



T-Cell *Xtend* -reagenssin testaus pitkittyneessä T-SPOT. *TB*-näytekuljetuksessa

Bioanalytiikan koulutusohjelma
Bioanalyttikko
Opinnäytetyö
Kevät

Kristel Kookmaa

Koulutusohjelma	Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma		
Tekijä/Tekijät		
Kristel Kookmaa		
Työn nimi		
T-Cell <i>Xtend</i> -reagenssin testaus pitkittyneessä T-SPOT. <i>TB</i> -näytekuljetuksessa		
Työn laji	Aika	Sivumäärä
Opinnäytetyö	Kevät 2010	20 + 1 liite
TIIVISTELMÄ		
<p>Latentin tuberkuloosin tutkimiseen käytettävää diagnostista in vitro ELISPOT-testiä varten otetun kokoverinäytteen lyhyt säilyvyysaika on ollut esteenä määrityksen laajemmalle käytölle, sillä näytteen käsittely tulee aloittaa neljän tunnin sisällä näytteenotosta. T-Cell <i>Xtend</i> -reagenssia markkinoidaan keinona pidentää näytteen kuljetusaikaa. Tämän työn tarkoituksena oli selvittää, miten näytteen 24 tunnin säilytys vaikuttaa ELISPOT-menetelmään perustuvan T-SPOT.<i>TB</i>-testin tarkkuuteen. Säilytyksen vaikutusta testattiin Vacutainer® CPT™ -putkessa (Cell Prepare Tube) sekä BD Vacutainer® litiumhepariiniputkessa, johon oli lisätty T-Cell <i>Xtend</i> -liuosta. Työssä arvioitiin T-Cell <i>Xtend</i> -liuoksen ja CPT-putken valmistajien antamat suositukset näytteen säilyvyydestä.</p> <p>Tulokset osoittivat, että verinäytteen säilytys 24 tuntia vaikutti T-SPOT.<i>TB</i>-määrityksen tarkkuuteen. T-Cell <i>Xtend</i> -liuoksen lisääminen ei selvästi parantanut vuorokauden kuluttua näytteenotosta analysoidujen näytteiden säilyvyyttä, vaan saadut spottimäärät olivat alhaisempia kuin heti näytteenoton jälkeen analysoidusta litiumhepariiniputkesta saadut spottimäärät. Näytteen säilytys CPT-putkessa 24 tuntia aiheutti myös spottimäärien laskua. Näytteen viivästynyt käsittely lisää riskiä, että reaktiivisten solujen frekvenssit ovat alhaisemmat kuin alle neljässä tunnissa käsitellyssä näytteessä.</p>		
Avainsanat		
T-Cell <i>Xtend</i> , ELISPOT näytteen säilyvyys, T-SPOT. <i>TB</i> , latentti tuberkuloosi, PBMC, <i>M. tuberculosis</i>		

Degree Programme in		Degree
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care
Author/Authors		
Kristel Kookmaa		
Title		
Testing of T-Cell <i>Xtend</i> -Reagent in Extended T-SPOT. <i>TB</i> - Sample Transportation		
Type of Work	Date	Pages
Final Project	Spring 2010	20 + 1 appendix
<p>ABSTRACT</p> <p>To diagnose latent tuberculosis infection (LTBI) new immunodiagnostic tests based on release of interferon gamma upon <i>ex vivo</i> stimulation with TB specific antigens (IGRA) have been recently introduced. One of the IGRAs is an ELISPOT- based commercial T-SPOT. <i>TB</i> assay (Oxford Immunotec). The availability of fresh samples with viable lymphocytes is the major concern to ensure accurate results. It is recommended that the samples should be analyzed within 4 hours from the venipuncture. To extend the storage of samples, a commercial reagent T-Cell <i>Xtend</i> was developed (Oxford Immunotec). The aim of this study was to evaluate T-Cell <i>Xtend</i> for prolonged sample storage and to compare the results to those obtained within 4 hours.</p> <p>The tested reagent was added to lithium heparin tubes 24 hours after the blood samples were preserved in a vertical position at room temperature. For the controls was used the same samples drawn in the same tube and into the Cell Preparation Tube (CPT) (Becton, Dickinson and Company) which were analyzed immediately. The stability of lymphocytes was checked from CTP tubes that were analyzed with a 24-hour delay. The purity of the lymphocyte fraction after centrifugation from each of the tested tubes was also compared.</p> <p>The addition of the T-Cell <i>Xtend</i> reagent after 24 hour storage did not preserve the frequencies of reactive lymphocytes on the same level as the samples that were processed immediately. The T-Cell <i>Xtend</i> reagent improved the separation of peripheral blood mononuclear cells from the whole blood but the observed immunological reactivities were lower compared to the samples processed immediately. We conclude that the delay in the processing of samples will result in suboptimal performance that cannot be compensated with the addition of the T-Cell <i>Xtend</i>. For the ELISPOT-based assays the samples should be processed within a 4-hour timeframe. However, if the delay is inevitable the borderline results should be interpreted with caution.</p>		
Keywords		
T-Cell <i>Xtend</i> , ELISPOT sample storing, T-SPOT. <i>TB</i> , latent tuberculosis, PBMC, <i>M. tuberculosis</i>		

OPINNÄYTETYÖN SISÄLTÖ

Opinnäytetyöni sisältää suunnitelmaosan sekä työstä julkaistavan artikkelin. Artikkelin on esitetty siinä muodossa, kuin se Kliinlab-lehteen toimitetaan.

- I OPINNÄYTETYÖN SUUNNITELMA
- II ARTIKKELI
- III OPINNÄYTETYÖPROSESSIN ARVIOINTI

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	MYKOBAKTEERIT	3
2.1	<i>M. tuberculosis</i> solumorfologia	3
2.2	<i>M. tuberculosis</i> virulenssitekijät	4
3	TUBERKULOOSI SAIRAUTENA	4
3.1	Taudin kulku	4
3.2	Latentti tuberkuloosi	6
3.3	Immuunipuolustus tuberkuloosi-infektiossa	7
4	LATENTIN TUBERKULOOSIN DIAGNOSOINTI	8
4.1	T-SPOT.TB	9
4.2	Muita menetelmiä	10
5	VERINÄYTTEEN SÄILYVYYS ANALYSOINTIKELPOISENA	11
5.1	BD CPT-putki	12
5.2	Li-hepariiniputki	13
5.2.1	Leucosep®-erotteluputket	13
5.2.2	T-Cell <i>Xtend</i> -liuos	14
6	TYÖN TARKOITUS	15
7	TYÖN TOTEUTTAMINEN	16
7.1	Testauksen aineisto ja eettinen pohdinta	16
7.2	Työn toteutusaikataulu	18
8	TULOKSET	18
9	TIEDONHAKU	19
	LÄHTEET	20
	LIITE 1	

1 JOHDANTO

Tuberkuloosi on *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerin aiheuttama infektio ja se luokitellaan yleisvaaralliseksi tartuntataudiksi. Suomi kuuluu tuberkuloosin vähäisen ilmaantuvuuden maihin, uusia tartuntoja ilmaantuu alle 400 vuodessa. Suomessa tuberkuloosiin sairastuvat useimmiten ikääntyneet henkilöt, joilla latentti tuberkuloosi aktivoituu. Myös korkean ilmaantuvuuden maista Suomeen saapuneilla maahanmuuttajilla esiintyy suhteellisen paljon tuberkuloosia. (Sosiaali- ja terveystieteiden tutkimuskeskus 2006: 9.) 90 % tapauksista tuberkuloosi jää tartunnan saaneella henkilöllä latenttiin muotoon. Tämä tarkoittaa sitä, että tuberkuloositartunnan saaneella henkilöllä ei esiinny aktiivisen tuberkuloosin aiheuttamia kliinisiä oireita, eikä siihen viittaavia löydöksiä. Latentti tuberkuloosi voi kuitenkin kehittyä aktiiviseksi, kun henkilön immuniteetti heikkenee esimerkiksi vanhuuden, jonkin sairauden tai sairauden hoidon myötä. (Viljanen – Liippo – Kokki 2005: 145.)

Tiettyjen sairauksien hoitoihin käytetyt lääkkeet saattavat laukaista potilaalla olevan latentin tuberkuloosin. Yleinen Suomessa esiintyvä tällainen sairaus on nivelreuma, mutta myös psoriaasi ja Chronin tauti kuuluvat näihin sairauksiin. Ennen edellä mainittujen sairauksien hoitojen aloittamista, on varmistettava, ettei potilaalla ole latenttia tuberkuloosia, joka voisi reaktivoitua hoitojen seurauksena. (Salonen – Repo – Leirisalo-Repo 2009.)

Nykyään latentin tuberkuloosin diagnosoinnissa käytetään kahta eri testiä, T-SPOT.*TB*- ja QuantiFERON®-TB Gold -testiä. T-SPOT.*TB*-testiä käytetään, jos verinäyte voidaan toimittaa analysoitavaksi neljän tunnin sisällä näytteenotosta, muussa tapauksessa käytetään QuantiFERON®-TB Gold -testiä. T-SPOT.*TB* on QuantiFERON®-TB Gold-testiä herkempi, mutta siihen liittyvät preanalyttiset vaatimukset ovat tähän asti olleet esteenä sen laajemmalle käytölle. Kumpikaan näistä määrittelytestistä ei erota latenttia tuberkuloosia aktiivisesta muodosta, vaan tulokseksi saadaan, onko elimistössä *M. tuberculosis* -bakteerille herkistyneitä lymfosyyttejä.

Tällä hetkellä HUSLAB tekee ELISPOT menetelmään perustuvaa T-SPOT.*TB*-testiä ainoastaan maanantaisin ja keskiviikkoisin. Näyte on toimitettava analysoivaan laboratorioon neljän tunnin sisällä näytteenotosta. Tämä hankaloittaa ja rajoittaa T-SPOT.*TB*-

määrityksen laajempaa käyttöä, sillä kauempana Suomessa sijaitsevilla laboratorioilla ei ole mahdollisuutta saada näytettä toimitettua ajoissa.

ELISPOT-määritystä varten verinäyte otetaan joko Vacutainer® CPT -putkeen (Cell Prepare Tube) tai litiumhepariiniputkeen. Oxford Immunotec'in valmistaman T-Cell *Xtend* -liuoksen on luvattu parantavan hepariiniputkeen otetun kokoverinäytteen eroteltavuutta niin, että näytteestä saadaan luotettavia tuloksia jopa 32 tuntia näytteenoton jälkeen. Becton Dickinson lupaa, että verinäyte säilyy analysointikelpoisena CPT-putkessa 24 tuntia, jos näyte erotellaan viimeistään kaksi tuntia näytteenoton jälkeen. Väitteiden paikkansapitävyyttä ei ole kuitenkaan vielä HUSLABissa tutkittu, joten tästä syystä ohjeistusta ei ole voitu päivittää.

Tarkoituksena on selvittää, miten 24 tunnin säilytysaika vaikuttaa ELISPOT-menetelmään perustuvaan T-SPOT.TB-testin tulokseen. Verinäytteen säilyvyyttä testataan litiumhepariiniputkessa, johon on lisätty T-Cell *Xtend* -liuosta (Oxford Immunotec). Kontrollina toimii CPT-putkeen (Becton Dickinson) otettu verinäyte, joka analysoidaan heti ja 24 tunnin kuluttua näytteenotosta. Mikäli valmistajien antamat säilyvyysajat toimivat annettujen suositusten mukaisesti, voidaan T-SPOT.TB -määrityksen käyttö ulottaa myös niihin tapauksiin, missä näytteen toimituksessa menee yli neljä tuntia.

Jos testauksessa saadaan tulokseksi, että verinäyte ei säily tarpeeksi laadukkaana kummassakaan putkessa 24 tuntia, ei T-SPOT.TB:n käyttöä voida suositella niissä tapauksissa, joissa näytteen toimituksessa menee yli neljä tuntia.

2 MYKOKAKTEERIT

Mykobakteereita tunnetaan kymmeniä eri lajeja. Näiden joukossa on sekä patogeenisiiä että terveelle ihmiselle vaarattomia lajeja. Bakteereita, jotka eivät aiheuta ihmisellä infektoita, kutsutaan apatogeenisiksi bakteereiksi. Mykobakteerit voidaan jakaa tuberkuloottisiin ja nontuberkuloottisiin mykobakteereihin (NTMs). Tuberkuloottisiin mykobakteereihin kuuluvat lajit ovat *M. tuberculosis*, *M. bovis* ja *M. africanum*. Kaikki tähän ryhmään kuuluvat bakteerit pystyvät elämään ihmisessä ja aiheuttamaan tuberkuloosi-infektion. Suurin osa tuberkuloosi-infektioista on kuitenkin *M. tuberculosis* -kannan aiheuttamia.

