

T CELL COMPANY

T-TRACK®
CMV

T-Track® CMV GEBRAUCHSANWEISUNG

Der T-Track® CMV ist ein Diagnostik-Kit zur Bestimmung der Funktionalität der zellvermittelten Immunantwort (cell-mediated immunity, CMI) von CMV-seropositiven Patienten.


Der Test erlaubt eine semiquantitative Beurteilung der CMV-spezifischen Immunkompetenz dieser Patienten. Der Test eignet sich nicht zur Bestimmung einer CMV-Infektion.

Ausreichend für 12 Tests
In-vitro-Diagnostikum

REF 11001003

IVD **CE**

Hersteller

 Lophius Biosciences GmbH
Am BioPark 13
D-93053 Regensburg

INHALTSVERZEICHNIS

Komponenten des T-Track® CMV Kits	3
Lagerung und Haltbarkeit	3
Lagerung	3
Haltbarkeit	3
Transport und Lagerung der Blutproben	4
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	4
Beschränkungen und Hinweise	4
Zusätzliche Geräte und Materialien	5
Verfahrensprinzip des T-Track® CMV	6
Versuchsdurchführung	8
Hinweise zur Versuchsdurchführung	8
Vorbereitung der Reagenzien	9
Gewinnung der PBMC	9
Vorbereitung der Arbeitslösungen	10
Vorbereitung der Teststreifen	11
Stimulation	12
Detektion IFN- γ -produzierender Effektorzellen	12
Auslesen der Ergebnisse	13
Qualitätskontrolle	14
Auswertung der Ergebnisse	14
T-Track® CMV Calculator Software	19
Leistungsmerkmale des T-Track® CMV	20
Klinische Sensitivität	20
Messbereich und Linearität	20
Wiederholpräzision	21
Vergleichspräzision	21
Literatur	22
Abkürzungen	23
Symbolerklärungen	24

KOMPONENTEN DES T-TRACK® CMV KITS

	Kit Komponente	Einheit	Menge	
1	K50001 Ready-MTP	Stück	1	Mikrotiterplatte (12 Teststreifen)
2	K50003 T-activated® IE-1	Volumen	70 µl	Konzentrat
3	K50002 T-activated® pp65	Volumen	70 µl	Konzentrat
4	K50073 PHA ¹⁾	Volumen	70 µl	Konzentrat
5	K50005 mAb-AP	Volumen	70 µl	Konzentrat
6	K50006 DB	Volumen	12 ml	gebrauchsfertig
7	K50007 Stain	Volumen	6 ml	gebrauchsfertig
8	K50008 WB1	Volumen	200 ml	gebrauchsfertig
9	K50009 WB2	Volumen	70 ml	gebrauchsfertig
10	K50010 Gebrauchsanweisung	Stück	1	

¹⁾ Positives Kontrollmaterial **CONTROL+**

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Lagerung

Die Lagerung aller Komponenten des Kits erfolgt bei 2-8 °C. Die Substratlösung ist lichtempfindlich und muss lichtgeschützt aufbewahrt werden. Nicht verwendete Teststreifen müssen unter sterilen Arbeitsbedingungen in die Originalverpackung zurückgelegt und lichtgeschützt bei 2-8 °C aufbewahrt werden.

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 und haben nach dem ersten Öffnen des Kits eine Haltbarkeit von bis zu 3 Monaten (höchstens bis zum Haltbarkeitsdatum des Kits).

Transport und Lagerung der Blutproben

Um die Funktionalität der Blutleukozyten zu gewährleisten, muss die Blutprobe bei Raumtemperatur (18-25 °C) transportiert oder gelagert und innerhalb von 24 Stunden nach der Blutabnahme analysiert werden.

Heparinisierte Blutproben dürfen nicht gekühlt oder eingefroren werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN



Mit humanem Material muss sorgfältig umgegangen werden. Alle Blutproben müssen als potenziell infektiös betrachtet werden. Die Handhabung von Blutproben und Testkomponenten sowie deren Gebrauch, Lagerung und Entsorgung muss gemäß nationaler Bio-gefährdungsrichtlinien und -vorschriften erfolgen. Mit Chemikalien muss sorgfältig umgegangen werden. Alle Chemikalien sollten als potenziell gefährlich betrachtet werden.

Weitere Informationen finden Sie in dem entsprechenden „Material Safety Data Sheet (MSDS)“, das über **Request@Lophius.com** angefordert werden kann.

