



T-SPOT® TB 96

Hjälpmedel vid diagnos av tuberkulosinfektion

Format 96-brunnsplatta (TB.200)

BIPACKSEDEL

För diagnostisk undersökning *in vitro*

T-SPOT.TB 96

Platta med brunnar i 96-format (TB.200)

Innehållsförteckning	Sida
Användningsområde	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	4
Beredning av reagenser	5
Procedur	5
Provtagning och preparering	5
Räkning och spädning av celler	6
Förberedelse av platta och inkubering	7
Utveckling och räkning av prickar	8
Kvalitetskontroll	9
Resultattolkning och analyskriterier	9
Analysens resultategenskaper	9
Referenser	10
Ordlista över symboler	10

Avsedd användning

Analysen 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). Analysen T-SPOT.TB är en förenklad enzymkopplad 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^{1,2}. Användningen av utvalda antigener för sammansättningen *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) förbättrar analysens specificitet för dessa organismer genom att minska korsreaktiviteten mot BCG-vaccinet och mot de flesta mykobakterier^{3,4} 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.

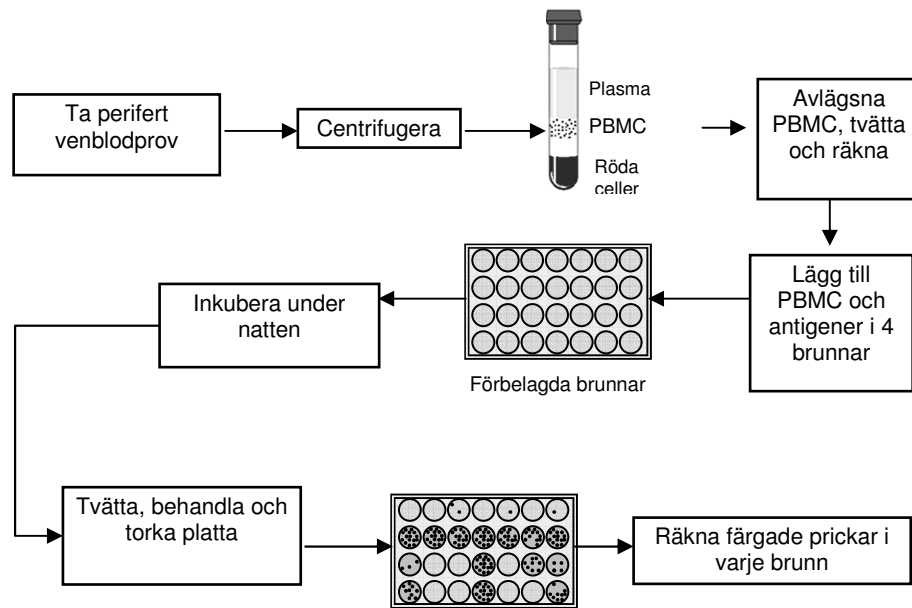
Analysen T-SPOT.TB är en förenklad variant av ELISPOT-analystekniken. ELISPOT-analyser är extremt känsliga eftersom målet cytokin fångas direkt runt den utsöndrande cellen, innan den späds ut i supernatanten och fångas av närliggande cellreceptorer eller degraderas. ELISPOT-analyser är därför mycket känsligare än vanliga ELISA-analyser⁵. Analysen T-SPOT.TB är utformad för detektering av effektor-T-celler som reagerar på stimulering med antigener specifika för *M. tuberculosis*^{3,4,6-9}. Analysen 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^{10,11}, oavsett ålder, kön, etnicitet, terapi eller immunostatus.

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 analysen. Detta säkerställer att även de som har låg koncentration av T-celler på grund av försvagat immunförsvar (immunkomprometterande och immunsuppressiva) får ett lämpligt antal blodkroppar tillsatta i mikrotiterbrunnarna. Såväl tvätt- och räkningsstadierna som ELISPOT-tekniken är överlägsna vid detektering 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 aktivering¹²) som bekräftar funktionaliteten av PBMC.



