



T-SPOT[®] TB



Oxford
Immunotec



Bluttest zur Diagnostik einer Tuberkuloseinfektion

PACKUNGSBEILAGE

Zur *In-vitro*-Diagnostik

Diese Packungsbeilage bezieht sich auf:

T-SPOT.TB 8 (8-Well Streifenplatte zur Mehrfachverwendung, Katalog-Nr.: TB.300)

Inhaltsverzeichnis	Seite
Verwendung	2
Einführung	2
Funktionsweise	2
Beschränkungen	3
Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen	4
Packungsinhalt	4
Lagerung	4
Stabilität	4
Für den Test erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Geräte und Materialien	4
Reagenzvorbereitung	5
Verfahrensweise	5
Probenentnahme und Vorbereitung	6
Zellzählung und Verdünnung	7
Plattenvorbereitung und Inkubation	8
Punktentwicklung und Zählung	9
Qualitätskontrolle	10
Auswertung der Ergebnisse und Testkriterien	11
Leistungsdaten	11
Literatur	12
Symbolerklärungen	12

Verwendung

Der T-SPOT®.TB-Test ist ein diagnostischer *In-vitro*-Test zum Nachweis von T-Effektorzellen, die auf Stimulation durch *Mycobacterium-tuberculosis*-Antigene reagieren. Der Test wird zur Unterstützung bei der Diagnose von Tuberkulose (TB)-Infektionen eingesetzt. Der T-SPOT. TB-Test ist eine vereinfachte ELISPOT (*enzyme-linked immunospot*)-Methode, bei der individuelle TB-spezifische aktivierte T-Effektorzellen gezählt werden.

Einführung

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit *M. tuberculosis* infiziert. Bei etwa 10% der Menschen, die eine latente Tuberkuloseinfektion (LTBI) in sich tragen, besteht das Risiko, dass sich eine aktive Erkrankung entwickelt. Diese Progressionsrate liegt bei bestimmten Gruppen (zum Beispiel bei frisch infizierten und bei Menschen mit einem geschwächten Immunsystem) noch höher.

Die Immunantwort auf eine Infektion mit *M. tuberculosis* ist in erster Linie eine zelluläre Reaktion. Im Rahmen dieser Immunantwort werden T-Zellen auf *M.-tuberculosis*-Antigene sensibilisiert. Die aktivierten spezifisch vom Blut getrennten T-Effektorzellen – CD4 und CD8 – können aufgrund ihrer Fähigkeit gezählt werden, *in vitro*- von diesen Antigenen stimuliert zu werden^{1,2}. Die Verwendung ausgewählter Antigene für den *M. tuberculosis*-Komplex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) verbessert die Spezifität des Tests für diese Organismen, indem die Kreuzreaktivität mit dem BCG-Impfstoff und den meisten Umweltmykobakterien^{3,4} reduziert wird. Zur Optimierung der Testsensitivität werden zwei separate Antigen-Panels verwendet, die klar die definierten Proteine ESAT-6 und CFP10 simulieren.

Der T-SPOT.TB-Test ist eine vereinfachte Variante des ELISPOT-Tests. ELISPOT-Tests sind außergewöhnlich empfindlich, da das Zielzytokin direkt in der Nähe der sezernierenden Zelle abgefangen wird, bevor es im Überstand verdünnt, von den Rezeptoren der Nachbarzellen abgefangen oder abgebaut wird. Dadurch sind ELISPOT-Tests erheblich sensitiver als konventionelle ELISA-Tests⁵. Der T-SPOT.TB-Test dient zum Nachweis von T-Effektorzellen, die auf Stimulation durch *M.-tuberculosis*-spezifische Antigene reagieren^{3,4,6-9}. Der Test zählt individuelle aktivierte TB-spezifische T-Zellen. Er eignet sich für alle Patienten, bei denen das Risiko einer LTBI bzw. ein Verdacht auf eine aktive Tuberkuloseerkrankung^{10,11} besteht, unabhängig von Alter, Geschlecht, ethnischer Zugehörigkeit, Therapie oder Immunstatus.

Funktionsweise

Periphere mononukleare Blutzellen (PBMC-Zellen) werden aus der Blutprobe gewonnen und gewaschen, um Quellen interferierender Hintergrundsignale zu entfernen. Anschließend werden die PBMC-Zellen gezählt, damit eine standardisierte Zellzahl im Test verwendet wird. Damit wird sicher gestellt, dass selbst bei Personen mit niedrigem T-Zelltitel aufgrund eines geschwächten Immunsystems (Immungeschwächte und Immunsupprimierte) eine ausreichende Zellzahl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben wird. Die Wasch- und Zählsschritte sowie die ELISPOT-Technik bieten eine überlegene Leistung beim Nachweis der TB-Erkrankung und einer latenten TB-Infektion.

Für jede Probe werden vier Vertiefungen benötigt (siehe Abbildung 1):

1. Eine Nullkontrolle zum Nachweis einer unspezifischen Zellaktivierung.
2. TB-spezifische Antigene, Panel A (ESAT-6).
3. TB-spezifische Antigene, Panel B (CFP10).
4. Eine Positive Kontrolle mit Phytohämagglutinin (PHA, einem bekannten polyklonalen Aktivator¹²) zur Bestätigung der Funktionalität der PBMC-Zellen.

