

T-SPOT[®].TB

 Oxford
Immunotec
a PerkinElmer company

Et hjelpemiddel til diagnostisering av tuberkuloseinfeksjoner

PAKNINGSVEDLEGG

Brukes til *in vitro*-diagnostikk

Dette pakningsvedlegget omfatter bruk av:

T-SPOT.TB 8 (8-brønners strip-plate til flergangsbruk. Katalognr.: TB.300)

Innholdsfortegnelse	Side
Bruksområde	2
Innledning	2
Prosedyreprinsipp	2
Begrensninger	3
Advarsler og forholdsregler	4
Medfølgende materiell	4
Oppbevaring	4
Stabilitet	4
Nødvendig utstyr og materiell, som ikke er inkludert	4
Klargjøring av reagens	5
Prosedyre	5
Prøvetaking og -klargjøring	6
Celletelling og fortykning	8
Plateoppsett og inkubasjon	8
Punktutvikling og telling	9
Kvalitetskontroll	10
Tolkning av resultater og testkriterier	11
Ytelsesegenskapene til testen	11
Referanseliste	12
Oversikt over symboler	12

Bruksområde

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

Innledning

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

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

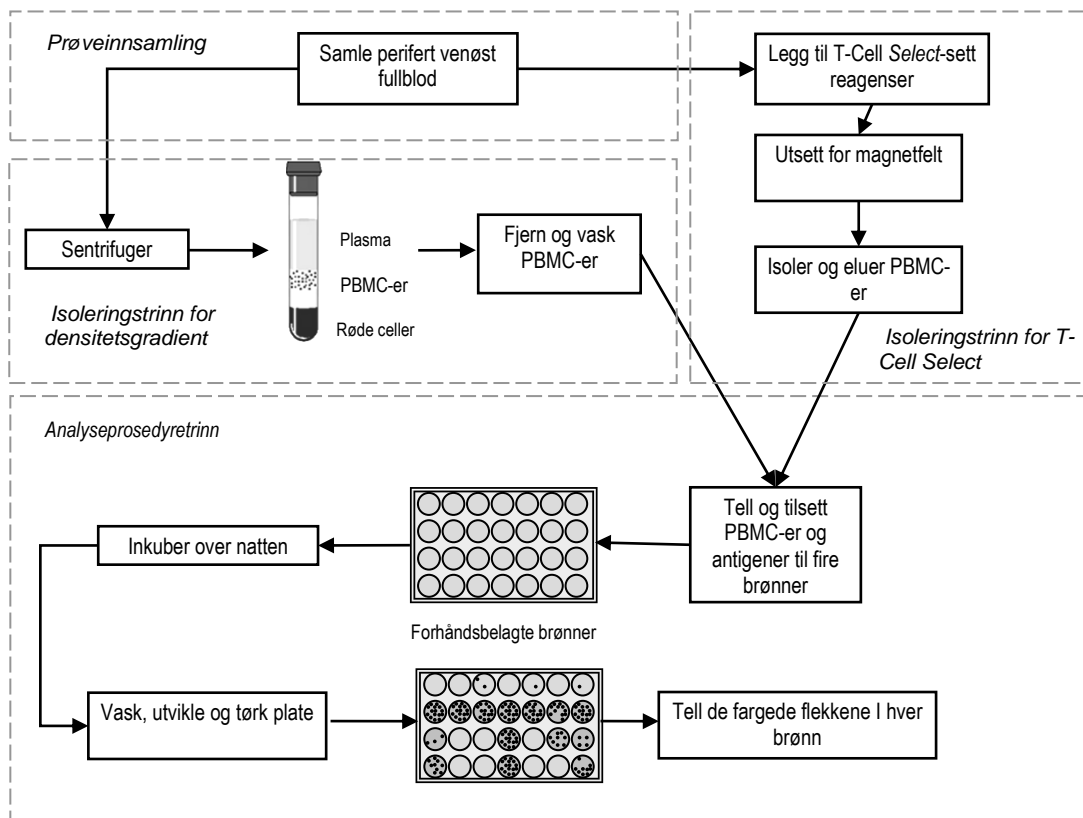
T-SPOT.TB-testen er en forenklet variant av testteknikken ELISPOT. ELISPOT-tester er ekstremt sensitive, fordi målcytokinet fanges opp direkte rundt den utskillende cellen, før den fortynnes i supernatant, fanges den opp av reseptorer på tilstøtende celler eller den nedbrytes. Det gjør ELISPOT-testene mye mer sensitive enn tradisjonelle ELISA-tester⁵. T-SPOT.TB-testen er beregnet på påvisning av effektor-T-celler som reagerer på stimulering med antigen som er spesifikke for *M. tuberculosis*^{3,4,6-9}. Testen teller individuelle, aktiverte TB-spesifikke T-celler. Den er egnet for bruk til alle pasienter med risiko for LTBI eller ved mistanke om TB-sykdom^{10,11}, uansett alder, kjønn, etnisk tilhørighet, terapi eller immunstatus.

