedmonsters en testbestanddelen, hun gebruik, bewaring en afvoer moeten plaatsvinden volgens de procedures die zijn gedefinieerd in de toepasselijke nationale veiligheidsrichtlijnen of -regels met betrekking tot biologische risico's.

Voorzichtigheid moet worden betracht bij het werken met chemische stoffen. Alle chemische stoffen moeten worden beschouwd als potentieel gevaarlijk.

Geleverde materialen

De T-SPOT.*TB* 8-kit bevat:

1. 1 microtiterplaat: (CW.300) 96 wells, geleverd als 12 x 8-wellstrips in een frame, gecoat met een muis monoklonaal antilichaam tegen het cytokine interferon gamma (IFN- γ).
2. 2 injectieflacons (PA.300, 0,8 mL per stuk) panel A: bevatten ESAT-6-antigenen, bovien serumalbumine en antimicrobiële middelen.
3. 2 injectieflacons (PB.300, 0,8 mL per stuk) panel B: bevatten CFP10-antigenen, bovien serumalbumine en antimicrobiële middelen.
4. 2 injectieflacons (CP.300, 0,8 mL per stuk) positieve controle: bevatten fytohemagglutinine (PHA) voor gebruik als controle van de celfunctionaliteit, bovien serumalbumine en antimicrobiële middelen.
5. 1 injectieflacon (CR.300, 50 μ L) 200 x geconcentreerd conjugaatreagens: muis monoklonaal antilichaam tegen het cytokine IFN- γ geconjugeerd met alkalinefosfatase.
6. 1 fles (SR.300, 25 mL) substraatoplossing: gebruiksklare BCIP/NBTplus-oplossing.
7. Gebruiksaanwijzingen, te vinden op de cd naast het MSDS, de trainingsgids, de T-SPOT celverduunningscalculator, conjugaatverduunningscalculator, centrifugesnelheid-calculator en het T-SPOT.*AutoReporter* programma.

Bewaring

Bewaar alle componenten van de kit bij 2-8 °C.

Vermijd langdurige blootstelling van de substraatoplossing aan licht.

Stabiliteit

Mix geen componenten die uit verschillende kitpartijen afkomstig zijn. Bewaar de ongeopende kit bij 2-8 °C. De bestanddelen van de kit zijn stabiel tot aan de vervaldatum die op de kitverpakking is afgedrukt, wanneer deze worden bewaard en gehanteerd onder de aanbevolen voorwaarden. De kit mag niet worden gebruikt na de vervaldatum op het kitlabel.

Bewaar de onderdelen van de geopende kit bij 2-8 °C. Geopende onderdelen moeten binnen 8 weken na opening worden gebruikt.

Benodigde maar niet geleverde apparatuur en materialen

1. 8-wellsstripplaatframe (beschikbaar via Oxford Immunotec) voor gebruik met een T-SPOT.TB 8-kit
2. Microbiologisch klasse-II-kast (aanbevolen).
3. Buisjes voor bloedafname, zoals Vacutainer® CPT™ (leverbaar via Oxford Immunotec),gehepariniseerde buisjes of citraathoudende buisjes.
4. Ficoll® Paque* Plus of alternatieve PBMC-scheidingsmaterialen.
5. T-Cell *Xtend*-reagens (leverbaar via Oxford Immunotec) kan worden gebruikt voor monsters die maximaal 32 uur na venapunctie zijn afgenomen. De T-Cell-*Select*-reagenskit (verkrijgbaar bij Oxford Immunotec) kan worden gebruikt voor monsters die tot 54 uur na de venepunctie zijn afgenomen. Alternatieve granulocytendepletiemethoden kunnen worden gebruikt voor monsters die maximaal 32 uur zijn bewaard. Klanten moeten alternatieve methoden in hun eigen laboratoria toetsen.
6. Leucosep-buisjes kunnen worden gebruikt voor een gemakkelijker scheiding van PBMC's met behulp van de Ficoll*-methode.
7. Centrifuge voor bereiding van PBMC's (met vermogen van ten minste 1800 x g en die de monsters op kamertemperatuur (18-25 °C) kan houden).
8. Een celwascentrifuge kan worden gebruikt voor de bereiding en het wassen van de gescheiden PBMC, zoals een DiaCent-CW-centrifuge (Bio-Rad). Klanten moeten het gebruik van dergelijke apparatuur in hun eigen laboratoria toetsen.
9. Apparatuur en reagentia voor telling van PBMC's; ofwel handmatig met behulp van trypaanblauw en een hemocytometer op een microscoop ofwel automatisch met behulp van een geschikt hematologieanalyseapparaat.
10. Een vochtige broedstoof op 37 ± 1 °C met een 5 % CO₂-toevoer.
11. Een microtiterplaatwasser of apparatuur om de platen handmatig te wassen.
12. Pipetten en steriele pipettips.
13. Steriele D-PBS-oplossing: zoals GIBCO® 1 x D-PBS (Invitrogen; catalogusnummer 14040-091).
14. Gedestilleerd of gedeïoniseerd water.
15. Een middel om de plaat af te lezen, zoals een microscoop, digitale microscoop, vergrootglas of platen-imager.
16. Steriel celkweekmedium zoals GIBCO AIM-V® (Invitrogen; catalogusnummer 31035-025): het gebruik van dit serumvrije medium voor de incubatiestap wordt sterk aanbevolen. RPMI 1640 (Invitrogen; catalogusnummer 21875-034) kan alleen worden gebruikt in de eerste monsterbereidingsstappen. Het wordt aanbevolen celkweekmedia te bewaren in geschikte aliquots en overtollig materiaal na gebruik af te voeren. Celkweekmedium moet worden verwarmd tot 37 °C vóór gebruik met de T-SPOT.TB-test.