Figur 1: De viktigaste stegen i T-SPOT.TB. Lagg 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 formar 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 reaktionsplatsen. Varje fläck representerar ett fotavtryck av en individuell T-cell som utsöndrar cytokin. Utvärderingen av antalet prickar som fås ger en mätning av 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.
- Öppnad utrustning ska förvaras vid 2-8 °C. Utrustningen ska inte användas efter utgångsdatum som anges på utrustningens etikett.
- Blanda inte komponenter från olika utrustningssatser.
- T-SPOT.TB 96-satsen är endast avsedd för engångsbruk.
- Läs analysinstruktionerna noggrant innan användning.
- Använd en aseptisk teknik för att undvika nedsmittning av reagens, analysbrunnar, cellsuspensioner och cellodlingsmedia.
- Variation av den angivna pipetteringen och tvättteknikerna, inkuberingstiderna och/eller temperaturerna kan påverka de verkliga resultaten och bör undvikas.
- Blodet bör samlas och tas till analys inom 8 timmar. Denna tidsbegränsning kan kringgåas genom användning av T-Cell Xtend™ reagens (kan beställas från Oxford Immunotec). När T-Cell Xtend reagens används tillsammans med analysen T-SPOT.TB, förlängs förvaringstiden för proverna till 32 timmar.
- Förvara och transportera blodprov till laboratoriet i rumstemperatur (18-25 °C). Om T-Cell Xtend reagens används kan proverna transporteras och förvaras vid 10-25 °C. Kyl eller frys inte ned hela blodprov.
- Analysen 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*^{3,4} och *M. goodnae*.

Säkerhetsvarningar och försiktighetsåtgärder

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

Hantering av blodprov och analyskomponenter, 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 96-satsen innehåller:

1. 1 mikrotiterplatta: 96 brunnar täckta med en musmonoklonal antikropp mot cytokin interferon-gamma (IFN-g).
2. 2 små flaskor (0,7 ml var). Panel A: innehåller antigenen ESAT-6, albumin från oxblod och antimikrobiologiska agenter.
3. 2 små flaskor (0,7 ml var). Panel B: innehåller antigenen CFP10, albumin från oxblod och antimikrobiologiska agenter.
4. 2 små flaskor (0,7 ml var). Positiv kontroll: innehåller phytohaemagglutinin (PHA), som används som funktionskontroll av cellerna, albumin från oxblod och antimikrobiologiska agenter.
5. 1 liten flaska (50 µl) 200x koncentrerad konjugatreagens: musmonoklonal antikropp mot cytokin IFN-g konjugerad till alkalisk fosfatas.
6. 1 flaska (25 ml) substratlösning: lösning BCIP/NBT^{plus} som är klar att användas.
7. Bruksanvisning, som finns på CD:n tillsammans med MSDS, teknisk handbok, procedurhandbok med bilder, T-SPOT cellspädningskalkylator, konjugatspädningskalkylator, centrifughastighetskalkylator och programmet T-SPOT.*AutoReporter*.

Förvaring

Förvara alla komponenter vid 2-8 °C.

Undvik långvarig ljusexponering av substratlösningen.

Stabilitet

Komponenterna i förpackningen är stabila fram till utgångsdatumet som finns på förpackningen om de förvaras och hanteras enligt rekommendationerna.

Utrustning och material som måste köpas separat

1. Mikrobiologiskt skåp, klass II (rekommenderas).
2. Rör för venprovtagning, till exempel Vacutainer[®] CPT[™] (kan beställas från Oxford Immunotec) eller hepariniserade rör.
3. FICOLL-PAQUE^{*} PLUS eller annat material som separerar PBMC.
4. T-Cell *Xtend* reagens (kan beställas från Oxford Immunotec) kan användas tillsammans med prover som tagits mer än 8 timmar tidigare.
5. Leucosep-rör kan användas för att förenkla separeringen av PBMC med användning av FICOLL^{*}-metoden.
6. Centrifug för preparering av PBMC (kapabel för minst 1 800 xg och kan hålla proverna i rumstemperatur (18-25 °C)).
7. Utrustning och reagens för att möjliggöra räkning av PBMC, antingen manuellt med trypanblått och en hemocytometer i mikroskop, eller automatiskt med lämplig hematologianalys.
8. En fuktig kuvös med temperaturen 37 ± 1 °C med en 5 % tillförsel av CO₂.
9. En tvättare för mikrotiterplattor eller utrustning för manuell tvätt av plattor.
10. Pipetter och sterila pipettspetsar.
11. Steril PBS-lösning: till exempel GIBCO[®] 1x D-PBS (Invitrogen, katalognummer 14040-091).