Prosedyreprinsipp

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

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

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



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

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

Begrensninger

- Skal kun brukes til *in vitro*-diagnostikk.
- Kun til profesjonell bruk.
- Ikke bland komponenter fra sett med ulike batchkoder (lot).
- Les nøye gjennom instruksjonene for testen før bruk.
- Bruk aseptisk teknikk for å unngå å kontaminere reagensene, testbrønnene, cellesuspensjonene og cellekulturmediene.
- Variasjon i angitte pipetterings- og vasketeknikker, inkubasjonstider og/eller temperaturer kan påvirke de faktiske resultatene som oppnås, og bør unngås.
- Blodprøvene må tas og behandles med testen innen 8 timer. Denne tidsbegrensningen kan fravikes ved å bruke T-Cell Select™-reagenssett eller T-Cell Xtend®-reagenset (tilgjengelig fra Oxford Immunotec). Når T-Cell Select-reagenssettet brukes sammen med T-SPOT.TB-testen, økes prøvelagringstiden til 54 timer og celleisolasjonsprosessen kan automatiseres. Når T-Cell Xtend-reagenset, eller en annen granulocytutarmingsmetode, brukes med T-SPOT.TB-testen, kan prøvenes oppbevaringstid forlenges til 32 timer.
- Oppbevar og transporter blodprøver til laboratoriet ved romtemperatur (18–25 °C), inkludert blodprøver til bruk med T-Cell Select-reagenssett. Dersom T-Cell Xtend-

reagenset skal benyttes, kan prøvene transporteres og oppbevares ved 10–25 °C. Fullblodsprøver må ikke avkjøles eller fryses.

- T-SPOT.TB-testen skal bare brukes og fortolkes i kontekst av det generelle kliniske bildet.
- Et negativt testresultat utelukker ikke muligheten for eksponering for eller infeksjon med *M. tuberculosis*.
- ESAT-6- og CFP10-antigen er fraværende fra BCG-stammer, og fra de fleste mykobakteriene i omgivelsene, med unntak av *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} og *M. goodnae*.

Advarsler og forholdsregler

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

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

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

Medfølgende materiell

T-SPOT.TB 8-settet inneholder:

1. 1 mikrotiterplate (CW.300): levert som 12 x 8-brønners strimmel i en ramme, belagt med monoklonalt museantistoff for cytokin interferon gamma (IFN-g).
2. 2 glassrør (PA.300, 0,8 mL hver) panel A: inneholder ESAT-6-antigener, bovint serumalbumin og antimikrobielle stoffer.
3. 2 glassrør (PB.300, 0,8 mL hver) panel B: inneholder CFP10-antigener, bovint serumalbumin og antimikrobielle stoffer.
4. 2 glassrør (CP.300, 0,8 mL hver) positiv kontroll: inneholder fytohemagglutinin (PHA) til bruk som cellefunksjonalitetskontroll, bovint serumalbumin og antimikrobielle stoffer.
5. 1 glassrør (CR.300, 50 µL) 200x konsentrert konjugatreagens: monoklonalt museantistoff for cytokin IFN-g konjugert for alkalisk fosfatase.
6. 1 flaske (SR.300, 25 mL) substratløsning: bruksklar BCIP/NBT^{plus}-løsning.
7. Bruksanvisning, som er å finne på den vedlagte CD sammen med HMS-databladet, opplæringsmanual, T-SPOT cellefortynnings-kalkulator, konjugatfortynnings-kalkulator, kalkulator for sentrifugehastigheter og T-SPOT.AutoReporter programmet.