Nontuberkuloottisia mykobakteerilajeja elää runsaasti ympäristössä ja jopa ihmisessä ja niiden patogeenisuus vaihtelee kannoittain. Ihmiselle patogeeniset nontuberkuloottiset kannat pystyvät aiheuttamaan taudin yleensä vain immuunipuutteisille henkilöille. Mykobakteerit voidaan jakaa myös kasvunopeutensa mukaan, nopeasti kasvaviin sekä hitaasti kasvaviin lajeihin. *M. tuberculosis* on tyypillinen hitaasti kasvava laji. (Forbes – Sahm – Weissfeld 1998: 715-718.)

2.1 *M. tuberculosis*-bakteerin solumorfologia

Mycobacterium tuberculosis on noin 0,4 µm leveä ja 3-4 µm pitkä liikkumaton sauva-bakteeri. Se on obligaatisti aerobi, joka tarkoittaa sitä, että se pystyy elämään ainoastaan hapellisissa oloissa. *M. tuberculosis* hakeutuu elimistössä solujen, yleisimmin makrofagien sisälle, joissa se alkaa lisääntyä. Bakteerin soluseinän hydrofobiset aineet antavat sille kyvyn kestää elinympäristön epäsuotuisia oloja. *M. tuberculosis* -bakteerin vahva soluseinä koostuu peptidoglykaanista ja erilaisista lipideistä, joista tärkeimpiä ovat glykolipidit, mykolihapot ja mykosidit. (Kayser – Bienz – Eckert – Zinkernagel 2005: 263-264; Liippo 2005: 402.)

Erikoisen haponkestävän soluseinänsä takia se ei värjäydy Gram-väreillä, vaan värjäykseen käytetään esimerkiksi Ziehl-Neelsen-värjäystä tai fluoresenssivärjäystä. Nopean, mutta epäherkän Ziehl-Neelsen-värjäyksen lisäksi tuberkuloosibakteeria voidaan tutkia mm. viljelemällä. Viljelyn haittapuolena on kuitenkin tuberkuloosibakteerin hidas kah-

dentumisaika, se jakaantuu vain kerran 12 tunnissa. (Kayser – Bienz – Eckert – Zinker-nagel 2005: 263-264; Liippo 2005: 402.)

2.2 *M. tuberculosis* virulenssitekijät

M. tuberculosis -bakteerin soluseinän lipidit ovat tärkeä virulenssitekijä. Soluseinän erityiset lipidit, mykolihapot, tekevät siitä vahamaisen, tiiviin ja happoja sekä alkoholia kestävän. Tämän ansiosta *M. tuberculosis* pystyy elämään makrofagien sisällä inhiboimalla fagosomin ja lysosomin fuusiota. Komplementtiresistenssin arvellaan myös joh-tuvan soluseinän lipideistä. *M. tuberculosis* -bakteeri on hyvin infektiivinen, jo yksi basilli voi aiheuttaa infektion. (Kayser ym. 2005: 264; Viljanen ym. 2005: 141-142.)

3 TUBERKULOOSI SAIRAUTENA

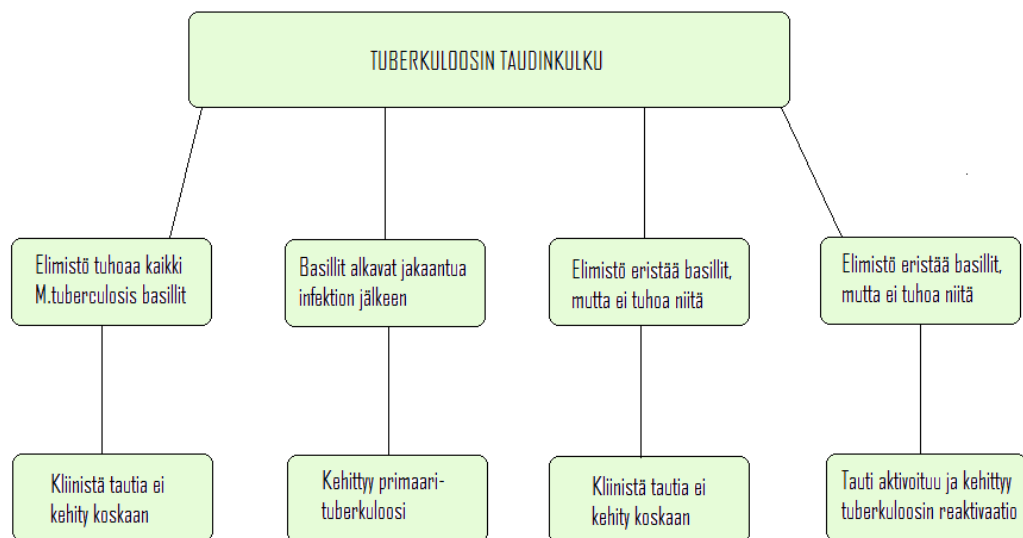
Tuberkuloosi on *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerin aiheuttama infektio ja se luoki-tellaan yleisvaaralliseksi tartuntataudiksi. Suomessa tavatuista tuberkuloositapauksista keuhkotuberkuloosi on yleisin tuberkuloosimuoto. Tuberkuloosi voi esiintyä muissakin elimissä, kuten luustossa, virtsateissä, aivoissa, imusolmukkeissa tai nivelissä. Tuberku-loosi tarttuu huonosti, noin 30 % lähipiirissä altistuneista saa tartunnan ja vain noin 10 % tartunnan saaneista tuberkuloosi kehittyy latentista muodosta kliiniseksi taudiksi jos-sain vaiheessa elämää. (Asiantuntijaryhmän suositus 2003; Sosiaali- ja terveysministe-riö 2006.)

3.1 Taudin kulku

Keuhkotuberkuloosi on ihmisestä toiseen tarttuva sairaus, joka leviää, kun tuberkuloosia sairastava henkilö esimerkiksi yskii tai aivastaa. Tuberkuloosi leviää yleensä vain keuh-kotuberkuloosia sairastavan henkilön välityksellä. Keuhkotuberkuloosi tarttuu, kun al-tistavan henkilön ysköksessä on tarpeeksi paljon tuberkuloosibakteereita. Tarttumisto-dennäköisyyteen vaikuttaa moni tekijä, kuten altistumisaika, tartuttavan henkilön yski-mistavat ja altistumistilan ilmanvaihto. Tuberkuloosia sairastava henkilö erittää tuberku-loosibakteeria pisara-aerosolimuodossa. Nesteen haihtuessa pisaroista muodostuu il-massa pieniä tarttuvia hiukkasia, jotka jäävät leijailemaan ympäristöön. (Liippo 2005: 402.)

Keuhkotuberkuloosin kehittymisessä on useita eri vaiheita. (Ks. kuvio 1.) Tuberkuloosibakteeri kulkeutuu sisään hengittävän henkilön keuhkoihin, keuhkorakkuloihin, joissa bakteerien ympärille syntyy alkeispesäkkeitä. Alkeispesäkkeistä tuberkuloosibakteerit voivat levitä imu- ja veriteitse muualle elimistöön. Tätä taudintilaa kutsutaan primäärituberkuloosiksi (Liippo 2005: 403.)

Tuberkuloosibakteerit joutuvat keuhkorakkuloissa aktivoimattomien makrofagien fagotsytosoimiksi. Osa bakteereista tuhoutuu, mutta bakteerin tehokkaiden virulenssitekijöiden ansiosta, osa voi säilyä hengissä ja alkaa lisääntyä makrofageissa. Tuberkuloosibakteeri lisääntyy makrofagissa niin pitkään, kunnes makrofagi repeytyy ja uudet bakteerit pääsevät leviämään muualle elimistöön. (Vasankari – Liippo – Ruutu 2007.) Yleensä elimistön puolustus kuitenkin pystyy voittamaan tuberkuloosibakteerit, jolloin muodostuneissa primääripesäkkeissä alkaa granulooman muodostuminen ja pesäkkeen kalkkeutuminen. Pesäkkeisiin jääneet bakteerit voivat myöhemmin, jopa kymmenien vuosien päästä tartunnasta, aiheuttaa postprimaarisen taudin eli latentin tuberkuloosin reaktivaation. (Liippo 2005: 403.)



KUVIO 1. Tuberkuloosin taudinkulku.

Noin 10 % sairastuneista latenti tuberkuloosi aktivoituu jossain vaiheessa elämää, yleensä henkilön yleiskunnon ja immunitietin heikennettyä. Kun immuunipuolustus ei enää jaksaa pitää latenssia yllä, tuberkuloosibakteereita sisältävät kuoliot alkavat rikkou-

tua, jonka seurauksena bakteerit alkavat hapensaannin myötä taas jakaantumaan. Tässä vaiheessa henkilö erittää ysköksissään hyvin paljon bakteereita ympäristöönsä. Keuhkot alkavat vaurioitua, kun niihin syntyy tuberkuloosin seurauksena repeämiä ja arpikudosta. Vain aktiivisessa vaiheessa olevaa keuhkotuberkuloosia sairastavat potilaat voivat levittää tautia eteenpäin. (Viljanen ym. 2005: 145.) Muissa elimissä kuin keuhkoissa oleva tuberkuloosi tarttuu hyvin harvoin. Keuhkotuberkuloosikin tarttuu yleensä vasta pitkäaikaisen altistumisen jälkeen. (Liippo 2005: 399.)

3.2 Latentti tuberkuloosi

Latentti tuberkuloosi, LTBI, tarkoittaa sitä, että tuberkuloositartunnan saaneella henkilöllä ei esiinny tuberkuloosin aiheuttamia kliinisiä oireita eikä siihen viittaavia löydöksiä. LTBI ei myöskään tartu ihmisestä toiseen. Latentin ja aktiivisen tuberkuloosin eroja on lueteltu alla olevassa taulukossa (ks. taulukko 1). Latentti tuberkuloosi voi kehittyä kliiniseksi taudiksi, kun henkilön immuniteetti heikkenee esimerkiksi vanhuuden tai sairauden hoidon myötä. Erityisen suuri riski tuberkuloosin aktivoitumiseen on rokotamattomilla lapsilla, joilla elimistön immuunipuolustus ei ole vielä täysin kehittynyt. (Asiantuntijaryhmän suositus 2003: 2; Vasankari ym. 2007: 2.)

TAULUKKO 1. Latentin tuberkuloosin ja aktiivisen tuberkuloosin eroja (Mukaillen Centers for Disease Control and Prevention).

Latentti tuberkuloosi (LTBI)	Aktiivinen tuberkuloosi
<ul style="list-style-type: none"> ◆ Kliinisten oireiden ja tuberkuloosiin viittaavien löydösten puuttuminen ◆ Positiivinen ELISPOT- tai Quantiferon-TB Gold -testi ◆ Keuhkoista otetssa röntgenkuvassa ei viitteitä taudista 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Mahdollisia oireita on mm. yskä, kipu keuhkoissa, jatkuva kuume, yöhikoilu, laihtuminen, ruokahalun puutos. ◆ Keuhkojen röntgenkuva voi olla epänormaali ◆ Yskösnäytteet voivat olla positiivisia viljelyssä tai värjäyksessä ◆ Positiivinen ELISPOT – tai Quantiferon-TB Gold -testi

Tavanomaista reumalääkitystä saavalla nivelreumapotilaalla on arvioitu olevan nelinkertainen riski latentin tuberkuloosin aktivoitumiseen. Mikäli perinteinen reumahoito osoittautuu tehottomaksi, annetaan potilaalle nivelreuman biologista täsmälääkettä, tuumorinekroositekijän (TNF) salpaajaa. Tämä edelleen nelinkertaistaa riskin, että latentti tuberkuloosi aktivoituu. Tästä syystä latentti tuberkuloosi on ehdottomasti diagnosoitava ja hoidettava ennen nivelreumalääkityksen aloittamista. TNF:n salpaajia käytetään nivelreuman lisäksi myös esimerkiksi selkärankareuman, psoriaasin ja tulehdussellisten suolistosairauksien, kuten Chronin taudin hoidoissa. (Salonen – Repo – Leirisalo-Repo 2007.)