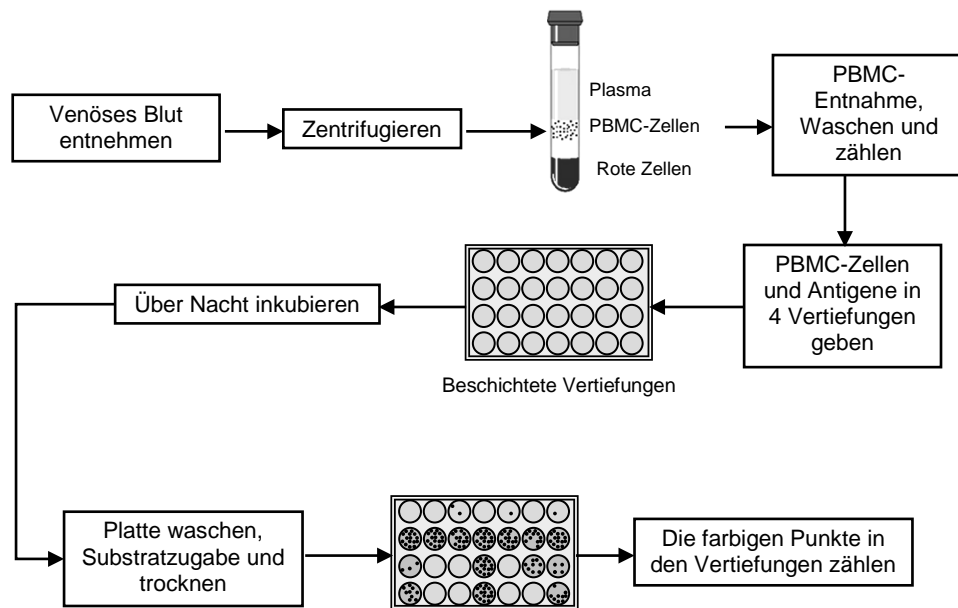


Abb. 1: Die Hauptschritte des T-SPOT.TB-Tests. Es ist zu beachten, dass sich in jeder Platte 96 Vertiefungen befinden.

Die PBMC-Zellen werden mit den Antigenen inkubiert, damit eine Stimulation etwaiger sensibilisierter T-Zellen stattfinden kann. Produziertes Zytokin wird mit Hilfe spezifischer Antikörper auf der Membran festgehalten, welche die Basis der Vertiefung bildet. Die Zellen und andere unerwünschte Materialien werden durch Waschen entfernt. Ein zweiter, mit alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des Zytokin-Moleküls gerichtet ist, wird hinzugefügt und bindet sich an das auf der Membranoberfläche festgehaltene Zytokin. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Jede Vertiefung wird mit einem löslichen Substrat versetzt; dies wird von gebundenem Enzym gespalten, mit dem Ergebnis, dass sich am Reaktionsort ein punktförmiger, unlöslicher Niederschlag bildet. Jeder Punkt stellt eine einzelne, Zytokin ausscheidende T-Zelle dar. Die Anzahl der entstandenen Punkte ist ein Maß für die Menge der *M. tuberculosis*-sensitiven T-Effektorzellen im peripheren Blut.

Beschränkungen

- Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.
- Nur von qualifizierten und geschulten Fachkräften anzuwenden.
- Das T-SPOT.TB 96-Testkit ist nur zum einmaligen Gebrauch bestimmt. Das T-SPOT.TB 8-Testkit kann hingegen mehrfach verwendet werden.
- Komponenten unterschiedlicher Chargen nicht miteinander mischen.
- Vor dem Gebrauch die Gebrauchsanleitung des Tests gründlich lesen.
- Steriles Arbeiten, um eine Kontamination der Reagenzien, Testplattenvertiefungen, Zellsuspensionen und Zellkulturmedien zu vermeiden.
- Abweichungen von den genannten Pipettierungs- und Waschtechniken, Inkubationszeiten und/oder -temperaturen können die Testergebnisse beeinträchtigen und sind zu vermeiden.
- Der Test sollte innerhalb von 8 Stunden nach der Blutentnahme angesetzt werden. Durch Einsatz einer Granulozyten-Abbau-Methode wie des T-Cell *Xtend*[®]-Reagenz (erhältlich von Oxford Immunotec) lässt sich diese Zeitbeschränkung umgehen. Wird das T-Cell *Xtend*-Reagenz oder eine andere Granulozyten-Abbau-Methode zusammen mit dem T-SPOT.TB-Test verwendet, erhöht sich die Lagerzeit der Blutprobe auf 32 Stunden.
- Blutproben bei Raumtemperatur (18-25°C) lagern und zum Labor transportieren. Wird Granulozyten-Abbau eingesetzt, z. B. das T-Cell *Xtend*-Reagenz, dann können die Proben bei 10-25°C transportiert und gelagert werden. Vollblutproben nicht im Kühlschrank oder Gefrierschrank aufbewahren.
- Der T-SPOT.TB-Test sollte nur vor dem Hintergrund des klinischen Gesamtbilds verwendet und ausgewertet werden.

- Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit eines Kontakts mit *M. tuberculosis* bzw. einer Tuberkuloseinfektion nicht aus.
- In den BCG-Stämmen und den meisten Umweltmykobakterien finden sich keine ESAT-6 und CFP10-Antigene, ausgenommen *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*^{3,4} und *M. goodnae*.

Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Bei der Handhabung von humanem Probenmaterial ist immer höchste Vorsicht geboten. Alle Blutproben sollten als potenziell infektiös behandelt werden.

Die Handhabung von Blutproben und Testbestandteilen, deren Verwendung, Lagerung und Entsorgung sollte gemäß den geltenden landestypischen Sicherheitsrichtlinien und Bestimmungen erfolgen.

