

**Spot-on
immune competence**
The right path
to a better therapy

T-Track[®]
EBV

Gebrauchsanweisung

Ausreichend für 6 Tests
Nur für Forschungszwecke

Der T-Track[®] EBV ist ein Diagnostik-Kit zur Bestimmung der Funktionalität der zellvermittelten Immunantwort (cell mediated immunity, CMI) von EBV-seropositiven Patienten. Der Test erlaubt eine semiquantitative Beurteilung der EBV-spezifischen Immunkompetenz solcher Patienten. Durch Wiederholung des Tests können Aussagen zum Status der EBV-spezifischen Immunkompetenz im Verlauf einer immunsuppressiven Behandlung, anderer Formen der Beeinträchtigung der CMI und/oder einer antiviralen Therapie gemacht werden.

Der Test eignet sich nicht zur Bestimmung einer EBV-Infektion.

Hersteller



Lophius Biosciences GmbH
Biopark Regensburg
Josef-Engert-Str. 13
93053 Regensburg

lophius
biosciences

Inhaltsverzeichnis

Komponenten des T-Track® EBV Kits	03
Lagerung und Stabilität	03
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	04
Beschränkungen	04
Zusätzliche Geräte und Materialien	05
Verfahrensprinzip des T-Track® EBV	06
Versuchsdurchführung	08
Vorbereitung der Versuchsdurchführung	08
Vorbereitung der Reagenzien	08
Gewinnung der PBMC	09
Bestückung der Teststreifen	10
Stimulation	11
Detektion IFN- γ produzierender Blutleukozyten	12
Auslesen der Ergebnisse	13
Qualitätskontrolle	13
Auswertung der Ergebnisse	14
Leistungsmerkmale des T-Track® EBV	15
Literaturangaben	15
Symbolerklärungen	16

Komponenten des T-Track® EBV Kits

	Kit-Komponenten	Einheit	Menge
1	K50011 Ready-MTP	Anzahl	1 Mikrotiterplatte à 12 Teststreifen
2	K50012 BZLF1*	Volumen	70 µl Konzentrat
3	K50013 EBNA-3A*	Volumen	70 µl Konzentrat
4	K50014 SEB	Volumen	70 µl Konzentrat
5	K50015 mAb-Biotin	Volumen	70 µl Konzentrat
6	K50016 Strep-AP	Volumen	70 µl Konzentrat
7	K50017 DB	Volumen	12 ml gebrauchsfertig
8	K50018 Stain	Volumen	6 ml gebrauchsfertig
9	K50019 WB1	Volumen	200 ml gebrauchsfertig
10	K50020 WB2	Volumen	70 ml gebrauchsfertig
11	K50021 Gebrauchs- anweisung	Anzahl	1

Lagerung und Stabilität

Lagerung

Die Lagerung aller Komponenten des Kits erfolgt bei 2 – 8 °C. Die Substratlösung ist lichtempfindlich und sollte lichtgeschützt aufbewahrt werden. Nicht verwendete Teststreifen sollten unter sterilen Arbeitsbedingungen in die Originalverpackung zurückgelegt werden. Nicht verwendete Teststreifen und geöffnete Komponenten sind bis zum weiteren Gebrauch bei 2 – 8 °C aufzubewahren.

Haltbarkeit

Die Bestandteile des Kits sind ungeöffnet unter den empfohlenen Lagerbedingungen bis zum Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Packungsvorderseite). Komponenten, die mehrfach gebraucht werden, sind bei 2 – 8 °C bis zur Weiterverwendung zu lagern.

Lagerung der Blutproben

Der Transport der Blutproben zum Labor muss ebenfalls bei Raumtemperatur (RT; 18 – 25 °C) erfolgen. Um die Funktionalität der Blutleukozyten zu gewährleisten, müssen die Blutproben bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) gelagert und innerhalb von 8 Stunden nach Blutabnahme analysiert werden. Die heparinisierte Blutprobe darf nicht gekühlt oder eingefroren werden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen



Mit humanem Material muss vorsichtig und sorgfältig umgegangen werden, da alle Blutproben als potenziell infektiös betrachtet werden müssen. Die Handhabung von Blutproben und Testkomponenten sowie deren Gebrauch, Lagerung und Entsorgung müssen gemäß nationaler Biogefährdungsrichtlinien erfolgen. Mit Chemikalien muss sorgfältig umgegangen werden. Alle Chemikalien sollten als potenziell gefährlich betrachtet werden. Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)  ist gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken.