Suomessa latenttia tuberkuloosia hoidetaan ainoastaan riskiryhmissä, sillä terveillä ja hyväkuntoisilla ihmisillä latentti tuberkuloosi harvoin aktivoituu. Lisäksi hoitomyöntyvyys voi hyväkuntoisilla henkilöillä olla puutteellista, sillä hoito on pitkäkestoinen, lääkemäärä suuri ja hoidossa käytetyillä lääkkeillä voi olla haittavaikutuksia. Edellä mainitut seikat ja LTBI:n oireettomuus voi aiheuttaa sen, että lääkitys jätetään kesken. Hoidon enneaikainen keskeyttäminen aiheuttaa resistenttien tuberkuloosikantojen syntyä. Riskiryhmiin kuuluvilla henkilöillä aktiiviseen tuberkuloosiin sairastumisriski on suuri, joten se on hoidettava tuberkuloosin kehittymisen estämiseksi. (Asiantuntijaryhmän suositus 2003: 2533.)

3.3 Immuunipuolustus tuberkuloosi-infektiossa

Tuberkuloosi-infektion seurauksena elimistössä kehitty tuberkuloosibakteeria vastaan soluvälitteinen immunitetti. Soluvälitteisessä eli hankitussa immunitetissa T-lymfosyytit tunnistavat spesifisesti elimistölle vieraita rakenteita eli antigeeneja. T-soluista muodostuu myös muistisoluja, joiden tehtävänä on muistaa ja tunnistaa aikaisemmin kohdattu antigeeni ja tuhota se tehokkaasti. (Arstila – Hänninen 2005: 707.)

Makrofagien fagosoidessa tuberkuloosibakteereita tartunnan jälkeen, osa bakteereista säilyy elinkykyisinä makrofagien sisällä. Makrofagien pinnoilla, tietyt fagosomista vapautuvat antigeenit alkavat ekspressoitua yhdessä HLA-antigeenien kanssa. Elimistön T-solut, tunnistavat tämän antigeenikompleksin ja aktivoituvat. Aktivoituneet T-solut käynnistävät sytokiinituotannon, joka puolestaan aktivoi makrofageja tuhoamaan tuberkuloosibakteereita. Aktivoituneet T-solut alkavat myös itse tuhota tuberkuloosibasilleja.

Eräs sytokiini, jota T-solut tuottavat, on gammainterferoni (INF γ). Aktivoituneet makrofagit pystyvät tunnistamaan ja tuhoamaan tuberkuloosibakteereita. Makrofagien aktiivoinnin lisäksi, sytokiinit aktivoivat granuloomamuodostusta sekä tulehdusreaktiota, joiden avulla elimistö pyrkii estämään infektion kulkua. (Arstila – Hänninen 2005: 709-710; Liippo ym. 2005: 404.)

Immuunipuolustuksen aktivoinnin tuloksena makrofagit ympäröivät tuberkuloosibasillit ja muodostavat näin bakteerille tiiviin etenemisesteen. Granulooman muodostuminen ja tulehdusreaktio aiheuttavat primääripesäkkeen arpeutumisen. Jos ihmisen immuunipuolustus jostain syystä heikkenee, eikä se jaksa enää pitää bakteereita muodostuneissa pesäkkeissä, tauti etenee aktiiviseen muotoonsa. Tuberkuloositartunnan saanut henkilö voi sairastua aktiiviseen tuberkuloosiin pian infektoitumisen jälkeen, mutta suurimmalla osalla tartunnan saaneista, tuberkuloosi pysyy elimistössä latentissa muodossa. (Viljanen ym. 2005: 145.)

4 LATENTIN TUBERKULOOSIN DIAGNOSOINTI

Latentin tuberkuloosin diagnosoinnissa käytetään nykyään mm. ELISPOT-menetelmään perustuvaa T-SPOT.TB-testiä sekä QuantiFERON®-TB Gold -määritystä. Latentin tuberkuloosin diagnosoinnin tarkoituksena on löytää oireettomat tuberkuloosin kantajat tilanteissa, joissa esimerkiksi jonkin hoidon seurauksena latenti tuberkuloosi voisi aktivoitua ja näin heikentää potilasta entisestään. T-SPOT.TB ja QuantiFERON®-TB Gold -testeillä voidaan osoittaa onko potilas altistunut tuberkuloosibakteerille, mutta niillä ei voida erottaa aktiivia tuberkuloosia latentista muodosta.

Kliinisten tuberkuloosi-infektioiden tunnistuksessa ensisijaisia menetelmiä ovat haponkestävän sauvan värjäys ja viljely. Viljelyn avulla määritetään potilaasta eristetyn kannan lääkeherkkyydet sekä selvitetään kannan epidemiologiaa. Haponkestävän sauvan värjäys tehdään potilaan ysköksestä, jonka avulla voidaan diagnosoida mahdollinen keuhkotuberkuloosi. Jos kyseessä on jokin muu kuin keuhkotuberkuloosi tai potilas ei kykene tuottamaan ysköstä, voidaan tuberkuloosin diagnosointiin käyttää histologisia tutkimuksia ja geenimonistustekniikoita. (Tuuminen ym. 2008: 1.)

ELISPOT-menetelmästä on suoritettua erilaisia tutkimuksia ympäri maailmaa. Yleensä tutkimukset keskittyvät lähinnä ELISPOTin, QuantiFERON®-TB Gold -testin ja ihotes-tin vertailuun, ELISPOTin herkkyteen ja tarkkuuteen, mutta myös näytteen säilyvyyttä on tutkittu. Säilyvyystutkimukset ovat kuitenkin keskittyneet useimmiten pakastukseen, ei niinkään tuorenäytteisiin.

Aikaisemmissa opinnäytetöissä ELISPOT-menetelmää on tutkittu moneen otteeseen. Vuonna 2001 tutkittiin yleisesti ELISPOT-menetelmää ja sen toimivuutta ja vuonna 2002 valmistuneen opinnäytetyön tarkoituksena oli ELISPOT-menetelmän pystyttäminen immunologian osastolla. ELISPOT-näytteiden pakastesäilytystä tutkittiin vuonna 2008 valmistuneessa opinnäytetyössä.

4.1 T-SPOT.TB

ELISPOT-menetelmään perustuvaa T-SPOT.TB-määrittystä varten potilaan verestä eristetään mononukleaariset solut eli pyöreä- tai ovaalitumaiset valkosolut, joita ovat lymfositit ja monosyytit. Eristettyjä soluja stimuloidaan spesifisillä tuberkuloosiantigeeneillä.

T-SPOT.TB on diagnostinen *in vitro* testi, jonka avulla voidaan selvittää, onko näyttees-sä T-soluja, jotka reagoivat *M. tuberculosis* -bakteerin antigeenistimulaatioon tuottamalla interferoni gamma-nimistä sytokiinia (INF γ). Elimistön infektoituessa *M. tuberculosis* -bakteerilla, T-solut herkistyvät tuberkuloosibakteerin antigeeneille. T-solut voidaan erotella verestä ja määrittää yksittäisen solun tasolla niiden sytokiinituotantoa. T-solujen stimuloimiseen käytetään kahta eri antigeeniä, ESAT-6- ja CFP10-proteiinia, jotka ovat *M. tuberculosis* -spesifisiä. (T-SPOT.TB Package Insert 2007.) Menetelmän tarkkuus perustuu ESAT-6- ja CFP10-geenien puuttumiseen BCG-rokotekannasta, joten BCG-kanta ei pysty myöskään tuottamaan kyseisiä antigeenejä. Tästä syystä tuberkuloosia vastaan rokotetuilla henkilöillä ei ole riskiä saada määrittäksessä vääriä positiivisia tuloksia. (Tuuminen ym. 2008: 2.)

Mononukleaariset solut erotellaan kokoverestä sentrifugoimalla, jonka jälkeen solut pestään ja lasketaan solulaskijalla. Solujen laskemisella varmistetaan, että soluja on tarpeeksi paljon luotettavan analysoinnin suorittamiseen. Kutakin näytettä kohtaan käytetään kahdeksan näytekaivoa: media, paneeli-A, paneeli-B, PPD ja PHA. Näytekaiivot on

päällystetty hiiren monoklonalisella INF γ -vasta-aineella. Negatiivisena kontrollina toimii media, jonka avulla tarkastellaan ei-spesifistä soluaktivaatiota. Paneeli-A sisältää ESAT-6-antigeenia ja paneeli-B CFP10-antigeenia. Positiivinen kontrolli sisältää polyklonaalista aktivaattoria, PHA:ta, jonka tarkoituksena on kontrolloida mononukleaarisolujen toimivuutta stimuloimalla epäspesifisesti solujen inteferonituotantoa. PPD on ”Purified Protein berirative”-proteiiniseos, jonka antigeenejä on läsnä myös BCG-rokotekannassa. (Elispot menetelmäohje 2009: HUSLAB; T-SPOT.TB Package Insert 2007.)

Analysointi suoritetaan niin, että ensin pestyt ja lasketut mononukleaariset solut inkuboidaan antigeenien kanssa yön yli näytekaivoissa. Tämän vaiheen tarkoituksena on stimuloida herkistyneitä T-soluja. Jos tuberkuloosille herkistyneitä T-soluja on tutkittavassa näytteessä, ne tuottavat sytokiinia, joka kiinnittyy erittävän solun ympärille kaivojen pohjalla oleviin INF γ -vasta-aineisiin. Inkubaation jälkeen solut ja muut ylimääräiset aineet pestään kaivoista, jolloin niihin jää ainoastaan vasta-aineisiin kiinnittyneet sytokiinit. Tämän jälkeen kaivoihin lisätään toista, entsyymillä (alkalinen fosfataasi) leimatua monoklonaalista INF γ -vasta-ainetta, joka sitoutuu sytokiineihin. Ylimääräinen, sitoutumaton aine pestään kaivoista, jonka jälkeen kaivoihin lisätään substraattia (BCIP/NBT). Entsyymi saostaa lisätyn substraatin, jolloin kuopan pohjalle muodostuu värillisiä täpliä ("spotteja"), joiden määrä mitataan automaattisella AID EliSpot reader system-lukijalaitteella. (Elispot menetelmäohje 2009: HUSLAB; T-SPOT.TB Package Insert 2007.)

Oxford Immunotec:in ohjeistuksen mukaan, verinäyte on otettava CPT-putkeen tai vaihtoehtoisesti litiumhepariiniputkeen. EDTA-putkea ei suositella, sillä EDTA saattaa häiritä määrittystä. Verinäytettä on säilytettävä huoneenlämmössä ja näyte pitää analysoida kahdeksan tunnin sisällä näytteenotosta, jotta mononukleaarisolujen laatu ja määrä pysyisivät tarpeeksi korkealla. (T-SPOT.TB Package Insert 2007.)

4.2 Muita menetelmiä

Ennen nykyisten verinäytteistä tehtävien tuberkuloosimäärittysten käyttöönottoa, latenttia tuberkuloosia diagnosoitiin yleisimmin Mantoux'n tuberkuliinikokeella, jossa tuberkuloosiantigeenia ruiskutetaan ihon pintakerrokseen. Tuberkuliinikokeen huonoja puolia ovat mm. sen antamat väärät negatiiviset tulokset etenkin nuorilla lapsilla ja im-

muunipuutospotilailla – ryhmällä, joilla latentin tuberkuloosin löytäminen on erittäin tärkeää. Toisin kuin nykyään käytettävät Quantiferon- ja ELISPOT-testit, ihotesti antaa usein myös vääriä positiivisia tuloksia etenkin niillä potilailla, jotka on rokotettu BCG-kannalla tai jotka ovat altistuneet jollekin muulle mykobakteerille. (Brink – Rooyen 2007.)

Tällä hetkellä HUSLAB käyttää QuantiFERON®-TB Gold -määrittystä tapauksissa, joissa verinäytettä ei ole mahdollista toimittaa laboratorioon neljän tunnin sisällä. Esikäsitteilyn ja inkubaation jälkeen on kolme vuorokautta aikaa toimittaa näyte tutkivaan laboratorioon. QuantiFERON®-TB Gold -määrittäminen on myös lapsiystävällinen, sillä määrittämiseen tarvittava verimäärä on pieni. Haittapuolena voidaan pitää sitä, että solujen stimulaatio tapahtuu näyteputkessa, jolloin ei voida olla varmoja kokoveren laadusta, siinä voi olla liian vähän soluja tai määrittäystä haittaavia tekijöitä. (Tuuminen ym. 2008: 2.) ELISPOT-määrittämisen etuja QuantiFERON®-TB Gold -määrittämiseen verrattuna ovat sen parempi herkkyys ja tarkkuus. ELISPOTilla saadaan vähemmän epävarmoja tuloksia ja se on QuantiFERON®-TB Gold -määrittäystä herkempi. (Brink – Rooyen 2007.)

