

# T-SPOT<sup>®</sup>.TB



Hjälpmedel vid diagnos av tuberkulosinfektion

## BIPACKSEDEL

För diagnostisk undersökning *in vitro*

Denna bipacksedel omfattar användning av:

T-SPOT.TB 8 (format 8-radsplatta för flergångsbruk. Katalognummer: TB.300)

## **Innehållsförteckning**

Avsedd användning	2
Introduktion	2
Princip	2
Begränsningar	3
Säkerhetsvarningar och försiktighetsåtgärder	4
Inkluderat material	4
Förvaring	4
Stabilitet	4
Utrustning och material som måste köpas separat	5
Beredning av reagenser	5
Procedur	6
Provtagning och preparering	6
Räkning och spädning av celler	8
Förberedelse av platta och inkubering	9
Utveckling och räkning av prickar	10
Kvalitetskontroll	11
Resultattolkning och testkriterier	11
Testets resultategenskaper	12
Referenser	12
Ordlista över symboler	12

### Avsedd användning

Testet T-SPOT®.TB är ett diagnostiskt *in vitro*-test som används vid upptäckt av effektor-T-celler som reagerar på stimulering med antigener mot *Mycobacterium tuberculosis* och är avsett att användas som hjälpmedel vid diagnos av tuberkulosinfektion (TB). Testet T-SPOT.TB är en förenklad enzymkonjugerad immunospot-metod (ELISPOT) som räknar individuella, TB-specifika, aktiverade effektor-T-celler.

### Introduktion

WHO uppskattar att en tredjedel av världens befolkning är infekterad av *M. tuberculosis*. Varje person som bär på en latent TB-infektion (LTBI) har cirka 10 % chans att utveckla en aktiv sjukdom. Denna progressionsfrekvens är förhöjd i vissa grupper, bl.a. dem som nyligen har blivit infekterade och de som har ett försvagat immunförsvar.

Immunreaktionen mot *M. tuberculosis* är huvudsakligen en cellmedierad immunreaktion (CMI). Som en del av denna reaktion blir T-cellerna känsliga för antigenerna mot *M. tuberculosis*. Aktiverade effektor-T-celler, både CD4 och CD8, som speciellt separerats från blod kan räknas med hjälp av deras förmåga att stimuleras *in vitro* med dessa antigener<sup>1,2</sup>. Användningen av utvalda antigener för sammansättningen *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) förbättrar testets specificitet för dessa organismer genom att minska korsreaktiviteten mot BCG-vaccinet och mot de flesta mykobakterier<sup>3,4</sup> som finns i den dagliga miljön. Två separata paneler med antigener som simulerar de välkarakteriserade proteinerna ESAT-6 och CFP10 används för att optimera testets känslighet.

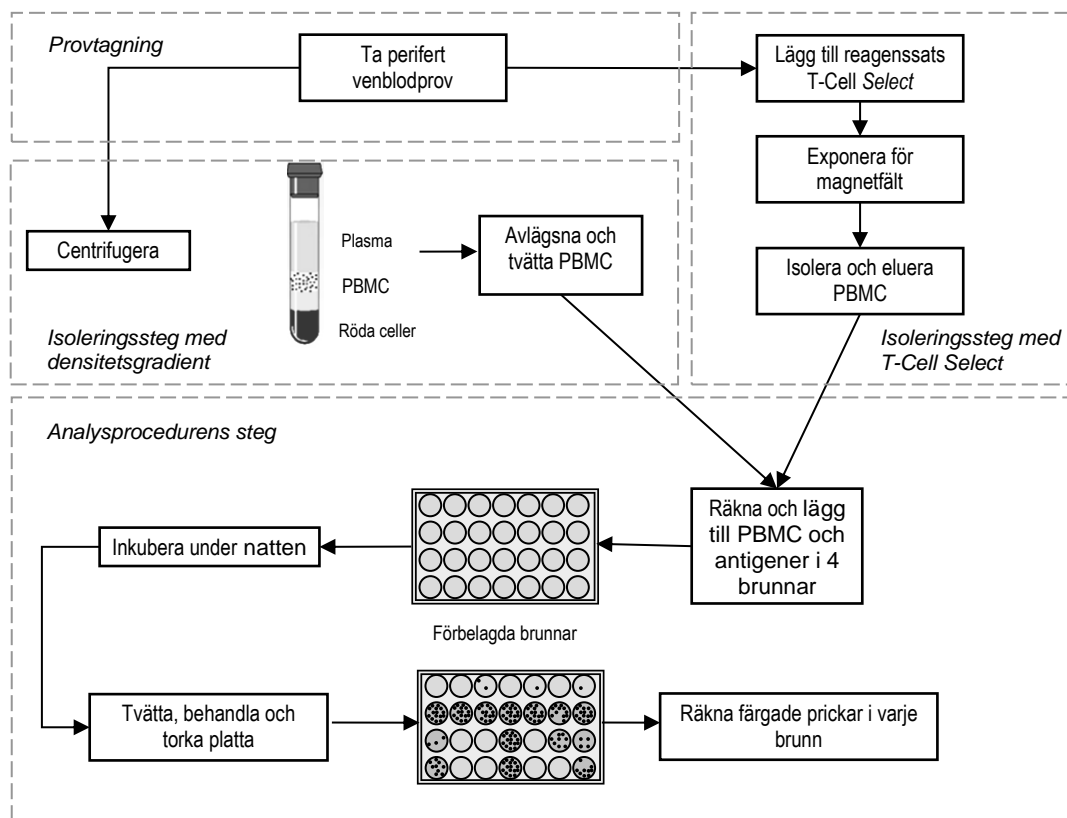
Testet T-SPOT.TB är en förenklad variant av ELISPOT-testtekniken. ELISPOT-tester är extremt känsliga eftersom cytokin fångas upp direkt runt den utsöndrande cellen, innan den späds ut i supernatanten och fångas av närliggande cellreceptorer eller degraderas. ELISPOT-tester är därför mycket känsligare än vanliga ELISA-tester<sup>5</sup>. Testet T-SPOT.TB är utformad för detektion av effektor-T-celler som reagerar på stimulering med antigener specifika för *M. tuberculosis*<sup>3,4,6-9</sup>. Testet räknar individuella, aktiverade, TB-specifika, T-celler. Den kan användas på alla patienter som befinner sig i riskzonen för LTBI eller vid misstanke om TB<sup>10,11</sup>, oavsett ålder, kön, etnicitet, terapi eller immunstatus.