12. Destillerat eller avjoniserat vatten.
13. Anordning för avläsning av plattan, som till exempel ett mikroskop, ett digitalt mikroskop, ett förstoringsglas eller en plattavbildare.
14. 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 analysen T-SPOT.TB.

Beredning av reagenser

1. Mikrotiterplatta. Mikrotiterplattan T-SPOT.TB 96 är klar att användas vid leverans. Ta fram den från förrådet och låt den anta rumstemperatur. Avlägsna den yttre folieförpackningen och kasta påsen med tolkmedel.
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 följer med varje analyssets) och preparera den precis innan användning.
6. Den medföljande substratlösningen är klar att användas. Ta fram den från förrådet och låt den anta rumstemperatur.

Procedur

Analysen ska utföras enligt principerna om god laboratoriesed och genom att noggrant följa denna bruksanvisning.

Oxford Immunotec Ltd har förberett en Procedurhandbok med bilder och en Teknisk handbok, som beskriver tagning och preparering av prov, urval av cellodlingsmedia och metoder för beräkning av prickar. Dessa artiklar finns på CD:n som medföljer varje analyssets, kan beställas på +44 (0) 1235 442780 eller laddas ned från www.oxfordimmunotec.com.

Provtagning och preparering

Enskilda användare bör validera procedurerna för insamling av PBMC, uppräknig av PBMC och val av lämpliga media som stöder T-cellernas funktionalitet under analysens primära inkuberingssteg. Normalt (patient med normalt fungerande immunförsvar) kan man erhålla tillräckligt med PBMC för analysen 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 litiumheparinrör
- Barn mellan 2 och 9 år: ett 4 ml CPT- eller litiumheparinrör
- Barn upp till 2 år: ett 2 ml pediatriiskt rör

Blodproven måste förvaras i rumstemperatur och analyseras inom 8 timmar efter provtagningen eller inom 32 timmar och förvaras vid 10-25 °C om provet behandlats med T-Cell *Xtend* reagens..

Cellodlingsmedia ska förvärmas till 37 °C innan de används med analysen 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 ned.	1. Blodproven kan samlas i flera olika rör. I våra laboratorier har vi med gott resultat använt Vacutainer CPT med natriumcitrat, CPT med natriumheparin och vanliga litiumheparinrör. Endast litiumheparinrör kan användas med T-Cell <i>Xtend</i> reagens. EDTA-rör rekommenderas inte.

<p>2. För venprovtagningsrör CTP ska tillverkarens instruktioner för separering av PBMC följas.</p> <p>Vid andra venprovtagningsmetoder ska PBMC separeras med centrifugering genom FICOLL-PAQUE PLUS med hjälp av procedurbeskrivningen.</p>	<p>2. Centrifugera 8 ml CPT-rör vid 1 600 xg under 28 minuter eller 4 ml CPT-rör vid 1 800 xg under 30 minuter vid 18 °C om en kyld centrifug finns tillgänglig. Låt centrifugen komma upp i 18 °C om längre 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. Skicka försiktigt det utspädda blodet (2-3 volymer) på FICOLL-PAQUE PLUS (1 volym) och centrifugera vid 1 000 xg under 22 minuter samtidigt som temperaturen hålls mellan 18 och 25 °C.</p> <p>Centrifughastighetskalkylatorn på CD:n som medföljer analyssetsen kan vara till hjälp vid konvertering av hastigheter från xg till rpm.</p> <p>Om proverna är mellan 8 och 32 timmar gamla bör de blandas med T-Cell <i>Xtend</i> reagens innan de skickas på FICOLL-PAQUE PLUS.</p> <p>Om Leucosep-rör eller T-Cell <i>Xtend</i> reagens (kan beställas från Oxford Immunotec) används följs protokollen som följer med dessa reagens.</p>
<p>3. 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>3. 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>4. Centrifugera vid 600 xg under 7 minuter. Håll bort supernatanten och lös upp pelleten igen i 1 ml medium.</p>	<p>4. Se punkt 3 ovan.</p>
<p>5. Kompensera volymen till 10 ml med färskt medium och centrifugera vid 350 xg under 7 minuter.</p>	<p>5. Se punkt 3 ovan.</p>
<p>6. Håll 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>