QuantiFERON®-TB Gold -määrittäminen eroaa ELISPOT-määrittämisestä myös siinä mielessä, että siinä mitataan T-lymfosyyttien tuottaman interferoni gamma ($IFN\gamma$) määrää näytteessä. T-lymfosyyttien tuottama $IFN\gamma$ -määrä on verrannollinen herkistyneiden lymfosyyttien määrään. ELISPOTissa taas tulokseksi saadaan $IFN\gamma$ tuottavien mononukleaarisolujen määrä: jokainen "spotti" edustaa solua, joka tuottaa $IFN\gamma$:aa. QuantiFERON®-TB Gold -määrittämisessä $IFN\gamma$:n mittaaminen tapahtuu suoraan putkesta, eikä preanalyttisiä käsittelyjä tarvita toisin kuin ELISPOT-määrittämisessä. (B –TbIFNg.)

5 VERINÄYTTEEN SÄILYVYYS ANALYSOINTIKELPOISENA

T-SPOT.TB-määrittämisessä verinäyte otetaan CPT-putkeen tai litiumhepariiniputkeen. Näytteestä erotellaan sentrifugoinnin avulla mononukleaarisolut, joiden toimintaa määrittämisessä tutkitaan. Jotta saadut tulokset olisivat luotettavia, on mononukleaarisolujen määrä oltava riittävä, eikä niiden elinkyky tai reagointi antigeenistimulaatioon saa olla heikentynyt. Mononukleaarisolujen määrä ja ominaisuudet laskevat mitä kauemmin

näytettä säilytetään. Myös näytteiden säilytyslämpötila vaikuttaa mononukleaarisoluihin.

Mitä pidempään näytettä säilytetään sitä vaikeampaa mononukleaaristen solujen erottelu muista soluista on. Tämä johtuu lähinnä siitä, että näytteen granulositytit alkavat ajan kuluessa menettää tiheyttään, joten ne eivät sentrifugoitaessa enää jää erottelumedian alapuolelle. Granulosyyttikontaminaatio alentaa T-solujen toimivuutta, jonka seurauksena tuloksista tulee epäluotettavia. (McKenna – Beatty – Vicetti – Bilonick 2009: 1.)

5.1 BD CPT-putki

BD Vacutainer® CPT™ -putken avulla voidaan kokoverestä erotella mononukleaariset solut. CPT-putki sisältää 0.1 M natriumsitraattia, joka toimii antikoagulanttia sekä FICOLL™ Hypaque™ -erottelumediana. Lisäksi CPT-putkessa on polyesterista koostuva geeli, joka erottaa natriumsitraatin ja erottelumedian. Ficoll-erottelumedian toiminta perustuu mononukleaaristen solujen alhaiseen tiheyteen, jonka ansiosta ne voidaan erottaa sentrifugoinnin avulla kokoverestä. Solut laskeutuvat putkessa eri solutyypin tiheyserojen mukaisesti. Sentrifugoinnin jälkeen polyesterigeelin päälle jää plasma sekä mononukleaariset solut ja geelin alle jäävät tiheydeltään suurempiä solut, kuten punasolut ja granulositytit.

Mononuklearisolut ja plasma kaadetaan varovasti steriiliin falcon-putkeen. Jos näytettä ei voida heti prosessoida, putkea käännettäessä varovasti niin, että mononukleariset solut sekoittuvat plasmaan. Plasmassa mononukleariset solut säilyvät pidempään elinkykyisinä, sillä se sisältää soluille tarvittavat ravinteet. BD:n mukaan sentrifugoidut ja plasmaan sekoitetut mononuklearisolut säilyvät analysointikelpoisina 24 tuntia. (Elispot menetelmäohje 2009: HUSLAB; Vacutainer® CPT™ tube Product Data Sheet 2009.)

Mononuklearisolujen erottelu tulee suorittaa viimeistään kaksi tuntia näytteenoton jälkeen, jotta välttyttäisiin punasolukontaminaatiolta. Mitä pidempään näytettä säilytetään kokoverenä sitä huonompaan erottelutulokseen päästään. Jos näytettä ei sentrifugoida kahden tunnin sisällä tai sentrifugoitua näytettä säilytetään yli 24 tuntia, alkaa punasolukontaminaation lisäksi mononuklearisolujen määrä laskea erottelun jälkeen. Lisäksi niiden toimintakyky heikkenee ja erottelu muista valkosoluista vaikeutuu. Esi-

merkiksi granulosityttikontaminaation riski nousee ajan kuluessa. (Vacutainer® CPT™ tube Product Data Sheet 2009.)

5.2 Litiumhepariiniputki

Työssä käytettiin kahdeksan millilitran litiumhepariiniputkia, joissa verta antikoaguloiva aine on litiumhepariini. Hepariiniputkiin otettuihin kokoverinäytteisiin lisättiin T-Cell *Xtend* -liuosta juuri ennen solujen erottelua Leucosep-putkissa. Ilman T-Cell *Xtend* -liuosta, ELISPOT-määrittystä varten hepariiniputkeen otettu verinäyte säilyy analysointikelpoisena noin kahdeksan tuntia. Liian pitkä säilytysaika aiheuttaa mononukleaarisolujen määrän ja toimintakyvyn alenemisen.

5.2.1 Leucosep®-erotteluputket

Työssä käytettiin Greiner Bio-One -valmistajan Leucosep®-erotteluputkia, joiden avulla eroteltiin hepariiniputkiin otetuista kokoverinäytteistä perifeerisen veren mononukleaarisolut. Leucosep-putket sisältävät huokoisen, aineita läpipäästävän esteen sekä erottelumedian. Ficoll Paque™ PLUS -median erottelukyky perustuu eri solupopulaatioiden tiheyseroihin. Putkessa sijaitsevan esteen avulla verinäyte voidaan lisätä erotteluputkeen ilman pelkoa, että näyte ja esteen alapuolella oleva Ficoll Paque™ PLUS -media sekoittuisivat keskenään. Tämä nopeuttaa ja helpottaa näytteen erottelua. Sentrifugoinnin aikana mononukleaariset solut jäävät erottelumedian yläpuolelle ja punasolut sekä granulositytit erottelumedian alapuolelle. (Leucosep Instruction Manual 2003.)

Putkia käytetään, kun litiumhepariiniputkiin otetuista kokoverinäytteistä halutaan erottaa mononukleaariset solut. Kokoveri kaadetaan Leucosep-putkeen, jonka jälkeen putki sentrifugoidaan ilman jarrua (10 minuuttia 1000 g). Sentrifugoinnin jälkeen erottelumedian yläpuolelle tulee plasma, mononukleaariset solut ja alapuolelle punasolut sekä granulositytit. Mononukleaariset solut pipetoidaan varovasti pipetillä plasmakerroksen alapuolelta, juuri ennen erottelumediaa ja siirretään puhtaaseen, tyhjään falcon-putkeen. (Leucosep Instruction Manual 2003.) Tarkka työohje on esitetty tarkemmin liitteessä 3. Jotta Leucosep-putkissa eriteltyt näytteet olisivat vertailukelpoisia muiden näytteiden kanssa, solujen pesu suoritetaan samoilla liuoksilla kuin muidenkin näytteiden pesu.

Leucosep®-putket helpottavat ja nopeuttavat mononukleaarisolujen erottelua, sillä niitä käytettäessä ei tarvitse varoa näytteen ja erottelumedian sekoittumista keskenään. Mononukleaarisolujen elinkyky ja riittävä määrä on hyvin tärkeää tutkittaessa T-solujen toimintaa. Tarkalla ja luotettavalla erottelutekniikalla taataan mononukleaarisolujen toimivuus ja elinkyky sekä minimaalinen punasolu- ja trombosyyttikontaminaatio. (Nilsson – Aboud – Karlén – Hejdeman – Urassa – Biberfeld 2008.)

5.2.2 T-Cell Xtend-liuos

T-Cell Xtend on Oxford Immunotec'in valmistama reagenssi, jonka avulla mononukleaarisolut voidaan erotella laadukkaasti kokoverestä jopa 32 tuntia näytteenoton jälkeen. ELISPOT-määrityksissä on normaalisti litiumhepariiniputkeen otettu verinäyte analysoitava viimeistään kahdeksan tuntia näytteenoton jälkeen. T-Cell Xtend -liuoksen avulla voidaan ELISPOT-määrityksen käyttöä laajentaa, sillä näytteen säilyvyyden pidentäminen antaa laboratorioille mahdollisuuden analysoida myös kauempaa tulevia näytteitä, joiden kuljetuksessa kestää yli kahdeksan tuntia.

T-Cell Xtend -liuos sitoo häiritsevät, ei-halutut solut punasoluihin vastaainekompleksien avulla ja näin lisää niiden tiheyttä. Kun tämän jälkeen näyte sentrifugoidaan Ficoll™-erottelumedian avulla, punasoluihin sidotut häiritsevät solut saadaan eroteltua putken pohjalle. Oxford Immunotec, joka valmistaa T-Cell Xtend -liuosta, lupaa, että mononukleaarisoluja, jotka on eroteltu T-Cell Xtend -liuoksen avulla, voidaan käyttää ELISPOT-menetelmässä 32 tunnin säilytyksenkin jälkeen. (T-Cell Xtend Package Insert 2008.)

Käytettäessä T-Cell Xtend -liuosta, on huomioitava, että verinäytettä ei saa ottaa CPT™-putkeen tai EDTA-putkeen, sillä ne häiritsevät Xtend-liuoksen toimivuutta. T-Cell Xtend-liuoksen käyttöön soveltuu ainoastaan litiumhepariiniputki. Erottelumenetelmänä mm. Leucosep®-putket ovat yhteensopivia T-Cell Xtend -liuoksen kanssa.

Verinäyte otetaan litiumhepariiniputkeen, jonka jälkeen sitä voidaan säilyttää 10–25 lämpöasteessa jopa 32 tuntia. Näytteen kuljetuksessa tulee siis ottaa huomioon kuljetuslämpötila, jotta näytteessä olevat mononukleaarisolut eivät vahingoittuisi. Verinäyte lähetetään tutkivaan laboratorioon, jossa siihen lisätään juuri ennen näytteen prosessointia 25 µl T-Cell Xtend -liuosta 1 ml kokoverta kohti. Näytettä sekoitetaan kääntelemällä

sitä varovasti noin kymmenen kertaa. Sekoittamisen jälkeen näytettä inkuboidaan 20 minuuttia huoneenlämmössä. Tämän jälkeen mononuklearisolut voidaan erotella esimerkiksi Leucosep®-erotteluputkella. (T-Cell Xtend Package Insert 2008.)

Oxford Immunotec'in suorittamassa tutkimuksessa 46 potilaalta otettiin kaksi putkea verta litiumhepariiniputkiin. Toinen putki analysoitiin kahdeksan tunnin kuluttua manuaalisesti Ficoll-menetelmällä erotellusta näytteestä ja toinen Leucosep®-putkella erotellusta näytteestä 29-32 tunnin kuluttua. Jälkimmäisen näytteen prosessoinnissa käytettiin T-Cell Xtend -liuosta. Molemmissa tapauksissa erotellut mononuklearisolut olivat säilyneet toimivina ja ELISPOT-määrityksestä saatiin tutkimuksen mukaan luotettavia tuloksia. (Leucosep tubes Package insert 2009.)

Oxford Immunotec'in suorittamaan tutkimukseen tulee kuitenkin suhtautua kriittisesti, sillä tutkimuksen suorittajana on toiminut T-Cell Xtend -reagenssin valmistaja, eikä tarkkaa työn toteutusta ja tulosten tulkintaa ole selvitetty.

6 TYÖN TARKOITUS

Työn tarkoituksena on selvittää, miten näytteen 24 tunnin säilytys vaikuttaa ELISPOT-menetelmään perustuvan T-SPOT.TB-testin tarkkuuteen. Säilytyksen vaikutusta testataan Vacutainer® CPT™ -putkessa (Cell Prepare Tube) sekä BD Vacutainer® litiumhepariiniputkessa, johon on lisätty T-Cell Xtend -liuosta. Työssä arvioidaan T-Cell Xtend -liuoksen ja CPT-putken valmistajien antamat suositukset näytteen säilyvyydestä. Työn tavoitteena on saada vastaus seuraaviin kysymyksiin:

1. Miten näytteen säilytys CPT-putkessa 24 tuntia vaikuttaa T-SPOT.TB-testin tulosten tarkkuuteen?
2. Miten T-Cell Xtend -reagenssin lisäys vaikuttaa litiumhepariiniputkiin otettujen T-SPOT.TB-näytteiden tuloksiin 24 tunnin säilytyksen jälkeen? Tuoko T-Cell Xtend-reagenssi selvää parannusta näytteen säilyvyyteen?