BESCHRÄNKUNGEN UND HINWEISE

- Vor Gebrauch muss die Anleitung sorgfältig gelesen werden.
- Nur zur sachkundigen Verwendung durch Fachanwender.
- Der Test eignet sich nicht zum Nachweis einer CMV-Infektion.
- Ergebnisse dürfen immer nur im Zusammenhang mit dem klinischen Gesamtbild verwendet und interpretiert werden.
- 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.
- Um eine Kontamination der Reagenzien, der Teststreifen, der Zellsuspensionen und der Zellkulturmedien zu vermeiden, müssen sterile Arbeitstechniken an den empfohlenen Stellen, sowie Vorsichtsmaßnahmen generell eingehalten werden.
Hinweis: Der Ausdruck „sterile Arbeitsbedingungen/Arbeitstechniken“ bedeutet eine kontrollierte Arbeitsumgebung, um Kontaminationen zu vermeiden.
- Änderungen an den angegebenen Pipettier- und Waschverfahren, Inkubationszeiten und/oder Temperaturen können das Ergebnis beeinflussen. Die Vorgaben dieser Gebrauchsanweisung **10** müssen eingehalten werden.
- Vollblutproben dürfen nicht gekühlt oder eingefroren werden.
- Für die Vergleichbarkeit der mit dem Test gewonnenen Ergebnisse wird empfohlen, im Vorfeld eine Validierung der Zellzählung und der verwendeten Messgeräte (Messbereich, Messprotokoll) durchzuführen.
- Die jeweiligen Beschränkungen der Messgeräte sind zu beachten.

ZUSÄTZLICHE GERÄTE UND MATERIALIEN

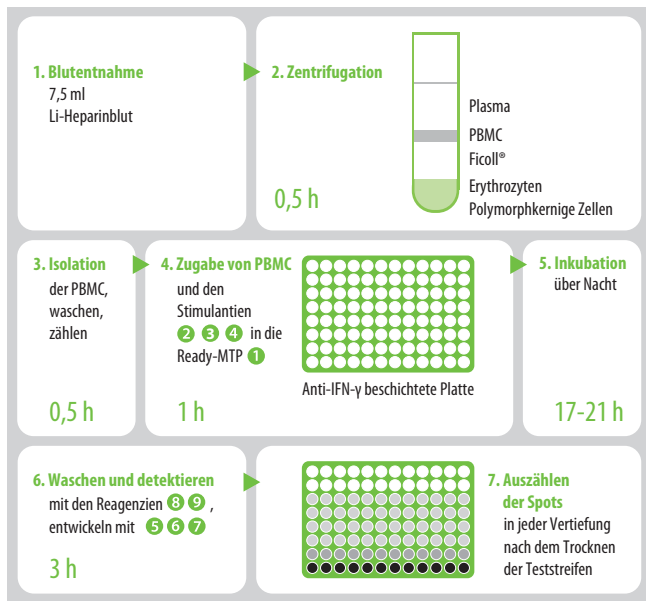
- Blutentnahmeröhrchen, S-Monovette® Li-Heparin 7,5 ml (Sarstedt, Kat.-Nr. 01.1608.001)
- Zentrifugen-Röhrchen (15 ml und 50 ml, Greiner, Kat.-Nr. 188271 und Kat.-Nr. 227261)
- Reaktionsgefäße (1,5 ml, Greiner, Kat.-Nr. 616201)
- Sterile Pipetten und Pipettenspitzen
- Sterile Pasteurpipetten
- Steriles PBS (Lonza, Kat.-Nr. BE17-516F)
- Ficoll® (Pancoll, PAN Biotech, Kat.-Nr. P04-60500)
- Trypanblau (optional, Sigma, Kat.-Nr. T8154)

- Steriles Serum-freies Zellkulturmedium (AIM-V®, Invitrogen, Kat.-Nr. 31035-025)
- Leitungswasser
- Zentrifuge mit Ausschwingrotor zur Präparation der PBMC, die mindestens 1000 x g erreicht, die Proben bei Raumtemperatur halten (18-25 °C) und ohne Bremse betrieben werden kann.
- Sicherheitswerkbank Klasse II
- Neubauer-Zählkammer mit Mikroskop und Trypanblau oder validiertes Gerät zur Zellzahlbestimmung (empfohlen)
- Feuchtinkubator (37 °C, 5 % CO₂)
- ELISpot Reader (empfohlen)

VERFAHRENSPRINZIP DES T-TRACK® CMV

Der T-Track® CMV basiert auf der hochsensitiven Enzyme-linked Immunosorbent Spot (ELISpot)-Technik. Dabei handelt es sich im Prinzip um einen Festphasen-ELISA unter Verwendung einer PVDF-Membran-bestückten Mikrotiterplatte. Der T-Track® CMV ermöglicht einen hoch-spezifischen und -sensitiven Nachweis der CMV-spezifisch reaktivierten (IFN- γ -sekretierenden) Effektorzellen auf Einzelzellniveau.