Räkning och spädning av celler

Analysen 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
<p>1. Räkna antalet viabla celler.</p>	<p>1. Cellerna kan räknas med flera olika metoder, inklusive manuell räkning med trypanblått och en hemocytometer, eller automatiskt med lämpligt instrument.</p>

2. Vid manuell räkning med Neubauer hemocytometer ska 10 µl av den slutliga cellsuspensionen läggas till 40 µl 0,4 % (viktprocent) 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 cellspädningskalkylator på CD:n som medföljer varje analysats underlättar denna beräkning.
4. Preparera en 500 µl koncentration på $2,5 \times 10^5$ celler/100 µl av den slutliga cellsuspensionen.	4. Se till att cellerna blandas ordentligt innan alikvoten avlägsnas för spädning.

Förberedelse av platta och inkubering

Analysen 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. Avlägsna den täckta mikrotiterplattan från förpackningen och låt den anta rumstemperatur.	1. Mikrotiterplattan har en skyddande plastbas. Denna ska inte avlägsnas under hela proceduren.
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. Jack i 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 kuvös med 37 °C och med 5 % CO ₂ under 16-20 timmar.	4. Undvik att röra plattan när den befinner sig i kuvösen. Stapla inte plattorna eftersom detta kan leda till ojämn temperatur och ventilation. Om den rekommenderade inkuberingstiden och -villkoren inte följs kan detta leda till felaktig tolkning av resultatet. Kontrollera att inkubatorn innehåller tillräckligt med vatten för att upprätthålla fuktigheten för inkubationsperioden.
---	---

Utveckling och räkning av prickar

Under plattans tvätt- och utvecklingsfaser får membranet inte röras med pipettspetsen eller den automatiska brunntvättspetsen. Jack i 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 och kassera cellodlingsmediumet.	1. Ta nu fram substratlösningen från utrustningen och låt den anta rumstemperatur.
2. Tillsätt 200 µl PBS-lösning i varje brunn.	
3. Kassera PBS-lösningen. Repetera brunntvätten ytterligare 3 gånger med färsk PBS-lösning vid varje tvätt.	3. Kassera all PBS efter det sista tvättsteget genom att vända plattan på ett absorberande papper innan du fortsätter.
4. Späd koncentrerad konjugatreagens 200 gånger i PBS för att skapa en fungerande lösningskoncentration.	4. Använd inte PBS som innehåller Tween [®] eller andra rengöringsmedel eftersom detta orsakar höga bakgrundsvärden. Preparera endast ett litet överskott av den fungerande lösningskoncentrationen för att undvika avfall. För 96 brunnar, som var och en kräver 50 µl, kompenserar du 5 ml fungerande lösningskoncentration genom att tillsätta 25 µl koncentrerad konjugatreagens i 4 975 µl PBS.
5. Tillsätt 50 µl fungerande lösningskoncentration med konjugatreagens 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. Kassera konjugatet och utför fyra 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 en ugn 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 resultatolkningen och analyskriterierna (se nedan) för att bestämma om patientprovet är "Positivt" eller "Negativt" för antigenerna TB.	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. <i>Tutor</i>) 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 "obestämbär". Se den tekniska handboken för T-SPOT. *TB* för eventuella orsaker (laddas ner från www.oxfordimmunotec.com). Ytterligare prover ska tas från personen och testas.

Antalet prickar i den positiva kontrollen av cellfunktionen ska vara ≥ 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^{13,14}. Om antalet prickar i den positiva kontrollen är < 20 prickar ska den räknas som "obestämbär". Om antingen panel A eller panel B är "Positiv" enligt beskrivningen i resultattolkning och analyskriterier (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 gränsvärde (tvetydigt). Gränsvärden (tvetydiga) är, trots att de är giltiga, mindre tillförlitliga än resultat där prickräkningen ligger längre från brytpunkten. Omtestning av patienten med användning av ett nytt prov rekommenderas därför. Om resultatet fortfarande är ett gränsvärde (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* beror på en infektion med *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* eller *M. goodii*. Alternativa tester krävs om dessa infektioner misstänks.