Bei der Arbeit mit Chemikalien ist Vorsicht geboten. Alle Chemikalien sind zunächst als potenzielle Schadstoffe anzusehen.

Packungsinhalt

Das T-SPOT.*TB* 8-Testkit enthält:

1. 1 Mikrotiterplatte: 96 Vertiefungen in Form von 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen in einem Rahmen, die mit einem murinen monoklonalen Antikörper gegen das Zytokin Interferon-gamma (IFN- γ) beschichtet sind.
2. 2 Fläschchen (à 0,8mL) Panel A: enthält ESAT-6-Antigene, Rinderserumalbumin und antimikrobielle Wirkstoffe.
3. 2 Fläschchen (à 0,8mL) Panel B: enthält CFP10-Antigene, Rinderserumalbumin und antimikrobielle Wirkstoffe.
4. 2 Fläschchen (à 0,8mL) Positive Kontrolle: enthält Phytohämagglutinin (PHA) zur Kontrolle der Zellfunktionalität, Rinderserumalbumin und antimikrobielle Wirkstoffe.
5. 1 Fläschchen (50 μ L) 200-fach konzentriertes Konjugatreagenz: mit alkalischer Phosphatase konjugierter, muriner monoklonaler Antikörper gegen Zytokin IFN- γ .
6. 1 Flasche (25mL) Substratlösung: gebrauchsfertige BCIP/NBT^{plus}-Lösung.
7. Gebrauchsanweisung. Diese findet sich auf der CD zusammen mit dem MSDS, Schulungsanleitung, T-SPOT-Zellverdünnungsrechner, Konjugatverdünnungsrechner, Zentrifugengeschwindigkeitsumrechner und dem Programm T-SPOT.*AutoReporter*.

Lagerung

Alle Komponenten des Testkits bei 2-8°C lagern.

Die Substratlösung vor längerer Lichteinwirkung schützen.

Stabilität

Komponenten unterschiedlicher Chargen dürfen nicht miteinander gemischt werden. Die ungeöffnete Packung bei 2-8°C lagern. Solange die empfohlenen Lager- und Handhabungsanweisungen befolgt werden, sind die Bestandteile des Testkits bis zu dem auf der Verpackung genannten Verfallsdatum stabil. Das Testkit darf nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.

Die geöffneten Kitkomponenten sind bei 2-8°C zu lagern. Die geöffneten Komponenten müssen innerhalb von 8 Wochen nach dem Öffnen verwendet werden.

Für den Test erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Geräte und Materialien

1. Mikrotiterplattenrahmen für 8-er Streifen (erhältlich von Oxford Immunotec) zur Verwendung mit dem T-SPOT.*TB* 8-Testkit
2. Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II (Empfehlung).

3. Blutentnahmeröhrchen, z. B. Vacutainer® CPT™ (erhältlich von Oxford Immunotec) oder Heparin-Blut-Röhrchen.
4. Ficoll®-Paque* Plus oder entsprechende Materialien zur Präparierung von PBMC-Zellen.
5. Das T-Cell *Xtend*-Reagenz (erhältlich von Oxford Immunotec) kann mit Blutproben verwendet werden, die mehr als 32 Stunden nach der Venenpunktion getestet wurden. Alternative Methoden für den Granulozyten-Abbau können für Blutproben verwendet werden, die bis zu 32 Stunden gelagert worden sind. Die Kunden müssen alternative Methoden in ihrem eigenen Labor validieren.
6. Zur Vereinfachung der Trennung von PBMC-Zellen unter Verwendung der Ficoll*-Methode können Leucosep-Röhrchen eingesetzt werden.
7. Zentrifuge zur Präparation von PBMC-Zellen (Zentrifugenleistung mindestens 1800xg; die Proben sollten auf Raumtemperatur (18-25°C) gehalten werden können).
8. Bei der Präparation und dem Waschen von separaten PBMC-Zellen kann eine Zellwaschzentrifuge, z. B. eine DiaCent-CW-Zentrifuge (Bio-Rad) eingesetzt werden. Die Kunden müssen die Anwendung solcher Geräte in ihrem eigenen Labor validieren.
9. Geräte und Reagenzien, die eine Zählung der PBMC-Zellen ermöglichen; entweder manuell unter Verwendung von Trypanblau und einer Neubauer-Kammer auf einem Mikroskop, oder automatisch mit Hilfe eines geeigneten Hämatologie-Analysegerätes.
10. Ein Inkubator mit Befeuchtung und einer Inkubationstemperatur von $37 \pm 1^\circ\text{C}$ und Zufuhr von 5% CO₂.
11. Mikrotiterplattenwaschgerät oder einer Pipette zum manuellen Waschen von Platten.
12. Pipetten und sterile Pipettenspitzen.
13. Sterile D-PBS-Lösung, z. B. GIBCO® 1x D-PBS (Invitrogen; Katalog-Nr. 14040-091).
14. Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
15. Ein Hilfsmittel zum Lesen der Platte, z. B. Mikroskop, Digitalmikroskop, Vergrößerungsglas oder Mikrotiterplattenbildgerät.
16. Ein steriles Zellkulturmedium, z. B. GIBCO AIM V® (Invitrogen, Katalog-Nr. 31035-025). Dieses serumfreie Medium wird für den Inkubationsschritt unbedingt empfohlen. RPMI 1640 (Invitrogen, Katalog-Nr. 21875-034) sollte nur für die ersten Schritte der Probenpräparation verwendet werden. Es wird empfohlen, das Zellkulturmedium in geeigneten Aliquots aufzubewahren und überschüssiges Material nach dem Gebrauch zu entsorgen. Das Zellkulturmedium sollte vor dem Benutzen mit dem T-SPOT.TB-Test auf 37°C vorgewärmt werden.

