



# CMV Brite™ Turbo

*CMV antigenemia detection test*

INTERNATIONAL PACKAGE INSERT  
ENGLISH • DEUTSCH • FRANÇAIS





## CMV Brite™ Turbo Kit

Rapid CMV pp65 Antigenemia for the detection of active CMV infection

**Product code: VIR-CMV 110**

CE0344 In Vitro Diagnostic medical device

**Product code: VIR-CMV110 BDC**

510(k) #991650 In Vitro Diagnostic medical device

Barcode GS1 (GTIN): 8717953022301

**PACKAGE INSERT**

**110 tests**

<b>ελληνικά</b>	Οι μεταφράσεις των Οδηγιών Χρήσης αυτού του προϊόντος (IFU)/ του Φύλλου Οδηγιών Χρήσης και του Δελτίου Δεδομένων Ασφαλείας Υλικού βρίσκονται στον Παγκόσμιο Ιστό στο <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . Μπορείτε επίσης να ζητήσετε αντίγραφα, στέλνοντας αίτημα μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου στο <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> ή κατόπιν επικοινωνίας με τον διανομέα προϊόντος της περιοχής σας.
<b>Español</b>	Las traducciones de las instrucciones de uso (IFU), del prospecto y de la SDS (hoja de datos de seguridad del material) del producto pueden obtenerse en Internet en <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . También puede solicitar copias enviando una solicitud por correo electrónico a <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> o contactando con su distribuidor local de productos.
<b>Italiano</b>	Le versioni tradotte delle Istruzioni per l'Uso/Foglietto Illustrativo e la Scheda di Sicurezza di questo prodotto sono disponibili sulla rete Internet all'indirizzo <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . Le copie possono essere richieste anche inviando una mail a <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> o contattando il distributore locale.
<b>Português</b>	As traduções das Instruções para Utilização (IFU) / Inserção do Produto e SDS deste produto podem ser encontrados na Internet em <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . Também poderão ser solicitadas cópias enviando um pedido de e-mail para <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> ou contactando o seu distribuidor de produto local.

# CMV Brite™ Turbo Kit

## Intended Use

The *CMV Brite™ turbo kit* Kit is intended for the rapid qualitative detection of Cytomegalovirus (CMV) lower matrix protein pp65 by indirect immunofluorescence using microscopy in isolated peripheral blood leukocytes obtained from ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or heparin anti-coagulated human peripheral blood. The detection of CMV pp65 in human peripheral blood cells aids in the diagnosis of acute or reactivated CMV infection. This product is not FDA cleared (approved) for use in testing (i.e. screening) of blood or plasma donors.

## Summary and Explanation

Human cytomegalovirus (CMV) is a DNA virus, approximately 200 nm in diameter, belonging to the herpes virus family. It has a double-stranded DNA core, a capsid composed of 162 capsomeres, and a surrounding envelope (1). Infection with CMV is common and is usually subclinical in the healthy host. However, CMV infection in the immuno-compromised host and the developing fetus may result in either localized or disseminated disease. Its clinical manifestations include pneumonia, retinitis, hepatitis, enteritis, and neurologic disease. Despite improved treatment modalities, CMV infection may result in significant morbidity and mortality in transplant patients, AIDS patients and cancer patients, particularly those with leukemia or lymphoma. Patients are at risk from both primary CMV infection and reactivation of latent infection (2-4).

Early and rapid diagnosis of CMV infection is of great importance in avoiding over treatment with immunosuppressive drugs and in guiding antiviral therapy.

However, distinguishing asymptomatic viral shedding from significant disease that requires treatment can be difficult. Isolation of CMV from blood specimens (CMV viremia) has been shown to correlate best with symptomatic disease, whereas isolation from saliva and urine are commonly found without apparent illness. Conventional methods for isolation of CMV from blood are sensitive, but may not yield results for several weeks. Shell vial cultures provide a result within 1 to 2 days, but are not sensitive for detection of CMV in blood specimens. In contrast, detection of CMV antigen in peripheral blood polymorphonuclear (PMN) cells (CMV antigenemia) is both sensitive and rapid (5, 6). This technique uses monoclonal antibodies to detect the CMV lower matrix phosphoprotein (pp65), an early antigen in virus replication, that is abundantly present in antigen-positive PMNs (6-9). The *CMV Brite™ Turbo* assay can be completed within 2 hours of sample collection. The CMV antigenemia assay is valuable in the diagnosis and monitoring of active CMV infection in solid organ and bone marrow transplant patients (1, 2, 10-13, 19). It has also been reported that CMV antigenemia shows correlation with CMV disease in AIDS patients (4, 18).

## Principles of the Procedure

The CMV antigenemia assay has been developed using a cocktail of two monoclonal antibodies (C10/C11) directed against CMV lower matrix protein pp65 (6). The assay uses the C10/C11 cocktail in an indirect immunofluorescence staining of cytospin preparations of peripheral blood leukocytes. The **CMV Brite™ Turbo** antigenemia assay is completed within two hours of blood collection, which saves time and means a rapid answer for the clinician.