### Princip

Perifera mononukleära blodkroppar (PBMC) separeras från helblodsprov och tvättas för att avlägsna källor av interfererande substanser i bakgrunden. Blodkropparna räknas så att ett standardiserat antal blodkroppar används i testet. Detta säkerställer att även de som har låg koncentration av T-celler på grund av försvagat immunförsvar (immunkomprometterade och immunsuppressiva) får ett lämpligt antal blodkroppar tillsatta i mikrotiterbrunnarna. Såväl tvätt- och räkningsstadierna som ELISPOT-tekniken är överlägsna vid detektion av TB-sjukdomar och latent TB-infektioner.

Fyra brunnar (se Figur 1) krävs för varje prov:

1. Nollkontroll som identifierar icke-specifik cellaktivering.
2. TB-specifika antigener, panel A (ESAT-6).
3. TB-specifika antigener, panel B (CFP10).
4. En positiv kontroll som innehåller phytohaemagglutinin (PHA, polyklonal aktivering<sup>12</sup>) som bekräftar funktionaliteten hos PBMC.



Figur 1: De viktigaste stegen i testet T-SPOT.TB. Lägg märke till att varje platta innehåller 96 brunnar.

PBMC inkuberas med antigenerna så att de känsliga T-cellerna som finns närvarande stimuleras. Cytokinet som utsöndras fångas upp av särskilda antikroppar på membranet, som utgör brunnens botten, och cellerna och annat oönskat material avlägsnas genom tvätt. En andra antikropp, konjugerad till alkalisk fosfat och riktad mot en annan epitop på cytokinmolekylen, läggs till och binds till cytokinet som fångats upp på membranets yta. Alla obundna konjugat avlägsnas genom tvätt. Ett lösligt substrat läggs i varje brunn. Detta klyvs av det bundna enzymet och formar en prick med olöslig utfällning vid reaktionplatsen. Varje prick representerar ett avtryck av en individuell T-cell som utsöndrar cytokin. Utvärderingen av antalet prickar ger en uppfattning om mängden effektor-T-celler som är känsliga mot *M. tuberculosis* i det perifera blodet.

### Begränsningar

- Endast avsedd för diagnostisk *in vitro*-undersökning.
- Endast avsedd för professionell användning.
- Blanda inte komponenter från olika utrustningssatser.
- Läs testinstruktionerna noggrant innan användning.
- Använd en aseptisk teknik för att undvika nedsmittning av reagens, testbrunnar, cellsuspensioner och cellodlingsmedia.
- Variation av den angivna pipetteringen och tvätteknikerna, inkuberingstiderna och/eller temperaturerna kan påverka de verkliga resultaten och bör undvikas.
- Blodet bör samlas och tas till test inom 8 timmar. Denna tidsbegränsning kan kringgåas genom användning av T-Cell Select™ reagenssats eller T-Cell Xtend® reagens (kan beställas från Oxford Immunotec). När T-Cell Select reagenssatsen används med testet T-SPOT.TB, förlängs förvaringstiden för proverna till 54 timmar och cellisoleringsprocessen kan automatiseras. När T-Cell Xtend reagens, eller annan metod för avlägsnande av granulocyt, används tillsammans med testet T-SPOT.TB, förlängs förvaringstiden för proverna till 32 timmar.