Reagenzvorbereitung

1. Mikrotiterplatte. Die T-SPOT.TB 8-Mikrotiterplatte ist gebrauchsfertig. Die benötigte Anzahl an 8-er-Streifen aus dem Kühlschrank nehmen und bei Raumtemperatur stehen lassen. Die verbleibenden Streifen wieder zusammen mit dem Beutel mit dem Trocknungsmittel in der äußeren Folienpackung verschließen.
2. Die Fläschchen mit den *M. tuberculosis* ESAT-6-Antigenen (Panel A) sind gebrauchsfertig.
3. Die Fläschchen mit den *M. tuberculosis* CFP10-Antigenen (Panel B) sind gebrauchsfertig.
4. Die Fläschchen mit der Positiven Kontrolle sind gebrauchsfertig.
5. Eine Arbeitslösung aus Konjugatreagenz (Verdünnungsverhältnis 1:200) herstellen. Das Volumen der benötigten Konjugat-Reagenzlösung berechnen (siehe T-SPOT Konjugatverdünnungsrechner auf der in jedem Testkit mitgelieferten CD). Das Reagenz kann unmittelbar vor der Verwendung hergestellt werden oder in Arbeitskonzentration angesetzt und vor der Verwendung bis zu sechs Wochen bei 2° C bis 8° C gelagert werden. Das verdünnte Reagenz nicht nach Ablauf der Haltbarkeit verwenden.
6. Die Substratlösung ist gebrauchsfertig. Die Lösung aus dem Kühlschrank nehmen und bei Raumtemperatur stehen lassen.

Verfahrensweise

Bei der Durchführung des Tests sind gute Laborpraktiken Voraussetzung und diese Gebrauchsanweisung zu beachten.

Oxford Immunotec Ltd hat eine Schulungsanleitung erarbeitet, in der die Probenentnahme und Vorbereitung, die Auswahl von Zellkulturmedien und Methoden zur Punktezahl beschrieben werden. Diese ist auf der in jedem Testkit mitgelieferten CD oder telefonisch unter der Nummer +44

(0) 1235 442780 erhältlich bzw. stehen zum Downloaden von unserer Website: www.oxfordimmunotec.com zur Verfügung.

Probenentnahme und Vorbereitung

Anwender sollten überprüfen, ob ihre Verfahrensweisen bei der Herstellung und Auszählung von PBMC-Zellen und bei der Auswahl geeigneter Medien zur Unterstützung der T-Zellfunktionalität während der ersten Inkubationsphase geeignet sind. Bei immunkompetenten Patienten kann die für den Test ausreichende Zahl an PBMC-Zellen wie folgt aus venösen Blutproben gewonnen werden:

- Erwachsene und Kinder über 10 Jahre: ein 8mL- oder zwei 4mL-CPT-Röhrchen bzw. ein 6mL-Heparin-Röhrchen
- Kinder 2-9 Jahre: ein 4mL-CPT- oder Heparin-Röhrchen
- Kinder bis zu 2 Jahren: ein 2mL-Röhrchen (Pädiatrie)

Blutproben müssen bei Raumtemperatur gelagert werden. Der Test ist innerhalb von 8 Stunden nach der Probenentnahme durchzuführen bzw., wenn die Probe mit einem Mittel zum Abbau von Granulozyten wie dem T-Cell *Xtend*-Reagenz behandelt wird, innerhalb von 32 Stunden bei einer Lagertemperatur von 10-25°C.

Das Zellkulturmedium sollte vor dem Benutzen mit dem T-SPOT.TB-Test auf 37°C vorgewärmt werden.

Verfahrensweise	Hinweise
1. Nehmen Sie eine Blutprobe gemäß den Anweisungen für das Entnahmegesäß. Bewahren Sie die Blutprobe bei Raumtemperatur (18-25°C) bzw., falls das T-Cell <i>Xtend</i> -Reagenz verwendet werden soll, bei 10-25°C auf. Die Blutprobe nicht im Kühl- oder Gefrierschrank lagern.	1. Für die Blutproben können unterschiedliche Röhrchen verwendet werden. In unseren Labors haben wir erfolgreich mit Vacutainer-Röhrchen mit Citrat, Röhrchen mit Heparin zur Zellpräparation und Standardröhrchen mit Heparin oder Citrat gearbeitet. Röhrchen zur Zellpräparation sind nicht zur Verwendung mit dem T-Cell <i>Xtend</i> -Reagenz geeignet. EDTA-Röhrchen werden nicht empfohlen.
2. Wenn Sie Entnahmeröhrchen zur Zellpräparation verwenden, folgen Sie bei der Abtrennung der PBMC-Zellen den Anweisungen des Herstellers. Wenn Sie Vacutainer-Röhrchen mit Heparin oder Citrat zur Blutentnahme verwenden, trennen Sie PBMC-Zellen mittels Zentrifugation durch Ficoll-Paque Plus laut Anweisung ab. Wenn Sie Leucosep-Röhrchen oder das T-Cell <i>Xtend</i> -Reagenz (Bei Oxford Immunotec erhältlich) verwenden, befolgen Sie die diesen Reagenzien beigefügten Protokolle.	2. Zentrifugieren Sie 8mL-CPT-Röhrchen 28 Minuten bei 1600xg bzw. 4mL-CPT-Röhrchen 30 Minuten bei 1800xg bei 18°C, wenn eine Kühlzentrifuge verfügbar ist. Falls vorher niedrigere Temperaturen verwendet wurden, lassen Sie die Zentrifuge sich auf 18°C erwärmen. Wird keine Kühlzentrifuge eingesetzt, ist sicherzustellen, dass die Temperatur nicht über 25°C ansteigt. Alternativ können Sie das Blut mit dem gleichen Volumen RPMI-1640-Medium verdünnen. Das verdünnte Blut (2-3 Volumen) vorsichtig auf Ficoll-Paque Plus (1 Volumen) schichten und 22 Minuten bei 1000xg bei einer Temperatur zwischen 18 und 25°C zentrifugieren. Bei Proben, die 8 bis 32 Stunden nach der Venenpunktion verwendet werden, benutzen Sie das T-Cell <i>Xtend</i> -Reagenz, bevor Sie die Probe auf Ficoll-Paque Plus aufschichten. Der auf der im Testkit enthaltenen CD verfügbare Zentrifugengeschwindigkeitsumrechner hilft bei der Umrechnung der Geschwindigkeit von xg in Upm.