### *The CMV Brite™ Turbo method consists of:*

- a. Direct lysis of peripheral blood erythrocytes
- b. Preparation of cytospin slides
- c. Fixation and permeabilization
- d. Indirect immunofluorescence staining using monoclonal antibodies directed against CMV pp65 protein
- e. Reading and evaluation of results



The first step in the **CMV Brite™ Turbo** method involves direct lysis of the peripheral blood erythrocytes (22). Following lysis the leukocytes are cytocentrifuged onto a slide, fixed and permeabilized to allow subsequent detection of CMV pp65 antigen. The presence of the CMV pp65 antigen is detected by the C10/C11 antibody cocktail and visualized by means of a specific secondary FITC-labeled antibody. CMV antigen-positive leukocytes exhibit homogeneous yellow-green polylobate nuclear staining when observed using a fluorescence microscope. The number of CMV antigen-positive cells is counted per duplicate stain.

The whole procedure can be performed in approximately 2 hours.

## Reagents

*Materials and reagents supplied in the CMV Brite™ Turbo Kit*

*Reagents for 110 tests including 5 control slides.*

<b>CMV Brite™ Turbo Reagent A</b>	Erythrocyte Lysing Solution - Ammonium chloride solution containing < 0.1% sodium azide. (10x). (Dilute before use in demineralized water).  <b>WARNING</b>	200 ml
<b>CMV Brite™ Turbo Reagent B</b>	Fixative Solution - Formaldehyde, in PBS, containing < 0.1% sodium azide. (Dilute before use in PBS). (5x)  <b>DANGER</b>	290 ml
<b>CMV Brite™ Turbo Reagent C</b>	Permeabilization Solution - Igepal Ca-630 and Newborn Calf Serum in PBS containing < 0.1% sodium azide.(5x) (Dilute before use in PBS).	290 ml
<b>CMV Brite™ Turbo Reagent D</b>	Monoclonal antibody C10/C11 (IgG1/IgG1) against CMV lower matrix protein pp65 containing < 0.1% sodium azide. (Ready to use)	4.0 ml
<b>CMV Brite™ Turbo Reagent E</b>	FITC-conjugated sheep anti-mouse Immunoglobulins - with Evans Blue containing < 0.1% sodium azide. (Ready to use)	4.0 ml
<b>CMV Brite™ Turbo Control Slides</b>	CMV Antigenemia Control Microscope Slides - Control slide in a sealed pouch with desiccant. (Ready to use).	5 slides

Each control slide contains a negative control spot (fixed CMV antigen-negative leukocytes) and a positive control spot (fixed CMV lower matrix protein pp65 antigen-positive cells mixed with antigen-negative leukocytes). Prior to opening, allow control slides to equilibrate to room temperature.

Upon receipt, store reagents at 2-8 °C. Avoid direct sunlight. Reagents stored according to

stated storage instructions are stable until the expiration date indicated on the label.

The **CMV Brite™ Turbo Kit** is available as a 110 test kit and contains 5 control slides. The reagents are sufficient for a minimal of 110 tests, or, 100 patient tests and 5 control slides. The recommended procedure is to run the antigenemia assay in duplicate for each patient blood sample.

## Warnings and Precautions

### FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

#### CMV Brite™ Turbo Control Slides

In the preparation of the **CMV Brite™ Turbo Control Slides**, leukocytes have been used obtained from a healthy human blood donor. Each donor sample has been tested by a FDA approved method and found non-reactive for the presence of antibodies to HIV-1, HIV-2, HCV and CMV as well as for HBsAg. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected samples will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that HIV-1, HIV-2, HCV, hepatitis B virus, CMV or other infectious agents are absent, all these reagents should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in "Biosafety in Microbial and Biomedical Laboratories," 2nd ed., 1988. HHS Publication No (CDC) 88-8395, Centers for Disease Control. The control slides supplied with the **CMV Brite™ Turbo Kit** have already been fixed and permeabilized.

#### Caution:

- Reagents containing sodium azide may react with lead or copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal, flush with large amounts of water to prevent azide build-up.
- All reagents should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions. In addition, handle all patient samples with appropriate precautions. Do not pipette by mouth.
- Reagent A (Erythrocyte Lysing Solution) contains Ammonium chloride.
  - ⚠ **WARNING**
  - H302 Harmful if swallowed; H319 Causes serious eye irritation. P305 + P351 + P338
  - IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

- Reagent B (Fixative Solution) contains less than 9,5 % formaldehyde. Formaldehyde is a highly toxic allergenic and potentially carcinogenic reagent. Avoid skin or eye contact.



#### **DANGER**

- H301 + H311 + H331 Toxic if swallowed, in contact with skin or if inhaled; H314 Causes severe skin burns and eye damage; H317 May cause an allergic skin reaction; H335 May cause respiratory irritation; H351 Suspected of causing cancer; H370 Causes damage to organs. P260 Do not breathe dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray; P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/Face protection; P301 + P310 IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician; P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing; P310 Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician.
- Reagent E contains Evans Blue. Avoid contact with eyes, skin, clothing. Keep container tightly closed. Wash thoroughly after handling.