Beschränkungen

- Nur zur sachkundigen Verwendung durch Fachanwender.
- Das Kit muss bei 2 – 8 °C gelagert werden. Das Kit darf nicht über das Haltbarkeitsdatum hinaus verwendet werden.
- Komponenten verschiedener Kit-Chargen dürfen nicht gemischt werden.
- Vor Gebrauch muss die Anleitung sorgfältig gelesen werden.
- Um eine Kontamination der Reagenzien, der Teststreifen, der Zellsuspensionen und der Zellkulturmedien zu vermeiden, müssen sterile Arbeitstechniken eingehalten werden.

- Alle Änderungen an den angegebenen Pipettier- und Waschverfahren, Inkubationszeiten und/oder Temperaturen können das tatsächliche Ergebnis beeinflussen. Die Vorgaben dieser Gebrauchsanweisung müssen eingehalten werden.
- Vollblutproben dürfen insbesondere nicht gekühlt oder eingefroren werden.
- Ergebnisse sollten immer nur im Zusammenhang mit dem klinischen Gesamtbild verwendet und interpretiert werden.
- Der Test eignet sich nicht zur Bestimmung einer EBV-Infektion.

Zusätzliche Geräte und Materialien

- Blutentnahmeröhrchen, S-Monovette Li-Heparin 7,5 ml (Sarstedt, Kat.-Nr. 01.1608.001)
- Sicherheitswerkbank Klasse II
- Trypanblau (Sigma, Kat.-Nr. T8154)
- Polypropylen-Röhrchen (15 ml und 50 ml, Greiner, Kat.-Nr. 188271)
- Reaktionsgefäße (1,5 ml, Greiner, Kat.-Nr. 616201)
- Ficoll (Pancoll, PAN Biotech, Kat.-Nr. P04-60500)
- Zentrifuge mit Ausschwingrotor zur Präparation der PBMC (mind. 1000 x g; muss die Proben bei Raumtemperatur halten können (18 – 25 °C))
- Neubauer-Zählkammer mit Mikroskop oder Hämozytometer
- Feuchtinkubator (37 °C, 5% CO₂)
- Sterile Pipetten und Pipettenspitzen
- Sterile Pasteurpipetten
- Steriles PBS (Lonza, Kat.-Nr. BE17-516Q)
- Steriles Zellkulturmedium (AIM-V, Invitrogen, Kat.-Nr. 31035-025)
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

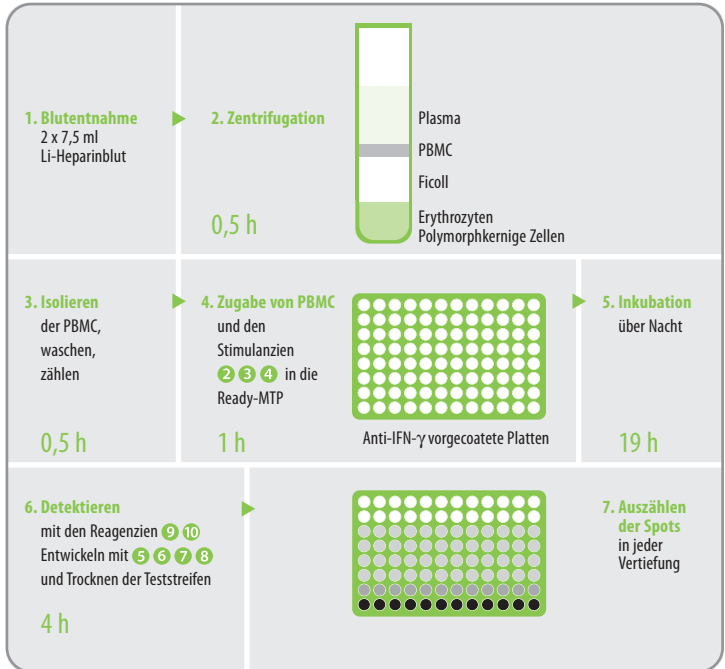
Verfahrensprinzip des T-Track® EBV

Das angewandte Testprinzip des T-Track® EBV basiert auf dem hochsensitiven ELISpot-Verfahren (Enzyme Linked Immuno Spot Technology). Diese Methode gewährleistet den hochspezifischen und sensitiven Nachweis EBV-spezifischer Protein-reaktiver Blutleukozyten. Bei dem ELISpot-Verfahren handelt es sich vom Prinzip her um einen Festphasen-ELISA.