- Förvara och transportera blodprov till laboratoriet i rumstemperatur (18-25 °C), inklusive blodprov som används med T-Cell *Select* reagenssats. Om T-Cell *Xtend* reagens används kan proverna transporteras och förvaras vid 10-25 °C. Kyl eller frys inte ned hela blodprov.
- Testet T-SPOT.*TB* ska användas och tolkas endast i relation till den kliniska översikten.
- Ett negativt testresultat utesluter inte möjligheten att ha utsatts för eller infekterats med *M. tuberculosis*.
- Antigenerna ESAT-6 och CFP10 är obefintliga i BCG-stammen och i de flesta mykobakterier som finns i den dagliga miljön, med undantag för *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*<sup>3,4</sup> och *M. goodii*.

### Säkerhetsvarningar och försiktighetsåtgärder

Material av humant ursprung ska hanteras varsamt. Alla blodprov ska betraktas som potentiellt smittbärande.

Hantering av blodprov och testkomponenter, deras användning, lagring och destruktion ska ske enligt de procedurer som beskrivs i lämpliga nationella säkerhetsföreskrifter eller regleringar för biologiska ämnen.

Försiktighet ska iakttas vid arbete med kemikalier. Alla kemikalier ska betraktas som potentiellt farliga.

### Inkluderat material

T-SPOT.*TB* 8 innehåller:

1. 1 mikrotiterplatta (CW.300): 96 brunnar, levererade som 12 x 8-brunnsrader i en ram, belagda med en monoklonal musantikropp mot cytokinet interferon-gamma (IFN-g).
2. 2 små flaskor (PA.300, 0,8 mL var). Panel A: innehåller ESAT-6-antigener, bovint serumalbumin och antimikrobiella medel.
3. 2 små flaskor (PB.300, 0,8 mL var). Panel B: innehåller CFP10-antigener, bovint serumalbumin och antimikrobiella medel.
4. 2 små flaskor (CP.300, 0,8 mL var). Positiv kontroll: innehåller phytohemagglutinin (PHA) som ska användas som cellfunktionskontroll, bovint serumalbumin och antimikrobiella medel.
5. 1 liten flaska (CR.300, 50 µL) 200x koncentrerat konjugatreagens: monoklonal musantikropp mot cytokinet IFN-g konjugerat med alkaliskt fosfat.
6. 1 flaska (SR.300, 25 mL) substratlösning: BCIP/NBT<sup>plus</sup>-lösning som är klar att använda.
7. Bruksanvisning som finns på CD:n tillsammans med MSDS, Instruktion, T-SPOT cellspädningsomräknaren, konjugatspädningsomräknaren, centrifughastighetsomräknaren och programmet T-SPOT.*AutoReporter*.

### Förvaring

Förvara alla komponenter vid 2-8 °C.

Undvik långvarig ljusexponering av substratlösningen.

### Stabilitet

Blanda inte komponenter från olika utrustningssatser. Förvara den öppnade satsen vid 2-8°C. Satsens komponenter är stabila fram till det utgångsdatum som anges på förpackningen om de förvaras och hanteras enligt rekommendationerna. Satsen får inte användas efter det utgångsdatum som anges.

Förvara öppnade förpackningar vid 2-8 °C. Måste användas inom 8 veckor efter öppnandet.