## Specimen Collection and Preparation

### *Processing of the blood sample*

Collect between 3 to 5 ml venous blood into an EDTA-treated tube, using aseptic venipuncture. Send the sample to the laboratory without delay. The blood sample should be kept at room temperature (20-25 °C) until processing. Processing should be performed within 6 to 8 hours of sample collection since it has been shown that a decrease of antigen-positive cells (collected in heparin) can be found after storage (15-17). Therefore, immediate preparation of the slides should always be attempted. In patients with severe neutropenia (absolute neutrophil count less than 200/mm<sup>3</sup>) at least 10 ml of blood may be required.

*Materials and reagents supplied*

• CMV Brite™ Turbo	Reagent A	200 ml
• CMV Brite™ Turbo	Reagent B	290 ml
• CMV Brite™ Turbo	Reagent C	290 ml
• CMV Brite™ Turbo	Reagent D	4.0 ml
• CMV Brite™ Turbo	Reagent E	4.0 ml
• CMV Brite™ Turbo	Control Slides	5 slides

*Laboratory material and equipment required**(but not included in the CMV Brite™ Turbo Kit)*

- Laboratory centrifuge
- 50 ml conical bottomed centrifuge tubes; sterile
- Pipettes
- Micropipette and tips
- Phosphate buffered saline (PBS); pH 7.4; Ca, Mg free
- Demineralized (distilled) water
- Hemocytometer or automated cell counter
- Cytocentrifuge slides
- Cytocentrifuge (such as Shandon Southern Products, Ltd., model Cytospin 3)
- Laboratory marker pen (Dako #52002)
- Coplin jars or histology staining jars
- Humid chamber
- 37 °C incubator
- Fluorescence microscope capable of 250x to 1000x magnification
- Mounting medium (non-fluorescent, such as CITI FLUOR, Glycerol PBS solution, UKC Chem Lab; or Immunoconcept Mounting Medium, Catalogue # 111)
- Fume Hood
- Micro cover glass
- Stop watch/Timer

## TEST PROCEDURE

*Note: Unless stated otherwise, reagents (including PBS) should be at room temperature when used in the test procedure. Room temperature is defined as 20-25 °C.*

*I. Preparation of leukocyte suspension*

*Note: Appropriate controls should be included for the specimen preparation process.*

- Dilute Reagent A 1:10 in demineralized (distilled) water and allow to cool to 4°C.
- Mix 2 ml blood with 30 ml of cold (+4°C) diluted erythrocyte lysing solution in a 50 ml conical bottomed tube and incubate for 5 minutes at +4°C.
- Centrifuge for 2 minutes at 1000xg (2500 rpm). Discard the supernatant.
- Repeat the cold lysing step if lysing of erythrocytes is not sufficient after the first time.
- Resuspend the cell pellet in 30 ml PBS
- Centrifuge for 2 minutes at 1000xg (2500 rpm). Discard the supernatant
- Resuspend the pellet in 1 ml PBS. (In patients with severe neutropenia re-suspension in as low as 0.2 ml may be required).

*II. Cell Counting*

- Count cells using a Hemocytometer or automated cell counter.
- Adjust concentration to  $2.0 \times 10^6$  cells/ml by diluting in PBS.

*III. Preparation of cytocentrifuge slides*

- Centrifuge 100 µl of the  $2.0 \times 10^6$  cells/ml suspension at approx. 600 rpm (54x g) for 4 minutes onto glass slides by cytocentrifuge.
- Prepare at least 3 slides per patient specimen (2 for testing, plus an additional slide for backup).



- Let slides dry for approximately 5 minutes.
- Circle cell area on the slide using a laboratory marker pen.
- Slides can be kept at room temperature overnight before fixation.

#### *IV. Fixation and permeabilization*

- Dilute fixative (reagent B) 1:5 in PBS in a fume hood prior to use.
- Dilute permeabilization solution (reagent C) 1: 5 in PBS in a fume hood prior to use. (Do not reuse).
- Immerse 2 slides in diluted reagent B for 5 minutes at room temperature in the fume hood.
- Dip slides 3 times in PBS (washing solution) and leave in the washing solution for 3 minutes.
- Immerse slides in diluted reagent C for 1 minute at room temperature.
- Dip slides 3 times in washing solution and place in fresh washing solution for 5 minutes (or any time up to 60 minutes). If staining with monoclonal antibody is to follow directly then proceed to step V.

To store slides:

If slides are to be stored then rinse in demineralized (distilled) water for 15 seconds. Let slides dry under the ventilator for approximately 20 minutes.

Once dry, slides should be packed in aluminum foil and stored at 4°C for 24 hours, or frozen at -80 °C.

