T-SPOT.TB

Oxford Immunotec

肺結核輔助診斷檢測套組

PACKAGE INSERT

使 用 說 明

僅供體外診斷用

本說明書內容涵蓋:

T-SPOT.*TB 8* (Multi-use 8-Well Strip Plate Format. Catalogue number: TB.300)

目錄

1. 效能 3

2. 綱要與說明 3

測試原理 4

3. 試劑與保存 6

套組提供的材料 6

保存與穩定性 6

需要但不提供的設備材料 6

4. 警告及注意事項 7

5. 檢體收集與處理 8

6. 使用說明 9

試劑配製 10

細胞計算與稀釋 11

微量滴盤準備與孵育 11

反應點的呈現與計算 13

品質管理 14

結果判讀與檢測標準 14

7. 限制因素 19

8. 期望數值 20

9. 性能特性 21

檢測的性能特性 21

臨床數據概要 23

性能概要 26

10. 疑難排解 36

11. 符號簡寫與詞彙表 37

12. 參考文獻 37

13. 聯絡資料 39

1. 效能

T-SPOT®*TB* 是一種體外診斷檢測法。利用蒐集人類全血於檸檬酸鈉、鈉或鋰肝素抗凝血劑中，藉由捕捉在 T 細胞附近的 γ 干擾素，檢測“效應 T 細胞”受結核分枝桿菌抗原 ESAT-6 與 CFP-10 刺激而起的反應。可應用在輔助結核分枝桿菌感染的診斷。

T-SPOT®*TB* 是結核分枝桿菌感染(與疾病)的間接檢測法，可與風險評估、X 光檢驗及其他醫療診斷評估方法合併使用。

2. 綱要與說明

大約一千五百萬的美國人感染結核分枝桿菌。每個帶有潛伏性肺結核感染(LTBI)的人，約有 10%的機會發展為活動性肺結核。包括近期感染者、出現相關臨床症狀者皆屬從潛伏性肺結核感染發展成活動性肺結核的高危險群。

根據過去經驗，都是用皮膚結核菌素試驗(TST)篩檢肺結核感染。在美國，操作 TST 的方式，是使用 Mantoux 法。Mantoux 皮膚測試是將結核菌素(也稱為純化蛋白衍生物-或簡稱 PPD)注射於前臂皮下。TST 的結果，要在注射過後 48-72 小時判讀；這段間隔時間是等待遲發性過敏反應。注射處硬塊的大小程度以 mm 來量算及記錄。根據接受注射病患的特性，有三種不同的截止點以增加 TST 的特異性。

TST 之外，還有 ELISA 為基礎的測試方法，檢測淋巴細胞受肺結核特異性抗原刺激後所分泌的 γ 干擾素。此法類似 T-SPOT®*TB* 原理，利用 ELISA 技術，計算血液中的 γ 干擾素含量。

T-SPOT®*TB* 是一種體外診斷檢測法，它以酵素連結免疫斑點法(ELISPOT)為基準。它用來計算受 ESAT-6 和 CFP10 抗原刺激而引起反應的效應 T 細胞。除了 M. kansasii、M. szulgai 與 M. marinum 外，ESAT-6 和 CFP10 是不會在卡介苗 (BCG Strains)與其他非結核分枝桿菌中出現。相反的，感染了結核分枝桿菌複合群微生物(M. tuberculosis、M. bovis、M. africanum、M. microti、 M. canetti)的人，通常血液中的 T 細胞可以認知這些抗原(ESAT-6 及 CFP10)及其他分枝桿菌抗原。

T-SPOT®*TB* 在一些高危險群中作為輔助篩檢肺結核之感染。此外，評估疑似有活動性肺結核的病患，也可使用 T-SPOT®*TB* 做為診斷的協助。

測試原理

感染結核分枝桿菌後，藉由刺激 T 細胞而引起免疫反應。T 細胞對結核分枝桿菌抗原相當敏感，受到這些抗原刺激時，活化的 CD4+和 CD8+ T 細胞，會產生細胞激素(cytokine) γ 干擾素。T-SPOT®*TB* 利用酵素連結免疫斑點法，經由捕捉 T 細胞分泌的 γ 干擾素(IFN-γ)，來計算因結核分枝桿菌而活化的 T 細胞。

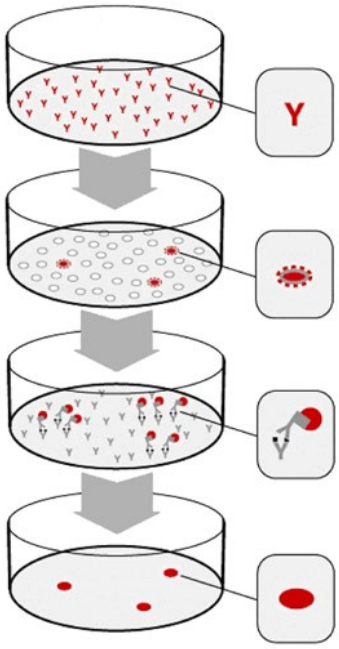
週邊血液單核細胞(PBMCs)在進入檢測前，須先從全血檢體中分離、清洗並加以計算。

將已分離的 PBMCs(白血球細胞)放入微量滴盤中，分別與植物血球凝集素對照組(phytohemagglutinin control) (一種促進細胞分裂的激素，用來表示細胞功能)、陰性對照組和兩個各別對結核分枝桿菌有特異性的抗原組(Panel A 及 B)一起培養，刺激已活化的 T 細胞。

微量滴盤孔底部布有特異性抗體組成的膜，抗體會捕捉分泌出的 γ 干擾素(IFN-γ)，T 細胞和不需要的物質都被洗掉。再加入已與鹼性磷酸酶共軛且會與干擾素(IFN-γ)分子上不同的抗原決定位點結合之二次抗體,使其與膜表面捕捉的 γ 干擾素(IFN-γ)結合。沒有結合的共軛抗體會被沖洗掉。然後每孔加入受質，這個受質可區分是否生成共軛體，在反應區形成沉澱(深藍色)反應點。

評估所得反應點的數量，可測得周邊血液對結核分枝桿菌敏感的效應 T 細胞數量。圖 1 說明 T-SPOT 檢測系統的原理。

圖 1: T-SPOT 檢測系統的原理。僅做圖示用，詳細操作步驟說明請參考第 6 單元。



首先收集病人的血液檢體。分離白血球細胞，然後放入 96 孔微量滴盤中。盤中預先被覆上對 IFN-γ 有高度親和力的抗體。IFN-γ 是一種效應 T 細胞對抗 TB 感染時釋放的細胞激素。

將由肺結核微生物所產生的抗原和白血球細胞加入盤中，刺激效應 T 細胞以激起 IFN-γ 的分泌，選用屬於結核分枝桿菌專一性的抗原， 因此可檢測出只對肺結核菌有特異性的反應 T 細胞。對抗原有特異反應的 T 細胞會釋放出細胞激素而會被滴盤底部的抗體捕捉在 T 細胞的緊鄰處。

經過一小段孵育時間後，清洗孔盤， 從盤中移除抗原和細胞。加入二次抗體，連結 T 細胞分泌出的 IFN-γ。

加入受質後，就會在由 T 細胞分泌出的 IFN-γ處，產生反應點。由此可計算出反應點的數目。

3. 試劑與保存

套組提供的材料

T-SPOT.*TB* 8 (12×8 孔條狀式) 內含:

1. 一個微量滴盤:96 孔盤，12×8 孔條狀式裝，包覆著抗細胞激素(cytokine)γ 干擾素(IFN-γ)的老鼠單株抗體。
2. 2 瓶(每瓶 0.8 mL)A 組:包含 ESAT-6 抗原、牛血清白蛋白和抗菌劑。
3. 2 瓶(每瓶 0.8 mL)B 組: 包含 CFP10 抗原、牛血清白蛋白和抗菌劑。
4. 2 瓶(每瓶 0.8 mL)陽性對照組:包含作為細胞功能對照組的植物血球凝集素(PHA)、牛血清白蛋白和抗菌劑。
5. 1 瓶(50 μL)200 倍濃縮共軛體試劑:結合鹼性磷酸酶的抗細胞激素(cytokine)γ 干擾素 IFN-γ 的老鼠單株抗體。
6. 1 瓶(25 mL)受質:直接使用的 BCIP/NBT^{plus} 溶液
7. 包含使用說明的 CD

保存與穩定性

未開封的套組保存於 2-8℃。遵照建議方法保存與操作，其內容物在有效期限內都是相當穩定的，勿使用過期的套組。

開封過的 T-SPOT.*TB* 8 保存於 2-8℃。打開過的內容物務必在 8 週內用完，不要超過於外盒標示的保存期限。避免受質長期暴露於光照下。

需要但不提供的設備材料

1. 8 孔條狀式微量滴盤 (可向 Oxford Immunotec 購買)
2. 二級微生物操作檯(建議)
3. 採血管，例如 Vacutainer^{R}CPT^{TM}，或肝素抗凝管(heparinized tubes)。(注意:CPT 管可以向 Oxford Immunotec 購買)
4. Ficoll (如不使用 CPT 管)
5. 如果使用密度離心法分離 PBMC，至少有 1800RCF(g)，請準備低溫離心機，能夠讓檢體維持在室溫(18-25℃)。
6. 計算 PBMC 的設備與試劑；以手工操作的錐藍染色液(Trypan Blue)(或其他適合的染色劑) 及用於顯微鏡上的血球計算盤或者使用適合的血球分析儀。