### Utrustning och material som måste köpas separat

1. Ram till 8-radsplatta (kan beställas från Oxford Immunotec) att användas tillsammans med en T-SPOT. *TB* 8-sats.
2. Mikrobiologiskt skåp, klass II (rekommenderas).
3. Rör för venprovtagning, till exempel Vacutainer® CPT™ (kan beställas från Oxford Immunotec), hepariniserade rör eller rör med tillsats av citrat.
4. Ficoll®-Paque\* Plus eller annat material som separerar PBMC.
5. T-Cell *Xtend* reagens (kan beställas från Oxford Immunotec) kan användas tillsammans med prover som tagits upp till 32 timmar efter venpunktion. T-Cell *Select* reagenssats (kan beställas från Oxford Immunotec) kan användas tillsammans med prover som tagits upp till 54 timmar efter venpunktion. Alternativa metoder för avlägsnande av granulocyt kan användas för prover som förvarats i upp till 32 timmar. Kunderna måste validera alternativa metoder i sina egna laboratorier.
6. Leucosep-rör kan användas för att förenkla separeringen av PBMC med användning av Ficoll\*-metoden.
7. Centrifug för preparering av PBMC (kapabel för minst 1 800 x g och kan hålla proverna i rumstemperatur (18-25 °C)).
8. En centrifug för celltvätt kan användas vid preparering och tvättning av PBMC som separerats, till exempel en DiaCent-CW-centrifug (Bio-Rad). Kunderna måste validera användningen av sådan utrustning i sina egna laboratorier.
9. Utrustning och reagens för att möjliggöra räkning av PBMC, antingen manuellt med trypanblått och en hemocytometer i mikroskop, eller automatiskt med lämplig hematologianalys.
10. En fuktig kuvös med temperaturen  $37 \pm 1$  °C med en 5 % tillförsel av CO<sub>2</sub>.
11. En tvättare för mikrotiterplattor eller utrustning för manuell tvätt av plattor.
12. Pipetter och sterila pipettspetsar.
13. Steril D-PBS-lösning: till exempel GIBCO® 1x D-PBS (Invitrogen, katalognummer 14040-091).
14. Destillerat eller avjoniserat vatten.
15. Anordning för avläsning av plattan, som till exempel ett mikroskop, ett digitalt mikroskop, ett förstoringsglas eller en plattavbildare.
16. Sterilt cellodlingsmedium, som exempelvis GIBCO AIM-V® (Invitrogen, katalognummer 31035-025): Vi rekommenderar användning av detta serumfria medium för inkuberingssteget. RPMI 1640 (Invitrogen, katalognummer 21875-034) kan endast användas i den initiala provförebereidelsen. Vi rekommenderar att cellodlingsmedia förvaras i lämpliga alikvoter och att överblivet material kasseras efter användning. Cellodlingsmedia ska förvärmas till 37 °C innan de används med testet T-SPOT. *TB*.

### Beredning av reagenser

1. Mikrotiterplatta. T-SPOT. *TB* 8-radsplatta levereras bruksfärdig. Ta fram det antal rader som behövs och låt dem anta rumstemperatur. Återförslut de resterande raderna i den yttre folieförpackningen och inkludera påsen med torkmedel.
2. De medföljande små flaskorna med antigenen *M. tuberculosis* ESAT-6 (panel A) är klara att användas.
3. De medföljande små flaskorna med antigenen *M. tuberculosis* CFP10 (panel B) är klara att användas.
4. De medföljande små flaskorna med positiv kontroll är klara att användas.
5. Preparera en 1:200-spädning av fungerande konjugatreagenslösning. Beräkna volymen fungerande konjugatreagenslösning (se T-SPOT konjugatspädningskalkylator på CD:n som medföljer varje testsats). Reagensen kan prepareras precis innan användning eller beredas till den fungerande koncentrationen (1:200) och förvaras i upp till sex veckor vid 2 °C–8 °C före användning. Använd inte den utspädda reagensen efter denna förvaringstid.
6. Den medföljande substratlösningen är klar att användas. Ta fram den från förrådet och låt den anta rumstemperatur.

## Procedur

Testet ska utföras enligt principerna om god laboratorierutin och genom att noggrant följa denna bruksanvisning.

Oxford Immunotec Ltd har förberett en instruktion som beskriver provtagning och preparering av prov, urval av cellodlingsmedia och metoder för beräkning av prickar. Denna finns på CD:n som medföljer varje testsats och kan beställas på +44 (0) 1235 442780 eller laddas ned från [www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com).

## Provtagning och preparering

Enskilda användare bör validera procedurerna för insamling av PBMC, räkning av PBMC och val av lämpliga media som förstärker T-cellernas funktionalitet under testets primära inkuberingssteg. Normalt (patient med normalt fungerande immunförsvar) kan man erhålla tillräckligt med PBMC för testet från venösa blodprov enligt följande riktlinjer:

- Vuxna och barn över 10 år: ett 8 mL eller två 4 mL CPT-rör eller ett 6 mL heparin- eller citratrör
- Barn mellan 2 och 9 år: ett 4 mL CPT-, heparin, eller citratrör
- Barn upp till 2 år: ett 2 mL pediatrikt rör

Blodproven måste förvaras i rumstemperatur och testats inom 8 timmar efter provtagningen eller inom 32 timmar och förvaras vid 10-25 °C om T-Cell *Xtend* reagens används eller inom 54 timmar och förvaras vid 18–25 °C om T-Cell *Select* reagenssats används.

Cellodlingsmedia ska förvärmas till 37 °C innan de används med testet T-SPOT.TB.