Bereiding van reagens

1. Microtiterplaat. De T-SPOT.TB 8 microtiterplaat wordt gebruiksklaar geleverd. Verwijder het vereiste aantal uit de 8-wellsstrips uit de opslag en laat deze op kamertemperatuur komen. Sluit de resterende strips weer in de buitenste folieverpakking en sluit hier ook het zakje met droogmiddel bij in.
2. De injectieflacons met *M. tuberculosis* ESAT-6-antigenen (panel A) worden gebruiksklaar geleverd.
3. De injectieflacons met *M. tuberculosis* CFP10-antigenen (panel B) worden gebruiksklaar geleverd.
4. De injectieflacons met positieve controle worden gebruiksklaar geleverd.
5. Bereid een 1:200 verdunning van werkende conjugaatreagensoplossing. Bereken het benodigde volume werkende conjugaatreagensoplossing (raadpleeg de T-SPOT conjugaatverdunningscalculator op de bij elke testkit meegeleverde cd). Het reagens kan onmiddellijk vóór gebruik worden bereid, of klaargemaakt tot de werkzame concentratie (1:200) en dan maximaal zes weken worden bewaard bij een temperatuur van 2 °C – 8 °C voorafgaand aan gebruik. Gebruik het verdunde reagens niet buiten deze houdbaarheidsperiode.
6. De substraatoplossing wordt gebruiksklaar geleverd. Neem deze uit de opslag en laat deze op kamertemperatuur komen.

Procedure

Deze test moet worden uitgevoerd volgens de beginselen van Goed Laboratorium Praktijk en met strikte naleving van deze Gebruiksaanwijzingen.

Oxford Immunotec Ltd heeft een trainingsgids gemaakt, waarin de afname en bereiding van monsters, de selectie van celweekmedia en methoden voor het tellen van spots zijn beschreven. Deze gids is beschikbaar op de bij elke testkit meegeleverde cd, door te bellen met +44 (0) 1235 442780 en kan worden gedownload vanaf www.oxfordimmunotec.com.

Monsterafname en -bereiding

Afzonderlijke gebruikers moeten hun procedures voor het verzamelen van PBMC's, het tellen van PBMC's en de keuze van geschikte media voor de ondersteuning van de T-celfunctionaliteit valideren tijdens de eerste incubatiefase van de test. Doorgaans kunnen voor een immunocompetente patiënt voldoende PBMC's voor het uitvoeren van de test worden verkregen uit veneuze bloedmonsters volgens de onderstaande richtlijnen:

- volwassenen en kinderen vanaf 10 jaar: één CPT-buisje van 8 mL of twee CPT-buisjes van 4 mL of één heparine- of citraatbuisje van 6 mL;
- kinderen van 2-9 jaar: één CPT-buisje of heparine- of citraatbuisje van 4 mL;
- kinderen tot 2 jaar: één pediatrisch buisje van 2 mL.