7. 能夠提供 5%的 CO_2 ，37±1℃ 的濕孵育箱。
8. 使用微量滴盤自動清洗器或八爪分注器或連續分注器以手工方法洗滌微量滴盤。
9. 吸取容量由 1-1000uL 的可調式微量吸管(例如 Gilson 微量吸管 1-10uL、2-20uL、20-200uL 和 100-1000uL)及無菌尖頭吸管。
10. 無菌 PBS 溶液: 例如 GIBCO™ 1 × D-PBS (Invitrogen;目錄號碼: 14040-133)。
11. 蒸餾水或去離子水。
12. 可以判讀或拍下微量孔盤數位影像的儀器，例如倒立顯微鏡、放大鏡協助計算反應點(spots)。
13. 無菌的細胞培養基，如 GIBCO AIM-V™(Invitrogen；目錄號碼: 31035-025)(注意: AIM-V 培養基可向 Oxford Immunotec 購買)。強烈建議孵育階段使用這類無血清培養基。RPMI1640(Invitrogen;目錄號碼 11875-093)只適合最初檢體準備階段。建議細胞培養基要適當分裝儲存，剩餘的材料使用後可以丟棄。使用 T-SPOT.*TB* 前，先將細胞培養基加溫至 37℃。分裝 AIM-V 或 RPMI1640 至分裝瓶中時，應避免培養基污染。

4. 警告及注意事項

- 僅供體外診斷用。
- 進行分析檢測前，操作者應接受操作步驟訓練，確定完全瞭解指導。
- 使用前仔細地閱讀說明書。不按照操作說明使用本產品，會導致錯誤的結果。
- 處理人類來源的檢體時，應特別注意。所有血液檢體視為有潛在傳染性的。處理血液檢體和檢測內容物時，使用、保存和丟棄的程序都應遵照國家、州或當地政府生物危害與安全指導的規則。
- 處理化學物質時要謹慎。所有化學物質要視為有危險性的。Oxford Immunotec 會提供物質安全資料表。
- 丟棄未使用的試劑和生物的檢體時，需依照當地政府、州和國家的規定。
- 微量滴盤每孔務必加入正確的細胞數量，否則會造成不正確的結果判讀。
- 不同批號的套組請勿混合使用。
- 須遵守無菌操作技術以避免汙染試劑、檢測微量滴盤、細胞懸浮液和細胞培養基。
- 使用和上述方法不同的吸取與洗滌的技術，孵育時間或溫度，可能會影響正確的結果。應避免。
- 血液應盡快採集與處理。
- 在室溫下(18-25℃)保存與運送血液檢體至實驗室。不要冷藏或冷凍全血檢體。

- 不按照建議的時間和溫度孵育，可能會導致不正確的結果判讀。
- 吸管或洗滌器尖頭在膜上造成的凹陷都會使反應點(spot)的計算造成混亂。

5. 檢體收集與處理

每個實驗室應先確效檢體採集與 PBMC 分離的步驟，以獲得足夠的 PBMC 數量。我們建議如下:

- 血液檢體採集至含檸檬酸鈉或含肝素鈉的 Vacutainer®CPT 試管中(Becton Dickinson)，依照製造商指示說明於管中分離 PBMC。
- 血液檢體採集至鋰肝素(lithium heparin)試管中，接著使用標準技術如 Ficoll-Paque®分離 PBMC。如有需要，也可採用其他方法來純化所分離的 PBMC。**不建議使用 EDTA 採血管**。
- 從同時間收集處理的多管血液中，如果需要得到足夠的細胞量，我們可以聚集這個病人的細胞。

典型的情形，一般具免疫能力的病患，依照以下指示，可從靜脈血液檢體中取得足夠的 PBMC:

- 成人與 10 歲及 10 歲以上的小孩:1 支 8 mL 或 2 支 4 mL 的 CPT 試管或者 2 支 6mL 的鋰肝素(lithium heparin)試管
- 2-9 歲的小孩:1 支 4mL 的試管(兩個方法)
- 2 歲以下的小孩:1 支 2mL 的小兒用試管(兩個方法)

血液檢體必須在 8 小時內檢測。檢體或許能成功地長時間保存，但使用者要能確效自己實驗室內的保存方法。**直到檢測前，全血血液檢體都要保持在 18-25℃之間。**以下是檢體採集步驟:

1. 按照採集裝置的使用說明採集血液檢體。上下顛倒試管(8-10 次)使血液與抗凝血劑充分混合。保存血液檢體於室溫(18-25℃)。**請勿冷藏或冷凍**。
2. 使用 CPT 採血管時， 8mL CPT 試管於室溫 18-25℃，1600RCF(g) 離心 28 分鐘或 4mL CPT 試管於 1800RCF(g) 離心 30 分鐘。如果使用 Ficoll-Paque™ Plus，稀釋血液用等量的 RPMI1640 培養基(1 血液:1 RPMI)。小心地將稀釋過的血液置入 Ficoll-Paque Plus 內 (2-3 份的稀釋血液置入於 1 份的 Ficoll-Paque 內)，室溫下(18-25℃)1000RCF(g) 離心 22 分鐘。

注意:使用 CPT 試管或 Ficoll-Paque 前，請先閱讀製造商的說明書。確定試管在正確的速度下離心。上述的速度是以加速重力(g)或相對的離心力(RCF)表示。不是每分鐘轉速(RPM)。如果離心機只能使用 RPM，請計算旋轉半徑配合換算表，轉換成建議的 RCF。Leucosep tubes (Greiner Bio-One)提供一種省時的 Ficoll 梯度方法。試管有一有孔的屏障，能夠讓血液檢體倒在 Ficoll 梯度上，不需輕輕地覆蓋在檢體上。

3. 用吸管吸取白色、混濁層的 PBMC 並移至 15mL 尖底離心管,再加入細胞培養基至 10mL。清洗步驟用的細胞培養基在加入到 PBMC 之前應先加熱至 37℃。

   一般我們都知道，全血檢體中的一些循環因子會干擾全血 γ 干擾素試驗，例如:類風濕病的因子、嗜異性抗體與原先已存在的 γ 干擾素。進行檢驗前，分離與洗滌 PBMC 能夠移除這些潛在的干擾物質。

   注意:離心後，用大口徑的尖頭吸管(例如 1mL)使其浸沒於 PBMC 層抽出 PBMC。小心地吸取混濁層置入無菌尖底管內用於洗滌步驟。確定吸取所有的混濁 PBMC 層。為了不讓 PBMC 殘留在採血管內，最好多吸取一些血漿層。如果使用 CPT 試管，應避免吸入分離膠質以免堵住尖頭吸管。如果發生這情況時，將尖頭內的細胞移入離心管，然後更換新的吸管尖頭吸取剩餘的 PBMC。步驟 3-5 可以選擇多種培養基來洗滌細胞，我們建議使用 AIM-V 和 RPMI 1640，因為兩者使用過的結果良好。

4. 於離心機 600RCF(g)離心 7 分鐘。倒掉上清液，於 1mL 的培養基中重新懸浮顆粒。
5. 新鮮的培養基加至 10mL 置於離心機 350RCF(g)離心 7 分鐘。
6. 倒掉上清液及於 0.7mL 的細胞培養基中重新懸浮顆粒。強烈建議使用無血清培養基 AIM-V。

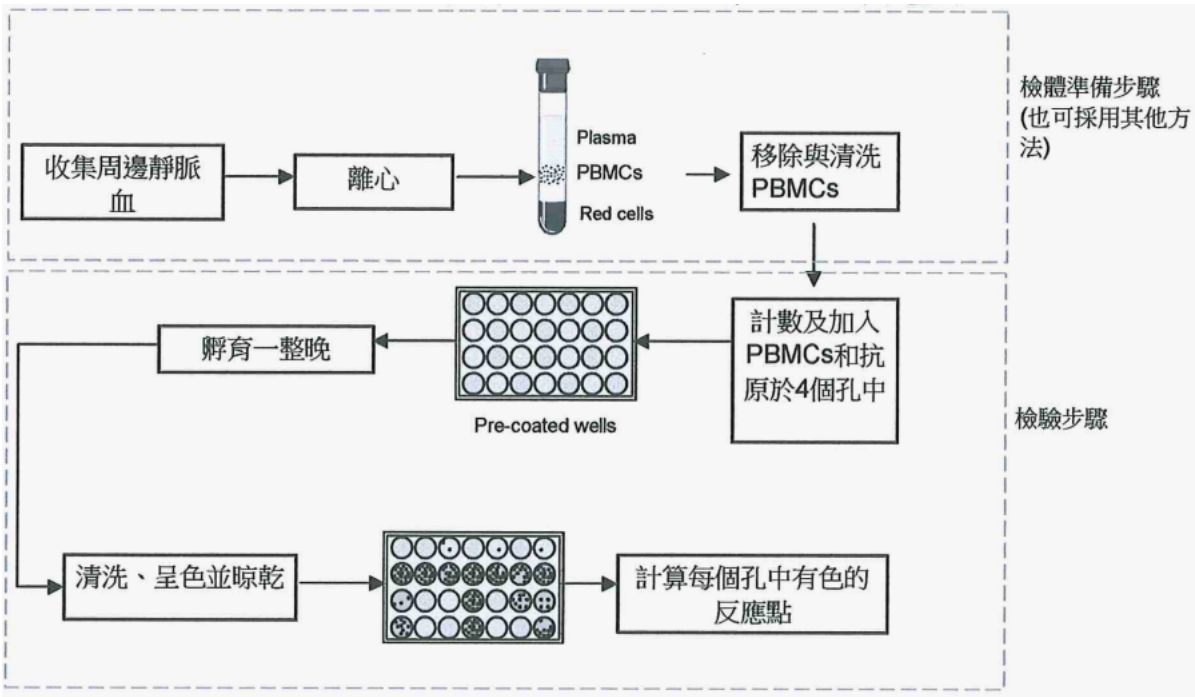
   注意: 步驟 2-6 應於二級微生物操作檯中進行。確保使用者的安全，避免檢體污染。