Gereinigte PBMC werden für 17-21 Stunden mit ausgewählten T-activated® CMV Proteinen (IE-1, pp65) stimuliert. Das dabei von CMV-reaktiven Zellen sezernierte Zytokin IFN- γ wird von IFN- γ -spezifischen Antikörpern (Capture-Antikörper) gebunden, die auf der PVDF-Membran immobilisiert sind. Nach Entfernen der Zellen erfolgt die Detektion des gebundenen IFN- γ mittels IFN- γ -spezifischer Detektions-Antikörper, an die das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist.



Durch die enzymatische Umsetzung des löslichen Substrats in einen unlöslichen, farbigen Niederschlag entstehen auf der Membran sogenannte Spots, wobei jeder Spot auf eine einzelne Antigen-reaktive, IFN- γ -sezernierende Effektorzelle zurückzuführen ist. Die Spots können entweder mit einem Mikroskop oder einem automatischen Bildanalysesystem (ELISpot Reader) ausgezählt werden.

Für die Untersuchung einer einzelnen Patientenprobe werden folgende Messungen durchgeführt:

- **Negativkontrolle** (2 Replikate): nicht-stimulierte PBMC zur Detektion unspezifisch aktivierter Blutleukozyten
- **Assay Marker 1** (2 Replikate): **CMV T-activated® immediate-early-1 (IE-1) Protein** ② Antigen-stimulierte PBMC
- **Assay Marker 2** (2 Replikate): **CMV T-activated® phosphoprotein 65 (pp65)** ③ Antigen-stimulierte PBMC
- **Positivkontrolle** (Zellfunktionalität, 1 Replikat): Phytohemagglutinin-L (PHA) ④-stimulierte PBMC
- **Operatorkontrolle** (korrekte Versuchsdurchführung, 1 Replikat): mit IFN-γ gesättigter Capture-Antikörper

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Dieser Test muss unter strenger Einhaltung der beschriebenen Schritte dieser Gebrauchsanweisung ⑩ erfolgen. Die Gewinnung der PBMC und der Ansatz der Teststreifen muss unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

Hinweise zur Versuchsdurchführung

Die Blutentnahme muss durch sachkundige Personen entsprechend den lokalen Anweisungen zur Blutentnahme erfolgen. Für die Testdurchführung wird ein vollständig mit Blut gefülltes 7,5 ml Li-Heparin-Röhrchen pro Patient benötigt, um die erforderliche Anzahl an PBMC bei immunkompetenten und -supprimierten Patienten gleichermaßen zu erreichen. Um die Funktionalität der Blutleukozyten während des Inkubationsschrittes zu gewährleisten, müssen die Abläufe der PBMC-Gewinnung validiert werden. Zusätzlich sollte das Verfahren zur Ermittlung der PBMC Zellzahl validiert werden. Zellzählungen können bei einem nicht-validierten Prozess variieren und zu unzuverlässigen Messergebnissen führen.

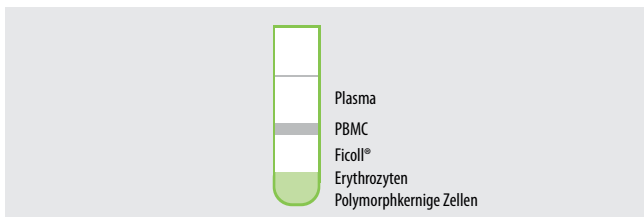
Die Methode der Zählung der entwickelten Spots muss durch den Anwender ebenfalls validiert werden. Zur Gewährleistung einer standardisierten Probenauswertung wird die Verwendung eines validierten und kalibrierten ELISpot-Readers mit zugehöriger Software empfohlen. Eine visuelle Inspektion der Spotzahlen sollte durchgeführt werden, um die Übereinstimmung mit der Ausgabe des Readers zu verifizieren. Die Geräteeinstellungen des Readers müssen etabliert sein und dürfen bei wiederholten Messungen 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 Lösungen sanft durchmischen (nicht vortexen) und die Vials anschließend kurz zentrifugieren.

Verpackungen, die unter der Sterilwerkbank eingesetzt werden, müssen vor Gebrauch desinfiziert werden.

Gewinnung der PBMC (unter sterilen Bedingungen)











- 1 15 ml Ficoll® in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen vorlegen.
- 2 7,5 ml Vollblut mit 7,5 ml sterilem PBS in einem weiteren 50 ml Röhrchen verdünnen.
- 3 Das Ficoll® mit 15 ml des verdünnten Vollbluts langsam und vorsichtig überschichten.