Procedur	Anteckningar
1. Ta ett blodprov enligt instruktionerna på provtagningsenheten. Förvara blodprovet i rumstemperatur (18-25 °C) eller 10-25 °C om T-Cell <i>Xtend</i> reagens ska användas. Blodprovet får inte kylas eller frysas.	1. Blodproven kan samlas i flera olika rör. I våra laboratorier har vi med gott resultat använt Vacutainer CPT med citrat, CPT med heparin och vanliga heparin- eller citratrör. CPT-rör är inte lämpliga för användning med T-Cell <i>Xtend</i> reagens.  EDTA-rör rekommenderas inte.

Procedur	Anteckningar
<p>2. Vid användning av venprovtagningsrör CTP ska tillverkarens instruktioner för separering av PBMC följas.</p> <p>Vid användning av andra Vacutainer-rör för blodprovtagning som innehåller heparin eller citrat ska PBMC separeras med centrifugering genom Ficoll-Paque Plus med hjälp av beskrivningen.</p> <p>För Leucosep-rör, T-Cell <i>Select</i> reagenssats eller T-Cell <i>Xtend</i> reagens (kan beställas från Oxford Immunotec) används protokollen som följer med dessa reagens.</p>	<p>2. Centrifugera 8 mL CPT-rör vid 1 600 x g under 28 minuter eller 4 mL CPT-rör vid 1 800 x g under 30 minuter vid 18 °C om en kyld centrifug finns tillgänglig. Låt centrifugen komma upp i 18 °C om lägre temperaturer har använts tidigare. Om en centrifug utan kyl används, kontrollera att temperaturen inte överstiger 25 °C.</p> <p>Alternativt kan blodet spädas med lika volym RPMI 1640 medium. Skikka försiktigt det utspädda blodet (2-3 volymer) på Ficoll-Paque Plus (1 volym) och centrifugera vid 1 000 x g under 22 minuter samtidigt som temperaturen hålls mellan 18 och 25 °C.</p> <p>För prover mellan 8 och 32 timmar efter venpunktion används T-Cell <i>Xtend</i> reagens innan skiktning av prover ovanpå Ficoll-Paque-Plus.</p> <p>För prover som lagras upp till 54 timmar efter venpunktion används protokollet som följer med T-Cell <i>Select</i> reagenssats.</p> <p>Centrifughastighetsomräknaren på CD:n som medföljer testsatsen kan vara till hjälp vid konvertering av hastigheter från x g till rpm.</p> <p>Vid användning av andra metoder för separation av PBMC måste dessa valideras av kunden för användning med testet T-SPOT. <i>TB</i>.</p>
<p>3a. Ta upp den vita, grumliga samlingen PBMC med en pipett och för över den till ett koniskt 15 mL centrifugeringsrör. Kompensera volymen till 10 mL med cellodlingsmediumet.</p> <p>3b. Alternativt kan en centrifug för celltvätt t.ex. DiaCent-CW (Bio-Rad) användas för att underlätta celltvättstegen. Om detta system används bör DPBS användas för att tvätta cellerna.</p>	<p>3a. Flera olika media kan användas vid celltvätten under denna process. I våra laboratorier har vi med gott resultat använt både AIM-V och RPMI 1640, vilka vi rekommenderar.</p> <p>3b. Metoden för användning av centrifug för celltvätt under preparering av PBMC finns att beställa från Oxford Immunotec. Kunderna måste dock validera denna metod i sina egna laboratorier.</p>
<p>4. Centrifugera vid 600 x g under 7 minuter. Häll bort supernatanten och lös upp pelleten igen i 1 ml medium.</p>	<p>4. Se punkt 3a ovan.</p>
<p>5. Kompensera volymen till 10 mL med färskt medium och centrifugera vid 350 x g under 7 minuter.</p>	<p>5. Se punkt 3a ovan.</p>
<p>6. Häll bort supernatanten och suspendera pelleten igen i 0,7 mL AIM-V kulturmedium.</p>	<p>6. I det här stadiet ska odlingsmediet för inkubering över natten användas för att suspendera pelleten igen. I våra laboratorier har vi med gott resultat använt det serumfria mediet AIM-V, vilket vi rekommenderar.</p>



T-celler som erhållits från andra kroppsvätskor såsom bronkoalveolärt lavage (BAL), pleuralutgjutning (PE) eller cerebrospinalvätska (CSF) har med framgång använts tillsammans med T-SPOT.TB-testet för att identifiera TB-infektion och sjukdom (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 och Patel *et al* (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77). Om andra prover än blodprover används, måste användarna validera procedurerna för insamling av tillräckligt antal mononukleära celler. Metoder för behandling av BAL-prover beskrivs i de publikationer som anges ovan.

Anmärkning 1: Brytpunkten för positivt resultat och giltiga kontroller för testet vid användning av andra prover än blodprover har inte utvärderats så utförligt och kan skilja sig från blodprovet. Användarna bör definiera sina kriterier för testtolkning. Läkare bör använda sitt omdöme vid granskning av resultaten.