6. 使用說明

整組的 T-SPOT.*TB* 可以檢測 24 位病患的檢體。為了達成 16-20 小時的隔夜孵育，檢測的進行通常安排在當天下午，隔天早上再繼續。如果採用這樣的時段進行檢測，則第一天下午從血液檢體中準備檢測用的 PBMCs，啟動整個檢測的方法是把 PBMCs 和抗原加入於微量滴盤中，放入孵育箱。第二天，將微量滴盤從孵育箱中取出，進行呈色步驟，判讀微量滴盤。第一天處理全部微量滴盤大約需要 3 小時的時間(由於有離心的步驟，實際手動人工時間會縮

短)，第二天 30 分鐘的人工時間(不包括 1 小時的二次抗體孵育時間和微量滴盤晾乾的時間)。操作試驗步驟的引導概述於圖 2 及敘述如下:

圖 2: 圖表說明 T-SPOT.*TB* 主要操作步驟。96 孔盤沒有全數於圖中畫出。



試劑配製

1. 瓶裝的結核分枝桿菌抗原 ESAT-6 (A 組)，結核分枝桿菌抗原 CFP10(B 組)及陽性對照組都是可”直接使用”。
2. 配製 1:200 倍的稀釋共軛試劑工作溶液。計算必需之共軛試劑工作溶液。製備成有工作效力的試劑，保存於 2-8℃ 下可維持 6 週。

   注意:每個病患的檢體使用微量滴盤 4 孔。每孔加入 50uL 的稀釋共軛試劑。因此，一個條式(2 個檢體，8 孔)，需配製 500uL 工作溶液，以 2.5uL 的濃縮共軛試劑加入 497.5uL 的 PBS 中。96 孔微量滴盤(24 個檢體)，需配製 5mL 溶液，以 25uL 的濃縮共軛試劑加入 4975uL 的 PBS 中。

3. 受質為直接使用。從孵育箱中拿出微量滴盤之前(第 2 天)，把保存的受質回溫至室溫。

細胞計算與稀釋

T-SPOT.*TB* 微量滴盤每孔需要 250,000± 50,000 PBMCs。每位病患的檢體需要微量滴盤 4 孔，因此每位病患需要 1 X 10^6 PBMCs 。檢體中結核分枝桿菌 T 細胞的數量須先標準化至特定濃度。

1. 計算 PBMCs 數量。計算細胞有很多種方法，包括使用錐藍染色液(Trypan Blue)(或其他適當的染液)和血球計算盤，或使用自動血球分析儀。
2. 簡單地說，加入 10uL 的最終細胞懸浮液量在 40uL 0.4%(w/v)錐藍染色液(Trypan Blue)中，用血球計算盤(Neubauer hemocytometer)人工計算。取適當的量注於血球計算盤上計算格子中的細胞數量。使用其他牌子血球計算盤或自動儀器，請按照製造商的說明書指示。

   注意:計算前，需仔細地確認細胞懸浮液有混合均勻。沉澱在試管底部的細胞會導致細胞數量錯誤。用手溫和地旋轉試管，或是用吸管將懸浮液溫和地上下吸起數次使其攪動混合。

3. 計算細胞懸浮液中的 PBMCs 濃度。

   注意:確認細胞計算系統是正確的，不足或過多的細胞，會導致判讀結果錯誤。

4. 配製 500uL 細胞懸浮液，濃度為 2.5x10^5 細胞/100μL (總量為 1.25 X10^6 PBMCs)。

   注意:稀釋前，用吸管將懸浮液溫和地上下吸取數次攪動，確認細胞有徹底地混合。我們已經知道，如果微量滴盤每孔的 PBMCs 數量介於 200,000 至 300,000 之間，會產生一致性的 T-SPOT.*TB* 檢測結果。

微量滴盤準備與孵育

T-SPOT.*TB* 每位患者檢體必須使用微量滴盤 4 孔，每一個檢體都必須做陰性對照組和陽性對照組。建議縱列的方式置入檢體於微量滴盤上，如下圖示說明。

- ◯ **陰性對照組**
- ◯ **A組 (ESAT-6)**
- ◯ **B組 (CFP10)**
- ◯ **陽性對照組**

每個 96 孔微量滴盤可以檢測 24 位病患檢體。有多少檢體就需要使用多少微量滴盤。每一條狀微量滴盤可以檢測 2 個檢體，依多少檢體量就只需取多少條狀式微量滴盤。

T-SPOT.*TB* 是檢測 T 細胞功能;不需要標準曲線。因此每個病患檢體只需微量滴盤 4 孔。24 個檢體排置於微量滴盤,如下圖示:

Row	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	3N	5N	7N	9N	11N	13N	15N	17N	19N	21N	23N
B	1A	3A	5A	7A	9A	11A	13A	15A	17A	19A	21A	23A
C	1B	3B	5B	7B	9B	11B	13B	15B	17B	19B	21B	23B
D	1M	3M	5M	7M	9M	11M	13M	15M	17M	19M	21M	23M
E	2N	4N	6N	8N	10N	12N	14N	16N	18N	20N	22N	24N
F	2A	4A	6A	8A	10A	12A	14A	16A	18A	20A	22A	24A
G	2B	4B	6B	8B	10B	12B	14B	16B	18B	20B	22B	24B
H	2M	4M	6M	8M	10M	12M	14M	16M	18M	20M	22M	24M

關鍵字: N=陰性對照組, A= A 組, B= B 組, M=陽性對照組

1. 從包裝中取出已包覆抗體的條狀式微量滴盤，平放固定於盤座上及讓其回復至室溫。只取出需要用的數量之條狀式微量滴盤，沒有使用的條狀式微量滴盤、乾燥劑放回原本的鋁箔包裝中，保存在 2-8℃。

   注意:將微量滴盤固定在空的盤座內要有合適的盤蓋、盤座，盤座及上蓋須保留重覆使用。

2. 加入 A、B 兩組與對照組中:

   i. 每一個陰性對照孔加入 50uL AIM-V。

   ii. 每個檢測孔加入 50uL A 組溶液。

   iii. 每個檢測孔加入 50uL B 組溶液。

   iv. 每個陽性對照孔加入 50uL 陽性對照溶液。

尖頭吸管不能碰到孔的膜。否則會導致膜凹陷，孔內會產生雜質。

3. 微量滴盤每 4 孔用於一個病患檢體，加入病患之已處理過後的細胞懸浮液 100uL(包含 250,000 個細胞)。每增加一個病患的細胞就使用一個新的尖頭吸管以避免孔之間交叉污染。如果要重複使用尖頭吸管加入液體於多孔，從這一孔到另一孔時要小心地不要污染到旁邊的孔。

注意:確定 100uL 細胞懸浮液在取用前都有充分地混合(詳如在細胞計算與稀釋步驟中)。

4. 微量滴盤蓋上蓋子放置於潮濕的孵育箱中以 5% CO_2 在 37℃ 孵育 16-20 小時。避免去干擾孵育箱中的微量滴盤。勿將微量滴盤箱疊成堆這會導致孵育溫度不平均與空氣不流通。

注意:二氧化碳孵育箱中必須潮濕。檢查置水盤要有足夠的水以確保孵育箱中空氣是潮濕的。

反應點 **(SPOT)** 的呈現與計算

1. 從孵育箱中取出微量滴盤後，將其細胞培養基移除。

   注意:此時從套組中取出受質並回復至室溫。

2. 每個孔加入 200uL PBS 溶液。**不要使用含有 Tween™或其他清潔劑的 PBS，會導致背景計算偏高。**

   注意:使用新鮮或滅菌 PBS。

3. 丟棄 PBS 溶液，以新鮮的 PBS 溶液重覆洗滌每個孔 3 次以上。洗滌步驟可用自動洗滌器。

   注意: 可以使用多爪微量吸管或微量滴盤洗滌器進行洗滌步驟。每次洗滌後，將 PBS 丟棄於適當的容器內。不要用微量吸管吸取 PBS，有破壞膜的風險。如果使用微量滴盤洗滌器，確定各種微量滴盤都適用，尖頭吸管不要觸碰到孔的膜。最後一次洗滌後，將微量滴盤用無塵擦拭紙輕拍以確保 PBS 都去除掉–任何過量的殘留會稀釋共軛試劑。

4. 如果在試劑配製階段沒有備妥，可以用 PBS 將濃縮的共軛試劑稀釋成 200 倍，以製成工作效力試劑(working strength solution)。

5. 每個孔加入 50uL 已稀釋的共軛試劑溶液(working solution)，並於 2-8℃ 孵育 1 小時。

   注意:建議使用多爪微量吸管(multi-channel pipette)或連續定量分注器(stepper pipette)。由於共軛試劑溶液是透明無色的,也許很難看清楚哪個孔已經加入溶液,需小心地確認每個孔都有加到。

6. 丟棄共軛試劑及進行 4 次的 PBS 洗滌步驟,已敘述於步驟 2 和 3。

7. 每個孔加入 50uL 受質並在室溫下孵育 7 分鐘。

8. 用蒸餾水或去離子水仔細地洗滌微量滴盤以中止反應。
9. 將微量滴盤立置於通風良好處晾乾或者放到 37℃以上的烘箱中烘乾。

   注意:反應點(spots)會隨著微量滴盤乾燥而可看得更清楚，所以判讀前微量滴盤需徹底乾燥,於 37℃ 烘乾 4 小時或於室溫中晾乾至少 16 小時。

10. 計算並記錄每個孔膜上明顯可見的深藍色反應點(spots)，應用判讀結果說明和檢測標準(如下文)，決定病患檢體是”陽性”或”陰性”。**抗原刺激產生的反應點(spots)應呈現大、圓、深色。深色中心和向四周擴散而瀰漫的顏色形成刻度般的效果。非特異雜質則呈現較小、極少量、不規則形狀。**