- 4 Im Ausschwingrotor bei 880 x g ohne Bremse für 30 min zentrifugieren.
- 5 Die Interphase (trübe PBMC-haltige Schicht zwischen Ficoll® und Plasma) mit einer sterilen Pasteurpipette abnehmen.
- 6 PBMC in ein neues 50 ml Röhrchen überführen.
- 7 Mit sterilem PBS auf ein Volumen von 50 ml auffüllen.
- 8 Für 10 min bei 300 x g zentrifugieren.
- 9 Den Überstand verwerfen (Waschschritt).
- 10 Das Zellpellet in 1 ml sterilem PBS resuspendieren.
- 11 Mit sterilem PBS auf ein Volumen von 50 ml auffüllen.
- 12 Für 10 min bei 300 x g zentrifugieren.
- 13 Den Überstand verwerfen (Waschschritt).
- 14 Das Zellpellet in 1 ml sterilem, Serum-freiem AIM-V® Medium resuspendieren.
- 15 Die lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop (Trypanblaufärbung) oder mittels eines validierten Geräts zur Zellzahlbestimmung (empfohlen) zählen.
- 16 Die Lebendzellzahl auf 2×10^6 Zellen pro ml AIM-V® Medium einstellen. Für einen Test werden $1,6 \times 10^6$ Zellen in 800 µl AIM-V® Medium benötigt.

Vorbereitung der Arbeitslösungen

Hinweis: Die nachfolgenden Volumina beziehen sich auf einen Test für einen Patienten (entspricht einem Teststreifen). Bei der Untersuchung einer größeren Anzahl von Probandenproben sind alle Volumina der Reagenzien sowie der Arbeitslösungen entsprechend anzupassen.

	Stammlösung	Medium (AIM-V®)	Arbeitslösung
Negativkontrolle	-	125 µl	125 µl
2 T-activated® IE-1	5 µl	120 µl	125 µl
3 T-activated® pp65	5 µl	120 µl	125 µl
4 PHA	5 µl	50 µl	55 µl
Operatorkontrolle	-	175 µl	175 µl

A		50 µl Negativkontrolle (Medium) je Vertiefung	Zugabe von 100 µl PBMC-Lösung je Vertiefung
B			
C		50 µl T-activated® IE-1-Arbeitslösung je Vertiefung	Zugabe von 100 µl PBMC-Lösung je Vertiefung
D			
E		50 µl T-activated® pp65-Arbeitslösung je Vertiefung	Zugabe von 100 µl PBMC-Lösung je Vertiefung
F			
G		50 µl PHA Arbeitslösung	Zugabe von 100 µl PBMC-Lösung
H		Operatorkontrolle: 150 µl Medium	-

Vorbereitung der Teststreifen (unter sterilen Bedingungen)

Pro Test (für einen Probanden) wird **1 Teststreifen** mit 8 Vertiefungen benötigt.

- 1 Die gebrauchsfertige Mikrotiterplatte (Ready-MTP) **1** aus der Verpackung entnehmen.
- 2 Überzählige Teststreifen aus dem Rahmen der Ready-MTP entnehmen.
Hinweis: Teststreifen sind durch Ziffern fortlaufend gekennzeichnet. Nicht verwendete Teststreifen zurück in den Aluminium-Beutel legen und sicher verschließen. Bis zum weiteren Gebrauch bei 2-8 °C lagern und vor mechanischen Schäden schützen.
- 3 Pipettieren der Arbeitslösungen in die Vertiefungen (beginnend mit der Negativkontrolle):
 - Negativkontrolle: 2-mal 50 µl Medium
 - IE-1 **2**: 2-mal 50 µl T-activated® IE-1-Arbeitslösung
 - pp65 **3**: 2-mal 50 µl T-activated® pp65-Arbeitslösung
 - PHA **4**: 1-mal 50 µl PHA-Arbeitslösung
 - Operatorkontrolle: 1-mal 150 µl Medium

Stimulation

- 1 Die eingestellte Zellsuspension (siehe Seite 9: Gewinnung der PBMC) unmittelbar vor dem Gebrauch durchmischen.
- 2 Je 100 µl Zellsuspension vorsichtig in jede Vertiefung beginnend mit der Negativkontrolle von oben nach unten zugeben. Achtung: Der Vertiefung mit der Operatorkontrolle wird KEINE Zellsuspension zugegeben. **Hinweis:** Nach jeder Vertiefung die Pipettenspitze wechseln, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- 3 Den Deckel der Ready-MTP ① auflegen.
- 4 Die Ready-MTP ① für 17-21 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ in einem Feuchtinkubator inkubieren.

Detektion IFN-γ-produzierender Effektorzellen

(sterile Arbeitsbedingungen sind nicht mehr notwendig)

Hinweis: Die im Folgenden angegebenen Volumina beziehen sich auf einen einzelnen Test.