Bloedmonsters moeten worden bewaard bij kamertemperatuur en onderzocht binnen 8 uur na de afname, binnen 32 uur en bewaard bij 10-25 °C als de T-Cell-*Xtend*-reagens wordt gebruikt, of binnen 54 uur bij opslag bij 18-25 °C als de T-Cell-*Select*-reagenskit wordt gebruikt.

Celweekmedium moet worden verwarmd tot 37 °C vóór gebruik met de T-SPOT.TB-test.

Procedure	Opmerkingen
1. Neem een bloedmonster af volgens de instructies bij het afnameapparaat. Bewaar het verzamelde bloed bij kamertemperatuur (18-25 °C) of bij 10-25 °C als T-Cell <i>Xtend</i> -reagens wordt gebruikt. Niet in koelkast of vriezer.	1. Bloedmonsters kunnen worden verzameld in uiteenlopende buisjes. In onze laboratoria hebben we met succes gebruik gemaakt van Vacutainer citraat CPT-, heparine CPT- en standaardheparine- of citraatbuisjes. CPT-buisjes zijn niet geschikt voor gebruik met het T-Cell- <i>Xtend</i> reagens. EDTA-buisjes worden afgeraden.

Procedure	Opmerkingen
<p>2. Volg bij gebruik van CPT-bloedafnamebuisjes de instructies van de fabrikant voor de scheiding van PBMC's.</p> <p>Scheid PBMC's bij gebruik van Vacutainers voor bloedafname met daarin heparine of citraat door middel van centrifugatie met behulp van Ficoll-Paque Plus volgens gepubliceerde procedures.</p> <p>Als Leucosep buisjes, de T-Cell-<i>Select</i>-reagenskit (leverbaar via Oxford Immunotec) worden gebruikt, volgt u de protocollen die bij deze reagentia worden geleverd.</p>	<p>2. Centrifugeer CPT-buisjes van 8 mL bij 1600 x g gedurende 28 min of CPT-buisjes van 4 mL bij 1800 x g gedurende 30 min bij 18 °C wanneer een gekoelde centrifuge beschikbaar is. Laat de centrifuge op 18 °C komen als er eerder lagere temperaturen zijn gebruikt. Als een niet-gekoelde centrifuge wordt gebruikt, zorg er dan voor dat de temperatuur niet hoger wordt dan 25 °C.</p> <p>Of verdun het bloed met een gelijk volume van RPMI 1640-medium. Plaats zorgvuldig het verdunde bloed (2-3 volumens) in lagen op een Ficoll-Paque Plus (1 volume) en centrifugeer bij 1000 x g gedurende 22 min, terwijl u zorgt dat de temperatuur tussen 18 en 25 °C blijft.</p> <p>Monsters tussen 8 en 32 uur oud na venapunctie moeten, voordat ze op Ficoll-Paque Plus worden gebracht, worden gemengd met T-Cell <i>Xtend</i>-reagens.</p> <p>Voor monsters die tot 54 uur na de venapunctie zijn bewaard, gebruikt u het protocol dat bij de T-Cell-<i>Select</i>-reagenskit wordt geleverd.</p> <p>De centrifugesnelheid-calculator op de bij de testkit geleverde cd kan helpen bij het omzetten van snelheden van x g naar rpm.</p> <p>Als andere PBMC-scheidingsmethoden worden gebruikt, moeten die vóór gebruik van de T-SPOT.TB-test worden getoetst door de klant.</p>
<p>3a. Verzamel de witte, nevelige band van PBMC's met een pipet en breng deze over naar een conisch centrifugeerbuisje van 15 mL. Vul het volume met celkweekmedium aan tot 10 mL.</p> <p>3b. Of gebruik een celwascentrifuge, zoals de DiaCent-CW (Bio-Rad), voor het vergemakkelijken van de fases van het wassen van cellen. Als dit systeem wordt gebruikt, moet DPBS worden gebruikt om de cellen te wassen.</p>	<p>3a. Diverse media kunnen gedurende dit proces worden gebruikt voor het spoelen van cellen. In onze laboratoria zijn zowel AIM-V als RPMI 1640 met succes gebruikt en deze worden dan ook aanbevolen.</p> <p>3b. De methodologie voor het gebruik van een celwascentrifuge tijdens bereiding van PBMC zal verkrijgbaar zijn bij Oxford Immunotec. Klanten moeten deze methode echter in hun eigen laboratoria toetsen.</p>
<p>4. Centrifugeer bij 600 x g gedurende 7 min. Schenk de bovendrijvende laag eraf en resuspendeer de pellet in 1 mL medium.</p>	<p>4. Zie 3a. hierboven.</p>
<p>5. Vul het volume aan tot 10 mL met vers medium en centrifugeer bij 350 x g gedurende 7 min.</p>	<p>5. Zie 3a. hierboven.</p>
<p>6. Schenk de bovendrijvende laag eraf en resuspendeer de pellet in 0,7 mL AIM-V kweekmedium.</p>	<p>6. In dit stadium moet het kweekmedium voor de overnacht incubatie worden gebruikt om de pellet te resuspenderen. In onze laboratoria is het serumvrije medium AIM V met succes gebruikt en dit wordt ten zeerste aanbevolen.</p>