    注意:可用放大鏡從孔中直接地計算反應點(spots)或使用倒立顯微鏡，或從顯微鏡捕捉數位影像。

一但反應點形成，整個檢測盤依然保持穩定，因而不需立刻判讀。如保持在乾燥、陰暗室溫下，微量滴盤可以存檔 12 個月做為追溯的品管控制(retrospective quality control)或用來再次審查。

品質管理

陰性對照組，典型的結果只有少數或無反應點;陽性對照組有 20 個或更多數量的反應點(參考圖 4a 和 b 為典型的結果，得之於美國臨床研究試驗)。

陰性對照組也可能產生很多反應點。另外，在一個或更多孔中也可能產生深色背景染色(high background staining)，使得計算反應點不易。如果產生深色背景染色，這樣會阻礙反應點辨別，結果可以被認為無效，通常這些結果是由試驗操作者導致而成的，如未充分洗滌微量滴盤、培養基污染或不適當的檢體處理及 PBMC 分離方法。然而少數案例可能是由於病患本身的健康狀況造成。

陰性對照組反應點計算，超過 10 個應視為”無效反應”。

典型的細胞功能陽性對照組反應點應≥20 個或呈現飽和(極多數量的反應點)。少數病患的 T 細胞可能對 PHA[11] 有限制性反應，在此陽性對照組可數的反應點少於 20 個， 應視為”無效反應 ”，除非 A 組(Panel A)或 B 組(Panel B)兩者之一是”陽性”或”無法判別 ”，如同敘述於結果判讀與檢測標準(如下述)，這個報告才有根據。

至於產生無效結果，這些應報告為”無效反應 ”，建議採集另外的檢體與再次檢測。

結果判讀與檢測標準

應用下列準則前請參照品質管理章節。

注意: 當使用 T-SPOT.TB 來診斷或排除肺結核以及評估潛伏性肺結核感染(LTBI)的機率，需要結合流行病學、病史、醫學與診斷方面的發現為考量。

T-SPOT.*TB* 的結果說明，從各個 Panel 計算反應點數目減去陰性對照組中的反應點數目，按照以下演算法:

- 當(A 組-陰性對照組)和/或(B 組-陰性對照組)≥8 個反應點，結果為陽性。
- 當(A 組-陰性對照組)和(B 組-陰性對照組)≤ 4 個點，結果為陰性。包括數值小於零。
- A 組或 B 組反應點計算結果(A/B 組-陰性對照組)，最高只有 5、6 或 7 個點，應視為無法判別，建議採集病患另一個檢體，再次檢測。
- 用另一個檢體再次檢測，如果得到的結果還是無法判別，則應該使用其他的診斷試驗和或流行病學資訊，來幫助判斷病患肺結核感染的狀況。

以下流程圖(圖 3)與表 1-3 為判讀方法。這個方法包括品質管制標準。

圖 3: 流程圖

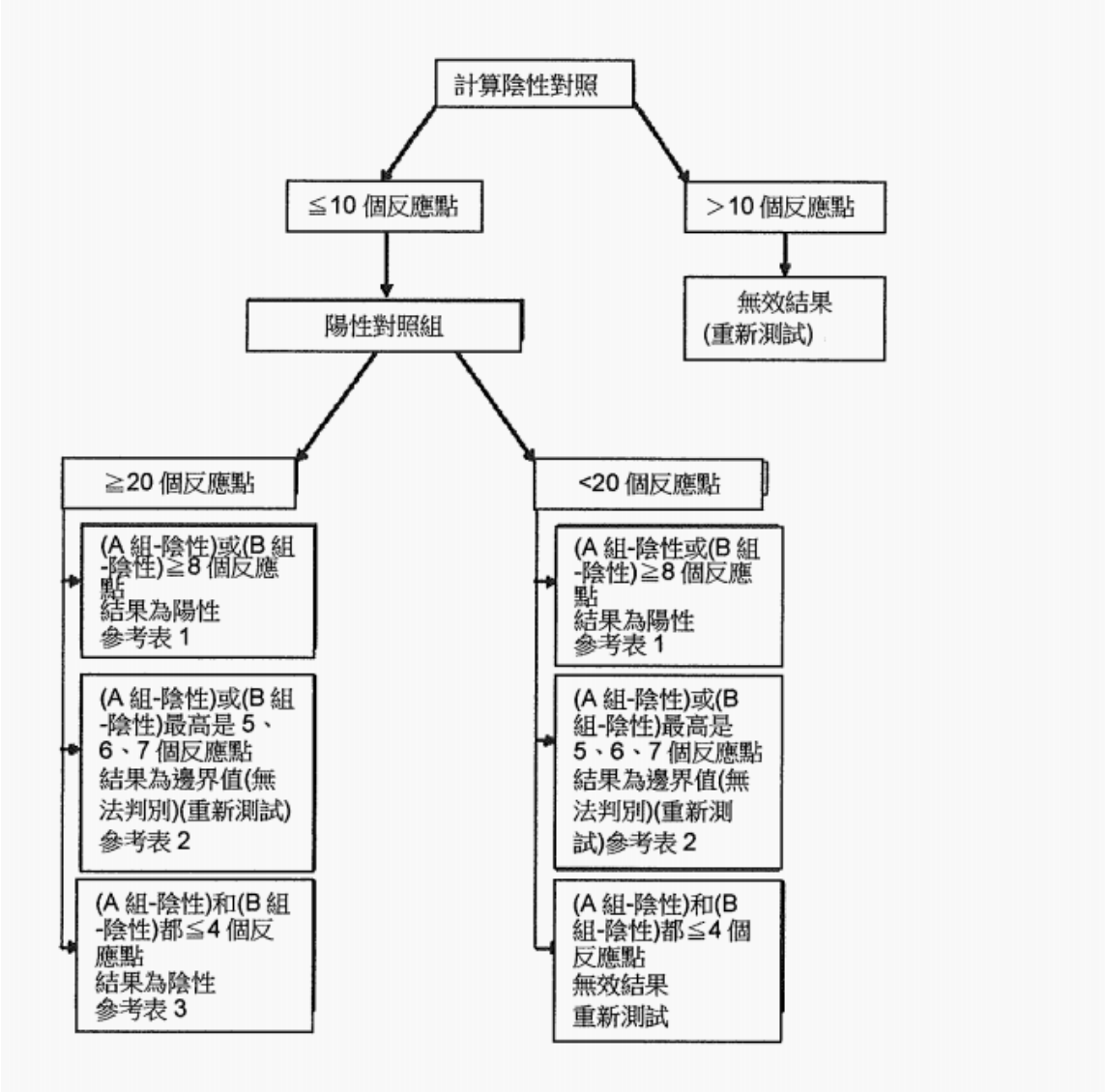


表 *1*: 陽性判讀: (A 組-陰性對照組)或(B 組-陰性對照組) ≥8 個反應點

陰性對照孔計算	A 組或 B 組有以下反應點數目†	結果判讀
0	≥8	陽性
1	≥9	陽性
2	≥10	陽性
3	≥11	陽性
4	≥12	陽性
5	≥13	陽性
6	≥14	陽性
7	≥15	陽性
8	≥16	陽性
9	≥17	陽性
10	≥18	陽性
>10 個反應點	n/a	無效反應

†注意: A/B 組-陰性對照組的最多反應點數目當作試驗結果。

表 *2*: 無法判別*:* 最高反應點數目 (A 組-陰性對照組)或(B 組-陰性對照組) *為 5,6,7*

陰性對照孔計算	A 組或 B 組最多反應點數目	結果判讀
0	5, 6, or 7	邊界值 (無法判別)*
1	6, 7, or 8	邊界值 (無法判別)*
2	7, 8, or 9	邊界值 (無法判別)*
3	8, 9, or 10	邊界值 (無法判別)*
4	9, 10, or 11	邊界值 (無法判別)*
5	10, 11, or 12	邊界值 (無法判別)*
6	11, 12, or 13	邊界值 (無法判別)*
7	12, 13, or 14	邊界值 (無法判別)*
8	13, 14, or 15	邊界值 (無法判別)*
9	14, 15, or 16	邊界值 (無法判別)*
10	15, 16, or 17	邊界值 (無法判別)*
>10 個反應點	n/a	無效反應

表 *3:* 陰性判讀*:* (A 組-陰性對照組)和(B 組-陰性對照組) 都 ≤4 個反應點

陰性對照孔計算	A 組和 B 組都有以下反應點數目	結果判讀
0	≤4	陰性

1	≤5	陰性
2	≤6	陰性
3	≤7	陰性
4	≤8	陰性
5	≤9	陰性
6	≤10	陰性
7	≤11	陰性
8	≤12	陰性
9	≤13	陰性
10	≤14	陰性
>10 個反應點	n/a	無效反應