- 1 Die Zellsuspension und das Medium verwerfen.
- 2 200 µl WB1 ⑧ pro Vertiefung zugeben.
- 3 WB1 verwerfen und den Waschschrift weitere 5-mal wiederholen.
Hinweis: An dieser Stelle kann die Detektion unterbrochen werden. Die nach dem letzten Waschen vollständig entleerte Platte kann bei -20 °C bis zu 48 Stunden gelagert werden.
- 4 Die mAb-AP-Arbeitslösung durch Mischen von 5 µl mAb-AP ⑤ mit 900 µl DB ⑥ herstellen.
- 5 Jeweils 100 µl mAb-AP-Arbeitslösung pro Vertiefung zugeben.
- 6 Den Deckel der Ready-MTP auflegen.
- 7 Die abgedeckten Teststreifen für 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren.
- 8 Die mAb-AP-Arbeitslösung verwerfen.
- 9 Jeweils 200 µl WB1 ⑧ pro Vertiefung zugeben.

- 10 WB1 verwerfen und den WB1-Waschschrift weitere 2-mal wiederholen.
- 11 Jeweils 200 µl WB2 9 pro Vertiefung zugeben.
- 12 WB2 verwerfen und den WB2-Waschschrift weitere 2-mal wiederholen.
- 13 Jeweils 50 µl Stain 7 pro Vertiefung zugeben.
- 14 Den Deckel der Ready-MTP auflegen.
- 15 Die Teststreifen für 6-7 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) im Dunkeln inkubieren.
Hinweis: Eine längere Inkubationszeit sollte vermieden werden, da andernfalls die Quantifizierbarkeit des Ergebnisses durch eine intensivere Hintergrundfärbung negativ beeinflusst werden kann.
- 16 Stain abgießen.
- 17 Die Färbereaktion durch 3-maliges Waschen der Vertiefungen mit Leitungswasser abstoppen.
- 18 Den Plattenboden abnehmen und die Vertiefungen leicht auf einem Papierhandtuch ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
- 19 Die Teststreifen über Nacht bei Raumtemperatur (18-25 °C) trocknen. Alternativ kann die Platte auch mindestens eine Stunde im Luftstrom der Sterilbank getrocknet werden.
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 den Anweisungen in den folgenden Kapiteln durchgeführt.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Negativkontrolle (unstimulierter Ansatz) weist im typischen Fall keine bis wenige Spots (< 10 pro 2×10^5 Zellen) auf. Eine gesteigerte Anzahl der Spots in der Negativkontrolle kann ein Hinweis auf eine subklinische CMV-Reaktivierung oder eine allgemeine unspezifische Stimulierung sein und hat eine verringerte analytische Sensitivität zur Folge.

Die Positivkontrolle (PHA) ④ ist ein Maß für die Funktionalität der PBMC und sollte zu einer hohen Anzahl an Spots führen (in immunkompetenten Personen üblicherweise > 200 Spots pro 2×10^5 Zellen). Gründe für geringe Spotzahlen in der Positivkontrolle können beispielsweise eine mögliche Immunsuppression des Spenders oder eine falsche Lagerung bzw. Behandlung der Blutproben sein. Die Ursachen dafür sollten über andere geeignete Verfahren geklärt werden.

Die Operatorkontrolle muss eine homogene Färbung der gesamten Membran ergeben. Diese Färbung ist unabhängig von der Qualität der Patientprobe und stellt sicher, dass der Test ordnungsgemäß durchgeführt wurde. Bei einem negativen oder inhomogenen Ergebnis der Operatorkontrolle sind die Testergebnisse nicht auswertbar.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