Anmärkning 2: Tiden från provtagning tills testet påbörjas har inte studerats utförligt.

### Räkning och spädning av celler

Testet T-SPOT.TB kräver  $2,5 \times 10^5$  viabla (livskraftiga) PBMC per brunn. Det behövs totalt fyra brunnar för varje patientprov. Rätt antal celler måste läggas i varje brunn. Om detta inte följs kan resultatet tolkas felaktigt.

Procedur	Anteckningar
1. Räkna antalet viabla celler.	1. Cellerna kan räknas med flera olika metoder, inklusive manuell räkning med trypanblått och en hemocytometer, eller automatiskt med lämpligt instrument.
2. Vid manuell räkning med Neubauer hemocytometer ska 10 µL av den slutliga cellsuspensionen läggas till 40 µL 0,4 % (viktpcent) trypanblått. Pipettera en lämplig mängd på hemocytometern och räkna cellerna i rutnätet. För andra typer av hemocytometrar och för automatiska enheter ska tillverkarens instruktioner följas.	2. Var noggrann med att cellsuspensionen blandas grundligt precis innan alikvoterna avlägsnas för spädning eller räkning. Celler kan lägga sig i botten av röret, vilket kan leda till att det korrekta antalet celler misstolkas.
3. Räkna koncentrationen av de viabla cellerna som finns i cellsuspensionen.	3. Kontrollera att räkningen är rätt enligt det cellräkningssystem som används eftersom både ett underskott och ett överskott av celler kan leda till att resultatet misstolkas. T-SPOT cellspädningsomräknare på CD:n som medföljer varje testsats underlättar denna beräkning.
4. Preparera 500 µL av $2,5 \times 10^5$ celler/100 µl av den slutliga cellsuspensionen.	4. Se till att cellerna blandas ordentligt innan spädning.

### Förberedelse av platta och inkubering

Testet T-SPOT. *TB* kräver fyra brunnar till varje patientprov. I varje individuellt prov ska en nollkontroll och en positiv kontroll av cellfunktionen göras. Vi rekommenderar att proverna placeras vertikalt på plattan så som bilden nedan visar.

- Nollkontroll
- Panel A
- Panel B
- Positiv kontroll

Procedur	Anteckningar
1. Ta de belagda raderna ut ur förpackningen, sätt fast i en plattram och får anta rumstemperatur.	1. Ta endast ut det antal remsor som behövs och lägg tillbaka de återstående på förvaring. Sätt fast de remsor som ska användas i en tom plattram försedd med underskydd och lock. Ramar, skydd och lock kan behållas och återanvändas.
2. Varje patientprov kräver 4 individuella brunnar: (i) Tillsätt 50 µL AIM V cellodlingsmedium till varje nollkontrollsbrunn. (ii) Tillsätt 50 µL panel A-lösning till varje önskad brunn. (ii) Tillsätt 50 µL panel B-lösning till varje önskad brunn. (iv) Tillsätt 50 µL lösning som positiv kontroll i varje brunn för cellfunktionskontroll.	2. Pipettspetsen får inte röra vid membranet. Skador på membranet som orsakats av pipettspetsen kan orsaka artefakter i brunnarna.  Det kan vara nödvändigt att försiktigt knacka på plattan så att lösningarna täcker membranet i botten av alla brunnar. Kraftig omskakning bör undvikas för att minimera korskontamination av antigenerna mellan brunnarna.
3. I alla 4 brunnarna som ska användas till ett patientprov ska 100 µl av patientens slutliga cellsuspension (innehållande 250 000 viabla celler) tillsättas.	3. Pipettera cellsuspensionen försiktigt upp och ned så att allt blandas ordentligt innan varje alikvot på 100 µL avlägsnas.  Vi rekommenderar att en ny spets används vid varje tillsättning av varje patients celler för att undvika korskontamination mellan de 4 brunnarna.
4. Inkubera plattan i en fuktig inkubator med 37 °C och med 5 % CO <sub>2</sub> under 16-20 timmar.	4. Undvik att röra plattan när den befinner sig i inkubatorn. Stapla inte plattorna eftersom detta kan leda till ojämn temperatur och ventilation. Om de rekommenderade inkuberingsförhållandena inte följs kan detta leda till felaktig tolkning av resultatet. Kontrollera att inkubatorn innehåller tillräckligt med vatten för att upprätthålla fuktigheten under inkubationsperioden.

### Utveckling och räkning av prickar

Membranet inte röras med pipettspetsen eller den automatiska brunntvättspetsen. Skador på membranet, som orsakats av pipett- eller brunntvättspetsen, kan orsaka artefakter i brunnarna, vilket kan störa räkningen av prickar.