7 TYÖN TOTEUTTAMINEN

Opinnäytetyö suoritetaan HUSLABin mikrobiologian vastuualueen immunologian osastolle. Työn ohjaajina toimivat Tamara Tuuminen sekä Milja Korpinen. Työssä käytetään Oxford Immunotec:in T-SPOT.TB 8 -kittiä, joka sisältää 12 kahdeksan kuopan mikrotitterstriippiä sekä tarvittavat antigeenit (panel A, panel B), positiivisen kontrollin (PHA) ja reagenssit (Conjugate reagent, Substrate solution). T-SPOT.TB-kitti on jo valmiina immunologian osastolla ja tarvittavat Leucosep-putket sekä T-Cell Xtend -liuos tilattiin joulukuussa 2009. Tammikuussa 2010 harjoittelin viikon ajan ELISPOT-menetelmää immunologian harjoittelujaksolla. Viikon aikana ehdin analysoida kaksi potilasnäytesarjaa.

Analysointeja tehdessäni aion seurata hyvin tarkkaan menetelmäohjeita ja kysyä tarvittaessa neuvoja ohjaajaltani. Pipetoinnit aion suorittaa tarkkaan ja mahdollisimman rauhallisesti. Tarkoitukseni on kirjata kaikki työvaiheet ja niiden onnistumisen mahdollisimman tarkkaan ylös ja pitää työpäiväkirjaa, jossa kuvaan työvaiheiden aikaiset tapahtumat. Näytteiden saapumisajat laboratorioon on tarkemmin esitelty liitteessä 1.

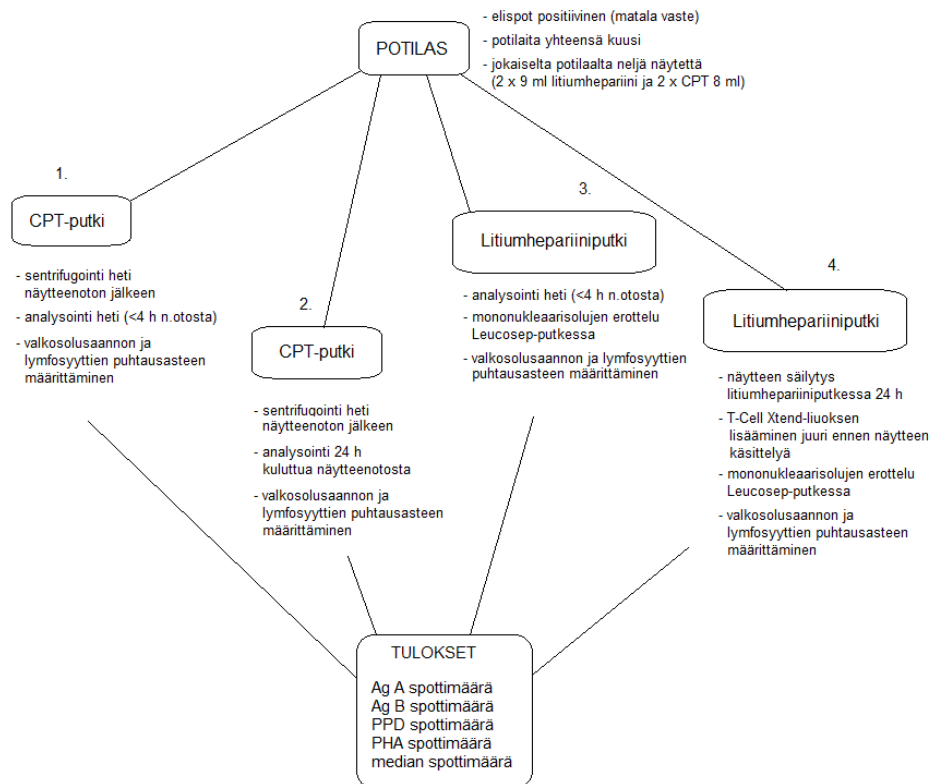
7.1 Testauksen aineisto ja eettinen pohdinta

Työssä käytetyt potilasnäytteet kerätään kuudelta täysi-ikäiseltä potilaalta, joilla on aikaisemmin todettu matalat Elispot-vasteet. (Ks. kuvio 2.) Matala Elispot-vaste tarkoittaa sitä, että positiivinen Elispot-tulos on lähellä negatiivisen ja positiivisen rajaa. Näin ollen pienikin spottimäärän alenema näkyy tuloksen muuttumisena negatiiviseksi ja helpottaa näin tulosten tulkintaa.

Verinäytteet otetaan kahteen BD Vacutainer CPT kahdeksan ml:n putkeen sekä kahteen kahdeksan ml muoviseen litiumhepariiniputkeen. Yksi litiumhepariiniputki ja yksi CPT-putki analysoidaan heti (alle neljä tuntia näytteenotosta). Kokoverestä, joka on otettu litiumhepariiniputkeen, erotellaan mononuklearisolut (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) Leucosep®-putkessa.

Vuorokauden kuluttua (24h) näytteenotosta analysoidaan toinen litiumhepariini- ja toinen CPT-putki. Becton Dickinson on luvannut CPT-putken säilyvyydeksi 24 tuntia, jos näyte sentrifugoidaan viimeistään kahden tunnin sisällä näytteenotosta. Litiumhepa-

riiniiniputkeen lisätään T-Cell Xtend -liuos (25µl/1ml kokoverta) juuri ennen analysointia. Kaikista putkista lasketaan valkosolujen saanto sekä lymfosyyttien puhtausaste analysointivaiheessa, jolla varmistetaan, että näyte on tarpeeksi laadukas analysoitavaksi. Laadukkaan tuloksen saamiseksi yhdessä näytekuopassa tulisi olla 250 000 solua. (T-SPOT.TB Package Insert 2007).



KUVIO 2. Näytteiden käsittelykaavio ja saadut tulokset.

Kirjallisen tutkimusluvan työlle myönsi HULABin toimitusjohtaja Martti Syrjälä. Koska testauksessa käytettiin näyttemateriaalina potilasnäytteitä, jotka otettiin ainoastaan tätä työtä varten, oli työlle haettava tutkimuslupa myös eettiseltä toimikunnalta. HUSin Sisätautien eettinen toimikunta myönsi työlle luvan syksyllä 2009.

Dosentti Heikki Repo etsi sopivat potilaat ja varmisti kirjallisesti heidän suostumuksensa testaukseen osallistumisesta. Potilaille kerrottiin työn tarkoitus sekä sisältö ja heillä oli mahdollisuus kieltäytyä osallistumasta. Testauksesta tai sen tuloksista ei aiheudu haittaa potilaan terveydelle, eikä potilaan henkilöllisyys tule esille saaduista tuloksista.

Työssä käytetyt potilasnäytteet nimetään numerotunnuksilla, jotta potilaan henkilöllisyys pysyisi salassa.

7.2 Työn toteutusaikataulu

Potilasnäytteiden prosessointi immunologian osastolla suoritetaan helmikuussa 2010 viikoilla viisi ja kuusi. Potilaille on varattu näytteenottoajat HUSin Kirurgisen sairaalan reumapoliklinikalla, josta näytteet toimitetaan mahdollisimman nopeasti HUSLABin immunologian laboratorioon. Tulokset analysoidaan viikolla seitsemän ja artikkeli pyritään saamaan valmiiksi maaliskuussa. Opinnäytetyö tulee olla valmiina 12.4. Artikkelin pyritään julkaisemaan elokuussa 2010 ilmestyvässä *Kliinlab-lehdessä*. Täysin valmis artikkeli tulee lähettää lehden päätoimittajalle viimeistään kaksi kuukautta ennen lehden ilmestymistä, jotta se ehtisi haluttuun numeroon.

8 TULOKSET

Kuopissa olevat spottimäärät lasketaan automaattisella AID EliSpot reader system -lukijalaitteella. Näytteistä saadut tulokset kerätään Excel-tilaukseen ja niiden analysointi aloitetaan viikolla seitsemän. Myös viikko kahdeksan on varattu tulosten analysointiin. Analysointi suoritetaan Excel-ohjelman avulla laskemalla eri putkista saatujen spottimäärien prosentuaalisia eroja. Tulokseksi saadaan kaikista näytteistä antigeeni A:n, antigeeni B:n, PHA:n, PPD:n ja median spottimäärät. Tulokset analysoidaan laskemalla putkien väliset prosentuaaliset erot niin, että jokaista putkea verrataan siihen CPT-putkeen, joka analysoitiin heti näytteenoton jälkeen.

Koska testauksessa analysoidaan vain kuuden potilaan näytteitä, ei siitä saada tilastollisesti merkittäviä tuloksia. Saadut tulokset ovat suuntaa antavia ja niiden tarkoituksena on arvioida Oxford Immunotec'in antamia suosituksia HUSLABin immunologian laboratoriossa. Tuloksien perusteella nähdään, miten näytteen analysointi vuorokauden kulluttua näytteenotosta vaikuttaa T-SPOT.TB-määrityksen tuloksiin, ja tuoko T-Cell Xtend -reagenssi selvää parannusta näytteen säilyvyyteen. Työssä selviää myös miten näytteen säilytys vuorokauden ajan CPT-putkessa vaikuttaa tuloksiin.

Testauksesta on tavoitteena saada julkaisu Kliinlab-lehteen. Tuloksista laaditaan lehden ohjeiden mukainen artikkeli, jossa esitellään johdanto, työnt avoitteet, työssä käytetyt materiaalit ja menetelmät, näytteiden keruu, saadut tulokset, pohdinta sekä johtopäätökset.

9 TIEDONHAKU

Hain työtä varten tietoa internetistä, kirjalähteistä, artikkeleista sekä HUSLABin Elispot-menetelmäohjeista. Käytin apuna myös aikaisempia aiheesta tehtyjä opinnäytetöitä, joista sain ideoita työni sisältöön. Suuren osan käyttämästäni kirjoista sekä osan artikkeleista lainasin eri kirjastoista. Tiedonhaku jatkui koko opinnäytetyöprosessin ajan, joten hakukoneita ja hakusanoja kertyi lukematon määrä.

Hain Nelli-hakukoneen avulla artikkeleja hakusanoilla T-Cell Xtend, elispot ja T-SPOT.TB. Näillä hakusanoilla en löytänyt yhtään sopivaa artikkelia. Terveyskirjaston hakukoneesta löytyi monta hyvää artikkelia hakusanoilla ”latentti tuberkuloosi” ja ”elispot”. Teoriatietoa etsiessäni käytin hyväkseni Metropolian ”Tietokannat A-Ö”-sivustoa, josta pääsi eri hakukoneiden sivuille. Yksi eniten käyttämäni hakukone oli PubMed. Myös Googlen kautta löysin monia eri sivustoja, josta löytyi työhöni sopivia artikkeleja.

LÄHTEET

- Arstila P. – Hänninen A. 2005: Soluvälitteinen immunitaetti. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaeheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.) 2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja 1. Duodecim. Jyväskylä: Gummerus kirjapaino Oy. 709-710.
- Asiantuntijaryhmän suositus 2003: Tuberkuloositartunnalle altistumisen aiheuttamat toimenpiteet. Suomen Lääkärilehti 58 (23). 2529-2534.
- B –TbIFNg. 2010. Tutkimusohjekirja. B -Mycobacterium tuberculosis-herkistyneet solut. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. <http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=20448&terms=tub>. Luettu 7.1.2010.
- Brink, AJ. – Rooyen, J. 2007: Gamma interferon assays as a diagnostic tool in tuberculosis infections. The Southern African Journal of Epidemiology and Infection 22 (4). 107-108.
- Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis of Latent TB Infection 2005. Verkkodokumentti. <<http://www.cdc.gov/tb/publications/LTBI/diagnosis.htm>>. Luettu 8.1.2010.
- Elispot menetelmäohje 2009: HUSLAB. Immunologian osasto.
- Forbes, Betty A. – Sahn, Daniel F. – Weissfeld, Alice S. 1998: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10. painos. C.V. Mosby. 715-718.
- Kayser F.H. – Bienz K.A. – Eckert J. – Zinkernagel R.M. 2005: Medical Microbiology. Thieme. 263-264.
- Liippo Kari 2005: Tuberkuloosi ja muut mykobakterioosit. Teoksessa Kinnula, Vuokko – Brander, E. Pirkko – Tukiainen, Pentti (toim.) 2005: Keuhkosairaudet. Duodecim. 3. uudistettu painos. Hämeenlinna: Karisto Oy:n kirjapaino. 399-402, 404.
- Leucosep Instruction Manual 2003: Greiner Bio-One Ltd. <www.greinerbioone.com>.
- Leucosep tubes Package insert 2009: Oxford Immunotec Ltd. <www.oxfordimmunotec.com>.
- McKenna K. – Beatty K. – Vicetti M. – Bilonick A. 2009: Delayed processing of blood increases the frequency of activated CD11b+ CD15+ granulocytes which inhibit T cell function. Journal of immunological methods 341 (1-2). 68-75.
- Nilsson – Aboud – Karlén – Hejdeman – Urassa – Biberfeld 2008: Optimal Blood Mononuclear Cell Isolation Procedures for Gamma Interferon Enzyme-Linked Immunospot Testing of Healthy Swedish and Tanzanian Subjects. Clinical and Vaccine Immunology 15 (4). 585-589.
- Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriö. 2006. Valtakunnallinen tuberkuloosiohjelma 2006. Verkkodokumentti. <<http://pre20090115.stm.fi/pr1158658370802/passthru.pdf>>. Luettu 11.12.2009.