T cellen verkregen van andere lichaamsvloeistoffen zoals door het spoelen van bronchi en alveoli (BAL), pleurale effusie (PE) of hersenvocht (CSF) zijn met succes met de T-SPOT.TB-test gebruikt voor het zowel identificeren van een TB-infectie als van een TB-ziekte (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 en Patel *et al* (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77). Bij gebruik van andere dan bloedmonsters, moeten de gebruikers de procedures valideren voor het verzamelen van voldoende mononucleaire cellen. De methoden voor het verwerken van BAL-monsters worden beschreven in de publicaties waar hierboven naar wordt verwezen.

Opmerking 1: De grenswaarde voor een positieve uitslag en geldige controles voor de test, bij gebruik van andere dan bloedmonsters, zijn niet uitgebreid beoordeeld en kunnen verschillen van de bloedtest. De gebruikers moeten de interpretatiecriteria voor de test definiëren. Artsen moeten hun klinisch oordeel gebruiken bij het beoordelen van de uitslagen.

Opmerking 2: De tijdsduur vanaf het verkrijgen van het monster tot aan het begin van de test is niet uitgebreid bestudeerd.

Celtelling en -verduunning

Voor de T-SPOT.TB-test zijn $2,5 \times 10^5$ levensvatbare PBMC's per well nodig. In totaal zijn vier wells vereist voor elk patiëntmonster. Het juiste aantal cellen moet worden toegevoegd aan elke well. Gebeurt dit niet, dan kan dat leiden tot een onjuiste interpretatie van het resultaat.

Procedure	Opmerkingen
1. Voer een telling van levensvatbare cellen uit.	1. Cellen kunnen worden geteld volgens uiteenlopende methoden, inclusief handmatige telling met behulp van trypaanblauw en een hemocytometer of geautomatiseerde telling met een geschikt instrument.
2. Voeg voor handmatige telling met een Neubauer hemocytometer kort 10 μ L van de uiteindelijke celsuspensie toe aan 40 μ L 0,4 % (w/v) trypaanblauwoplossing. Plaats een geschikt aliquot op de hemocytometer en tel de cellen in het raster. Volg voor andere typen hemocytometers en voor automatische apparaten de instructies van de fabrikant.	2. Zorg ervoor dat de celsuspensie grondig wordt gemengd onmiddellijk vóór de verwijdering van aliquots voor verduunning of telling. Er kunnen zich cellen op de bodem van het buisje vastzetten, wat leidt tot een verkeerde interpretatie van het werkelijke aantal cellen.
3. Bereken de concentratie van levensvatbare cellen die aanwezig zijn in de stockcelsuspensie.	3. Zorg ervoor dat de berekening correct is voor het gebruikte celtellingssysteem, aangezien het gebruik van ofwel onvoldoende ofwel te veel cellen kan leiden tot een onjuiste interpretatie van het resultaat. U kunt deze berekening eenvoudig uitvoeren met de T-SPOT celverduunningscalculator op de bij elke testkit meegeleverde cd.
4. Bereid 500 μ L van de uiteindelijke celsuspensie bij een concentratie van $2,5 \times 10^5$ cellen/100 μ L.	4. Zorg ervoor dat de cellen grondig gemengd zijn alvorens een aliquot voor verduunning te verwijderen.

Plaatconfiguratie en incubatie

Voor de T-SPOT.TB-test moeten vier wells worden gebruikt voor elk patiëntmonster. Een nulcontrole en een positieve controle van de celfunctionaliteit moeten worden uitgevoerd met elk afzonderlijk monster. Het wordt aanbevolen dat de monsters verticaal op de plaat worden gerangschikt zoals hieronder afgebeeld.