Procedur	Anteckningar
1. Avlägsna plattan från kuvösen.	1. Om en fördröjning av bearbetning inte kan undvikas, t.ex. vid resursproblem över helgen, kan plattorna avlägsnas från inkubatorn och förvaras vid 2–8 °C. Den maximala rekommenderade förvaringstiden är 72 timmar och plattorna bör täckas över under förvaring. Kunden bör validera denna process i sitt eget laboratorium.
2. Kassera cellodlingsmediumet och tillsätt 200 µl D-PBS-lösning i varje brunn.	Ta nu fram substratlösningen från utrustningen och låt den anta rumstemperatur.
3. Kassera D-PBS-lösningen. Repetera tvätten ytterligare 3 gånger med färsk D-PBS-lösning vid varje tvätt.	3. Kassera all D-PBS efter det sista tvättsteget genom att vända plattan på ett absorberande papper innan du fortsätter.
4. Späd koncentrerad konjugatreagens 200 gånger i D-PBS för att skapa konjugatlösning.	4. Använd inte D-PBS som innehåller Tween® eller andra rengöringsmedel eftersom detta orsakar höga bakgrundsvärden. Preparera endast ett litet överskott av konjugatlösningen för att inte slösa med reagens..  För T-SPOT. TB 8 och för varje 8-rad (varje brunn kräver 50 µL) gör du 500 µL konjugatlösning genom att tillsätta 2,5 µL koncentrerat konjugatreagens i 497,5 µL D-PBS. Konjugatspädningsomräknaren på CD:n som medföljer varje testsats kan användas för denna beräkning.
5. Tillsätt 50 µL konjugatlösning i varje brunn och inkubera vid 2-8 °C under 1 timme.	5. Om den rekommenderade inkuberingstiden inte följs kan detta leda till felaktig tolkning av resultatet.
6. Avlägsna konjugatet och utför fyra D-PBS-tvättar enligt stegbeskrivningarna 2 och 3 ovan.	
7. Tillsätt 50 µL substratlösning i varje brunn och inkubera i rumstemperatur under 7 minuter.	7. Om den rekommenderade inkuberingstiden inte följs kan detta leda till felaktig tolkning av resultatet.
8. Tvätta plattan noggrant med destillerat eller avjoniserat vatten så att detekteringsreaktionen stoppas.	
9. Låt plattan torka genom att ställa den på en plats med god ventilation eller i ett värmeskåp med högst 37 °C.	9. Prickarna blir synliga när plattan torkar. Låt den torka under 4 timmar vid 37 °C eller över natten i rumstemperatur.
10. Räkna och registrera antalet tydliga, mörkblå prickar på membranet i varje brunn. Tillämpa resultattolkningen och testkriterierna (se nedan) för att bestämma om patientprovet är "Positivt" eller "Negativt" för TB antigenerna.	10. Prickarna kan ses med hjälp av flera olika metoder, t.ex. manuellt med handhållet förstoringsglas, ett passande mikroskop, ett digitalt mikroskop eller med en ELISPOT-plattavbildare som är avsedd för ändamålet. En utbildningshandbok för prickräkning (programmet T-SPOT. Tutor) kan beställas från Oxford Immunotecs webbsida.

### Kvalitetskontroll

Ett typiskt resultat förväntas ha färre eller inga prickar i nollkontrollen och fler än 20 prickar i den positiva kontrollen.

Om nollkontrollen har fler än 10 prickar räknas den som ogiltig. Se Instruktion för T-SPOT.TB för eventuella orsaker (laddas ner från [www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)). Ytterligare prover ska tas från personen och testas.

Antalet prickar i den positiva kontrollen av cellfunktionen ska vara  $\geq 20$  eller visa mättnadsgraden (för många prickar att räkna). En liten andel patienter kan ha T-celler som visar endast en begränsad reaktion på PHA<sup>13,14</sup>. Om antalet prickar i den positiva kontrollen är  $< 20$  prickar ska den räknas som ogiltig. Om antingenpanel A eller B är "Positiv" enligt beskrivningen i resultattolkning och testkriterier (se nedan) är resultatet giltigt.

På grund av potentiella biologiska och systematiska variationer, där högre delen av (Panel A minus nollkontroll) och (Panel B minus nollkontroll) är 5, 6 eller 7 prickar, kan resultatet betraktas som ett gränsfall (tvetydigt). Gränsfallen (tvetydiga) är, trots att de är giltiga, mindre tillförlitliga än resultat där antalet prickar ligger längre från brytpunkten. Omtestning av patienten med användning av ett nytt prov rekommenderas därför. Om resultatet fortfarande är ett gränsfall (tvetydigt) vid omtestning, måste andra diagnostiska tester och/eller epidemiologisk information användas för att fastställa TB-infektionsstatus för patienten.