Oppbevaring

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

Stabilitet

Ikke bland komponenter fra sett med ulike batchkoder (lot). Oppbevares i uåpnet sett ved 2-8 °C. Komponentene i settet er stabile inntil utløpsdatoen som er trykket på esken med settet når det oppbevares og håndteres ved anbefalte betingelser. Settet må ikke brukes etter utløpsdatoen på merkingen av settet.

Oppbevar komponentene fra åpnet sett ved 2-8 °C. Komponenter som er åpnet må brukes innen 8 uker etter åpning.

Nødvendig utstyr og materiell, som ikke er inkludert

1. 8-brønners strips-plate (tilgjengelig fra Oxford Immunotec) til bruk med a TSPOT.TB 8 sett.
2. Mikrobiologiskap (anbefalt).
3. Blodprøverør, f.eks. Vacutainer® CPT™ (tilgjengelig fra Oxford Immunotec), hepariniserte rør eller citratholdige rør.
4. Ficoll®-Paque* Plus eller alternative PBMC-separasjonsmaterialer.

5. T-Cell *Xtend*-reagenset (tilgjengelig fra Oxford Immunotec) kan benyttes med prøver som er tatt opptil 32 timer etter venepunksjon. T-Cell *Select*-reagenssett (fås fra Oxford Immunotec) kan brukes med prøver som er tatt opptil 54 timer etter venepunksjon. Alternative fremgangsmåter for granulocytutarming kan anvendes for prøver lagret opptil 32 timer. Kunder må validere alternative metoder i sitt eget laboratorium.
6. Leucosep-rør kan brukes for å forenkle separasjonen av PBMC'er ved bruk av Ficoll*-metoden.
7. Sentrifuge for preparering av PBMC-er (med kapasitet på minst 1800xg og som kan holde prøvene ved romtemperatur (18–25 °C)).
8. En cellevaskesentrifuge kan anvendes ved fremstillingen og vasking av separert PBMC, for eksempel, en DiaCent-CW sentrifuge (Bio-Rad). Kunder må validere bruken av slikt utstyr i sitt eget laboratorium.
9. Utstyr og reagenser som muliggjør telling av PBMC-er, enten manuelt ved bruk av trypanblått og et hemocytometer på et mikroskop eller automatisk bruk av egnet hematologianalysator.
10. En fuktet inkubator med kapasitet på 37 ± 1 °C med 5 % CO₂-tilførsel.
11. En mikrotiterplatevasker eller utstyr for manuell vask av platene.
12. Pipetter og sterile pipettespisser.
13. Steril D-PBS-løsning: f.eks. GIBCO® 1x D-PBS (Invitrogen, katalognummer 14040-091).
14. Destillert eller avionisert vann.
15. Avlesningsmetode, som mikroskop, digitalt mikroskop, lupe eller plate bildeanalysator.
16. Sterilt cellekulturmedium, som GIBCO AIM-V® (Invitrogen, katalognummer 31035-025): bruk av dette serumfrie mediet til inkubering anbefales sterkt. RPMI 1640 (Invitrogen, katalognummer 21875-034) kan kun brukes ved første prøveprepareringstrinn. Vi anbefaler at cellekulturmediet oppbevares i egnede alikvoter, og overflødig materiale kastes etter bruk. Cellekulturmediet bør forhåndsoppvarmes til 37 °C før bruk med T-SPOT.TB-testen.