	Falls andere Granulozyten-Abbau-Methoden verwendet werden, müssen diese vom Kunden zur Verwendung mit dem T-SPOT.TB-Test validiert werden.
3a. Entnehmen Sie die weiße, trübe Schicht der PBMC-Zellen mit einer Pipette und übertragen Sie es in ein konisches 15mL-Zentrifugenröhrchen. Das Röhrchen mit Zellkulturmedium auf ein Volumen von 10mL auffüllen.	3a. Für das Waschen der Zellen bei diesem Prozess können unterschiedliche Medien verwendet werden. In unseren Labors kamen sowohl AIM V als auch RPMI 1640 erfolgreich zum Einsatz und sind zu empfehlen.
3b. Alternativ kann zur Erleichterung der Zellwaschphasen eine Zellwaschzentrifuge, z. B. DiaCent-CW (Bio-Rad) benutzt werden. Wird dieses System verwendet, sollte DPBS zum Waschen der Zellen verwendet werden.	3b. Die Methodologie für die Verwendung der Zellwaschzentrifuge während der Präparation von PBMC-Zellen ist bei Oxford Immunotec erhältlich. Die Kunden müssen diese Methode jedoch in ihrem eigenen Labor validieren.
4. 7 Minuten bei 600xg zentrifugieren. Den Überstand abgießen und das Pellet in 1mL Medium erneut resuspendieren.	4. Siehe Anmerkung 3a.
5. Das Röhrchen mit frischem Medium auf 10mL auffüllen und 7 Minuten bei 350xg zentrifugieren.	5. Siehe Anmerkung 3a.
6. Den Überstand abgießen und das Pellet in 0,7mL AIM V-Kulturmedium erneut resuspendieren.	6. Zu diesem Zeitpunkt sollte das für die über Nacht vorgesehene Kulturmedium zum Resuspendieren des Pellets verwendet werden. Wir empfehlen das serumfreie Medium AIM V, das wir in unseren Labors erfolgreich verwendet haben.

T-Zellen, die von anderen Körperflüssigkeiten wie bronchoalveolärer Lavage (BAL), Pleuraerguss (PE) oder cerebrospinales Fluid (CSF) erhalten wurden, wurden erfolgreich mit dem T-SPOT.TB-Test zum Nachweis einer TB-Infektion und -Erkrankung verwendet (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 und Patel *et al* (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77). Werden andere Proben als Blutproben verwendet, müssen die Anwender die Verfahren zur Entnahme ausreichender mononukleärer Zellen validieren. Methoden zur Bearbeitung von BAL-Proben sind in den oben zitierten Publikationen beschrieben.

Hinweis 1: Der Grenzwert für ein positives Ergebnis und gültige Kontrollen für den Test bei der Verwendung von Nicht-Blutproben wurden nicht umfassend evaluiert und können sich vom Bluttest unterscheiden. Anwender sollten ihre Testinterpretationskriterien definieren. Ärzte sind aufgefordert, die Ergebnisse mit ärztlichem Urteilsvermögen zu prüfen.

Hinweis 2: Die Dauer vom Erhalt der Probe bis zum Beginn des Tests wurde nicht umfassend untersucht.

Zellzählung und Verdünnung

Der T-SPOT.TB-Test erfordert $2,5 \times 10^5$ lebende PBMC-Zellen pro Vertiefung. Für jede Patientenprobe werden vier Vertiefungen benötigt. In jede Vertiefung muss die korrekte Anzahl an Zellen gegeben werden. Abweichende Zellzahlen können zu einer inkorrekten Auswertung des Ergebnisses führen.

Verfahrensweise	Hinweise
1. Zählen Sie die lebenden Zellen.	1. Die Zellen können auf unterschiedliche Weise gezählt werden, z. B. durch manuelles Zählen mit Hilfe von Trypanblau und einer Neubauer-Kammer oder durch automatisches Zählen mit einem geeigneten Gerät.