* A 組或 B 組反應點計算結果(A/B 組-陰性對照組)，最高只有 5、6 或 7 點，應視為無法判別，建議蒐集病患另一份檢體，重新測驗。

**萬一是無效的結果，應回報為”無效反應”，建議採集病患另一份檢體，重新測試。

7. 限制因素

- 沒有按照此說明書操作可能會造成錯誤的結果。
- 不正確的試驗操作可能會造成偽陽性或偽陰性反應。
- 不正確的血液檢體採集或不適當的檢體處理方式會影響淋巴細胞功能，而造成偽陰性反應。
- 目前尚未使用來自 17 歲以下年輕人、孕婦、血友病病患的檢體，來適當地評估 T-SPOT.*TB* 的效能。
- 當試驗受 M. xenopi，M. kansasii 和 M. gordonae 影響，會出現偽陽性結果。M.bovis 的卡介苗菌和很多存在於環境的分枝桿菌缺乏 ESAT-6 和 CFP10 抗原，T-SPOT.*TB* 陽性結果可能是由感染 M. kansasii，M. szulgai，M. gordonae 或 M. marinum 而造成。如果懷疑有這樣的感染存在，應採取其他替代的測試方式。
- T-SPOT.*TB* 試驗結果應結合個人的流行病史、目前醫療情況和其他診斷的評估結果。
- 即使是陰性反應，也不能排除感染結核分枝桿菌的可能性。近期有接觸肺結核感染者的患者，就算 T-SPOT.*TB* 檢測為陰性，也應該於 6 週內重新檢測，或由其他相關的臨床症狀判斷有無感染。
- 陽性的試驗結果不能判定為活動性肺結核；應進行其他檢驗方法來證實診斷結果為活性，如痰抹片與培養、PCR 和胸部 X 光。
- 接受一個月以上抗肺結核治療的病患不適用 T-SPOT.*TB* 測試。
- 冷藏或冷凍檢體是不建議使用於 T-SPOT.*TB* 試驗。

8. 期望數值

臨床試驗所見的反應點計算範圍都圖示於 4a-c。這些都是由觀察它與對照抗原及 TB 抗原的反應所得到的。

圖 4a: 所有測試項目陰性對照組反應的長條圖

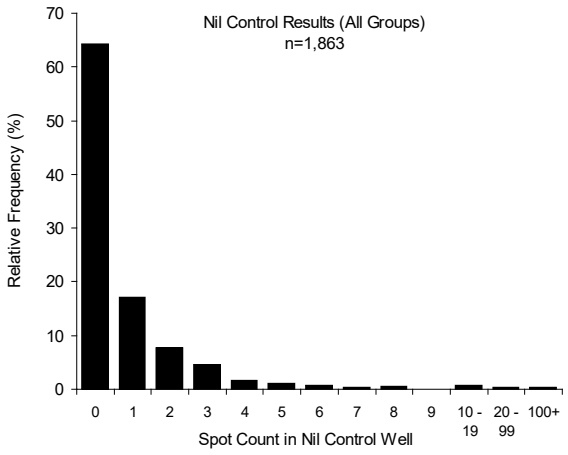


圖 4b: 所有測試項目陽性對照組反應的長條圖

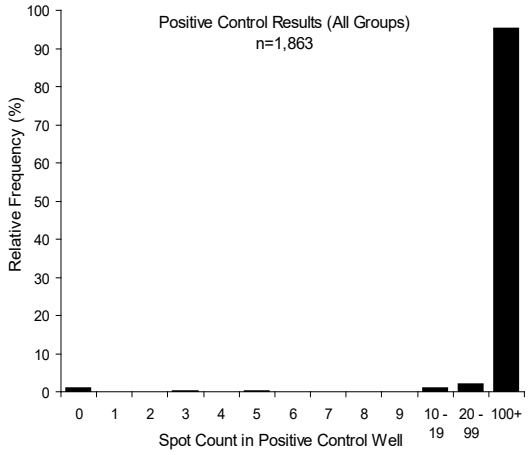
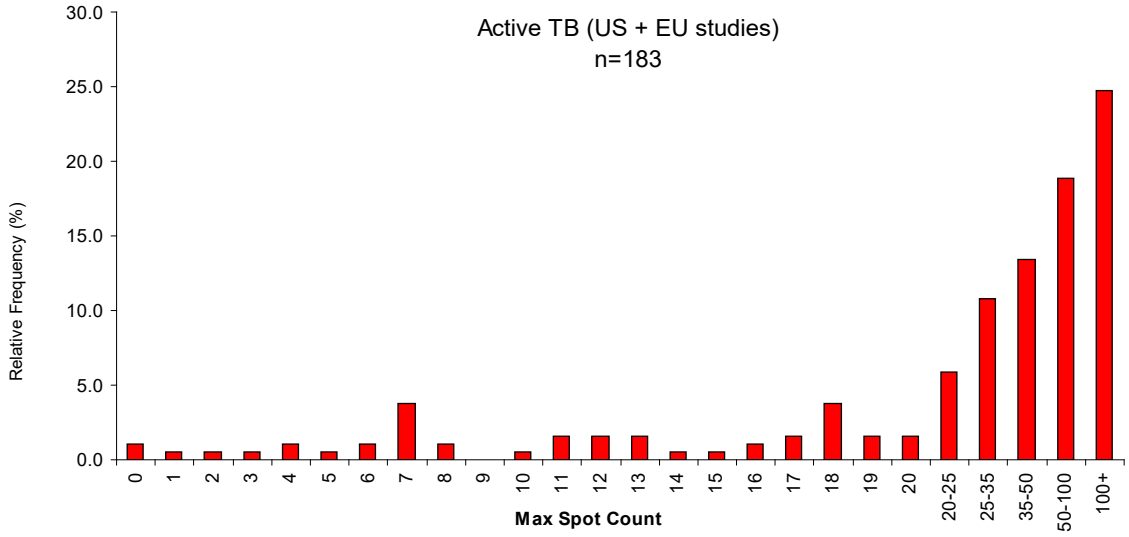


圖 4c:圖表顯示，確定感染活性 TB 反應點計算的分布圖。

'Max spot count'是 A 組或 B 組(A、B 組減去陰性對照組)的最大反應



9. 性能特性

檢測的性能特性

T-SPOT.*TB* 試驗可偵測到的最小反應單位是一個反應點(spots)。

全血中 PBMCs 的分離與洗滌減少了血液檢體中異嗜性抗體或本身 IFN-γ 的干擾，這也可能移除了 IFN-γ 的背景量、其他干擾的部分血漿、血紅素和異嗜性抗體。

我們預期細胞激素是由白血球所產生，其包括 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、TNFα、IFN-α 和 IFN-β。這些細胞激素和 T-SPOT.*TB* 檢測中所用的”抗體配對”之間的交叉反應情形都經過檢驗。結果顯示此抗體配對不會和其他的細胞激素產生交叉反應。

分析實驗室內部試驗變化性(Intra-assay variability)是由同一位操作者在同一微量滴盤上進行 T-SPOT.*TB* 試驗比較。由三位操作者在 9 個微量滴盤上進行實驗，結果以 CV 值百分比表示試驗固有的變化程度。高的反應點總數(210.40±11.59)得到的範圍介於 2.21%-7.7% CV(平均 CV 百分比=4.43)，中的反應點總數(71.17±8.47)得到的範圍是 6.57%-16.49% CV(平均 CV 百分比=11.0%)，而接近於截止的反應點總數(5.71±1.25)得到的平均 CV 百分比為 21.97%。

收集實驗室間的精確數據，以三位不同操作者使用三個批號套組於六個場合去測試相同的三個檢體。三個檢體，三位操作者和三個批號套組交叉測量，CV 值是 3.68%，檢體平均反應點總數 210.40。反應點總數接近 T-SPOT.*TB* 截止點，實驗室間試驗的變化值是 24.95%。中等的反應點標準平均 CV 百分比是 13.86%。每一個批號試驗結果的 CV 百分比是前後一致的。

使用三位操作者和來自於三個批號套組的各個微量滴盤，評估操作者間的再現性。觀察到操作者之間的變化 CV 值為 3.64%-5.76%。

分別進行兩個實驗室間的試驗，而每個案例都在兩個地方，從同一個病患採取兩管血液，進行平行的試驗。結果顯示於表 4。兩間實驗室都有陰性與陽性結果，整體一致性為 95%。

表 4: 實驗室間測試結果

	Site 2		
Site 1	**Positive**	**Borderline (equivocal)**	**Negative**
Positive	13 (31.7%)	0	0
Borderline (equivocal)	0	0	1 (2.4%)
Negative	0	1 (2.4%)	26 (63.4%)

檢體(n=41)在地點 1 與其他地點平行測試

試驗截止值的決定是使用接收人操作特徵(ROC)的曲線分析，截止值≥6 的反應點時，使試驗的敏感性與特異性得到最大化。

臨床數據概要

從暴露在結核分枝桿菌的風險下的族群裡，同時用”經過培養而證實為活動性肺結核”和”潛伏性的結核感染症”二者，我們設計了一個關鍵性的臨床研究，來建構 T-SPOT.*TB* 試驗的臨床效果。2355 位登記接受實驗者；詳如表五所示，使用 11 個研究場所的受驗者。2355 位登記的受驗者中，492 個檢體沒有達到研究標準，只有 1863 位受驗者能夠進行分析。

492 個檢體被排除的理由為:14 個沒有表示同意/可能強迫，11 個因場所被排除，13 個重複登記，59 個沒有採集血液檢體，115 血液檢體採集量不足以進行 T-SPOT.*TB* 試驗，66 個因實驗室進行 T-SPOT.*TB* 試驗有誤差，18 個是無風險群(資料不齊)，196 個沒有 TST 結果(121 個為沒有施予 TST 或沒有可以提供的結果，67 個沒有 TST 記錄或遺失醫療記錄，6 個 TST 結果來自於先前研究已超過一年及沒有當前的結果,1 個沒有回診判讀 TST 結果，1 個在登記後才施予 TST)

按照 CDC 的指導方針，整體來說，被研究調查的族群預計是要含括所有顯示出需做結核感染篩檢的主要危險族群。在 TST 有可能出現偽陽性結果的族群中，進行 T-SPOT.*TB* 評估(譬如:病患暴露於非結核分枝桿菌與先前有接受卡介苗注射)。此外，在 TST 有可能出現為陰性結果的族群中，進行 T-SPOT.*TB* 評估(譬如:非常年輕或年老的病患及各種類型免疫力抑制的病患)和一些有較高風險可能從潛伏性肺結核感染發展為活動性肺結核的病患。根據 CDC/ATS 指導，所有 TST 結果是使用 5、10 或 15mm 的截止點。