Auf einer mit IFN- γ -spezifischen Antikörpern gesättigten Membran werden Blutleukozyten (PBMC) mit ausgewählten viralen Proteinen inkubiert. Das von reaktiven Zellen sezernierte Zytokin IFN- γ wird von den auf der Membran immobilisierten spezifischen Antikörpern (Capture-Antikörper) gebunden. Die Zellen werden nach der 19-stündigen Stimulation entfernt. Mithilfe eines zweiten biotinylierten IFN- γ -spezifischen Antikörpers (Detektions-Antikörper) wird anschließend das gebundene IFN- γ markiert. Im Anschluss wird Enzym-konjugiertes Streptavidin zugegeben, das spezifisch den Detektionsantikörper bindet. Ein lösliches Substrat wird in jede Vertiefung gegeben. Durch die enzymatische Umsetzung des löslichen Substrats in einen nicht löslichen Niederschlag entstehen auf der Membran sogenannte Spots, die jeweils die Signatur einer Antigen-reaktiven Zytokin produzierenden Zelle darstellen. Die Spots können entweder mit einem Mikroskop oder einem automatischen Bildanalyse-System detektiert und ausgezählt werden. Für die Untersuchung einer Patientenprobe werden folgende Stimulanzien eingesetzt:

- **Negativkontrolle** (4 Replikate): nicht stimulierte PBMC zur Detektion unspezifisch aktivierter Blutleukozyten
- **Assay Marker 1** (4 Replikate): **EBV „Nuclear Protein EBNA-3A**“ Antigen** stimulierte PBMC

- **Assay Marker 2** (4 Replikate): **EBV „Immediate-Early Protein BZLF1*“ Antigen** stimulierte PBMC
- **Positivkontrolle** (Zellvitalität, 2 Replikate): Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) stimulierte PBMC
- **Operatorkontrolle** (korrekte Versuchsdurchführung, 2 Replikate): mit IFN- γ gesättigter Capture-Antikörper



Versuchsdurchführung

Dieser Test sollte unter strenger Einhaltung der beschriebenen Schritte dieser Gebrauchsanweisung erfolgen. Die Gewinnung der PBMC und die Bestückung der Teststreifen muss unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

Vorbereitung der Versuchsdurchführung

Die Blutentnahme muss durch sachkundige Personen entsprechend den lokalen Anweisungen zur Blutentnahme erfolgen. Für die Testdurchführung werden zwei vollständig mit Blut gefüllte 7,5 ml Li-Heparin-Röhrchen benötigt, um die erforderliche Anzahl an PBMC auch bei immunsupprimierten Patienten sicher zu erreichen. Um die Funktionalität der Blutleukozyten während des Inkubationsschrittes zu gewährleisten, sollten die Abläufe der PBMC-Gewinnung validiert werden.

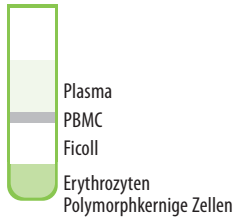
Die Messung der fertig entwickelten Tests muss durch den Anwender validiert werden. Zur Gewährleistung einer standardisierten Probenauswertung wird die Verwendung eines kalibrierten ELISpot-Readers mit zugehöriger Software empfohlen. Die Geräteeinstellungen des Readers müssen etabliert sein und dürfen bei Wiederholungen nicht verändert werden.

Vorbereitung der Reagenzien

Das Zellkulturmedium muss vor Gebrauch auf Raumtemperatur vorgewärmt werden. Das Kit muss vor der Anwendung auf Raumtemperatur akklimatisiert werden. Vor dem Gebrauch müssen die Vials kurz zentrifugiert werden. Die Lösungen durch Schnipsen der Vials durchmischen und die Vials anschließend wieder zentrifugieren.