2. Bei manueller Zählung mit einer Neubauer-Kammer: 10µL der endgültigen Zellsuspension zu 40µL 0,4% (m/V) Trypanblau-Lösung geben. Geben Sie die geeignete Menge in die Neubauer-Kammer und zählen Sie die Zellen im Raster. Bei anderen Zählkammern und automatischen Geräten den Anweisungen des Herstellers folgen.	2. Darauf achten, dass die Zellsuspension unmittelbar vor Entnahme der zu verdünnenden bzw. zu zählenden Aliquote gründlich vermischt ist. Die Zellen können sich am Röhrchenboden abgesetzt haben, was zu einer fehlerhaften Auswertung der Zellzahl führt.
3. Errechnen Sie die Konzentration der in der Ausgangssuspension enthaltenen lebenden Zellen.	3. Darauf achten, dass die Berechnung für das zu verwendende Zellzählsystem korrekt ist. Die Verwendung von zu wenigen oder zu vielen Zellen kann zu fehlerhaften Auswertungsergebnissen führen. Der auf der mit jedem Testkit mitgelieferten CD befindliche T-SPOT-Zellverdünnungsrechner erleichtert diese Berechnung.
4. 500µL der endgültigen Zellsuspension mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen / 100µL herstellen.	4. Vor Entnahme eines Aliquots zur Verdünnung darauf achten, dass die Zellen gründlich vermischt sind.

Plattenvorbereitung und Inkubation

Der T-SPOT.TB-Test erfordert vier Vertiefungen für jede Patientenprobe. Mit jeder Patientenprobe eine Nullkontrolle und eine Positive Kontrolle für die Zellfunktionalität mitlaufen lassen. Es empfiehlt sich, die Proben vertikal wie unten abgebildet auf der Platte zu positionieren.

- Nullkontrolle
- Panel A
- Panel B
- Positive Kontrolle

Verfahrensweise	Hinweise
1. Den vorbeschichteten 8-er Streifen aus der Verpackung entnehmen, in einen Plattenrahmen einsetzen und bei Raumtemperatur stehen lassen.	1. Nur die benötigte Anzahl an Streifen entnehmen. Die verbleibenden Streifen lagern. Die zu verwendenden Streifen in einen leeren, mit Bodenschutz und Deckel versehenen Plattenrahmen einsetzen. Rahmen, Bodenschutz und Deckel sollten zur Wiederverwendung aufbewahrt werden.
2. Für jede Patientenprobe werden 4 Vertiefungen benötigt. (i) Geben Sie in jede Nullkontrolle 50µL des AIM V-Kulturmediums. (ii) Geben Sie in jede erforderliche Vertiefung 50µL Panel-A-Lösung. (iii) Geben Sie in jede erforderlichlich Vertiefung 50µL Panel-B-Lösung. (iv) Geben Sie 50µL Positive Kontrolle in jede Vertiefung zur Kontrolle der Zellfunktionalität.	2. Die Pipettenspitze darf die Membran nicht berühren. Durch die Pipettenspitze verursachte Einkerbungen in der Membran können zu Artefakten in den Vertiefungen führen. Möglicherweise ist es erforderlich, leicht gegen die Platte zu klopfen und auf diese Weise sicherzustellen, dass die Lösungen die Membran im Boden einer jeden Vertiefung bedecken. Kräftiges Schütteln ist zu vermeiden, um eine Kreuzkontamination zwischen Antigenen unterschiedlicher Vertiefungen zu vermeiden.
3. Zu jeder der 4 für eine Patientenprobe verwendeten Vertiefungen 100µL der endgültigen Zellsuspension des jeweiligen Patienten hinzugeben (250.000 lebende Zellen).	3. Vor der Entnahme eines jeden 100µL-Aliquots die Zellsuspension mehrere Male in die Pipette aufziehen und wieder herausdrücken, um eine gründliche Mischung der Zellen zu gewährleisten. Es wird empfohlen, für jedes Hinzufügen

	patienteneigener T-Zellen eine neue Pipettenspitze zu verwenden, um die Gefahr einer Kreuzkontamination zwischen den 4 Vertiefungen zu vermeiden.
4. Die Platte in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C und 5% CO ₂ über 16-20 Stunden inkubieren.	4. Die Platte nicht mehr bewegen, sobald sie sich im Inkubator befindet. Die Mikrotiterplatten nicht stapeln, da dies zu einer ungleichmäßigen Temperaturverteilung und Belüftung führen kann. Nichtbeachtung der empfohlenen Inkubationszeit bzw. der Inkubationsbedingungen kann zu fehlerhaften Auswertungsergebnissen führen. Prüfen Sie, ob sich im Inkubator ausreichend Wasser befindet, damit die Feuchtigkeit über den Inkubationszeitraum hinweg erhalten bleibt.

Punktentwicklung und Zählung

Beim Waschen und Entwickeln der Platte darauf achten, dass es zu keiner Berührung der Membran durch die Pipettenspitzen oder die Spitzen automatischer Plattenwaschgeräte kommt. Durch Pipettenspitzen oder Spitzen der Geräte verursachte Membranbeschädigungen können zu Artefakten in den Vertiefungen führen, welche die Punktzählung beeinträchtigen können.