從這個關鍵性的研究中，受驗者被分類成五個主要的組來作分析。所有病患的分配詳細於圖 5。

- **第 1 組**–活動性肺結核 (n=105)

從已知為活動性、經培養被證實目前肺結核感染的受驗者來評估 T-SPOT.*TB* 試驗的敏感性。只有培養證實為陽性結果的受驗者含括在這一組。TST 的結果對這一組來說不是必要的條件。69 位受驗者來自巴西，剩下的 36 位受驗者來自美國德州的三個地區。此外，來自德國(n=34)、義大利(n=22)與英國(n=28)的研究結果被包括於這組僅作為敏感性計算。因此，敏感性計算是基於結合族群的 189 位受驗者，其中 6 個 T-SPOT.*TB* 試驗結果無效，分析剩下的 183 個檢體。結果於表 7。

- **第 2 組-**低風險分析對照 (n=311)

我們儘可能從"被臆測為肺結核感染機率低的病人”中，來預估 T-SPOT.*TB* 的特異性。”低風險”受驗者的挑選是基於在臨床，流行病學和診斷方面來說都沒有感染肺結核的風險因子。這組需要 TST 陰性結果。

雖然我們都是從這些受驗者來評估一般的危險因子，但是無法取得每一個參與者完整的流行病學背景資料，這個族群可能含括真正的肺結核或 NTM 感染。我們就利用這一組，來評估 T-SPOT.*TB* 的特異性。

以病患的自我報告為準，如果沒有下列的各項因素，我們就認定他是感染肺結核的低風險者:

- 待在肺結核流行的國家超過 3 個月(肺結核盛行率>40/100,000)
- 在高風險地區工作過，例如:肺結核實驗室、醫護人員
- 處於高風險的環境中，例如:監獄、安養院或庇護所
- 已知與肺結核指引病例接觸
- 使用 IV 藥物
- 習慣於重度酒精
- 已知感染 NTM
- 感染 HIV 或其他免疫力抑制情況
- 曾有感染過肺結核或服用過肺結核藥物
- 放射學的或微生物學的檢驗，結果一致是肺結核感染
- TST 結果為陽性

311 個結果中，5 個為無效 T-SPOT.*TB* 結果，剩下 306 個做分析。結果於表 8。

- **第 3 組**-LTBI 懷疑者 (n=1403)

這個組是依照 CDC 指導方針來篩選出有潛伏性肺結核感染的人，該組人數是此次研究中最大族群。這個組含括了廣泛的混合受驗者，他們被用來篩選各種不同程度的危險暴露情形(例如:近期接觸已知的案例、同牢者)，以及危險程度進行的狀況(例如:感染 HIV 的人、較年幼的孩童、年長者、有免疫抑制的人)。這個組是用來證實在這個族群中，T-SPOT.*TB* 結果陽性的人數和 TST 的結果有相關性。

1403 個結果中，有 55 個為無效 T-SPOT.*TB* 結果，剩下 1348 個結果做分析。結果於表 10。

- **第 4 組**-NTM (n=19)

這個組中是一小群已知的非結核分枝桿菌(NTM)感染的受驗者。[注意: 這些有時也稱為 MOTT 或非典型分枝桿菌]。這組包括受驗者是近期診斷為 NTM 感染(不超過前 12 個月)或那些 12 個

月前就被診斷出感染，但被醫生登記為活動性的感染。TST 不是必要的，但有時被包括在他們正規的臨床照護。這個組是用來證實評估 T-SPOT.*TB* 於 NTM 感染的預估交叉反應。19 個結果中，1 個是無效的 T-SPOT.*TB* 結果剩下 18 個結果做分析。結果於表 11。

- **第 5 組-**未被確定活動性肺結核 (n=25)

在被募集為受驗者而帶有活動性肺結核的人之中，25 個受驗者在臨床上被診斷出來但是未經培養確定(culture-confirmation) ，沒有一致性地做 TST。25 個結果中，1 個是無效 T-SPOT.*TB* 結果，剩下 24 個結果做分析。結果於 26 頁。

以場所來表示，含括接受臨床調查研究的每一組群，將受驗者的人數(經排除後)以摘要列於表5:

表 **5:** 以場所來表示所做的摘要，包括接受臨床調查研究的每一組群受驗者。

實驗地點與樞紐試驗中主要的登記人口	第 **1** 組 敏感性計算	第 **2** 組 特異性計算	第 **3** 組 疑似 **LTBI**	第 **4** 組 **NTM** 感染	第 **5** 組 未確定的活動性肺結核	受驗 總人數*
同牢者, ***TX***	7	0	462	5	3	477
活動性肺結核病人 ***Brazil***	69	0	0	0	0	69
肺結核病患接觸者 ***NY***	0	3	183	2	0	188
肺結核門診的小孩 ***TX***	12	13	184	1	18	228
疑似有肺結核的 **HIV** 病人, ***TX***	17	0	17	1	3	38
腎病末期的病人, ***Canada***	0	0	195	0	1	196
HIV 門診的病人, ***GA***	0	0	227	0	0	227
軍隊招募時接受檢查的海軍新兵, ***IL***	0	294	52	0	0	346
感染 **NTM** 的病人, ***NH***	0	1	2	10	0	13
接受抗 **TNFα** 治療的類風濕性關節炎病人, ***Canada***	0	0	34	0	0	34
接受免疫抑制治療的類風濕性關節炎病人, ***MA***	0	0	47	0	0	47
總數 **I**	105	311	1403	19	25	1863

*包括無效結果

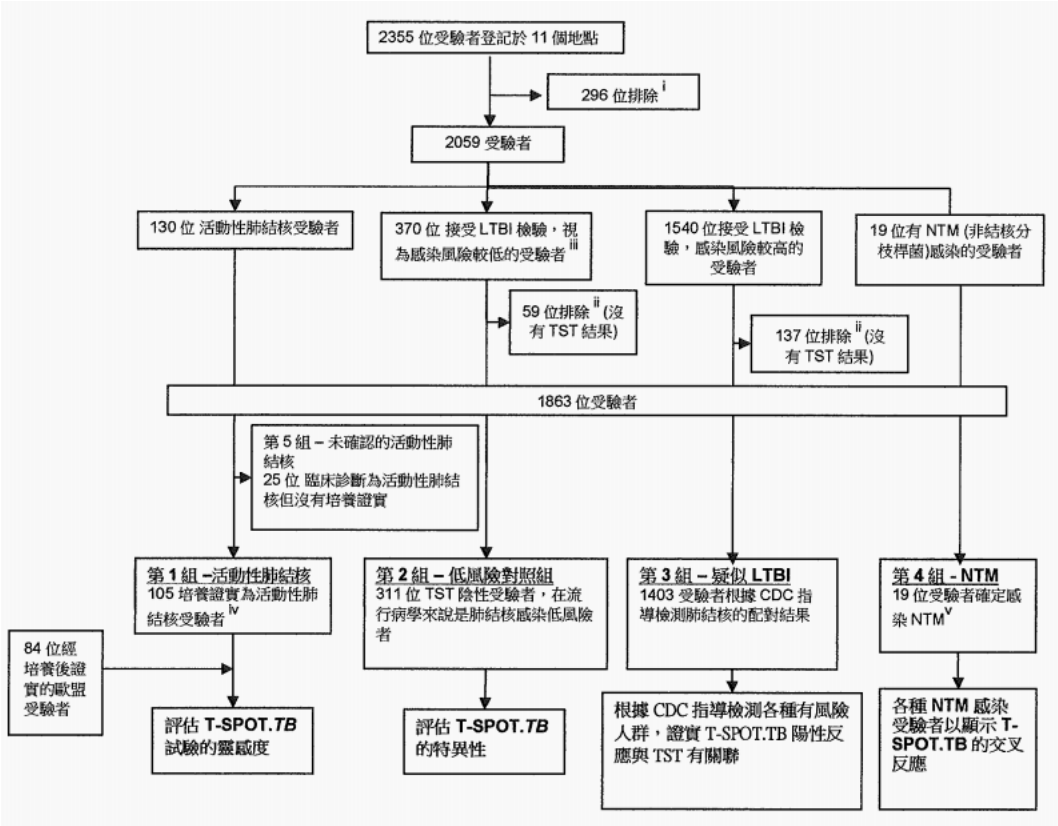
表六為每組關鍵性試驗中，所有受驗者的人口統計學與主要流行病資訊。

表 6: 族群受驗者重要調查之人口統計資料一覽表

性別	第 1 組	第 2 組	第 3 組	第 4 組	第 5 組	所有組別
男性	62	260	917	11	13	1263
女性	43	50	483	8	12	596
性別不明/沒有紀錄	0	1	3	0	0	4
出生地						
美國出生	20	299	687	18	15	1039
外國出生	16	10	488	1	10	525
無資料	69	2	228	0	0	299
卡介苗注射歷史						
注射過 BCG	11	1	290	1	8	311
沒有注射 BCG	22	212	783	17	15	1049
未知/無紀錄	72	98	330	1	2	503
種族團體						
白人	4	213	391	10	3	621
黑人	8	40	532	6	1	587
西班牙人	91	34	335	2	16	478
中東 / 印度人	0	2	35	0	1	38
亞洲人	2	7	87	0	2	98
印地安人 / 阿拉斯加人	0	5	3	1	0	9
夏威夷人 / 太平洋島民	0	3	6	0	0	9
其他	0	5	11	0	2	18
種族不明/無紀錄	0	2	3	0	0	5
年齡團體						
0 到 2 歲	2	0	37	1	1	41
>2 到 5 歲	1	2	41	0	6	50
6 到 17 歲	6	9	78	0	11	104
年齡沒有紀錄	0	0	1	0	0	1
年齡範圍	0.4–69 歲	3–65 歲	0.08-93 歲	1.83-77 歲	2–52 歲	0.08 – 93 歲
0 到 17 歲 (小孩)	9	11	156	1	18	195
18 到 64 歲 (成人)	94	299	1117	14	7	1531
65+ 歲 (年長者)	2	1	129	4	0	136
總數	**105**	**311**	**1403**	**19**	**25**	**1863**