Komponenten, die unter der Sterilwerkbank eingesetzt werden, sollen vor Gebrauch mit Alkohol abgerieben werden.

Gewinnung der PBMC (unter sterilen Bedingungen)



- Vorlegen von 15 ml Ficoll in ein 50-ml-Polypropylen-Röhrchen.
- Verdünnen von 15 ml Vollblut mit 15 ml sterilem PBS in einem anderen Röhrchen.
- Vorsichtiges und langsames Überschichten des Ficolls mit 30 ml des verdünnten Vollbluts.
- Zentrifugation im Ausschwingrotor bei 880 x g ohne Bremse für 30 min.
- Abnehmen der Interphase (trübe PBMC-haltige Schicht zwischen Ficoll und Plasma).
- Überführen der PBMC in ein neues 50 ml Röhrchen.
- Auffüllen auf 50 ml Volumen mit sterilem PBS.
- Zentrifugieren für 10 min bei 300 x g.
- Abnehmen des Überstands (Waschschritt).
- Resuspendieren des Zellpellets in 1 ml PBS.
- Auffüllen auf 50 ml Volumen mit sterilem PBS.
- Zentrifugieren für 10 min bei 300 x g.
- Abnehmen des Überstands (Waschschritt).
- Resuspendieren des Zellpellets in 1 ml sterilem AIM-V.
- Lebend-Tot-Färbung mittels Trypanblau-Färbung
Hinweis: Die Zellen werden zuerst 1:5 in PBS (10 µl Zellen + 40 µl PBS) verdünnt und dann 1:1,5 in Trypanblau (10 µl Zellen + 5 µl Trypanblau) weiter verdünnt.

- Sofortiges Zählen der lebenden (ungefärbten) Zellen in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop oder mittels eines Hämozytometers.
- Einstellen der Lebendzellzahl auf 2×10^6 lebende Zellen pro ml in insgesamt 1,8 ml AIM-V (entspricht $3,6 \times 10^6$ lebenden Zellen).
- Lagern der Zellen auf Eis bis zum Gebrauch.

Bestückung der Teststreifen (unter sterilen Bedingungen)

Pro Probandenprobe werden 2 Teststreifen à 8 Vertiefungen benötigt.

- Herausnehmen der gebrauchsfertigen Mikrotiterplatte (Ready-MTP) ① aus der Verpackung.
- Herausnehmen von überzähligen Teststreifen aus dem Rahmen der Ready-MTP.
Hinweis: Teststreifen sind durch Ziffern paarweise gekennzeichnet.
- Nicht verwendete Teststreifen zurück in die Verpackung legen und sicher verschließen.

Ansetzen der Arbeitslösungen

Arbeitslösung	Stammlösung	Medium	Finales Volumen
Negativkontrolle	-	250 µl	250 µl
EBNA-3A* ③	10 µl	240 µl	250 µl
BZLF1* ②	10 µl	240 µl	250 µl
SEB ④	10 µl	100 µl	110 µl
Operatorkontrolle	-	350 µl	350 µl

Hinweis: Die nachfolgenden Volumina beziehen sich auf einen Test. Bei der Untersuchung einer größeren Zahl von Probandenproben *müssen* alle Volumina der Reagenzien sowie die Gesamtvolumina entsprechend angepasst werden.

A		50 µl Medium	Zugabe von 100 µl PBMC-Lösung je Vertiefung
B			
C		50 µl EBNA-3A*-Arbeitslösung	Zugabe von 100 µl PBMC-Lösung je Vertiefung
D			
E		50 µl BZLF1*-Arbeitslösung	Zugabe von 100 µl PBMC-Lösung je Vertiefung
F			
G		50 µl SEB-Arbeitslösung	Zugabe von 100 µl PBMC-Lösung je Vertiefung
H		150 µl Medium	

Pipettieren der Arbeitslösungen beginnend bei der Negativkontrolle (NK) in die Vertiefungen (je Teststreifen):