Klargjøring av reagens

1. Mikrotiterplate. T-SPOT.TB 8 mikrotiterplate leveres klar til bruk. Fjern det ønskede antall med 8-strips fra oppbevaring og la dem oppnå romtemperatur. De gjenværende strips forsegles på nytt i den ytre foliepakningen og legg ved posen med tørkemiddel.
2. Glassrør med *M. tuberculosis* ESAT-6-antigen (panel A) leveres klare til bruk.
3. Glassrør med *M. tuberculosis* CFP10-antigen (panel B) leveres klare til bruk.
4. Glassrør med positiv kontroll leveres klare til bruk.
5. Klargjør en fortykning på 1:200 med konjugatreagensløsning. Beregn volumet med konjugatreagensløsning som er nødvendig (se T-SPOT konjugatfortynnings-kalkulator på CD'en som følger med hvert testsett), og tilbered umiddelbart før bruk. Reagenset kan tilberedes før bruk, eller tilberedes til arbeidskonsentrasjon (1:200) og lagres i opp til seks uker ved 2 °C –8 °C før bruk. Ikke bruk den fortynnede reagensen etter holdbarhetstiden er utløpt.
6. Substratløsningen leveres klar til bruk. Finn fram oppbevaring og la den oppnå romtemperatur.

Prosedyre

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

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

Prøvetaking og klargjøring

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

- Voksne og barn over 10 år gamle: ett rør på 8 mL eller to CPT-rør på 4 mL eller ett 6 mL Heparin- eller citratrør
- Barn 2–9 år: ett CPT-, heparin- eller citratrør på 4 mL
- Barn opptil 2 år: ett pediatrik rør på 2 mL

Blodprøvene oppbevares ved romtemperatur og testes innen 8 timer etter blodprøvetakingen, innen 32 timer og oppbevart ved 10–25 °C dersom T-Cell *Xtend*-reagenset benyttes, eller innen 54 timer ved oppbevaring ved 18–25 °C dersom T-Cell *Select*-reagenssettet benyttes.

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

Prosedyre	Merknader
<p>1. Ta blodprøven i samsvar med instruksjonene som følger prøvetakingsutstyret. Oppbevar blodprøven i romtemperatur (18–25 °C) eller ved 10–25 °C dersom T-Cell <i>Xtend</i>-reagenset blir brukt. Må ikke oppbevares i kjøleskap eller fryses.</p>	<p>1. Blodprøvene kan tas i en rekke forskjellige rør. På våre laboratorier har vi med hell brukt Vacutainer citrat-CPT, heparin-CPT, standard heparin- eller citratrør. CPT-rør er ikke egnet til bruke med T-Cell <i>Xtend</i>-reagenset.</p> <p>EDTA-rør anbefales ikke.</p>
<p>2. Ved bruk av CPT-blodprøverør følges produsentens instruksjoner for separasjon av PBMC-er.</p> <p>Ved bruk av Vacutainere som inneholder heparin, eller citrat blodprøvetakings-metoder, separer PBMC-ene ved sentrifugering på Ficoll-Paque Plus ved bruk av angitte fremgangsmåter.</p> <p>Dersom det brukes Leucosep-rør, T-celle <i>Select</i>-reagenssettet eller T-Cell <i>Xtend</i>-reagenset (tilgjengelig fra Oxford Immunotec), skal veiledningene som er vedlagt disse reagensene følges.</p>	<p>2. Sentrifuger 8 mL CPT-rør ved 1600xg i 28 min eller 4 mL CPT-rør ved 1800xg i 30 min. ved 18 °C dersom en sentrifuge med kjøling er tilgjengelig. Sørg for å få temperaturen opp til 18 °C dersom sentrifugen tidligere er brukt ved lavere temperatur. Dersom det brukes en sentrifuge uten kjøling, må en forsikre seg om at temperaturen ikke kommer over 25 °C.</p> <p>Alternativt, fortynn blodet med et tilsvarende volum RPMI 1640-medium. Legg forsiktig det fortynnede blodet lagvis (2–3 volumer) på Ficoll-Paque Plus (1 volum) og sentrifuger ved 1000xg i 22 min. mens temperaturen holdes mellom 18 og 25 °C.</p> <p>Dersom prøvene er mellom 8 og 32 timer etter venepunksjon, brukes T-Cell <i>Xtend</i>-reagenset før prøven legges lagvis på Ficoll-Paque-Plus.</p> <p>For prøver lagret i opptil 54 timer etter venepunksjon, bruk protokollen som følger med T-Cell <i>Select</i>-reagenssettet.</p> <p>Kalkulator for sentrifugehastigheter på CD'en som følger med testsettet kan hjelpe til med å regne om hastigheter i xg til omdreininger per minutt (rpm).</p> <p>Dersom andre PBMC-separasjonsmetoder benyttes, må disse godkjennes av kunden for bruk med T-SPOT.TB-testen.</p>