- Nulcontrole
- Panel A
- Panel B
- Positieve controle

Procedure	Opmerkingen
1. Verwijder de vooraf gecoate 8-wellstrips uit de verpakking, klem deze in een plaatframe en laat de strips op kamertemperatuur komen.	1. Verwijder alleen het benodigde aantal strips, brengt de rest terug naar de opslag. Klem de te gebruiken strips in een leeg plaatframe dat is uitgerust met een onderklep en een deksel. Frames, kleppen en deksels moeten worden bewaard en opnieuw worden gebruikt.
2. Voeg aan elk van de 4 wells die voor een patiëntmonster moeten 4 afzonderlijke wells worden gebruikt; (i) Voeg 50 µL AIM V kweekmedium toe aan elke nulcontrolewell. (ii) Voeg 50 µL panel A-oplossing toe aan elke benodigde well. (iii) Voeg 50 µL panel B-oplossing toe aan elke benodigde well. (iv) Voeg 50 µL positieve-controleoplossing toe aan elke controlewell voor celfunctionaliteit.	2. Zorg dat de pipettip de membraan niet aanraakt. Indeukingen in de membraan door pipettips kunnen artefacten in de wells veroorzaken. Het kan nodig zijn voorzichtig tegen de plaat te tikken om ervoor te zorgen dat de oplossingen de membraan aan de basis van elke well bedekken. Heftige bewegingen moeten worden vermeden om kruisbesmetting van de antigenen tussen wells te minimaliseren.
3. Voeg aan elk van de 4 wells die voor een patiëntmonster worden gebruikt, 100 µL van de uiteindelijke celsuspensie van de patiënt (met 250.000 levensvatbare cellen) toe.	3. Pipetteer de celsuspensie voorzichtig op en neer om grondig te mengen vóór verwijdering van elk aliquot van 100 µL. Het is raadzaam een nieuwe tip te gebruiken voor elke toevoeging van cellen van iedere patiënt om kruisbesmetting tussen de 4 wells te voorkomen.
4. Incubeer de plaat in een vochtige broedstoof bij 37 °C met 5 % CO ₂ gedurende 16-20 uur.	4. Vermijd beweging van de plaat als deze zich eenmaal in de incubator bevindt. De platen niet stapelen aangezien dit kan leiden tot ongelijkmatige temperatuurverdeling en ventilatie. Worden de aanbevolen incubatietijd en -condities niet opgevolgd, dan kan dit leiden tot een onjuiste interpretatie van het resultaat. Controleer of de incubator voldoende water bevat om de vochtigheid gedurende de incubatietijd op peil te houden.

Spotontwikkeling en -telling

Raak de membraan tijdens het wassen van de plaat en de ontwikkelingsfasen niet aan met pipettips of met verdeelstukken van geautomatiseerde wellwassertips. Indeukingen in de membraan door pipet- of wellwassertips kunnen artefacten in de wells veroorzaken, wat de spottelling zou kunnen verstoren.