- Negativkontrolle: 2-mal 50 µl Medium
 - EBNA-3A* **3** 2-mal 50 µl EBNA-3A*-Arbeitslösung
 - BZLF1* **2** 2-mal 50 µl BZLF1*-Arbeitslösung
 - SEB **4** 1-mal 50 µl SEB-Arbeitslösung
 - Operatorkontrolle 2-mal 150 µl Medium
- Durchmischen der eingestellten Zellsuspension (s. S. 09: Gewinnung der PBMC) direkt vor dem Gebrauch.
 - Vorsichtige Zugabe von je 100 µl Zellsuspension. Beginnend mit der Negativkontrolle beiden Teststreifen parallel die Zellsuspension von oben nach unten zugeben. Den Vertiefungen mit der Operatorkontrolle wird keine Zellsuspension zugegeben.
Hinweis: nach jeder Vertiefung die Pipettenspitze wechseln.
 - Abdecken der Ready-MTP.

Stimulation

- Inkubation der Ready-MTP bei 37 °C, 5% CO₂ für 19 Stunden im Feuchtinkubator.

Detektion IFN- γ produzierender Blutleukozyten

- Verwerfen der Zellsuspension und des Mediums.
- Zugabe von 200 μ l WB1 9 pro Vertiefung für jeweils 3 min.
- Verwerfen des Puffers.
- Wiederholen des Waschschrilles 6-mal.
- Herstellen der mAb-Biotin-Arbeitslösung durch Mischen von 10 μ l mAb-Biotin 5 mit 1,8 ml DB 7.
- Zugabe von jeweils 100 μ l mAb-Biotin-Arbeitslösung pro Vertiefung.
- Inkubation der abgedeckten Teststreifen für 2 h bei RT.
- Verwerfen der mAb-Biotin-Arbeitslösung.
- Zugabe von 200 μ l WB1 9 pro Vertiefung für jeweils 3 min.
- Verwerfen des Puffers.
- Wiederholen des Waschschrilles 3-mal.
- Verwerfen des Puffers.
- Zugabe von 200 μ l WB2 10 pro Vertiefung für jeweils 3 min.
- Verwerfen des Puffers.
- Wiederholen des Waschschrilles 3-mal.
- Herstellen der Strep-AP-Arbeitslösung durch Mischen von 10 μ l Strep-AP 6 mit 1,8 ml DB 7.
- Zugabe von jeweils 100 μ l Strep-AP-Arbeitslösung pro Vertiefung.
- Inkubation der abgedeckten Teststreifen für 1 h bei RT.
- Verwerfen der Strep-AP-Arbeitslösung.
- Zugabe von 200 μ l WB2 10 pro Vertiefung für jeweils 3 min.
- Verwerfen des Puffers.
- Wiederholen des Waschschrilles 6-mal.
- Zugeben von 50 μ l Stain 8 je Vertiefung.
- Abdecken der Teststreifen.
- Inkubieren der Teststreifen für 6 bis 7 min bei RT im Dunkeln.
Hinweis: Eine längere Inkubationszeit sollte vermieden werden, da andernfalls die Quantifizierbarkeit des Ergebnisses negativ beeinflusst werden kann.

- Abstoppen der Färbereaktion durch 3-maliges Waschen der Vertiefungen mit Wasser.
- Abnehmen des Plattenbodens.
- Einwickeln der Teststreifen in der Halterung in ein Papiertuch.
- Trocknen der Teststreifen über Nacht bei RT.
Hinweis: Nach dem Trocknen ist die Färbung im Dunkeln für mehrere Wochen stabil.

Auslesen der Ergebnisse

Die entstandenen Spots werden ausgezählt, und die Auswertung, Interpretation und Dokumentation der Versuchsergebnisse wird entsprechend der Anweisungen in den folgenden Kapiteln durchgeführt.

Qualitätskontrolle

Die Negativkontrolle weist im typischen Fall keine bis wenige Spots (maximal 10 Spots) auf.

Die Positivkontrolle (SEB) sollte in immunkompetenten Probanden eine sehr hohe Reaktion hervorrufen (> 400 Spots pro Vertiefung). Sie ist ein Maß für die Zellfunktionalität. Unter Immunsuppression kann die Positivkontrolle entsprechend dem Grad der Suppression reduziert sein oder sogar negativ ausfallen. Die Ursache für diesen Befund kann über andere geeignete Verfahren abgeklärt werden.