Prosedyre	Merknader
3a. Samle opp det hvite, uklare båndet med PBMC-er ved hjelp av en pipette, og overfør til et konisk sentrifugeringsrør på 15 mL. Fyll opp volumet til 10 mL med cellekulturmedium.	3a. En rekke medier kan brukes til å vaske cellene under denne prosessen. Våre laboratorier har brukt både AIM-V og RPMI 1640 med hell og kan anbefale disse.
3b. Alternativt kan en cellevaskesentrifuge, for eksempel DiaCent-CW (Bio-Rad), kan anvendes for å forenkle cellevasketrinnene. Dersom dette systemet benyttes, skal DPBS brukes for å vaske cellene.	3b. Metodikken for bruk av cellevaskesentrifugen under fremstillingen av PBMC vil være tilgjengelig fra Oxford Immunotec. Imidlertid må kundene validere denne metoden i sine egne laboratorier.
4. Sentrifuger ved 600 x g i 7 min. Hell av supernatant, og resuspender pelleten i 1 mL medium.	4. Se 3a. ovenfor.
5. Fyll opp volumet til 10 mL med ferskt medium, og sentrifuger ved 350 x g i 7 min.	5. Se 3a. ovenfor.
6. Hell av supernatant og resuspender pelleten i 0,7 mL AIM-V kulturmedium.	6. På dette stadiet bør kulturmediet brukes til inkubering over natten for å resuspendere pelleten. Våre laboratorier har brukt det serumfrie mediet AIM-V med hell, og anbefaler dette sterkt.

T-celler som er tatt fra andre kroppsvæsker slik som bronkoalveolær lavage (BAL), pleuravæske (PE) eller cerebrospinalvæske (CSF) har gitt gode resultater med T-SPOT.TB-test for å identifisere TB-infeksjon og sykdom (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). Dersom det brukes andre prøver enn blodprøver må brukerne validere prosedyren for innsamling av tilstrekkelig mengde mononukleære celler. Metoder for behandling av BAL-prøver er beskrevet i publikasjonene i referansene ovenfor.

Anm. 1: Avslutning for et positivt resultat og gyldige kontroller for testen ved bruk av andre prøver enn blodprøver er ikke blitt tilstrekkelig evaluert og kan være forskjellig fra blodtester. Brukere bør definere deres tolkningskriterier for testen. Klinikere bør bruke deres vurderingsevne når resultatene gjennomgås.

Anm. 2: Tidsintervall mellom prøvetaking og start på analysen er ikke blitt tilstrekkelig studert.