#### *V. Immunofluorescence staining*

- From this point on, do not allow the cell preparations to dry out during the remainder of the staining procedure.
- **CMV Brite™ Turbo** Control slide. Rehydrate control slide in PBS for 1 or 2 minutes
- Remove one slide at a time from the washing solution, carefully dry the area surrounding the cell spot.
- Apply 35 µl of C10/C11 MoAb solution (reagent D) incubate for 20 minutes at 37 °C in a humid chamber.
- Dip slides 3 times in washing solution (PBS) and put in fresh washing solution for 3 minutes.
- Remove one slide at a time from the washing solution, carefully dry the area surrounding the cell spot.
- Apply 35 µl conjugate (reagent E), incubate for 20 minutes at 37 °C in a humid chamber.
- Wash twice in fresh PBS and carefully rinse with tap water (3 times) and mount with mounting medium and a micro cover glass.

#### *VI. Reading*

Perform reading as soon as possible. Slides may be stored for up to 8 hours at 4°C covered tightly in order to minimize fading. Perform microscopic evaluation using an immunofluorescence microscope at 400 x magnification. A higher magnification of 1000x may be used to increase resolution. (See note on recommendations for microscope and fluorescence cube under “Laboratory material and equipment”).

Scan the whole surface of the spot. Two spots should be scanned per patient.

Positive cells show homogenous yellow-green polylobate nuclear staining.

Negative cells show no yellow-green nuclear staining.

*Equivocal readings due to artifacts may occur rarely (less than 5%):*

- The most common artifact is due to eosinophils. They are recognized by a nonspecific cytoplasmatic staining, with the nucleus appearing as black holes, often spectacle-shaped. The cytoplasm may appear dull and more yellow.
- If all cells appear greenish, this represents an artifact, which may be associated with some types of patients and is very rare.
- A greenish staining of cells at the periphery of the spot only, is not considered positive. This may occur if the spot has started to dry out during incubation with either monoclonal antibody solution or conjugate solution. Be sure to incubate in a humid chamber and check that the whole cell spot is covered with the reagent.

If slides are not interpretable due to equivocal readings of artifacts, stain backup slide(s) or if unresolved obtain and test an additional specimen.

## Quality Control

The positive and negative control slides are provided with the kit. The slides are only used to check the staining procedure and do not influence the diagnostic value of the kit. The positive control must demonstrate appropriate

staining before patient specimens can be evaluated. The positive control should exhibit homogeneous yellow-green staining of positive cells with round morphology (nucleus is not visible). The negative control should show no yellow-green staining. Despite the fact that the quality procedures are followed strictly, single positive cells could be observed in the negative control. In such cases the staining run should not be considered invalid. The single positive cells on the negative control do not mean that the slide with patient material can not be interpreted.

## Results

### 1. Reading and Interpretation

Results of evaluation of patient specimen slides are qualitative. The clinical significance of an increase or decrease in the number of antigen-positive cells during time in one patient has not been determined. Therefore results should be reported only as Positive or Negative, according to the following definitions:

**Positive** - one or more CMV antigen-positive cells present per duplicate stain.

**Negative** - no CMV antigen-positive cells present per duplicate stain.

A minimum of approximately 50,000 specimen cells should be present in order to determine that a result is negative. If equivocal readings due to artifacts occur on both duplicate stains, the results should not be interpreted. Stain back-up slides or obtain and test an additional patient specimen.

## 2. Choice of Microscope

Selecting the correct filter cube configuration, which matches the fluorochrome in use, is important. This will vary for each microscope manufacturer. Select the correct combination for FITC use, such as the Olympus BX-40 or BX-60 microscope with:

<i>Fluorescence cube:</i>	<i>U-MNB</i>
<i>Excitation wavelength:</i>	<i>470-490 nm</i>
<i>Emission wavelength:</i>	<i>&gt;515 nm</i>

## Limitations of the Procedure

1. Detection of CMV pp65 lower matrix, early structural protein should be performed by laboratories experienced in immunocytochemical techniques.
2. Leukocyte preparation should be performed by personal experienced in aseptic techniques.
3. The efficacy of the **CMV Brite™ Turbo Kit** with samples other than human blood leukocytes has not been established.
4. Test performance characteristics have been established using the **CMV Brite™ Kit** (EDTA and heparin specimens) and validated in internal studies using the **CMV Brite™ Turbo Kit** (EDTA specimens only).
5. The **CMV Brite™ Turbo Kit** is intended for use only with immunofluorescent microscopy and not for use with flow cytometry.
6. The type and condition of the instrumentation used will influence the visual appearance of the image obtained. The reaction may vary due to the type of microscope employed, the light source, age of the bulb, filter assembly and filter thickness, differences in sensitivity of the antigen substrate, or the assay procedure used. Each laboratory should establish its own criteria for the reading of patient specimens using appropriate controls.
7. The detection and confirmation of CMV pp65 lower matrix, early structural protein in peripheral blood leukocytes is not diagnostic of symptomatic illness, since CMV pp65 may be present for a significant period following acute infection and patients with CMV antigenemia (especially low levels) may have asymptomatic illness. There are many published reports of patients who are antigenemia-negative and viremia positive and some of these patients may have CMV disease. Thus, a negative antigenemia test does not absolutely exclude CMV infection or disease.
8. The **CMV Brite™ Turbo Kit** is not intended for antiviral drug monitoring.
9. Test performance characteristics have not been established using neonatal specimens.
10. A decrease can be noted of antigen-positive cells (collected in heparin) per slide after storage (15-17). Therefore, immediate preparation of the slides should always be attempted. The maximal specimen storage time at room temperature has not been determined.
11. In patients with severe neutropenia (absolute neutrophil count less than 200/mm<sup>3</sup>) at least 10 ml of blood may be required.
12. Since the monoclonal antibodies have been prepared using a prototype strain, they may not detect all antigenemic or new strains of CMV. For example, monoclonal antibodies may fail to detect strains of CMV which have undergone minor amino acid changes in the target epitope region.
13. Test performance characteristics have not been established using specimens collected in heparin.