- Salonen, Juha – Repo, Heikki - Leirisalo-Repo, Marjatta 2007: Uusiin reumalääkkeisiin liittyvät infektioriskit. Duodecim 123. 2470-2479.
- T-Cell Xtend Package Insert 2008: Oxford Immunotec Ltd.
<www.oxfordimmunotec.com>.
- T-SPOT.TB Package Insert 2007: Oxford Immunotec Ltd.
<www.oxfordimmunotec.com>.
- Tuuminen, Tamara – Repo, Heikki – Salo, Eeva – Hakala, Pirjo – Eskola, Jussi – Sepälä, Ilkka 2008: Tuberkuloosin uusiutuva laboratoriodiagnostiikka. Lääkärilehti 63 (4). 1-11.
- Vacutainer® CPT™ tube Product Data Sheet 2009: Becton, Dickinson and Company.
- Vasankari, Tuula – Liippo, Kari – Ruutu, Petri 2007: Miten tartuttava tuberkuloosipotilas on? Tartuntaan liittyvät toimet. Lääkärilehti 62 (41). 3737-3740.
- Viljanen, Matti – Liippo, Kari – Kokki, Maarit 2005: Mykobakteerit ja nokardiat. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.) 2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja 1. Duodecim. Jyväskylä: Gummerus kirjapaino Oy. 145-146.

T-Cell *Xtend* -reagenssin testaus pitkittyneessä T-SPOT.*TB*-näytekuljetuksessa

Kristel Kookmaa, Ilkka Seppälä ja Tamara Tuuminen

Yhteenveto

Latentin tuberkuloosin tutkimiseen käytettävää diagnostista *in vitro* ELISPOT-testiä varten otetun kokoverinäytteen lyhyt säilyvyysaika on ollut esteenä määrityksen laajemmalle käytölle, sillä näytteen käsittely tulee aloittaa neljän tunnin sisällä näytteenotosta. T-Cell *Xtend* -reagenssia (Oxford Immunotec) markkinoidaan keinona pidentää näytteen kuljetusaikaa. Tämän työn tarkoituksena oli selvittää, miten näytteen 24 tunnin säilytys vaikuttaa ELISPOT-menetelmään perustuvan T-SPOT.*TB*-testin (Oxford Immunotec) tarkkuuteen. Säilytyksen vaikutusta testattiin CPT-putkessa (Cell Prepare Tube) sekä litiumhepariiniputkessa (Becton, Dickinson and Company), johon oli lisätty T-Cell *Xtend* -liuosta. Työssä arvioitiin T-Cell *Xtend*-liuoksen ja CPT-putken valmistajien antamat suositukset näytteen säilyvyydestä.

Tulokset osoittivat, että verinäytteen säilytys 24 tuntia vaikutti T-SPOT.*TB* -määrityksen tarkkuuteen. T-Cell *Xtend* -liuoksen lisääminen ei selvästi parantanut vuorokauden kuluttua näytteenotosta analysoidujen näytteiden säilyvyyttä, vaan saadut spottimäärät olivat alhaisempia kuin heti näytteenoton jälkeen analysoidusta näytteistä saadut spottimäärät. Vaikka T-Cell *Xtend* paransi mononukleaarisolujen eroteltavuutta kokoverestä, solujen immunologinen reaktiivisuus oli alhaisempaa kuin heti analysoiduissa näytteissä. Näytteen säilytys CPT-putkessa 24 tuntia aiheutti myös spottimäärien laskua. Näytteen viivästynyt käsittely lisää riskiä, että reaktiivisten solujen esiintymistiheys on alhaisempaa kuin alle neljässä tunnissa käsitellyssä näytteessä.

English summary

To diagnose latent tuberculosis infection (LTBI) new immunodiagnostic tests based on release of interferon gamma upon *ex vivo* stimulation with TB specific antigens (IGRA) have been recently introduced. One of the IGRAs is an ELISPOT- based commercial T-SPOT.*TB* assay (Oxford Immunotec). The availability of fresh samples with viable lymphocytes is the major concern to ensure accurate results. It is recommended that the samples should be analyzed within 4 hours from the venipuncture. To extend the storage of samples, a commercial reagent T-Cell *Xtend* was developed (Oxford Immunotec). The aim of this study was to evaluate T-Cell *Xtend* for prolonged sample storage and to compare the results to those obtained within 4 hours.

The tested reagent was added to lithium heparin tubes 24 hours after the blood samples were preserved in a vertical position at room temperature. For the controls was used the same samples drawn in the same tube and into the Cell Preparation Tube (CPT) (Becton, Dickinson and Company) which were analyzed immediately. The stability of lymphocytes was checked from CPT tubes that were analyzed with a 24-hour delay. The purity of the lymphocyte fraction after centrifugation from each of the tested tubes was also compared.

The addition of the T-Cell *Xtend* reagent after 24 hour storage did not preserve the frequencies of reactive lymphocytes on the same level as the samples that were processed immediately. The T-Cell *Xtend* reagent improved the separation of peripheral blood mononuclear cells from the whole blood but the observed immunological reactivities were lower compared to the samples processed immediately. We conclude that the delay in the processing of samples will result in suboptimal performance that cannot be compensated with the addition of the T-Cell *Xtend*. For the ELISPOT-based assays the samples should be processed within a 4-hour timeframe. However, if the delay is inevitable the borderline results should be interpreted with caution.

Johdanto

Tuberkuloosi on *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerin aiheuttama infektio. Suomi kuuluu tuberkuloosin vähäisen ilmaantuvuuden maihin, uusia tartuntoja esiintyy alle 400 tapausta vuodessa (1). 90 %:ssa tapauksista tuberkuloosi jää tartunnan saaneella henkilöllä latenttiin muotoon (1). Latentti tuberkuloosi voi kuitenkin aktivoitua kliiniseksi taudiksi, jos henkilön immunitaetti heikkenee esimerkiksi vanhuuden, jonkin sairauden tai sairauden hoidon myötä. Etenkin nivelreuman hoidossa käytetyt aggressiiviset hoitokäytännöt ja uudet biologiset lääkkeet lisäävät latentin tuberkuloosin aktivoitumisriskiä. Tästä syystä, ennen hoitojen aloittamista on varmistettava, ettei potilaalla ole latenttia tuberkuloosia, joka voisi reaktivoitua hoitojen seurauksena (2).

Latentin tuberkuloosi-infektion diagnostiikassa käytetään mm. ELISPOT-menetelmään perustuvaa T-SPOT.*TB*-testiä (Oxford Immunotec) ja QuantiFERON®-TB Gold -testiä (Cellestis). T-SPOT.*TB*-testiä voidaan käyttää, jos verinäyte pystytään toimittamaan analysoitavaksi neljän tunnin sisällä näytteenotosta, muussa tapauksessa käytetään QuantiFERON®-TB Gold -testiä. T-SPOT.*TB* on QuantiFERON®-TB Goldia herkempi testi (3, 4), mutta siihen liittyvät preanalyttiset vaatimukset ovat tähän asti olleet esteenä sen laajemmalle käytölle. Kumpikaan näistä määrittämisistä ei erota latenttia tuberkuloosia aktiivisesta taudista, vaan tulokset osoittavat pelkästään henkilön altistuksen tuberkuloosibakteerille. Verinäyte on toimitettava T-SPOT.*TB*-tutkimusta varten analysoivaan

laboratorioon neljän tunnin sisällä näytteenotosta. Tämä hankaloittaa ja rajoittaa määrittämisen laajempaa käyttöä, sillä kauempana Suomessa sijaitsevilla laboratorioilla ei ole mahdollisuutta saada näytettä toimitettua määräajassa.

Näytteen pitkittynyt säilytys aiheuttaa mononukleaarisolujen kontaminoitumisen granulosityeillä, joiden on todettu inhiboivan T-solujen toimintaa. T-solujen toiminnan estyminen aiheuttaa laskua T-SPOT.*TB*-tuloksissa (5). Valmistajan mukaan mononukleaarisoluja, jotka on eroteltu T-Cell *Xtend*-liuoksen avulla, voidaan käyttää ELISPOT-menetelmässä 32 tunnin säilytyksen jälkeen. T-Cell *Xtend*-liuos sitoo näytteen granulosityit punasoluihin kaksoisspesifisyyttä omaavien vasta-aineiden avulla. Kun granulosityit on sidottu komplekseihin, verinäyte sentrifugoidaan, jolloin saadaan puhdas mononukleaarisolufraktio (6). Äskettäin julkaistussa tutkimuksessa 24 tunnin säilytys ei aiheuttanut spottimäärän laskua ELISPOT-tutkimuksessa, kun näytteeseen lisättiin T-Cell *Xtend*-liuosta (7).

Tarkoituksena oli selvittää, miten 24 tunnin säilytysaika vaikuttaa ELISPOT-testin tulokseen. Verinäytteen säilyvyyttä testattiin litiumhepariiniputkessa, johon on lisätty T-Cell *Xtend*-liuosta (Oxford Immunotec). Kontrollina toimi CPT-putkeen (Becton Dickinson) otettu verinäyte, joka oli analysoitu heti ja 24 tunnin kuluttua näytteenotosta. Mikäli valmistajien antamat säilyvyysajat toimivat annettujen suositusten mukaisesti, voidaan T-SPOT.*TB*-määrittämisen käyttö ulottaa myös niihin tapauksiin, joissa näytteen toimituksessa menee yli neljä tuntia.

Materiaalit ja menetelmät

Vertailussa käytettiin kahdeksan millilitran Vacutainer® CPT™ -putkia (Becton Dickinson). Valmistajan mukaan viimeistään kaksi tuntia näytteenoton jälkeen sentrifugoidut ja plasmaan sekoitetut mononukleaarisolot säilyvät analysointikelpoisina 24 tuntia (8). Lisäksi testauksessa käytettiin Becton Dickinsonin yhdeksän millilitran litiumhepariiniputkia, joihin lisättiin T-Cell *Xtend*-liuosta juuri ennen solujen erottelua. Litiumhepariiniputkiin otetuista kokoverinäytteistä eroteltiin mononukleaarisolot Leucosep® (Greiner Bio-One) -erotteluputkien avulla.

Työssä käytettiin Oxford Immunotec:in T-SPOT.*TB*-kittiä. T-SPOT.*TB* on diagnostinen *in vitro* testi, jonka avulla voidaan selvittää, onko näytteessä herkistyneitä T-soluja, jotka reagoivat *M. tuberculosis*-bakteerin antigeenistimulaatioon tuottamalla interferoni gamma (INF γ) nimistä sytokiinia. T-SPOT.*TB*-määrittämistä varten potilaan verestä eristetään mononukleaarisolot ja niitä stimuloidaan spesifisillä antigeeneillä. Herkistyneiden T-solujen frekvenssit lasketaan niiden erittämän INF γ :n perusteella. Tuotettu INF γ toimii reaktiivisten solujen ”sormenjälkenä” muodostamalla spotteja. Muodostuneiden

spottien määrä on suoraan verrannollinen näytteessä olevien herkistyneiden T-solujen määrään (9).

Vertailussa käytettiin näytemateriaalina potilasnäytteitä, jotka otettiin ainoastaan tätä työtä varten, joten työlle haettiin tutkimuslupa HUS-piirin Sisätautien eettiseltä toimikunnalta. Tutkimuslupa (Nro: 214/13/03/01/09) myönnettiin syksyllä 2009. Kaikilta potilailta pyydettiin kirjallinen suostumus tutkimukseen osallistumisesta.