Medan antigenerna ESAT-6 och CFP10 är obefintliga i BCG-stammen *M. bovis* och i de flesta mykobakterier som finns i den dagliga miljön, är det möjligt att ett "Positivt" resultat från T-SPOT.TB-testet beror på en infektion med *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* eller *M. goodii*. Alternativa tester krävs om dessa infektioner misstänks.

### Resultattolkning och testkriterier

Se avsnittet om kvalitetskontroll innan följande kriterier tillämpas.

T-SPOT.TB-testresultaten tolkas genom subtraktion av prickräkningen i nollkontrollbrunnen från prickräkningen i var och en av panelerna, enligt följande algoritm.

- Testresultatet är "Positivt" om (panel A minus nollkontroll) och/eller (Panel B minus nollkontroll)  $\geq 6$  prickar.
- Testresultatet är "Negativt" om både (Panel A minus nollkontroll) och (Panel B minus nollkontroll)  $\leq 5$  prickar. Detta inkluderar värden mindre än noll.

**Ett "Positivt" resultat indikerar att provet innehåller effektor-T-celler som är reaktiva mot *M. tuberculosis*.**

**Ett "Negativt" resultat indikerar att provet antagligen inte innehåller effektor-T-celler som är reaktiva mot *M. tuberculosis*.**

### Testets resultategenskaper

**Specificiteten** utvärderades genom test av 93 prover från donatorer som enligt den medicinska historiken och den personliga informationen ansågs befinna sig på lågrisknivå för infektion med *M. tuberculosis*. Specificiteten för testet T-SPOT.TB beräknades som 100 % (93/93) (95 % konfidensgräns 95,8 % - 100 %).











**Känsligheten** utvärderades genom test av 87 prover från odlingar som ansågs vara infekterade med *M. tuberculosis*, inklusive immunkomprometterade grupper. Känsligheten av testet T-SPOT.TB beräknades som 98,8 % (86/87) (95 % konfidensgräns 90,8 % - 99,9 %).

**Reproducerbarheten** utvärderades, som en surrogatmarkör för intertestvariation, genom analys av dubbla blodprover som testades på samma platta. Totalt 145 blodprover från 140 individuella donatorer testades dubbelt (två brunnar för både panel A och panel B) med testet T-SPOT.TB. I 142/145 (97,9 %) dubbelanalyser observerades klinisk överensstämmelse. Två dubbelanalyser gav motsatta gränsvärden och endast 1/145 prov gav avvikande resultat.

### Referenser

1. Janeway and Travers (1996) *Immunobiology* 2<sup>nd</sup> Ed.
2. Staines *et al* (1999) *Introducing Immunology* 2<sup>nd</sup> Ed.
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](http://www.elispot-analyzers.de/english/science-elispot-assays.html)
6. Pathan *et al* (2001) *J. Immunol.*, **167**: 5217-5225.
7. Ewer *et al* (2001) *Lancet*, **357**: 2017-2021.
8. Lalvani *et al* (2001) *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **163**: 824-828.
9. Pathan *et al* (2001) *J. Immunol.*, **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.

### Ordlista över symboler

	Används före/utgångsdatum (år-månad-dag)
	Partinummer
	Katalognummer
	Varning, se användarinstruktioner
	Tillverkare
	Tillräckligt för "n" tester
	Utrustning för diagnostik <i>in vitro</i>
	Temperaturgräns/förvaras mellan
	Se instruktioner för användning
	Auktoriserad representant inom EU

## Kontaktuppgifter

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

Besök vår webbplats för nedladdningsbart produktstöd och ytterligare information:  
[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

T-SPOT, T-Cell *Xtend* och Oxford Immunotecs logotyp är registrerade varumärken som tillhör Oxford Immunotec Limited.

T-Cell *Select* är ett varumärke som tillhör Oxford Immunotec Limited.

AIM V och GIBCO är varumärken som tillhör Life Technologies Corporation.

CPT och Vacutainer är varumärken som tillhör Becton, Dickinson and Company.

Ficoll och Ficoll-Paque är registrerade varumärken som tillhör Cytiva, ett dotterbolag till Global Life Sciences Solutions USA LLC.


Tween är ett registrerat varumärke som tillhör Croda Americas LLC.

Användning av reagenset T-Cell *Xtend* skyddas av följande patent och patentansökningar:  
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

Revisionsnummer: 4   Utfärdandedatum: juli 2022  
© 2022 Oxford Immunotec. Med ensamrätt.

### ■ Tillverkare

Oxford Immunotec Ltd  
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon  
Oxfordshire, OX14 4SE, Storbritannien  
[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

 Auktoriserad representant inom EU

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