Procedure	Opmerkingen
1. Verwijder de plaat uit de incubator.	1. Bij een onvermijdbare vertraging bij de verwerking, zoals gebrek aan spullen in het weekend, moeten de platen wellicht uit de incubator worden gehaald en bij 2-8 °C worden bewaard. De maximaal aanbevolen opslagtijd is 72 uur, en de platen moeten tijdens opslag zijn afgedekt. De klant dient dit proces in zijn eigen laboratorium te toetsen.
2. Voer het celweekmedium af en voeg 200 µL D-PBS-oplossing toe aan elke well.	2. Neem de substraatoplossing nu uit de kit en laat deze op kamertemperatuur komen.
3. Voer de D-PBS-oplossing af. Herhaal de wellspoeling nog 3 maal met schone D-PBS-oplossing voor elke spoeling.	3. Voer al de D-PBS uit de laatste wasstap af door de plaat op absorberend papier om te draaien voordat u verdergaat.
4. Verdun geconcentreerde conjugaatreagens 200 maal in D-PBS om de oplossing op werksterkte te maken.	4. Gebruik geen D-PBS met Tween® of andere reinigingsmiddelen, aangezien dit hoge achtergrondtellingen veroorzaakt. Zorg dat slechts een kleine overmaat (met het oog op verspilling) aan oplossing op werksterkte wordt bereid. Maak voor T-SPOT.TB 8 en voor elke 8-wellsstrip (waarbij voor elke well 50 µL noodzakelijk is), 500 µL oplossing op werksterkte door het toevoegen van 2,5 µL geconcentreerde conjugaatreagens aan 497,5 µL D PBS. Voor deze berekening kan de conjugaatverdunningscalculator op de CD die bij elke testkit is bijgesloten worden gebruikt.
5. Voeg 50 µL werksterkte conjugaatreagensoplossing toe aan elke well en incubeer deze bij 2-8 °C gedurende 1 uur.	5. Wordt de aanbevolen incubatietijd niet opgevolgd, dan kan dit leiden tot een onjuiste interpretatie van het resultaat.
6. Voer het conjugaat af en voer vier D-PBS-spoelingen uit zoals beschreven in stap 2 en 3 hierboven.	
7. Voeg 50 µL substraatoplossing toe aan elke well en incubeer deze bij kamertemperatuur gedurende 7 min.	7. Wordt de aanbevolen incubatietijd niet opgevolgd, dan kan dit leiden tot een onjuiste interpretatie van het resultaat.
8. Was de plaat zorgvuldig met gedestilleerd of gedeïoniseerd water om de detectiereactie te stoppen.	
9. Laat de plaat drogen door deze op een goed geventileerde plaats te zetten of in een oven bij maximaal 37 °C.	9. Spots worden beter zichtbaar als de plaat opdroogt. Laat de plaat 4 uur drogen bij 37 °C of overnacht bij kamertemperatuur.
10. Tel en noteer het aantal afzonderlijke donkerblauwe spots op de membranen van elke well. Pas de testcriteria toe (Interpretatie van resultaten en testcriteria, zie hieronder) om te bepalen of een patiëntmonster 'Positief' of 'Negatief' is voor TB-antigenen.	10. Spots kunnen op een aantal manieren zichtbaar worden gemaakt, onder andere handmatig met een handvergrootglas, via een geschikte microscoop, een digitale microscoop of met een daarvoor bestemde ELISPOT-platen-imager. Een oefengids voor het tellen van spots (het T-SPOT.Tutor programma) kan worden aangevraagd via de website van Oxford Immunotec.

Kwaliteitscontrole

Van een typisch resultaat wordt verwacht dat er weinig of geen spots in de nulcontrole aanwezig zijn en meer dan 20 spots in de positieve controle.

Een nulcontrolespottelling boven 10 spots moet worden beschouwd als 'onduidelijk'. Raadpleeg het T-SPOT.TB Trainingsgids voor foutopsporing voor mogelijke oorzaken (te downloaden vanaf www.oxfordimmunotec.com). Er dient nogmaals een monster te worden afgenomen en opnieuw te worden getest.

Doorgaans zou de positieve-controlespottelling van de celfunctionaliteit een resultaat van ≥ 20 moeten opleveren of saturatie moeten vertonen (te veel spots om te tellen). Een klein deel van de patiënten kan T-cellen hebben die slechts een beperkte respons op PHA geven^{13,14}. Waar de spottelling van de positieve controle < 20 spots is, moet dit worden beschouwd als 'onduidelijk', tenzij panel A of panel B 'Positief' is, zoals beschreven in de Interpretatie van resultaten en testcriteria (zie hieronder), waardoor het resultaat valide is.

Waar de hoogste waarde van (Panel A min nulcontrole) en (Panel B min nulcontrole) 5, 6 of 7 spots bedraagt, kan het resultaat vanwege potentiële biologische en systematische variaties worden beschouwd als grensgeval (twijfelachtig resultaat). Grensgevallen (twijfelachtige resultaten) zijn weliswaar geldig, maar zijn minder betrouwbaar dan resultaten waarbij de spottelling verder van de grenswaarde af ligt. Het wordt daarom aangeraden om in deze gevallen de patiënt opnieuw te testen, met een nieuw monster. Als het resultaat dan nog steeds een grensgeval (twijfelachtig resultaat) is, dienen andere diagnostische tests en/of epidemiologische gegevens worden gebruikt om de status van de TB-infectie van de patiënt vast te stellen.

Terwijl ESAT-6- en CFP10-antigenen afwezig zijn in BCG-stammen van *M. bovis* en in de meeste omgevingsmycobacteriën, is het mogelijk dat een 'Positief' T-SPOT.TB-resultaat kan worden veroorzaakt door infectie met *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* of *M. goodii*. Alternatieve tests zijn vereist indien deze infecties worden vermoed.