## Expected Values

The CMV Brite™ Kit was evaluated at two geographically distinct clinical virology laboratories in bone marrow or solid organ transplant or AIDS treatment centers (20). A total of 300 venous blood samples were collected from transplant recipients (159 allogeneic bone marrow and 47 solid organ), 85 HIV positive/AIDS patients, and 9 immunocompetent patients. 92 samples (30.7%) were determined to be CMV positive by the CMV Brite™ Kit. In random blood donor populations, the number of specimens found repeatedly reactive for CMV antigenemia by the CMV Brite™ Kit has typically been 0%.

## Specific Performance Characteristics

*Note: The performance characteristics have been established using the CMV Brite™ Kit and validated in internal studies using the CMV Brite™ Turbo Kit.*

The CMV Brite™ Kit was compared to CMV virus detection in conventional culture (CC) and shell vial culture (SV) using human peripheral blood leukocytes. 300 clinical samples were evaluated in comparison to conventional culture (CC) and shell vial culture (SV).

*Comparison of CMV Brite™ Kit with CC and SV (Clinical Site # 1)*

### Test CMV Brite™

CC/SV	+	-	Total numbers
+	3	0	3
-	45	103	148
Total numbers	48	103	151

*Comparison of CMV Brite™ Kit with CC and SV (Clinical Site # 2)*

### Test CMV Brite™

CC/SV	+	-	Total numbers
+	28	3	31
-	16	102	118
Total numbers	44	105	149

*Comparison of CMV Brite™ Kit with CC and SV (Two Sites Combined)*

### Test CMV Brite™

CC/SV	+	-	Total numbers
+	31	3	34
-	61	205	266
Total numbers	92	208	300

- Sensitivity  $31/34 = 91.2\%$   
(95% CI = 76.3 to 98.1%)
- Specificity  $205/266 = 77.1\%$   
(95% CI = 70.2 to 81.1%)

The imprecision of CMV culture (conventional and shell vial) when compared to CMV antigenemia has been documented in the literature (20).

Discrepant results appear to be the consequence of antiviral therapy or sample variability (12). Further, detection of CMV antigenemia has been accepted as clear evidence of active CMV infection in addition to shell vial culture and conventional culture (4th International CMV Workshop, Paris, April 19-21, 1993).

Discrepant results were resolved by looking for evidence of CMV infection at other sites in the patient, e.g. positive cultures of urine, throat, broncho alveolar lavage (BAL) samples and reviewing patient history for other related clinical findings evident of CMV infection. Additionally, evidence of CMV infection was obtained from histology and cultures of biopsies, and/or CMV IgG or IgM serology (not for bone marrow transplant patients or AIDS patients), and/or reference (in house validated, not commercially available) CMV antigenemia assay results.

*Comparison of CMV Brite™ Kit with other methods for detection of CMV infection (Clinical Site # 1)*

#### Test CMV Brite™

CMV expected	+	-	Total numbers
+	47	6	53
-	1	97	98
Total numbers	48	103	151

*Comparison of CMV Brite™ Kit with other methods for detection of CMV infection (Clinical Site # 2)*

#### Test CMV Brite™

CMV expected	+	-	Total numbers
+	42	3	45
-	2	102	104
Total numbers	44	105	149

*Comparison of CMV Brite™ Kit with other methods for detection of CMV infection (Two Sites Combined)*

19 of the 64 discrepant results were resolved on the basis of the reference CMV antigenemia assay result in conjunction with CMV serology.

#### Test CMV Brite™

CMV expected	+	-	Total numbers
+	89	9	98
-	3	199	202
Total numbers	92	208	300

- Resolved sensitivity  $89/98 = 90.8\%$   
(95% CI = 83.3 to 95.7%)
- Resolved specificity  $199/202 = 98.5\%$   
(95% CI = 95.7 to 99.7%)
- Positive Predictive Value  $89/92 = 96.7\%$   
(95% CI = 90.8 to 99.3%)
- Negative Predictive Value  $199/208 = 95.7\%$   
(95% CI = 91.6 to 97.9%)

The performance of the **CMV Brite™ Turbo Kit** was validated in a study of 183 patient samples. The patient samples included 173 organ transplant patients, 9 immunocompetent patients and 1 HIV positive patient sample. Each patient was tested in parallel with the **CMV Brite™** and **CMV Brite™ Turbo Kits**. The results of this validation study are provided in the table below.