Celletelling og fortykning

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

Prosedyre	Merknader
1. Utfør telling av levedyktige celler.	1. Cellene kan telles ved hjelp av en rekke metoder, inkludert manuell telling ved bruk av trypanblått og et hemocytometer eller automatisert telling ved bruk av et egnet instrument.
2. For en rask telling med et Neubauer hemocytometer tilsettes 10 µL av den endelige celleduspensjonen til 40 µL 0,4 % (w/v) trypanblå løsning. Plasser en egnet alikvot på hemocytometeret, og tell cellene i rutenettet. Følg produsentens instruksjoner ved bruk av andre typer hemocytometere eller automatisk utstyr.	2. Pass på at celleduspensjonen blir grundig blandet umiddelbart før alikvotene fjernes for fortykning eller telling. Cellene kan utfelles nederst i røret og føre til at celleantallet feiltolkes.
3. Beregn konsentrasjonen av levedyktige celler som er til stede i grunncelleduspensjonen.	3. Pass på at beregningen er riktig for celledellingssystemet som brukes, siden bruk av enten for få eller for mange celler kan føre til at resultatene tolkes feil. T-SPOT cellefortynningskalkulatoren på CD'en som følger med hvert testsett vil lette denne beregningen.
4. Tilbered 500 µL av den endelige celleduspensjonen ved en konsentrasjon på $2,5 \times 10^5$ celler/100 µL.	4. Pass på at cellene telles grundig før du fjerner en alikvot til fortykning.

Plateoppsett og inkubasjon

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

- Nullkontroll
- Panel A
- Panel B
- Positiv kontroll

Prosedyre	Merknader
1. Fjern de ferdigbelagte 8-brønners strips fra forpakningen, klem inn i platerammen og la dem oppnå romtemperatur	1. Fjern kun det nødvendige antall strips og returner de resterende til oppbevaring. Klem strips som skal brukes inn i en tom plateramme med underdeksel og lokk. Rammer, deksler og lokk bør oppbevares og brukes om igjen.

Prosedyre	Merknader
<p>2. Til hver pasientprøve brukes 4 individuelle brønner.</p> <p>(i) Tilsett 50 µL AIM V kulturmedium til hver nullkontrollbrønn.</p> <p>(ii) Tilsett 50 µL panel A-løsning i hver brønn som skal brukes.</p> <p>(ii) Tilsett 50 µL panel B-løsning i hver brønn som skal brukes.</p> <p>(iv) Tilsett 50 µL positiv kontrolløsning i hver brønn for cellefunksjonalitetskontroll.</p>	<p>2. Ikke la pipetten berøre membranen. Fordypningene som pipettespisser kan gi membranen, kan produsere artefakter i brønnene.</p> <p>Det kan være nødvendig å banke forsiktig på platen for å sikre at løsningene dekker membranen i bunnen av hver brønn. Kraftig risting må unngås, ellers kan det oppstå krysskontaminering av antigenene mellom brønnene.</p>
<p>3. Tilsett 100 µL (med 250 000 levedyktige celler) av pasientens endelige celleduspensjon i hver av de 4 brønnene som skal brukes til pasientprøven.</p>	<p>3. Pipetter celleduspensjonen forsiktig opp og ned for å sikre grundig blanding før hver alikvot på 100 µL fjernes.</p> <p>Vi anbefaler bruk av ny spiss hver gang pasientceller tilsettes, slik at krysskontaminering mellom de 4 brønnene unngås.</p>
<p>4. Inkuber platen i en fuktet inkubator ved 37 °C med 5 % CO₂ i 16–20 timer.</p>	<p>4. Ikke berør platen når den er i inkubatoren. Ikke stable plater oppå hverandre. Det kan føre til ujevn temperaturfordeling og ventilasjon. Hvis ikke anbefalt inkubasjonstid og betingelser overholdes, kan resultatene feiltolkes. Kontroller at inkubatoren har nok vann til å opprettholde fuktigheten i hele inkubasjonstiden.</p>

Punktutvikling og telling

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

Prosedyre	Merknader
<p>1. Fjern platen fra inkubatoren.</p>	<p>1. Dersom det oppstår en uunngåelig forsinkelse i behandlingen, som for eksempel et ressursspørsmål løpet av en helg, kan platene fjernes fra inkubatoren og oppbevares ved 2 °C- 8 °C. Maksimal anbefalt lagringstid er 72 timer og platene skal være tildekket under lagring. Kunden skal godkjenne denne prosessen i sitt eget laboratorium.</p>
<p>2. Kast cellekulturmediet og tilsett 200 µL D-PBS-løsning i hver brønn.</p>	<p>2. Fjern substratløsningen fra settet og la den nå romtemperatur.</p>
<p>3. Kast PBS-løsningen. Gjenta brønnvaskingen 3 ganger med ny D-PBS-løsning for hver vask.</p>	<p>3. Kast all D-PBS fra siste vasketrinn ved å forsiktig snu platen på absorberende papir før du går videre.</p>