Interpretatie van resultaten en testcriteria

Raadpleeg de rubriek Kwaliteitscontrole alvorens de onderstaande criteria toe te passen.

T-SPOT.TB-testuitslagen worden geïnterpreteerd door de spottelling van de nulcontrole-well af te trekken van de spottellingen in de afzonderlijke panels, volgens het volgende algoritme:

- Het testresultaat is 'Positief' als (Panel A min nulcontrole) en/of (Panel B min nulcontrole) ≥ 6 spots.
- Het testresultaat is 'Negatief' als zowel (Panel A min nulcontrole) als (Panel B min nulcontrole) ≤ 5 spots. Dit is inclusief waarden kleiner dan nul.

Een 'Positief' resultaat geeft aan dat het monster effector-T-cellen bevat die reactief zijn op *M. tuberculosis*.

Een 'Negatief' resultaat geeft aan dat het monster waarschijnlijk geen effector-T-cellen bevat die reactief zijn op *M. tuberculosis*.

Kenmerken testuitvoering

Specificiteit werd beoordeeld door het testen van 93 monsters van donoren van wie op grond van de medische voorgeschiedenis en persoonlijke informatie is verklaard dat zij een laag risico van infectie met *M. tuberculosis* hebben. De specificiteit van de T-SPOT.TB-test werd berekend als 100 % (93/93) (95 % betrouwbaarheidsgrenzen 95,8 % - 100 %).











Sensitiviteit werd beoordeeld door het testen van 87 monsters van door middel van kweek bevestigde gevallen van *M. tuberculosis*-infectie, inclusief immunogecompromitteerde groepen. De sensitiviteit van de T-SPOT.TB-test werd berekend als 98,8 % (86/87) (95 % betrouwbaarheidsgrenzen 90,8 % - 99,9 %).

Reproduceerbaarheid werd beoordeeld, als substituut-marker van intra-testvariatie, door middel van analyse van duplicaat bloedmonsters uitgevoerd op dezelfde plaat. In totaal werden 145 bloedmonsters van 140 afzonderlijke donoren in duplicaat getest (twee wells voor zowel panel A als panel B) met behulp van de T-SPOT.TB-test. In 142/145 (97,9 %) duplicaat analyses werd klinische overeenstemming waargenomen. Twee duplicaat analyses leverden discordante grensresultaten op en slechts 1/145 monsters gaven discrepante resultaten.

Referenties

1. Janeway en 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. Zie 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. Door NCCLS goedgekeurde richtlijn. *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.

Verklaring van de symbolen

	Houdbaar tot/Vervaldatum (jaar-maand-dag)
	Lotnummer
	Catalogusnummer
	Let op, zie gebruiksinstructies
	Fabrikant
	Voldoende voor "n" tests
	Apparaat voor <i>in-vitro</i> -diagnostiek
	Temperatuurlimiet/Bewaren tussen
	Raadpleeg gebruiksinstructies
	EU-gemachtigde vertegenwoordiger

Contactgegevens

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


Voor downloads van productondersteuning en verdere technische informatie kunt u terecht op onze website: www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT, T-Cell *Xtend* en het Oxford Immunotec-logo zijn gedeponeerde handelsmerken van Oxford Immunotec Limited.
T-Cell *Select* is een handelsmerk van Oxford Immunotec Limited
AIM-V en GIBCO zijn handelsmerken van the Life Technologies Corporation.
CPT en Vacutainer zijn handelsmerken van Becton, Dickinson and Company.
Ficoll en Ficoll-Paque zijn gedeponeerde handelsmerken van Cytiva, een dochteronderneming van Global Life Sciences Solutions USA LLC.
Tween is een gedeponeerd handelsmerk van Croda Americas LLC.

Het gebruik van het T-Cell *Xtend*-reagens wordt beschermd door de volgende octrooien en octrooien in aanvraag: EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Revisienummer: 5 Datum van afgifte: November 2023
© 2023 Oxford Immunotec. Alle rechten voorbehouden.

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

 EU-gemachtigde vertegenwoordiger
Oxford Immunotec (Ierland)
Unit 3d North Point House,
North Point Business Park,
New Mallow Road,
Cork, T23 AT2P
Republiek Ierland



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



www.oxfordimmunotec.com