Test CMV Brite™

CMV Brite™ Turbo Kit	+	-	Total numbers
+	43	7	50
-	6	127	133
Total numbers	49	134	183

## Cross Reactivity

Cross reactivity studies were performed using the **CMV Brite™** monoclonal antibody cocktail and conjugate, and single isolates of viruses (except for HSV-1 which was tested with 7 isolates) related to CMV, inducing similar clinical symptoms and/or isolated from peripheral blood. Unless otherwise noted, clinical isolates of the following viruses were tested.

- Herpes virus type 1
- Herpes virus type 2
- Varicella-zoster virus
- Adenovirus 2
- Adenovirus 4
- Adenovirus 5
- Parainfluenza virus 1
- Parainfluenza virus 2
- Parainfluenza virus 3
- Respiratory syncytial virus
- Poliovirus 3 (wild type 3)

- Echovirus 11
- Echovirus 30
- Epstein-Barr virus (laboratory strain P3HR1)\*
- Human herpes virus type 6 (laboratory strain GS) \*
- Human immunodeficiency virus (type 1 commercially available IF slides) \*\*

\* National Institute of Public Health and Environmental Protection, The Netherlands

\*\* Virion, Switzerland

No cross reactivity was observed except for a weak positive reaction with six of the seven HSV-1 isolates in the shell vial assay. The weak staining observed with the six HSV-1 isolates was cytoplasmic (i.e., seen only outside the nucleus, in a limited number of small foci), similar to the IF pattern usually found with HSV-1 monoclonal antibodies. The weak staining observed may have been due to Fc receptors being expressed by the HSV-1 infected cells in the shell vial assay. Subsequent analysis concluded that there is no evidence of cross reactivity between HSV and the CMV antigenemia assay using the C10/C11 monoclonal antibody cocktail.

# CMV Brite™ Turbo Kit

Immunofluoreszenztest zum Nachweis  
von CMV pp65 in humanen peripheren  
Leukozyten

Product code: VIR-CMV 110  
CE0344 In Vitro Diagnostikum

Packungsbeilage

110 tests

<b>ελληνικά</b>	Οι μεταφράσεις των Οδηγιών Χρήσης αυτού του προϊόντος (IFU)/ του Φύλλου Οδηγιών Χρήσης και του Δελτίου Δεδομένων Ασφαλείας Υλικού βρίσκονται στον Παγκόσμιο Ιστό στο <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . Μπορείτε επίσης να ζητήσετε αντίγραφα, στέλνοντας αίτημα μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου στο <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> ή κατόπιν επικοινωνίας με τον διανομέα προϊόντος της περιοχής σας.
<b>Español</b>	Las traducciones de las instrucciones de uso (IFU), del prospecto y de la SDS (hoja de datos de seguridad del material) del producto pueden obtenerse en Internet en <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . También puede solicitar copias enviando una solicitud por correo electrónico a <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> o contactando con su distribuidor local de productos.
<b>Italiano</b>	Le versioni tradotte delle Istruzioni per l'Uso/Foglietto Illustrativo e la Scheda di Sicurezza di questo prodotto sono disponibili sulla rete Internet all'indirizzo <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . Le copie possono essere richieste anche inviando una mail a <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> o contattando il distributore locale.
<b>Português</b>	As traduções das Instruções para Utilização (IFU) / Inserção do Produto e SDS deste produto podem ser encontrados na Internet em <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . Também poderão ser solicitadas cópias enviando um pedido de e-mail para <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> ou contactando o seu distribuidor de produto local.

# CMV Brite™ Turbo Kit

## Anwendung

Der **CMV Brite™ Turbo** Kit dient zum schnellen qualitativen Nachweis von pp65 Lower Matrix Protein des humanen Cytomegalie-Virus (CMV) in isolierten peripheren Leukozyten aus menschlichem EDTA oder heparinisiertem Blut. Der Antigennachweis erfolgt durch ein Mix aus zwei monoklonalen Antikörpern (CMV C10 und C11). Der Nachweis von pp65 in humanen peripheren Blutzellen unterstützt die Diagnose der akuten oder reaktivierten CMV-Infektion. Dieses Produkt ist nicht für Blut- oder Plasmauntersuchungen (Screenings) von der FDA geprüft (zugelassen).

## Zusammenfassung

Das humane Cytomegalie-Virus ist ein DNA-Virus, das zur Familie der Herpesviren gehört. Sein Durchmesser beträgt ca. 200 nm. Es besitzt einen Kern (Core) aus doppelsträngiger DNA, ein Kapsid aus 162 Protein-Untereinheiten (Kapsomere) und eine Hülle (Envelope) (1). Infektionen mit dem CMV sind weit verbreitet, verlaufen beim Gesunden aber meist subklinisch. Bei abwehrgeschwächten Patienten und während der fetalen Entwicklung kann eine CMV-Infektion jedoch mit lokaler Symptomatik oder mit generalisierten Krankheitsverläufen einhergehen. Zu den vielfältigen Manifestationen gehören Pneumonie, Retinitis, Hepatitis, Enteritis und neurologische Erkrankungen.