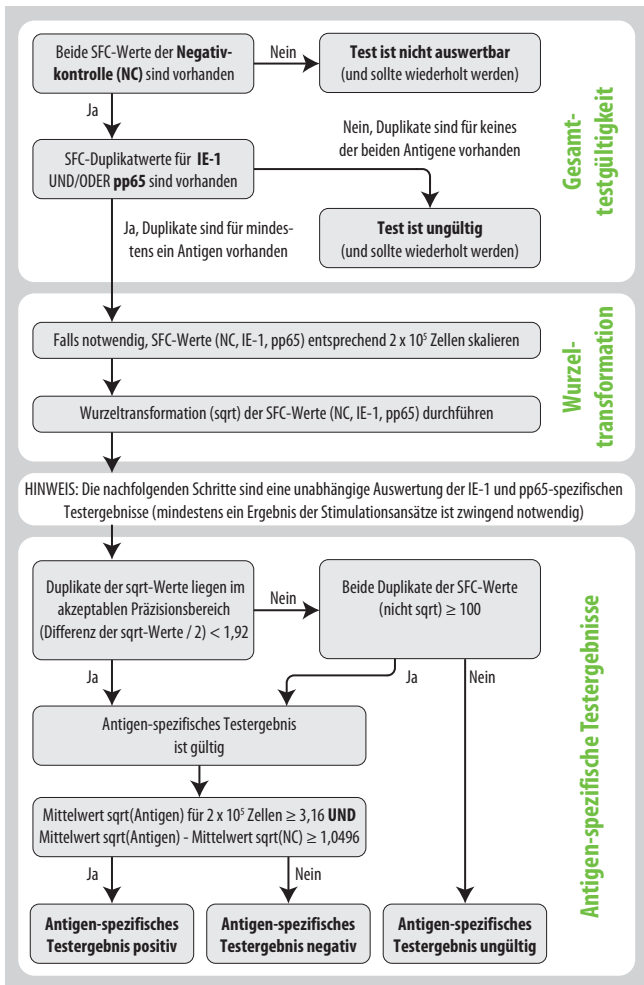
Die Funktionalität der zellvermittelten Immunantwort wird über die Häufigkeit IFN- γ -produzierender Zellen (*spot-forming cells*, SFC) in spezifisch stimulierten Ansätzen (T-activated® IE-1 ② und T-activated® pp65 ③) und unstimulierten Ansätzen (Negativkontrolle) bestimmt.

Für die **Validierung** und **qualitative Auswertung** der Ergebnisse werden die entsprechenden Duplikate der SFC-Werte (pro 2×10^5 Zellen) der stimulierten und unstimulierten Ansätze wurzeltransformiert (*square root transformation, sqrt*) (siehe Fußnote 1). Wir empfehlen die Verwendung der bereitgestellten **T-Track® CMV Calculator** Software (Freeware) für die Validierung und qualitative Auswertung des Testergebnisses.

Um gültig zu sein, muss das Testergebnis folgende Kriterien erfüllen (siehe Entscheidungsbaum auf Seite 16):

- Es ist mindestens ein Testergebnis unter stimulierten Bedingungen (T-activated® IE-1 ② und/oder T-activated® pp65 ③) erforderlich.
- Es sind beide Replikate der SFC-Werte unter entsprechenden Bedingungen (Negativkontrolle, T-activated® IE-1 ② und T-activated® pp65 ③) erforderlich.
- Die Duplikate der SFC-Werte der entsprechenden stimulierten Bedingungen müssen innerhalb einer akzeptablen Streuweite liegen. Hierbei gilt als Vorgabe: (Unterschied der Duplikate der sqrt-Werte / 2) < 1,92 (siehe Fußnote 2).
- Im Fall von unpräzisen Duplikaten der SFC-Werte der stimulierten Bedingungen bleibt das Testergebnis qualitativ gültig, wenn beide SFC-Werte ≥ 100 sind. Die quantitative Auswertung ist jedoch aufgrund einer „unpräzisen Messung“ ungültig.

-
1. Basierend auf einer Neuauswertung von klinischen Studienergebnissen unter Betrachtung von duplikaten Messwerten durch einen unabhängigen Statistiker.
 2. Wobei $'1,92' = 3 \times 0,64$. 0,64 entspricht dem Wert der intraserialen Standardabweichung, die aus einem großen Satz an Messungen aus fünf unabhängigen Kohorten, bestehend aus sowohl immunkompetenten als auch immunge-schränkten Individuen, ermittelt wurde.



HINWEIS: Die folgenden Schritte sind eine kombinierte Auswertung der IE-1 und pp65-spezifischen Testergebnisse

T-Track® CMV Gesamtergebnis

Mindestens ein Antigen-spezifisches Testergebnis ist positiv (pos/pos, pos/neg, pos/unbekannt, pos/ungültig)

Nein

Ja

Ein Antigen-spezifisches Testergebnis ist vorhanden und negativ (neg/unbekannt, neg/ungültig)

Nein

Ja

Beide Antigen-spezifische Testergebnisse sind negativ (neg/neg)

Nein,
beide Antigen-spezifische Testergebnisse sind unbekannt oder ungültig

ungültig

Ja

Positivkontrolle (PHA)
≥ 10 Spots für 2×10^5 Zellen

Ja

Nein

Negativer Test ist nicht gesichert (und sollte wiederholt werden)

Test ist nicht auswertbar (und sollte wiederholt werden)

**T-Track® CMV
Test positiv**

**T-Track® CMV
Test negativ**

Der Test ist **positiv**, wenn folgende zwei Kriterien für mindestens einen der spezifisch stimulierten Ansätze (T-activated® IE-1 ② und/oder T-activated® pp65 ③) erfüllt sind:

A, das Mittel der wurzeltransformierten stimulierten Spotanzahl liegt für 2×10^5 Zellen $\geq 3,16$ (siehe Fußnote 3)

UND

B, das Mittel der wurzeltransformierten stimulierten Spotanzahl abzüglich des Mittels der wurzeltransformierten unstimulierten Spotanzahl ist $\geq 1,0496$ (siehe Fußnote 4).