Verfahrensweise	Hinweise
1. Die Platte aus dem Inkubator nehmen.	1. Für den Fall einer unvermeidbaren Verzögerung bei der Verarbeitung, z. B. Probleme mit Ressourcen am Wochenende, können die Platten aus dem Inkubator entfernt und bei 2°C bis 8° C aufbewahrt werden. Die maximal empfohlene Aufbewahrungszeit beträgt 72 Stunden und die Platten müssen während der Aufbewahrung abgedeckt werden. Der Kunde muss diesen Prozess im eigenen Labor validieren.
2. Den Überstand abgießen und in jede Vertiefung 200µL D-PBS-Lösung geben.	2. Die Substratlösung aus dem Testkit entnehmen und bei Raumtemperatur stehen lassen.
3. Die D-PBS-Lösung abgießen. Das Waschen der Vertiefungen 3 Mal wiederholen. Für jeden Waschvorgang frische D-PBS-Lösung verwenden.	3. Vor dem nächsten Schritt die gesamte D-PBS-Lösung des letzten Waschvorgangs durch Umdrehen der Platte auf saugfähigem Papier abgießen.
4. Das konzentrierte Konjugatreagenz im Verhältnis 1:200 mit D-PBS-Lösung verdünnen. Dies ist die für die Arbeitslösung erforderliche Verdünnung.	4. Verwenden Sie keine D-PBS-Lösung, die Tween® oder sonstige Detergenzien enthält, da dies zu hohen Hintergrundzählungen führt. Achten Sie darauf, dass nur ein kleiner Überschuss (für eventuellen Verlust) Arbeitslösung in der erforderlichen Verdünnung hergestellt wird. Für den T-SPOT.TB 96, für den jede der 96 Vertiefungen 50µL benötigt, stellen Sie 5 mL Arbeitslösung durch Zugabe von 25µL konzentriertem Konjugatreagenz zu 4975µL D-PBS-Lösung her. Für den T-SPOT.TB 8 und für jeden Streifen mit 8 Vertiefungen (jede benötigt 50µL), stellen Sie 500µL Arbeitslösung durch Zugabe von 2,5µL konzentriertem Konjugatreagenz zu 497,5µL D-PBS-Lösung her. Für diese Berechnung kann der

	Konjugatverdünnungsrechner auf der mit jedem Testkit mitgelieferten CD verwendet werden.
5. In jede Vertiefung 50µL der Konjugat-Arbeitslösung geben und 1 Stunde bei 2-8°C inkubieren.	5. Nichtbeachtung der empfohlenen Inkubationszeit kann zu fehlerhaften Auswertungsergebnissen führen.
6. Das Konjugat abgießen und viermal mit D-PBS-Lösung waschen (siehe Schritt 2 und 3).	
7. In jede Vertiefung 50µL Substratlösung geben und bei Raumtemperatur 7 Minuten lang inkubieren.	7. Nichtbeachtung der empfohlenen Inkubationszeit kann zu fehlerhaften Auswertungsergebnissen führen.
8. Die Platte gründlich mit destilliertem oder deionisiertem Wasser waschen, um die Nachweisreaktion zu stoppen.	
9. Die Platte an einem gut belüfteten Ort oder Sterilisator bei bis zu 37°C trocknen lassen.	9. Während die Platte austrocknet, werden die Punkte besser sichtbar. 4 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur trocknen lassen.
10. Die auffälligen, dunkelblauen Punkte auf der Membran einer jeden Vertiefung zählen und notieren. Anhand der Auswertung der Ergebnisse und Testkriterien (siehe unten) überprüfen, ob eine Patientenprobe ‚positiv‘ oder ‚negativ‘ gegenüber TB-Antigenen ist.	10. Die Punkte können auf unterschiedliche Weise sichtbar gemacht werden: Manuell durch ein Vergrößerungsglas, durch ein geeignetes Mikroskop, ein Digitalmikroskop oder durch Verwendung eines speziellen ELISPOT-Plattenbildgerätes. Über die Webseite von Oxford Immunotec ist ein Schulungsprogramm zur Punkteählung (das T-SPOT.Tutor-Programm) erhältlich.

Qualitätskontrolle

Bei einem typischen Ergebnis wären wenige oder keine Punkte in der Nullkontrolle und mehr als 20 Punkte in der Positiven Kontrolle.

Eine Nullkontrolle mit mehr als 10 Punkten gilt als ‚unbestimmt‘. Mögliche Ursachen können Sie der Schulungsanleitung (als Download erhältlich von www.oxfordimmunotec.com) entnehmen. Es wird empfohlen, vom Patienten eine neue Probe zu entnehmen und die Untersuchung zu wiederholen.

Die Positive Kontrolle für die Zellfunktionalität sollte im Normalfall ≥ 20 sein oder eine Sättigung zeigen (d.h. zu viele Punkte, um sie zählen zu können). Ein kleiner Anteil von Patienten hat möglicherweise T-Zellen, die nur begrenzt auf PHA^{13,14} ansprechen. Liegt eine Positive Kontrolle unter 20 Punkten, sollte sie als ‚unbestimmt‘ betrachtet werden, sofern nicht Panel A oder Panel B ‚positiv‘ gemäß der Beschreibung im Abschnitt *Auswertung der Ergebnisse und Testkriterien* (siehe unten) sind, in diesem Fall ist das Ergebnis gültig.

Wenn aufgrund möglicher biologischer und systematischer Variationen der höhere Wert aus (Panel A minus Nullkontrolle) und (Panel B minus Nullkontrolle) 5, 6 oder 7 Punkte beträgt, kann das Ergebnis als grenzwertig (Graubereich) angesehen werden. Obwohl sie Gültigkeit haben, sind grenzwertige Ergebnisse weniger verlässlich als solche, bei denen die Punktzahl weiter vom Grenzwert entfernt liegt. Deshalb wird eine erneute Untersuchung des Patienten unter Verwendung einer neuen Blutprobe empfohlen. Fällt das Ergebnis dieser neuen Untersuchung immer noch grenzwertig aus, sollten andere diagnostische Tests und/oder epidemiologische Informationen zur Bestimmung des Status einer TB-Infektion bei diesem Patienten herangezogen werden.