下列圖 5 的流程圖描述了 2355 位登記做為臨床評估受驗者資料，且對每一組群須做的分析也做了定義說明。

圖 *5:* 流程圖說明登記參加研究的受驗者分類與用途。



i. 296 個的檢體被排除的理由為: 14 個沒有表示同意/可能強迫，11 個因場所被排除，13 個重複登記，59 個沒有採集血液檢體，115 個檢體採集量不足以進行 T-SPOT.*TB* 試驗，66 個因實驗室進行 T-SPOT.*TB* 試驗有誤差，18 個非風險族群(資料不齊)

ii. 196 個沒有 TST 結果(121 個為沒有施予 TST 或沒有可以提供的結果，67 個沒有 TST 記錄或遺失醫療記錄，6 個 TST 結果來自於先前研究超過一年及沒有當前的結果，1 個為沒有回診判讀 TST 結果，1 個在登記後才施予 TST)

iii. “低風險”的受驗者被挑選出來是基於他們在臨床、流行病學及診斷上沒有感染肺結核的風險因子。

iv. 為避免病患的治療與試驗結果引起交互反應，已經接受抗 TB 治療的受驗者，被排除於這一組。TST 結果不是這組中每一位病患的必備條件。

v. 非結核分枝桿菌(NTM)感染包括受驗者最近診斷為 NTM 感染(不超過前 12 個月) 或那些超過 12 個月前就被診斷出感染，但被醫生列為活動性感染。TST 不是必需條件。

靈感度試驗結果 (關鍵性試驗第一組與歐洲試驗受驗者)

表 7: 於此關鍵性的研究中， 第 1 組病患與歐洲受驗者的敏感性結果

培養確認的檢體來源		T-SPOT.*TB*						
		陽性	邊界值 (無法判別)			陰性	總數	特異性 [95% CI]
		≥8 個反應點	7 個反應點	6 個反應點	≥5 個反應點	4 個反應點		
美國		31	3	0	0	2	36	94.4% (34/36) [81.3-99.3%]
巴西		60	1	1	1	4	67	92.5% (62/67) [83.4-97.5%]
歐盟	德國	31	1	0	0	1	33	97.0% (32/33) [84.2-99.9%]
	義大利	19	1	0	0	0	20	100.0% (20/20) [86.1-100.0%]
	英國	25	1	1	0	0	27	100.0% (27/27) [89.5-100.0%]
總數		**166**	**7**	**2**	**1**	**7**	**183***	**95.6% (175/183) [91.6-98.1%]**

* 189 個檢體中，6 個結果為無效:1 個受驗者有深的背景，4 個受驗者有高陰性對照反應，1 個受驗者有低陽性對照反應。無效結果排除計算，留下 183 個檢體做分析。

使用事先設定截止值為≥6 個反應點，T-SPOT.*TB* 預估的靈感度為 95.6%(175/183) [95%CI 91.6%-98.1%]

如果所有無法判別結果都視為是陽性或陰性，評估 T-SPOT.*TB* 的預估的敏感性分別是 96.2% (176/183)或 90.7% (166/183)。

特異性試驗結果 (第二組)

表 8:特異性結果

美國低風險檢體	T-SPOT.*TB*						
	陽性	邊界值 (無法判別)			陰性	總數	特異性 [95% CI]
	≥8 個反應點	7 個反應點	6 個反應點	5 個反應點	≤4 個反應點		
總數	**3**	**1**	**5**	**7**	**290**	**306***	**97.1% (297/306) [94.5-98.7%]**

*311 個檢體中，5 個結果為無效:1 個受驗者有高背景反應，1 個受驗者有陰性對照反應，3 個受驗者有低陽性對照反應 。無效結果不算在內，留下 306 個檢體做分析。

使用之前設定的≥6 個反應點截止， T-SPOT.*TB* 特異性為 97.1% (297/306) [95%CI 94.5%-98.7%]

如果所有無法判別結果都視為是陽性或陰性， T-SPOT.*TB* 預估的特異性分別為 94.8% (290/306)與 99.0% (303/306)。

ATS/CDC 風險組受驗者結果(第三組)

有 1403 位受驗者分配到第 3 組,具有 1889 個風險因子。有一些注射過 BCG 的人和在國外出生的人也含括在內，這是和美國肺結核流行病學一致的。廣範圍年齡層的受驗者也包括在內。

表 9 顯示第 3 組受驗者人數的分析，這些受驗者是從每一個 ATS/CDC 風險組及其他重要的流行病學資訊募集及收集而來。此表顯示在第 3 組內的病患人數他們各自的風險因子。病患可能同時有一種以上的風險因子，所以在此表的不同列上被計算一次以上。

表 9: 第三組受驗者歸類於 ATS/CDC 風險組。有些受驗者可能有一種以上的情況，所以表中有重複計算。

ATS/CDC 風險組	有一種或數種風險因子的受驗者	第三組 **1403** 位受驗者中，有一種或數種風險因子的百分比
HIV 陽性者	328	23.4%
近期與肺結核患者接觸者	229	16.3%
胸部 **X** 光檢查有纖維化變化的病人	26	1.9%
接受器官移植的病人與其他免疫抑制病人**(**在 **1** 個月或更長的時間內，病人接受相當於**≥15mg/d** 的 **Prednisone)**[i]	122	8.7%
從肺結核盛行國家來的近期移民者 **(**例如**,**最近五年內**)**	41	2.9%
注射藥物者	97	6.9%
來自於以下高風險背景的住民與員工**:**監獄或拘留所、安養院與其他長期照護年長者的設施、醫院與其他健康照護設施、病人是免疫缺乏症候群**(AIDS)**的居住設施、遊民庇護所	613	43.7%
Mycobacteriology 實驗室人員	5	0.4%
矽肺病	0	0.0%
糖尿病	108	7.7%
慢性腎衰竭 **(**腎病末期**)**	195	13.9%
血液疾病	5	0.4%
其他特定惡性腫瘤 [ii]	23	1.6%
胃切除術和小腸繞道手術	4	0.3%

四歲以下幼童或嬰兒、小孩、接觸肺結核高危險群大人的青少年	93	6.6%

i. 受驗者有服用以下藥品，也歸類於這組: **anti-TNF-alpha**、**steroids**、**transplant recipients**、**adalimumab**、 **azathioprine**、**ciclosporin**、 **etanercept**、 **infliximab**、 **leflunomide**、 **methotrexate**、**mycophenolate mofetil**、 **prednisone**、 **sulfasalazine**、 **tacrolimus**

ii. 任何一位正在進行癌症化學療法的參與者。

表 10 根據 CDC 指導，所有組別，除了矽肺症病患之外，都有經過檢查且歸類於第三組。已有發表數據指出一組矽肺病人的 T-SPOT.*TB* 和 TST 的比較結果(comparative results)。

T-SPOT.*TB* 與 TST 檢驗結果，列於下表 10 中。TST 截止值是以 CDC 的建議為準。

表 10: 第 3 組的結果一覽表。經試驗 55 個無效的全部排除。

第 3 組 (疑似 LTBI)		T-SPOT.*TB*					
		陽性	邊界值 (無法判別)			陰性	總數
		≥8 個反應點	7 個反應點	6 個反應點	5 個反應點	≤4 個反應點	
TST	陽性	166	6	4	9	118	303
	陰性	116	23	13	25	868	1045
	總數	282	29	17	34	986	1348

55 個受驗者是無效的，9 個高背景，22 個高陰性對照反應，24 個低陽性對照反應。無效的結果沒有計算在內。

使用之前設定的截止值為≥6 個反應點，T-SPOT.*TB* 陽性結果為 24.3% (328/1348)，TST 陽性結果為 22.5% (303/1348)。如果所有無法判別結果都視陽性/陰性，則 T-SPOT.*TB* 的陽性結果百分比為 26.9% (362/1348) / 20.9% (282/1348)。

第 3 組的研究是用於評估 T-SPOT.*TB* 和 TST 之間的一致性。根據之前設定的≥6 個反應點截止，結果如下:

- **整體一致性= 79.3% (1069/1348) [95%CI 77.0-81.4%]**
- **陽性一致性= 58.1% (176/303) [95%CI 52.3-63.7%]**
- **陰性一致性= 85.5% (893/1045) [95%CI 83.2-87.5%]**

如果所有無法判別結果都視為陽性:

- **整體一致性= 78.1% (1053/1348) [95%CI 75.8-80.3%]**
- **陽性一致性= 61.1% (185/303) [95%CI 55.3-66.6%]**
- **陰性一致性= 83.1% (868/1045) [95%CI 80.7-85.3%]**

如果所有無法判別結果都視為陰性:

- **整體一致性= 81.2% (1095/1348) [95%CI 79.0-83.3%]**
- **陽性一致性= 54.8% (166/303) [95%CI 49.0-60.5%]**