Työn toteutus

Työ tehtiin opinnäytetyönä HUSLABin mikrobiologian vastuualueen immunologian osastolle keväällä 2010. Testauksessa käytetyt potilasnäytteet kerättiin HUSin Kirurgisen sairaalan reumapoliklinikalta. Työhön valittiin kuusi täysi-ikäistä potilasta, joilla oli aikaisemmin todettu raja-arvoiset ELISPOT-vasteet. Matalavasteisessa ELISPOT-näytteessä on suurempi riski kuin korkeavasteisessa näytteessä, että kuljetuksen aikana tapahtuva pienikin responssin pudotus aiheuttaa väärän kliinisen tulkinnan.

Jokaiselta potilaalta otettiin verinäytteet kahteen kahdeksan millilitran BD Vacutainer CPT -putkeen sekä kahteen yhdeksän millilitran muoviseen litiumhepariiniputkeen (kuva 1). Näytteet kuljetettiin kahden tunnin sisällä näytteenotosta analysoivaan laboratorioon. Kuljetus tapahtui pystyasennossa ja huoneenlämmössä. Kaikki CPT-putket sentrifugoitiin viimeistään kaksi tuntia näytteenoton jälkeen. Jokaiselta potilaalta analysoitiin yksi litiumhepariiniputki ja yksi CPT-putki heti näytteenoton jälkeen (alle neljä tuntia näytteenotosta). Litiumhepariiniputkiin otettujen näytteiden mononukleaarisolut eristettiin Leucosep-putkissa Greiner Bio-Onen antamien ohjeiden mukaisesti. Solut pestiin käytössä olevan pesuohjelman mukaisesti. Valkosolusaanto ja lymfosyyttien puhtausaste mitattiin ADVIA 60 -analysaattorilla (Bayer Corporation). Solumäärät laskettiin niin, että jokaiseen analysoitavaan kuoppaan pipetoitiin 250 000 mononukleaarisolua. ELISPOT-määritys suoritettiin valmistajan antamien ohjeiden mukaisesti ja saadut spottimäärät laskettiin automaattisella AID EliSpot reader system -lukijalaitteella (AID Autoimmun Diagnostika GmbH).

Vuorokauden kuluttua (24 h) näytteenotosta analysoitavia näytteitä säilytettiin pystyasennossa huoneenlämmössä. 24 tuntia säilytettyyn litiumhepariiniputkeen lisättiin valmistajan ohjeiden mukaisesti T-Cell *Xtend* -liuosta ja sen annettiin inkuboitua 20 minuuttia ennen solujen erottelua Leucosep-putkessa. Eritellyt mononukleaarisolut pestiin käytössä olevan pesuohjelman mukaisesti. Solujen laskeminen ja näytteen analysointi suoritettiin loppuun samalla tavalla kuin on edellä kuvattu.

Tulokset

Kaikista näytteistä saatiin frekvenssit reaktiivisista soluista, jotka tunnistivat kitin antigeeni A:n, antigeeni B:n, PHA:n (fytohemagglutiniini) ja PPD:n (purified protein derivative). Kustakin putkesta saatuja spottimääriä verrattiin heti analysoidusta CPT-putkesta saatuihin spottimääriin.

CPT (0 h) vs. CPT (24 h)

Näytteen säilyttäminen vuorokauden ajan CPT-putkessa aiheutti spottimäärän laskua 3/6:ssa potilaiden näytteistä (kuva 2). Lymfosyyttifraktion puhtausaste ei laskenut yhdenkään potilaan näytteissä 24 tunnin säilytyksen aikana (kuva 3). Tästä voidaan päätellä, että 24 tunnin säilytysaika heikensi näiden kolmen potilaan lymfosyyttien reaktiivisuutta antigeenistimulaatioon. Granulosyyttien on arveltu estävän T-solutoimintaa ja näin alentavan spottien määrää. 24 tunnin säilytys ei kuitenkaan aiheuttanut selvää granulosyyttien osuuden nousua CPT-putkissa eritellyissä mononuklearisolufraktioissa.

Litiumhepariini (0 h) vs. litiumhepariini (T-Cell *Xtend*) (24 h)

Vuorokauden säilytyksen jälkeen analysoitujen näytteiden spottimäärissä tapahtui 2/6 potilaalla laskua verrattuna heti litiumhepariiniputkista analysoituihin näytteisiin. Molemmissa tapauksissa lymfosyyttien puhtausaste oli heti analysoidussa näytteessä matalampi kuin vuorokauden ajan säilytetyssä näytteessä. Tästä voidaan päätellä, että vaikka 24 tuntia säilytetyn näytteen lymfosyyttien puhtausaste oli korkeampi, niiden reaktiivisuus antigeenistimulaatioon oli säilytyksen aikana heikentynyt.

Tuloksia vertailtaessa huomattiin, että vaikka T-Cell *Xtend* -liuos paransi selvästi lymfosyyttifraktion puhtausastetta, lymfosyyttien reaktiivisuus antigeenistimulaatioon kuitenkin heikentyi. Spottimäärän lasku ei johtunut suoraan granulosyyttikontaminaatiosta, sillä T-Cell *Xtend* -liuos auttoi vähentämään granulosyyttien määrää mononuklearisolufraktiossa.

CPT (0 h) vs. litiumhepariini (T-Cell *Xtend*) (24 h)

Litiumhepariiniputkissa 24 tuntia säilytettyjen näytteiden spottimäärät olivat 4/6:ssa tapauksista selvästi alhaisempia kuin heti analysoiduissa CPT-putkiin otetuissa näytteissä. Lymfosyyttien prosentuaalinen määrä oli 24 tuntia säilytetyissä litiumhepariiniputkissa korkeampi kuin CPT-putkissa, joten spottimäärän lasku johtui mononuklearisolujen alentuneesta reaktiivisuudesta antigeenistimulaatioon.

Pohdinta

Työssä huomattiin, että pidentynyt näytteen kuljetus heikentää tuloksien luotettavuutta varsinkin, jos näytteessä on niukasti reaktiivisia soluja. T-Cell *Xtend* -reagenssin lisäys ei tätä ongelmaa poistanut. Jotta T-Cell *Xtend* -reagenssista olisi merkittävää apua laboratoriodiagnostiikassa, pitäisi mononukleaarisolujen reaktiivisuus antigeenistimulaatioon olla säilytetystä näytteestäkin selkeästi samantasoisia kuin heti analysoidussa CPT-putkessa.

Luotettavien tulosten saamiseksi laboratorioanalytiikan on oltava toimivaa ja tulosten pitää olla toistettavia. T-Cell *Xtend* -liuoksen käyttö lisäsi työvaiheita ja pidensi kohtalaisen pitkäkestoisen ja monivaiheisen analyysin kestoa. Näytteen käsittelyn lisäys saattaa aiheuttaa mononukleaarisolujen määrän laskua sekä heikentää niiden elinkykyä ja reaktiivisuutta antigeenistimulaatioon. Työssä käytetyn aineiston pienen koon takia, tuloksista ei voitu tehdä tilastollisia arvioita. Työn tarkoituksena ei ollut yleistää saatuja tuloksia, vaan testata T-Cell *Xtend* -reagenssin toimivuus HUSLABin immunologian osastolla.

Uusi T-Cell *Xtend* -reagenssi ei tuonut selvää parannusta näytteen säilyvyyteen. Testauksen perusteella CPT-putkien käyttöä voidaan suositella jatkossakin ensisijaisena näyteputkena T-SPOT.TB-määrityksessä. Näyte pyritään analysoimaan neljän tunnin sisällä näytteenotosta. Mikäli aika ylittyy, on näytteeseen tehtävä merkintä, ja pitkittynyt näytteen kuljetus on otettava huomioon tulosten tulkinnessa. Jos näytteen kuljetukseen arvioidaan menevän yli neljä tuntia, QuantiFERON®-TB Gold -testin käyttö on suositeltavaa.

Kiitokset

Kiitän HUSLABin immunologian osastoa työtä varten saamastani materiaalista. Suuri kiitos myös potilaille, jotka osallistuivat testaukseen. Lisäksi kiitän professori Marjatta Leirisalo-Repoa ja dosentti Heikki Repoa potilaiden rekrytoinnista sekä laboratoriohoitajaa Milja Korpista hänen avustaan työn toteutuksessa ja tuloksien analysoinnissa.

Kirjallisuusviitteet

1. Sosiaali- ja terveysministeriö. Valtakunnallinen tuberkuloosiohjelma 2006.
2. Repo H, Salonen J, Leirisalo-Repo M. Nivelreuman biologisten lääkkeiden varjopuolena infektiot lisääntyvät. Lääkärilehti 2009; 64(8); 697-705.
3. Ajit Lalvani. Diagnosing Tuberculosis Infection in the 21st Century: New Tools To Tackle an Old

Enemy. Chest 2007; 131(6): 1898-1906.

4. Madhukar Pai, Alice Zwerling, Dick Menzies. T-cell based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. Annals of Internal Medicine 2008; 149(3): 177-184.

5. McKenna KC, Beatty KM, Vicetti Miguel R, Bilonick RA. Delayed processing of blood increases the frequency of activated CD11b+ CD15+ granulocytes which inhibit T-cell function. Journal of Immunological Methods 2008; 341: 68-75.

6. T-Cell *Xtend* Package Insert 2008: Oxford Immunotec Ltd. www.oxfordimmunotec.com.

7. Lenders LM, Meldau R, van Zyl-Smit RN, Woodburne V, Maredza A, Cashmore TJ, Semple PL, Badri M, Zumla A, Dheda K. Comparison Of Same Day Versus Delayed Enumeration of Tb-Specific T-Cell Responses. Journal of Infection 2010; DOI: 10.1016/j.jinf.2010.01.012.

8. Vacutainer® CPT™ tube Product Data Sheet 2009: Becton, Dickinson and Company.

9. T-SPOT.*TB* Package Insert 2007: Oxford Immunotec Ltd. www.oxfordimmunotec.com.

Kirjoittajat

KRISTEL KOOKMAA

bioanalyytikko-opiskelija

Metropolia Ammattikorkeakoulu

kristel.kookmaa@metropolia.fi

ILKKA SEPPÄLÄ

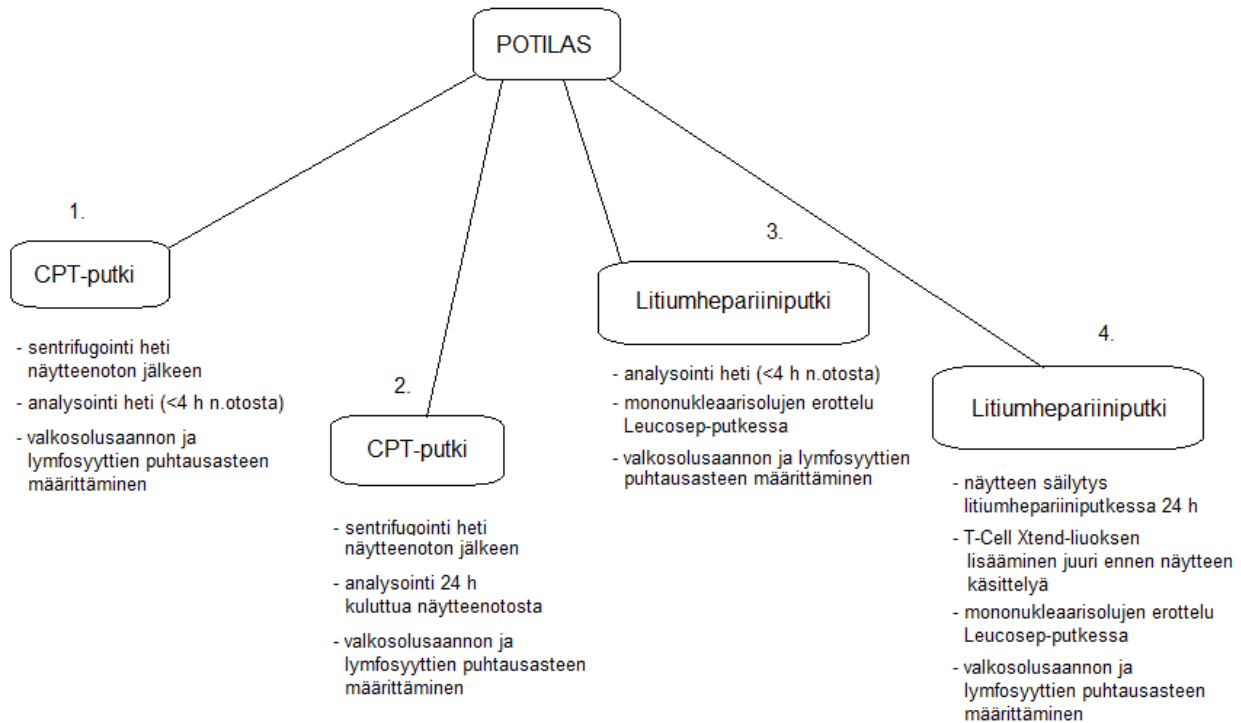
kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri, dos.