Trotz verbesserter Therapieschemata führt die CMV-Infektion bei Transplantatempfängern sowie Patienten mit malignen Tumoren (insbesondere bei Leukämie oder Lymphomen) oder bei Immunschwäche durch AIDS zu hoher Morbidität und Mortalität. Für diese Patienten besteht das Risiko einer Erkrankung sowohl durch eine Primärinfektion als auch durch eine reaktivierte latente Infektion (2-4). Von besonderer Bedeutung ist die frühe und schnelle Diagnostik der Virusinfektion zur Vermeidung von zu hohen Gaben immunsuppressiver Medikamente und als Begleitung antiviraler Therapie.

Schwierigkeiten bereitet jedoch die Unterscheidung zwischen asymptomatischer Virusausscheidung und therapiebedürftiger Infektion. Der Nachweis des Cytomegalie-Virus aus Blutproben (CMV-Virämie) korreliert am ehesten mit dem symptomatischen Krankheitsverlauf, während die Isolierung aus Speichel und Urin auch bei inapparentem Krankheitsverlauf möglich ist (5). Die konventionellen Methoden der CMV-Isolierung aus Blut sind zwar sensitiv, aber das Ergebnis liegt meist erst nach Wochen vor.

“Shell Vial Cultures“ (Deckglaskulturen) liefern ein Ergebnis innerhalb von 1-2 Tagen, aber die Methode ist für Blutproben nicht empfindlich genug. Dagegen ist der Nachweis von CMV-Antigen (CMV-Antigenämie) in polymorphkernigen peripheren Leukozyten (PMNL) sowohl sensitiv als auch schnell (5,6).



Bei dieser Technik werden monoklonale Antikörper verwendet, um das "Lower Matrix" Phosphoprotein pp65 nachzuweisen; pp65 ist ein bei der Virusreplikation früh auftretendes Antigen, das im Überschuss in PMNL vorkommt (6-9). Mit dem **CMV Brite™ Turbo Kit** kann der Test bereits 2 Stunden nach Blutentnahme abgeschlossen sein.

Der CMV-Antigenämie-Test hat sich bewährt zur Diagnose und Überwachung von aktiven CMV-Infektionen bei Organ- und Knochenmark-Transplantatempfängern (1, 2, 10-13, 19). Es liegen Berichte vor, wonach auch bei AIDS-Patienten die CMV-Antigenämie eine Korrelation mit der CMV-Erkrankung zeigt (4, 18).

## Testprinzip

Beim CMV Antigenämie-Test wird ein Mix aus zwei monoklonalen Antikörpern (CMV C10 und C11) verwendet, die gegen das CMV Lower Matrix Protein pp65 gerichtet sind. Im **CMV Brite™ Turbo Kit** wird dieser Antikörper-Mix in Verbindung mit einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung bei Präparaten aus peripheren Blutleukozyten (PMNL) eingesetzt, um das CMV-spezifische Antigen pp65 nachzuweisen.

Der CMV Brite™ Turbo Antigenämie-Assay kann innerhalb von 2 Stunden komplett abgearbeitet werden. Dies bedeutet eine erhebliche Zeitersparnis und ermöglicht den Kliniken eine rasche diagnostische Aussage.

Der Testablauf gliedert sich in folgende Schritte:

- a) Direkte Lyse von peripheren Erythrocyten
- b) Herstellung von Objektträger-Präparaten durch Zytocentrifugation
- c) Fixierung und Permeabilisierung der Zellen
- d) Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen das CMV pp65 Protein
- e) Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse

Im ersten Schritt wird durch Lyse von peripheren Erythrozyten eine Suspension gereinigter Leukozyten hergestellt (22). Die Zellmembran der auf einen Objektträger zentrifugierten und fixierten Leukozyten wird permeabel gemacht, um den Nachweis des CMV pp65 Proteins durch die monoklonalen Antikörper C10/C11 zu ermöglichen. Der gebildete Immunkomplex wird durch Reaktion mit einem zweiten, FITC-konjugierten Antikörper sichtbar gemacht. CMV-Antigen positive Leukozyten zeigen im Fluoreszenzmikroskop eine homogene, gelbgrüne polylobate Kernfärbung. Die Anzahl der positiven Leukozyten wird bei 2 parallel angefertigten Objektträgern gezählt.

Die gesamte Testdurchführung einschließlich Probenaufbereitung erfordert nur zwei Stunden.

## Reagenzien

### Inhalt des CMV Brite™ Turbo Kits

Die Reagenzien sind ausreichend für 110 Tests einschließlich 5 Kontroll-Präparaten.