- **陰性一致性= 88.9% (929/1045) [95%CI 86.8-90.7%]**

各別為T-SPOT.*TB*與TST施行研究複邏輯回歸分析，調查挑選的風險因子(性別、年齡、種族、卡介苗注射、免疫功能不全、出生於肺結核流行國家、接觸感染源案例、之前肺結核感染史)與試驗結果之關聯。這個分析是以第3組的963位受驗者為基準，附有模組內所有變數的完整數據。因此，資料不齊全的385個病患沒有包含在內。陽性T-SPOT.*TB*試驗是按照之前設定的截止值≥ 6個反應點，不包括無效的結果。T -SPOT.*TB* 和TST使用相同的資料集。控制模組中其他變數後，T-SPOT.*TB*和TST的陽性結果，顯然與之前的肺結核感染史有關。T-SPOT.*TB*陽性結果，明顯與接觸感染源及出生在肺結核流行國家中有關連。然而，TST陽性結果與這些變數無關。TST陽性結果與卡介苗注射有關；但是，T-SPOT.*TB*結果與卡介苗注射沒有觀察到相關性。TST陰性與免疫功能不全有關，可是沒有觀察到T-SPOT.*TB*結果與免疫功能不全的關聯。許多TST陽性結果孩童(5-17歲)比成人(18-64歲)多，然而，T-SPOT.*TB*結果沒有受年齡影響。

NTM 感染試驗結果 (第四組)

眾所皆知 TST 對非結核分枝桿菌感染如 M. avium 會產生交叉反應。T-SPOT.*TB* 不會對感染 NTM 的病患產生交叉反應，因為使用不會出現在 M. avium 的抗原 ESAT-6 和 CFP10。12 個受驗者鑑定有 M. avium 感染，沒有一個受驗者是 T-SPOT.*TB* 陽性反應。對於感染 M.avium 和其他非結核分枝桿菌受驗者的 T-SPOT.*TB* 結果示於如下表 11。

表 11: 18 個確定感染非結核分枝桿菌病患(NTM) 於 T-SPOT.TB 和 TST 的結果。

檢定出的 NTM 種類	數量	T-SPOT.*TB* 陽性數量	TST 陽性數量
M. avium	12	0	Not done
*M. xenopii**	1	1	1
M. kansasii	1	1	1
M. gordonae	4	4	4

沒有無法判別結果。1 個無效的 T-SPOT.TB 結果已排除。

***注意: 此研究的參與者已知曾接觸到感染源案例，也強烈懷疑有 LTBI。**

不確定的活動性肺結核試驗結果(第五組)

第 5 組的 25 個病患中，有一人是 T-SPOT.*TB* 無效(低陽性對照)，剩下 24 個檢體做分析。使用先前設定的≥6 個反應點截止，T-SPOT.*TB* 陽性為 79.2% (19/24)。如果無法判別結果(7 個反應點)視為陰性，T-SPOT.*TB* 的陽性率變成 75.0% (18/24)。如果無法判別反應視為陽性，T-SPOT.*TB* 陽性率為 79.2% (19/24)。

性能概要

靈感度

設定截止值為≥ 6 個反應點，受驗者是經培養證實為肺結核感染者，其靈感度為 95.6% (175/183) [95%CI 91.6%-98.1%]

特異性

設定截止值為≥ 6 個反應點，受驗者是肺結核感染的低風險者，其特異性為 97.1% (297/306) [95%CI 94.5%-98.7%]

整體試驗結果中，T-SPOT.*TB* 無效率為 3.4% (64/1863)。

10. 疑難排解

依照臨床試驗優良操作規範進行本試驗，並且嚴格遵守使用說明。

無法判別的結果

(A/B 組-陰性對照組)的 ROC 截止值(cut-off)為 6 個反應點， 當試驗結果出現 6±1 個反應點時，則此結果視為無法判別。比起”所計算的反應點遠多於截止點的結果”來看，無法判別的結果雖然有效但不確實。建議使用新的檢體，幫病患重新檢驗。如果重新檢驗還是得到無法判別的結果，則應使用其他診斷試驗或流行病資訊來幫助診斷病患的肺結核感染狀況。

無效結果

無效結果不常見且可能與受驗者本身的免疫狀況有關，也可能和一些技術因素有關，足以成為”高背景”、” 低陽性”與”高陰性”結果，例如:

- 使用不適當的採血管
- 進行實驗前，血液儲存超過 8 小時
- 血液沒有按照建議的溫度範圍儲存(實驗前 18-25ºC)
- 細胞培養基汙染
- 微量滴盤洗滌不完全

對於無效結果，建議使用病患新的檢體重新試驗。備有排除疑難問題的技術資料可供索取。請洽詢 Oxford Immunotec。

技術支援，請聯絡: (02)23926855 醫信國際有限公司

11. 符號簡寫與詞彙表

ATS	American Thoracic Society
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BCIP/NBT	5-bromo, 4-chloro, 3-indoylphosphate/nitroblue tetrazolium
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFP10	Culture Filtrate Protein
CPT	Cell Preparation Tubes
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked Immnunospot Assay
ESAT-6	Early Secretory Antigenic Target
FDA	Food and Drug Administration
IFN-γ	Interferon gamma
LTBI	Latent TB Infection
NTM	Non Tuberculous Mycobacteria
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Phytohemagglutinin
PPD	Purified Protein Derivative (also known as Tuberculin)
RCF	Relative Centrifugal Force
RPM	Revolutions per minute
TST	Tuberculin Skin Test
Yrs	Years

12. 參考文獻

1. American Thoracic Society. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med.,* 2000; 161: 1376-1395

2. CDC. Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis. MMWR weekly, June 09, 2000; 49(RR06): 1 – 54.

3. PMA P010033 supplement number S011. Quantiferon-TB Gold In Tube package insert. Downloaded from www.cellestis.com. Date accessed 5th March 2008.

4. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune- based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000;356:1099–1104.

5. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999;284:1520–3.

6. Lalvani A. Spotting latent infection: the path to better tuberculosis control. *Thorax*, 2003; 58(11): 916-918.

7. Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, van Dissel JT, Theisen M, Andersen P and Ottenhoff T. Antigenic equivalence of Human T Cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and Culture Filtrate Protein 10 and to mixtures of synthetic proteins. *Infection and Immunity*, 2000; 68(6): 3314-3321.

8. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G and Hill AVS. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001; 163: 824-828.

9. NCCLS. Performance of single cell immune response assays; approved guideline. NCCLS document I/LA26-A.

10. Meier T, Eulenbruch H-P, Wrighton-Smith P, Enders G and Regnath T. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*., 2005; 24: 529-536.

11. Köller MD, Kiener HP, Aringer M, Graninger WB, Meuer S, Samstag Y, Smolen JS. Functional and molecular aspects of transient T cell unresponsiveness: role of selective interleukin-2 deficiency. *Clin Exp Immunol*. 2003 May;132(2):225-31.

12. NCCLS. Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots. *NCCLS document GP10*.

13. Huebner RE, Schein MF and Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin. Infect. Dis.,* 1993; 17: 968-975.

14. Huebner RM, Schein M, Hall C and Barnes S. Delayed-type hypersensitivity anergy in human immunodeficiency virus-infected persons screened for infection with *Mycobacterium tuberculosis. Clin. Infect. Dis*. 1994; 19: 26-32

15. Shankar MS,Aravindan AN, Sohal PM, Kohil HS, Sud K, Gupta KL, Sakhuja V and Jha V. The prevalence of tuberculin sensitivity and anergy in chronic renal failure in an endemic area: tuberculin test and the risk of post-transplant tuberculosis. Nephrol Dial Transplant. 2005; Dec; 20(12): 2720 – 4

16. Fang HC, Chou KJ, Chen CL, Lee PT, Chiou YH, Hung SY and Chung HM. Tuberculin skin test and anergy in dialysis patients of a tuberculosis-endemic area. Nephron. 2002; Aug; 91(4): 682 – 7

17. CDC. Anergy skin testing and tuberculosis preventive therapy for HIV-infected persons: revised recommendations. MMWR. 1997; 46(RR-15): 1 – 10

18. Zuber PL, McKenna MT, Binkin NJ, Onorato IM and Castro KG. Long-term risk of tuberculosis among foreign-born persons in the United States. *JAMA,* 1997; 278: 304-307.

19. Leung CC, Yam WC, Yew WW, Ho PL, Tam CM, Law WS, Wong MY, Leung M, Tsui D. Comparison of T-Spot.TB and tuberculin skin test among silicotic patients. *Eur Respir J*. 2007 Oct 24

13. 聯絡資料

Oxford Immunotec, Inc
293 Boston Post Road West, Suite 210
Marlborough
MA 01752 USA Toll Free: 877-208-7768

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

下載產品支援與更多技術資訊，請參考我們的網站:

www.oxfordimmunotec.com

T-SPOT 和 Oxford Immunotec 的標誌為 Oxford Immunotec Limited 所屬商標
AIIM-V、RPMI 和 GIBCO 是 Invitrogen 的商標
CPT 和 Vacutainer 是 Becton Dickinson 的商標
Ficoll-Paque 是 GE Health Technologies 的商標
Tween 是 ICI Americas 的商標

T-SPOT.*TB* 受到下列專利及專利期間保護:

US7575870, US8617821, US9360480, EP941478, JP4094674, AU728357, CA2272881; US7115361; US7632646, EP1144447, JP4633931, ZA2001-3356; US7901898, US8216795, US8507211, US9005902; US7579141, US8021832, US9238066, US9482671, US 15/019,532, EP1214088, EP2087906, JP4820489, AU773268, CA2372583

T-SPOT.*TB* incorporates patented technology under license from the Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark, Isis Innovation Limited, Oxford, UK and the Public Health Research Institute, New York, USA and may only be used for human *in vitro* diagnostics.

Revision number: 7 Date of Issue: Nov 2023
© 2023 Oxford Immunotec. All rights reserved.

製造業者名稱：Oxford Immunotec Ltd.
製造業者地址：143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon, Oxfordshire, OX14 4SE, England, United Kingdom
醫療器材商名稱：醫信國際有限公司
醫療器材商地址：台北市中正區愛國東路 22 號 9 樓之 1