HUSLAB immunologian osasto

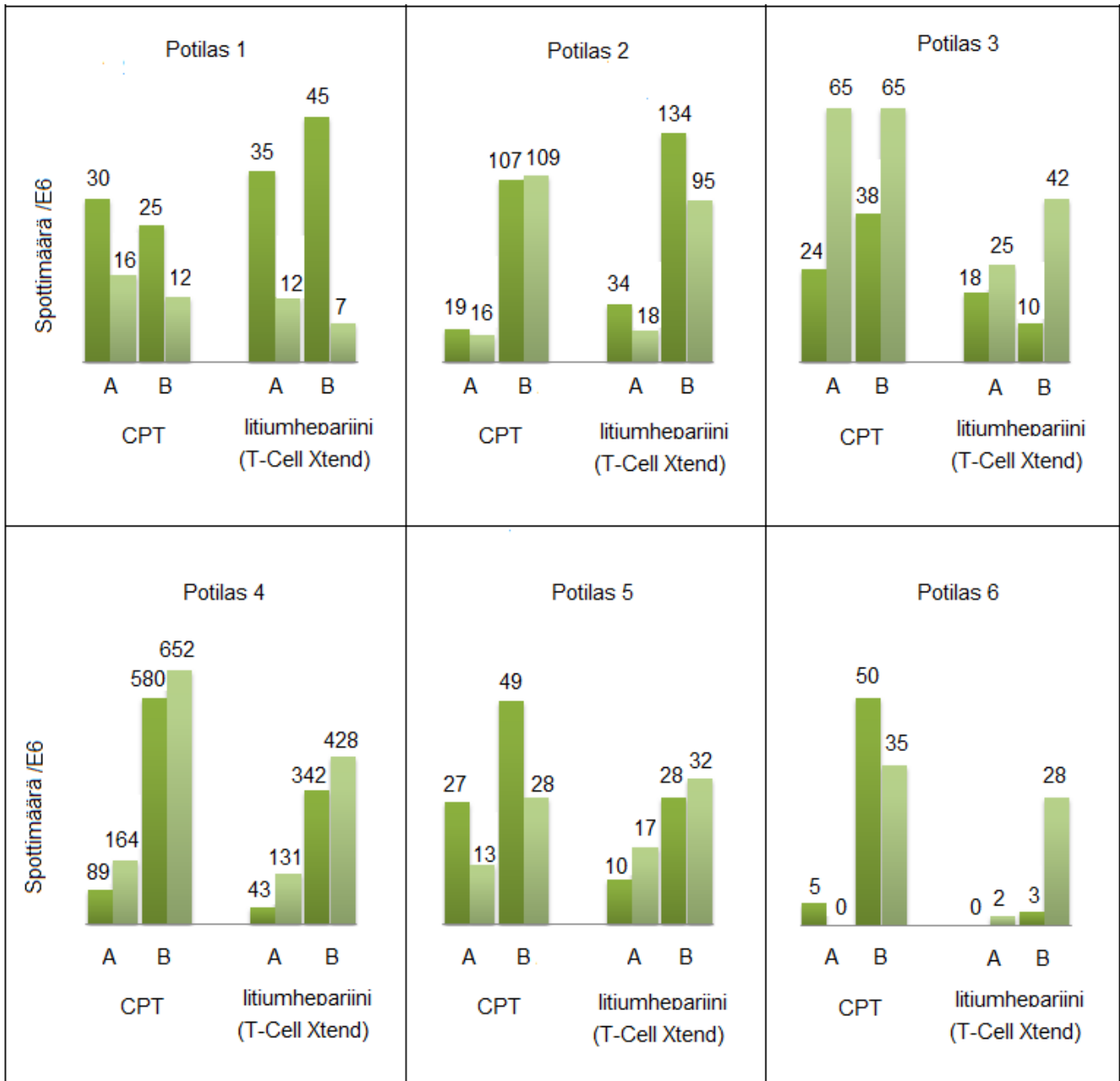
TAMARA TUUMINEN

kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri, dos.

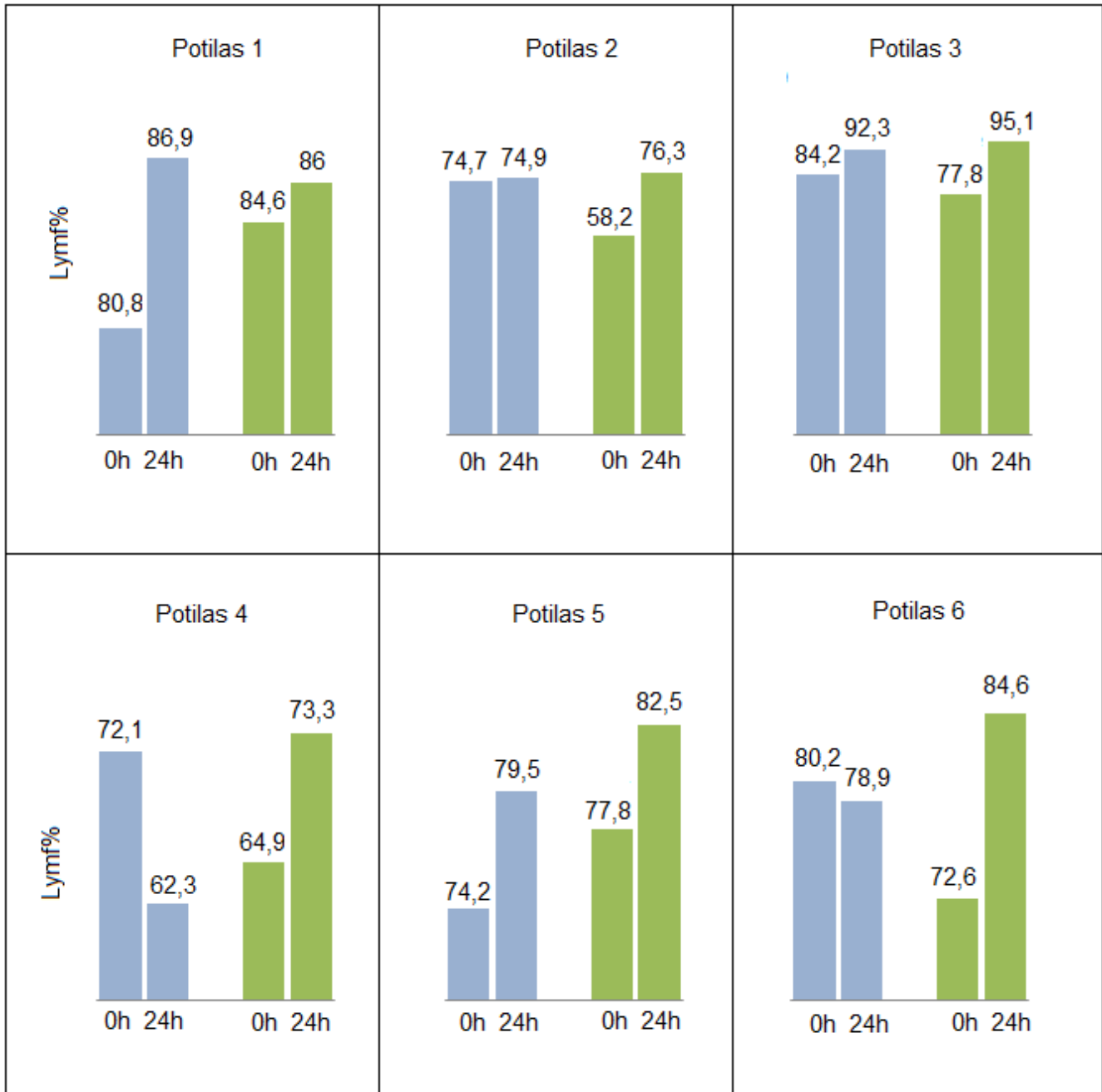
Helsingin Yliopisto ja HUSLAB immunologian osasto



Kuva 1. Testauksen kulkukaavio. Testausta varten kerättiin verinäytteet kuudelta potilaalta kahteen CPT-putkeen (à 8ml) ja kahteen litiumhepariini-putkeen (à 9ml). Yksi CPT-putki ja litiumhepariini-putki analysoitiin heti ja toinen CPT-putki ja litiumhepariini-putki 24 tuntia näytteenoton jälkeen. 24 tuntia säilytettyyn litiumhepariini-putkeen lisättiin T-Cell Xtend -reagenssi juuri ennen näytteen käsittelyä.



Kuva 2. Testauksessa analysoidujen kuuden potilaan antigeeni-A ja antigeeni-B spottimäärät per miljoona lymfosyyttiä CPT-putkissa ja litiumhepariiniputkissa. Tummanvihreät palkit edustavat spottimääriä heti analysoiduissa näytteissä ja vaaleanvihreät palkit spottimääriä 24 tuntia säilytetyissä näytteissä. T-Cell Xtend -reagenssi lisättiin 24 tuntia litiumhepariiniputkissa säilytettyihin näytteisiin.



Kuva 3. Testauksessa analysoidujen kuuden potilaan lymfosyyttiprosentit mononuklearisolufraktoista heti analysoiduissa ja 24 tunnin säilytyksen jälkeen analysoiduissa näytteissä. Siniset palkit edustavat CPT-putkeen otettuja näytteitä ja vihreät palkit litiumhepariiniputkiin otettuja näytteitä. T-Cell Xtend-reagenssi lisättiin 24 tuntia litiumhepariiniputkissa säilytettyihin näytteisiin.

POHDINTAA TYÖN TOTEUTUKSESTA

Tein opinnäytetyöni lopputuotoksen artikkelimuodossa. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että opinnäytetyön suunnitelmavaiheessa olin jo perehtynyt työn viitekehykseen ja kirjoittanut teoriaa aiheestani. Suunnitelmavaiheessa oli tarkoitus, että hallitsen opinnäytetyöni aiheen keskeisimmät asiat. Teoriaosuudessa etsin tietoa mm. tuberkuloosista, latentista tuberkuloosista, T-Cell Xtend -reagenssista sekä ELISPOT-näytteen säilyvyydestä. Suunnitelmavaiheessa laadin myös mahdollisimman tarkan työsuunnitelman, jotta työn toteutus laboratoriossa sujuisi mahdollisimman hyvin. Suunnitelmavaiheessa hain työlle tarvittavat luvat, kuten eettisen luvan sekä tutkimusluvan. Lisäksi tein vakio-sopimuksen HUSLABin kanssa.

Suunnitelmavaiheen jälkeen suoritin työni käytännön osan immunologian laboratoriossa. Kaikkien potilasnäytteiden analysoinnissa minulla meni kaksi viikkoa. Käytännön jakso sujui suunnitelmien mukaisesti. Seuraavaksi oli luvassa tulosten taulukointi ja analysointi. Tulosten analysoinnissa minua olivat auttamassa laboratorionhoitaja Milja Korpinen sekä mikrobiologian erikoislääkäri Tamara Tuuminen.

Tulosten analysoinnin jälkeen aloin laatimaan työstäni artikkelia. Aikaisemmin tekemästäni työn suunnitelmasta oli tässä vaiheessa paljon hyötyä, sillä minulla oli jo valmiina joitain osia tulevaan artikkeliin. Esimerkiksi johdanto, materiaalit ja menetelmät sekä työn toteutus osiot olivat jo valmiina. Artikkelin laadinnassa haastavinta oli saada tiivistettyä työ tarpeeksi lyhyeen muotoon. Tämän lisäksi koin haastavana tieteellisen kielen kirjoittamisen. Koin tärkeänä sen, että minulla oli ohjaajina henkilöitä, joilla oli paljon kokemusta tieteellisten artikkelien kirjoittamisesta. Sain heiltä paljon rakentavaa palautetta, jonka pohjalta pystyin muokkaamaan tekstiäni, samalla säilyttäen sen kuitenkin omana tuotoksenani.

Opinnäytetyön tekeminen artikkelimuodossa oli mielestäni opettava kokemus. Olin tiiviisti tekemisissä työelämän kanssa ja sain paljon rakentavaa palautetta. Työssä haastavimmalta tuntui se, ettei artikkelin kirjoittamisesta opinnäytetyönä ollut aikaisempaa kokemusta. Mielestäni sain työni kuitenkin tehtyä hyvin, eikä suurempia ongelmia työn toteutuksessa esiintynyt. Toivon, että työstäni olisi hyötyä tulevaisuudessa niille, jotka haluavat tehdä opinnäytetyön artikkelimuodossa.