Die Operatorkontrolle muss bei korrekter Versuchsdurchführung eine homogene Färbung der ganzen Membran ergeben. Diese Färbung ist unabhängig von der Qualität der Patientenprobe. Somit ist sichergestellt, dass der Test ordnungsgemäß durchgeführt wurde. Bei einem negativen oder inhomogenen Ergebnis der Operatorkontrolle sind die Testergebnisse prinzipiell nicht auswertbar.

Auswertung der Ergebnisse

Die Funktionalität der zellvermittelten Immunantwort wird durch die Bestimmung der Häufigkeit IFN- γ produzierender Zellen in spezifisch stimulierten und unstimulierten Ansätzen bestimmt. Hierbei stellt jeder gezählte Spot die Signatur eines reaktiven Blutleukozyten dar.

Die Ergebnisse der jeweils vier mit BZLF1* ② und EBNA-3A* ③ stimulierten Vertiefungen werden mittels des Mann-Whitney-U-Tests mit den vier Einzelwerten der unstimulierten Ansätze verglichen.

Ergebnisse sind positiv, wenn sie durch den Test als signifikant ($p < 0,05$) bestätigt werden. Bei grenzwertigen Ergebnissen sollte eine weitere Probandenprobe mit jeweils 8 Replikaten analysiert werden. Negative Testergebnisse sind als gesichert negativ zu werten, wenn gleichzeitig die Positivkontrolle (SEB) positiv ausfällt (> 200 Spots). Bei einem negativen Testergebnis und gleichzeitiger negativer bzw. geringer Spotzahl in der Positivkontrolle kann keine verlässliche Aussage bezüglich des Testergebnisses getroffen werden. Dieser Befund kann auf eine starke Immunsuppression des Patienten hinweisen oder durch eine falsche Lagerung oder Behandlung der Blutprobe hervorgerufen werden.

Enthält eine Vertiefung mehr als 400 Spots (abhängig von der Auflösung des Auslesegerätes), so muss die Blutprobe für eine exaktere Quantifizierung der Spotzahl in einer entsprechenden Verdünnung von 1:2 bis 1:5 nachgetestet werden.

Eine gesteigerte Anzahl der Spots in der Negativkontrolle (unspezifisch aktivierte Blutleukozyten) hat eine verringerte analytische Sensitivität zur Folge. Dieser Befund kann ein Hinweis auf eine subklinische EBV-Reaktivierung oder eine allgemeine unspezifische Stimulierung sein.

Leistungsmerkmale des T-Track® EBV

Klinische Sensitivität

Die klinische Sensitivität wurde durch die Stimulation frisch isolierter PBMC von 20 gesunden EBV-seropositiven Spendern mit EBNA-3A* und BZLF1* und der anschließenden Ermittlung des prozentualen Anteils der Proben mit einem signifikant positiven Testergebnis bestimmt. Die klinische Sensitivität des T-Track® EBV Tests lag hierbei bei 90%.

Messbereich und Linearität

Die Anzahl der PBMC im Testansatz wurde so festgelegt, dass bei gesunden Spendern eine gut messbare Zahl Antigen-reaktiver Blutleukozyten zu erwarten ist. Bei Auftreten von mehr als 400 Spots pro Vertiefung liegt der Messwert außerhalb des linearen Bereichs (abhängig von der Auflösung des Ausleesegerätes). In diesem Fall muss die Probe in einer Verdünnung von 1:2 bis maximal 1:3 neu vermessen werden. Pro Vertiefung sind maximal 2×10^5 Zellen analysierbar.

Literaturangaben

Barabas et al. (2008): Urea-mediated Cross-Presentation of Soluble Epstein-Barr Virus BZLF1 Protein. *PLoS Pathogens* 4 (11)

Daveni et al. (2011): The clinical value of concomitant EBV-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol*, 24 (4)

Symbolerklärungen



Ausreichend für „n“ Tests



Gebrauchsanweisung beachten



Achtung, Begleitdokumente beachten



Hersteller



Bestellnummer



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Temperaturbegrenzung zur Lagerung



Positives Kontrollmaterial

Hersteller:



Lophius Biosciences GmbH
Josef-Engert-Straße 13
93053 Regensburg, Deutschland
Phone +49 (0)941 630 9197-0

K50021
Ausgabe 2011-09-19
Rev. 01.00