Prosedyre	Merknader
4. Fortynn konsentrert konjugatreagens 200 ganger i D-PBS for å lage en løsning med bruksstyrke.	4. Ikke bruk D-PBS som inneholder Tween® eller andre rensemidler, da dette forårsaker høye bakgrunnstillinger. Påse at kun et lite overskudd (for å tillate spill) av løsningen med bruksstyrke tilberedes. For T-SPOT. <i>TB 8</i> og for hver 8-brønners strip (hver brønn krever 50 µL) tilberedes 500 µL løsning med bruksstyrke ved å tilsette 2,5 µL av konsentrert konjugatreagens til 497,5 µL D-PBS. Konjugatfortynnings-kalkulator på CD som følger med hvert testsett kan brukes til utregningen.
5. Tilsett 50 µL konjugatreagensløsning i bruksstyrke i hver brønn og inkuber ved 2–8 °C i 1 time.	5. Hvis ikke anbefalt inkubasjonstid overholdes, kan resultatene feiltolkes.
6. Kast konjugatet og utfør fire D-PBS-vaskinger, som forklart i trinn 2 og 3 ovenfor.	
7. Tilsett 50 µL substratløsning i hver brønn, og inkuber ved romtemperatur i 7 min.	7. Hvis ikke anbefalt inkubasjonstid overholdes, kan resultatene feiltolkes.
8. Vask platen grundig med destillert eller avionisert vann for å stanse påvisningsreaksjonen.	
9. Tørk platen ved å sette den i et godt ventilert område eller en ovn ved opptil 37 °C.	9. Punkter blir mer synlige etter som platen tørker. La det tørke i 4 timer ved 37 °C eller over natten i romtemperatur.
10. Tell og registrer antallet tydelige, mørkeblå punkter på membranen til hver brønn. Bruk kriteriene for tolking av resultater og tester (se nedenfor) for å bestemme om en pasientprøve er "positiv" eller "negativ" for TB-antigen.	10. Punktene kan visualiseres ved hjelp av en rekke metoder, inkludert manuell bruk av håndholdt forstørrelsesglass, ved bruk av et egnet mikroskop, et digitalt mikroskop eller ved bruk av en egen ELISPOT plate bildeanalysator. En opplæringsveiledning for punkttelling (T-SPOT. <i>Tutor</i> -programme) kan lastes ned fra Oxford Immunotec's hjemmeside.

Kvalitetskontroll

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

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

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

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

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

Tolkning av resultater og testkriterier

Se informasjonen under Kvalitetskontroll før bruk av følgende kriterier.

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

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

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

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

Ytelsesegenskapene til testen

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











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

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

Referanseliste

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

Oversikt over symboler

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

Kontaktinformasjon

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

For produktsupportnedlastinger og annen teknisk informasjon, gå til nettstedet vårt:
www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT, T-Cell *Xtend* og Oxford Immunotec-logoen er registrerte varemerker for Oxford Immunotec Limited.

T-Cell *Select* er et varemerke for Oxford Immunotec Limited.

AIM-V og GIBCO er varemerker for Life Technologies Corporation.

CPT og Vacutainer er varemerker for Becton, Dickinson and Company.

Ficoll and Ficoll-Paque er registrerte varemerker for Cytiva, en tilknyttet part av Global Life Sciences Solutions USA LLC.

Tween er et varemerke for Croda Americas LLC.

Bruken av T-Cell *Xtend*-reagenset er beskyttet av følgende patenter og anmeldte patenter:
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Revisjonsnummer: 4 Utgivelsesdato: Juni 2022
© 2022 Oxford Immunotec. Med enerett.

🏢 Produsent

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

 EU-autorisert representant

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