Der Test ist **gesichert negativ**, wenn keiner der beiden spezifisch stimulierten Ansätze diese Kriterien erfüllt UND die Positivkontrolle (PHA ④) bei ≥ 10 Spots pro 2×10^5 Zellen liegt.

Der Test ist **nicht auswertbar**, wenn die Spotanzahl der Positivkontrolle (PHA) ④ bei einem negativen Test ebenfalls < 10 Spots pro 2×10^5 Zellen liegt. Ist einer der spezifisch stimulierten Ansätze nach den oben genannten Kriterien (A und B) positiv bewertet, die Positivkontrolle (PHA) ④ liegt jedoch bei < 10 Spots / 2×10^5 Zellen, so wird der Test dennoch als **positiv** gewertet.

3. Wobei '3,16' = $\sqrt{10}$ und '10' die Spotanzahl ist.

4. Wobei '1,0496' auf einem einseitigen z-Test für zwei Replikate mit einer intraserialen Standardabweichung von 0,64 beruht. Der Wert der Standardabweichung wurde aus einem großen Satz an Messungen aus fünf unabhängigen Kohorten bestehend aus sowohl immunkompetenten als auch immuneingeschränkten Individuen ermittelt.

Für den Fall von fehlenden oder ungültigen Messungen für eine oder zwei der stimulierten Bedingungen (T-activated® IE-1 ② oder T-activated® pp65 ③) gilt:

- Ein **positives** Testergebnis ist **gesichert positiv**, wenn es die oben aufgeführten Kriterien (A und B) erfüllt.
- Ein **negatives** Testergebnis ist **nicht gesichert** (bei ungültigem oder fehlendem Ergebnis für das zweite Antigen). Das Testergebnis sollte durch Wiederholung des Tests bestätigt werden.

Enthält eine T-activated® Antigen-stimulierte Vertiefung mehr Spots als das Messgerät auflösen kann, so muss die Blutprobe für eine exaktere Quantifizierung der Spotzahl in einer Verdünnung von 1:2 bis maximal 1:3 (Messbereich des verwendeten ELISpot Readers beachten) nachgetestet werden.

T-TRACK® CMV CALCULATOR SOFTWARE

Wir empfehlen die Verwendung der bereitgestellten **T-Track® CMV Calculator** Software (Freeware) zur genauen Validierung und qualitativen Auswertung der Testergebnisse. Einzelheiten dazu befinden sich in der Gebrauchsanweisung zur **T-Track® CMV Calculator** Software.

Als zusätzliche Information gibt die **T-Track® CMV Calculator** Software den Mittelwert der SFC Werte (gerundet auf die nächste ganze Zahl) aus. Die Berechnung erfolgt dabei über die Formel:

$$[\text{Mittelwert } \sqrt{\text{SFC}}]^2$$

LEISTUNGSMERKMALE DES T-TRACK® CMV

Klinische Sensitivität

Die klinische Sensitivität wurde durch die Stimulation frisch isolierter PBMC von 67 CMV-seropositiven, nicht immunsupprimierten Hämodialysepatienten mit T-activated® IE-1 ② und T-activated® pp65 ③ und der anschließenden Ermittlung des prozentualen Anteils der Proben mit einem positiven Testergebnis bestimmt. Die klinische Sensitivität des T-Track® CMV Tests lag insgesamt bei 90% basierend auf der Messung von 4 Replikaten und der Auswertung des geometrischen Mittels der SFC Werte (Barabas *et al.*, 2017; Banas *et al.*, 2017). Eine erneute Auswertung dieser Ergebnisse basierend auf den sechs möglichen Zweierkombinationen, der Wurzeltransformation der SFC Werte und der Anwendung der oben beschriebenen QC-Regeln ergab eine Gesamtsensitivität des Assays von 90%.

Messbereich und Linearität

Die Leistungsmerkmale Messbereich und Linearität sind zum Teil vom verwendeten Messgerät abhängig. Zur Bestimmung aller Leistungsmerkmale wurde der Bioreader® 5000 Ea verwendet. In einem Bereich von 10 bis 1000 Spots ist die Anzahl der Spots proportional zu den T-activated® Antigen-reaktiven Effektorzellen. Beim Auftreten von mehr als 400 Spots pro Vertiefung kann jedoch, abhängig von der Sensitivität des verwendeten Messsystems, eine Wiederholung des Tests mit einer Verdünnung der eingesetzten Zellzahl von 1:2 bis maximal 1:3 erforderlich werden.