Resultattolkning och analyskriterier

Se avsnittet om kvalitetskontroll innan följande kriterier tillämpas.

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

- Testresultatet är "Positivt" if (panel A minus nollkontroll) och/eller (Panel B minus nollkontroll) ≥ 6 prickar.
- Testresultatet är "Negativt" om både (Panel A minus nollkontroll) och (Panel B minus nollkontroll) ≤ 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*.

Analysens resultategenskaper

Specificiteten utvärderades genom analys 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 analysen T-SPOT. *TB* beräknades som 100 % (93/93) (95 % konfidensgräns 95,8 % - 100 %).

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










Reproducerbarheten utvärderades, som en surrogatmarkör för interanalysvariation, genom analys av dubbla blodprover som testades på samma platta. Totalt 145 blodprover från 140 individuella donatorer analyserades dubbelt (två brunnar för både panel A och panel B) med analysen

T-SPOT.TB. I 142/145 (97,9 %) dubbelanalyser observerades klinisk överenskommelse. Två dubbelanalyser gav motsatta gränsresultat och endast 1/145 prov gav avvikande resultat.

Referenser

1. Janeway and Travers (1996) *Immunobiology* 2nd Ed.
2. Staines *et al* (1999) *Introducing Immunology* 2nd Ed.
3. Chapman *et al* (2002) *AIDS*, **16** (17): 2285-2293.
4. Ewer *et al* (2003) *Lancet*, **361**: 1168-1173.
5. Se 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 *in vitro*
-  Temperaturgräns/förvaras mellan
-  Se instruktioner för användning

T-SPOT, T-Cell *Xtend* och Oxford Immunotecs logotyp är varumärken som tillhör Oxford Immunotec Limited.
AIM V och GIBCO är varumärken som tillhör Invitrogen.
CPT och Vacutainer är varumärken som tillhör Becton Dickinson.
* FICOLL och FICOLL-PAQUE är varumärken som tillhör GE Companies.
Tween är ett varumärke som tillhör Uniqema Americas LLC.

Analysen T-SPOT. *TB* skyddas av följande patent och patent som sökts:

US 09/308,725, EP 941478, JP 1998-524410, AU 728357, CA 2272881, EP 1152012, AU 765013, US 7115361, US 09/830,839, EP 99952697.3, JP 2000-579635, ZA 2001-3356, US 7135280, EP 02726998.4, JP 2002-554719, AU 2002-219338, CA 2483236, CZ 2003/001866, IN 0105/DELNP/2003, NZ 526807, US 6290969, US 6338852, US 6350456, US 6458366, US 6962710, EP 850305, EP 851927, EP 1203817, JP 2001-517069, AU 727602, AU 756833, AU 753995, BR 9610262, BR 9610268, CA 2230885, CA 2230927, CN 1200146, CN 1200147, CZ 9800628, HU 9900902, IL 123506, NO 9800883, PL 325373, TR 9800411, ZA 9607394, ZA 9607395, US 5955077, EP 706571, JP 2001-515359, AU 682879, CA 2165949, NZ 267984, US 1999/132505, EP 928851, JP 2000-615041, AU 773268, CA 2372583

T-Cell *Xtend* reagens skyddas av följande patentet och patent som sökts:
WO 2008/041004

Analysen T-SPOT. *TB* innefattar patenterad teknologi under licens från Statens Serum Institut, Köpenhamn, Danmark och Isis Innovation Limited, Oxford, Storbritannien.

Analysen T-SPOT. *TB* säljs under licens från Public Health Research Institute och kan användas under patenträttigheterna från PHRI endast vid human diagnostisk undersökning *in vitro*.

© Oxford Immunotec Limited, 2009. Med ensamrätt.

Tillverkare
Oxford Immunotec Ltd
94C Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4RY, Storbritannien
www.oxfordimmunotec.com



Oxford Immunotec Limited, 94C Milton Park,
Abingdon, Oxon OX14 4RY, UK
Tel: +44 (0)1235 442780 Fax: +44 (0)1235 442781
E-mail: info@oxfordimmunotec.com

www.oxfordimmunotec.com