ESAT-6 und CFP10-Antigene sind in BCG-Stämmen von *M. bovis* und den meisten Umweltmykobakterien nicht enthalten. *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* und *M. goodnae* können jedoch ein ‚positives‘ Ergebnis im T-SPOT.TB-Test erzeugen. Bei Verdacht auf diese Infektionen sind weitere Tests erforderlich.

Auswertung der Ergebnisse und Testkriterien

Lesen Sie den Abschnitt *Qualitätskontrolle*, bevor Sie die folgenden Kriterien anwenden.

Die Ergebnisse des T-SPOT.TB-Tests werden ausgewertet, indem man die Punktzahl in der Vertiefung der Nullkontrolle von der Punktzahl in jedem der Panels abzieht und dabei den folgenden Algorithmus anwendet:

- Das Testergebnis ist 'positiv', wenn (Panel A minus Nullkontrolle) und / oder (Panel B minus Nullkontrolle) ≥ 6 Punkte ergibt.
- Das Testergebnis ist 'negativ', wenn beide (Panel A minus Nullkontrolle) und (Panel B minus Nullkontrolle) ≤ 5 Punkte ergeben. Das schließt Werte von weniger als Null ein.

Ein ‚positives‘ Ergebnis deutet darauf hin, dass die Probe T-Effektorzellen enthält, die reaktiv gegenüber *M. tuberculosis* sind.

Ein ‚negatives‘ Ergebnis deutet darauf hin, dass die Probe vermutlich keine T-Effektorzellen enthält, die reaktiv gegenüber *M. tuberculosis* sind.

Leistungsdaten

Die Spezifität wurde durch Testung von 93 Spenderproben ermittelt, deren Krankengeschichten und persönlichen Angaben zufolge ein niedriges Risiko für eine Ansteckung mit *M. tuberculosis* besteht. Die Spezifität des T-SPOT.TB-Test wurde als 100% (93/93) errechnet (95% Vertrauensgrenzen: 95,8% - 100%).










Die Sensitivität wurde durch Testen von 87 Proben aus Kulturen ermittelt, die gesicherte *M. tuberculosis*-Infektionen waren, wozu auch immunsupprimierte Gruppen gehörten. Die Sensitivität des T-SPOT.TB-Test wurde als 98,8% (86/87) errechnet (95% Vertrauensgrenzen: 90,8% - 99,9%).

Als Surrogatmarker für die Intratest-Variation wurde die **Reproduzierbarkeit** durch Analyse von Doppelproben ermittelt, die auf der gleichen Platte getestet wurden. Unter Verwendung des T-SPOT.TB-Test wurden 145 individuelle Blutproben von 140 unterschiedlichen Spendern im Doppel getestet (jeweils zwei Vertiefungen für Panel A und Panel B). Bei 142/145 (97,9%) Doppelanalysen wurde eine klinische Übereinstimmung beobachtet. Zwei Doppelanalysen ergaben nicht übereinstimmende, grenzwertige Ergebnisse und nur 1/145 Proben zeigte ein abweichendes Ergebnis.

Literatur

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. Siehe www.elispot-analyzers.de/english/science-elispot-assays.html
6. Pathan *et al* (2001) *J. Immunol.*, **167**: 5217-5225.
7. Lavani *et al* (2001) *Lancet*, **357**: 2017-2021.
8. Lavani *et al* (2001) *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **163**: 824-828.
9. Lavani *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.

Symbolerklärungen

-  Verfallsdatum (Jahr-Monat-Tag)
-  Chargenbezeichnung
-  Artikelnummer oder Produktcode
-  Achtung, siehe Gebrauchsanweisung
-  Hersteller
-  Ausreichend für "n" tests
-  *In-vitro*-Diagnostikum
-  Temperaturbeschränkung/Lagerung bei
-  Siehe Gebrauchsanweisung

T-SPOT, T-Cell *Xtend* und das Oxford-Immunotec-Logo sind Warenzeichen von Oxford Immunotec Limited.

AIM-V und GIBCO sind Warenzeichen von Invitrogen.

CPT und Vacutainer sind Warenzeichen von Becton Dickinson.

* FICOLL und FICOLL-PAQUE sind Warenzeichen von GE Companies.

Tween ist ein Warenzeichen von Uniqema Americas LLC.

Der T-SPOT. *TB*-Test ist durch die folgenden Patente und Patentanmeldungen geschützt:

US7575870, US8617821, US14/090,221, EP941478, JP4094674, AU728357, CA2272881; US7115361; US7632646, EP1144447, JP4633931, ZA2001-3356; US7901898, US8216795, US8507211, US9005902; EP1203817, JP43245597, AU727602, CA2653566, CN1200147, CZ300953, HU0900047, NO9800883, TR2009/01109, ZA9607394, ZW10496; US5955077; US7579141, US8021832, US9238066, EP1214088, EP2087906, JP4820489, AU773268, CA2372583

Die Verwendung des T-Cell *Xtend*-Reagenz ist durch die folgenden Patente und Patentanmeldungen geschützt:

EP2084508; US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP2014-112089, IN2165/DELNP/2009, CA2665205

Der T-SPOT. *TB*-Test enthält patentierte Technologie unter Lizenz von Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark.

© Oxford Immunotec Limited, 2016. Alle Rechte vorbehalten.

Hersteller

Oxford Immunotec Ltd
94C Innovation Drive Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4RZ, UK
www.oxfordimmunotec.com



Oxford Immunotec Ltd.
94C Innovation Drive, Milton Park,
Abingdon, Oxfordshire, OX14 4RZ, UK.
Tel: +44 (0)1235 442780
Fax: +44 (0)1235 442781



www.oxfordimmunotec.com