Die Linearität des IFN- γ ELISpot konnte für 6×10^4 bis 2×10^5 eingesetzten PBMC pro Vertiefung gezeigt werden.

Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision des Testverfahrens wurde mit PBMC von 11 einzelnen Probanden ermittelt. Dazu wurde jedem Probanden Blut für drei unabhängige Messungen abgenommen. Insgesamt 33 PBMC Proben wurden parallel isoliert und anschließend unabhängig voneinander mit dem T-Track® CMV von einem Operator unter Verwendung derselben Reagenzien und Geräte vermessen. Die maximal ermittelte Variation der Wiederholungsmessungen basierend auf 2 Replikaten der SFC Werte lag unter 35% [der mittlere Variationskoeffizient lag dabei bei 14,4% (in einem Bereich von 2,8 - 34,9%)].

Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision des Testverfahrens wurde mit PBMC von 3 einzelnen Probanden ermittelt. Dazu wurde jedem Probanden Blut für 2 unabhängige Messungen abgenommen. Insgesamt 6 PBMC Proben wurden parallel isoliert und anschließend unabhängig voneinander mit dem T-Track® CMV vermessen. Bei den Messungen wurde jeweils nur einer der folgenden Parameter variiert:

- Inter-Operator Variation (3 unterschiedliche Operatoren am selben Standort mit denselben Reagenzien und Geräten)
- Inter-Batch Variation (3 unterschiedliche Kitlots am selben Standort mit demselben Operator und denselben Geräten) wurde mit demselben Verfahren ermittelt.

Die Variabilität der Ergebnisse lag, bei einer validierten Bestimmung der Zellzahl, für die Variation der Operatoren, der eingesetzten Messgeräte und Kitlots unter 38% basierend auf einer Simulation aller sechs möglichen Zweierkombinationen aus vier gemessenen Replikaten [der mittlere Variationskoeffizient lag dabei bei 9,8% (in einem Bereich von 0,1 - 37,1%) zwischen den Operatoren und bei 9,1% (in einem Bereich von 0,6 - 36,6%) zwischen den Kitlots].












LITERATUR

- Barabas *et al.* (2008). Urea-mediated Cross-Presentation of Soluble Epstein-Barr Virus BZLF1 Protein. *PLoS Pathog.* 4(11):e1000198.
- Barabas *et al.* (2017). An optimized IFN- γ ELISpot assay for the sensitive and standardized monitoring of CMV protein-reactive effector cells of cell-mediated immunity. *BMC Immunol.* 18:14.
- Banas *et al.* (2017). Validation of T-Track[®] CMV to assess the functionality of cytomegalovirus-reactive cell-mediated immunity in hemodialysis patients. *BMC Immunol.* 18:15.
- Reuschel *et al.* (2017). Functional impairment of CMV-reactive cellular immunity during pregnancy. *J. Med. Virol.* 89:324-331.

ABKÜRZUNGEN

AP	Alkalische Phosphatase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CMV	Cytomegalievirus
DB	<i>Dilution buffer</i> , Verdünnungspuffer
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISpot	Enzyme-linked Immunosorbent Spot
IE-1	Immediate-early-1
IFN-γ	Interferon-γ
Kat.-Nr.	Katalognummer
Li	Lithium
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
MSDS	<i>Material safety data sheet</i> , Sicherheitsdatenblatt
MTP	Mikrotiterplatte
NC	<i>Negative control</i> , Negativkontrolle
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> , Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PHA	Phytohemagglutinin-L
pp65	Phosphoprotein 65
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SFC	<i>Spot forming cells</i> , Spot erzeugende Zellen
sqrt	<i>Square root transformation</i> , Wurzeltransformation
WB	<i>Wash buffer</i> , Waschpuffer


SYMBOLERKLÄRUNGEN

	Ausreichend für „n“ Tests
	Gebrauchsanweisung beachten
	Achtung
	Hersteller
	Bestellnummer
	Chargenbezeichnung
	Verwendbar bis / Haltbarkeitsdatum
	Lagertemperaturbegrenzung
	Positives Kontrollmaterial
	In-vitro-Diagnostikum
	CE-Konformitätskennzeichnung

Dieses Produkt wird durch die Allgemeinen Verkaufsbedingungen von Lophius Biosciences abgedeckt, welche unter www.Lophius.com erhältlich sind.

T-Track® CMV ist ein IFN- γ ELISpot basierend auf der proprietären T-activation Technologie von Lophius Biosciences.

Hersteller

 Lophius Biosciences GmbH
Am BioPark 13
D-93053 Regensburg
+49 (0)941 63091970

K50010-DE
Issue 2018-12
Version 14.00