<b>CMV Brite™ Turbo</b> Reagenz A	Lösung zur Erythrozytenlyse (Ammoniumchlorid-Lösung), Konzentrat: 1:10 mit Aqua dest. verdünnen ⚠️ <b>WARNUNG</b>	200 ml
<b>CMV Brite™ Turbo</b> Reagenz B	Fixierlösung (Formaldehyd in PBS), Konzentrat: 1:5 mit PSB verdünnen ⚠️ ⚠️ ⚠️ <b>GEFAHR</b>	290 ml
<b>CMV Brite™ Turbo</b> Reagenz C	Lösung zur Permeabilisierung der Zellmembran (Igepal CA-630 und Newborn Calf Serum in PBS), Konzentrat: 1:5 mit PSB verdünnen	290 ml
<b>CMV Brite™ Turbo</b> Reagenz D	Monoklonale Antikörper (Maus), Mix von C10/C11 (IgG1/IgG1) gegen das CMV Lower Matrix Protein pp65, gebrauchsfertig	4.0 ml
<b>CMV Brite™ Turbo</b> Reagenz E	FITC-konjugierte Anti-Maus-Immunglobuline v. Schaf mit Evans Blue, gebrauchsfertig	4.0 ml
<b>CMV Brite™ Turbo</b> Kontroll-Präparate	Objektträger mit je 1 Positivkontrolle (fixierte pp65 antigenhaltige Zellen, gemischt mit Antigen-negativen Human-Leukozyten) und 1 Negativkontrolle (fixierte CMV-Antigen-negative Human- Leukozyten), einzeln mit Trockenmittel verpackt, gebrauchsfertig	5 x 1 Stück

Jedes Kontrollpräparat ist mit einem Negativ-Kontroll-Bezirk (gebundene CMV Antigen-Negativ Leukozyten) und einem Positiv-Kontroll-Bezirk (Gemisch aus gebundenem CMV Lower Matrix Protein pp65 Antigen-positiven Leukozyten und CMV Antigen-negativen Leukozyten) versehen. Vor dem Öffnen alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Lagerung bei 2-8 °C. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.

Unter Einhaltung der angegebenen Lagerbedingungen sind die Reagenzien bis zum Verfallsdatum haltbar.

Der **CMV Brite™ Turbo** Kit enthält Reagenzien aus reichend für 110 Tests und 5 Kontroll-Präparaten. Damit sind die Reagenzien ausreichend für mindestens 110 Tests oder 100 Patientenproben und 5 Kontroll-Präparate. Beim Antigennachweis ist eine Doppelbestimmung jeder Patienten-Blutprobe empfehlenswert.

## Warn- und Entsorgungshinweise

### IN VITRO DIAGNOSTIKUM

**CMV Brite™ Turbo** Kontroll-Objekträger  
Zur Präparation der Kontroll-Objekträger wurden Leukozyten von gesunden menschlichen Blutspendern benutzt. Jede Spende wurde auf HBsAg, HIV1, HIV2, HCV und CMVAntikörper getestet und als negativ bewertet. Obwohl die Testmethoden eine hohe Genauigkeit aufweisen, stellen sie keine Garantie dafür dar, daß alle infektiösen Einheiten erkannt werden können. Die Präparate sollten daher so behandelt werden, als ob Krankheiten übertragen werden könnten. Alle Proben und bei der Testdurchführung verwendeten Materialien und Testreagenzien müssen als potentiell infektiös angesehen werden und daher vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren bei 121 °C, 1 Stunde).

#### Achtung:

- Die Reagenzien enthalten NaNC ( $< 0,1\%$ ), das bei Kontakt mit Blei- oder Kupferrohren explosive Metallazide bildet. Deshalb bei der Beseitigung der Reagenzien mit reichlich Wasser nachspülen.
- Alle Reagenzien sind entsprechend herrschender Laborpraxis anzuwenden. Zusätzlich alle Patientenproben mit geeigneten Vorsichtsmaßnahmen behandeln. Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Das Reagenz A (Lösung zur Erythrozytenlyse) enthält Ammoniumchlorid.

#### WARNUNG

H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken;

- H319 Verursacht schwere Augenreizung. P305 + P351 + P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- Das Reagenz B (Fixierlösung) enthält bis zu 9,5 % Formaldehyd, ein hochtoxisches Allergen und eine potentiell kanzerogene Verbindung, die unter geeigneten Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden soll. Der Kontakt mit Haut oder Augen ist zu vermeiden.

#### GEFAHR

- H301 + H311 + H331 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen; H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden; H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen; H335 Kann die Atemwege reizen; H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen; H370 Schädigt die Organe. P260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen; P280 Schutzhandschuhe/ Schutzhose/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen; P301 + P310 BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen; P305 + P351 + P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P310 Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- Das Reagenz E enthält Evans Blau. Der Kontakt mit Haut, Augen oder Kleidung ist zu vermeiden. Die Behälter fest verschlossen halten. Nach Verwendung gründlich waschen.

## Probenentnahme und -vorbereitung

### Behandlung der Blutproben

Mittels aseptischer Venenpunktion 3 bis 5 ml Blut entnehmen (Antikoagulanz: EDTA). Die Leukozytenpräparation sollte möglichst innerhalb von 6 bis 8 Stunden erfolgen (Lagerung bei 20-25 °C). Jede Lagerung des Blutes kann zu einer Abnahme von Antigenpositiven Zellen führen (15-17). Deshalb sollte die unmittelbare Präparation der Objektträger durchgeführt werden. Bei Patienten mit schwerer Neutropenie (absolute Neutrophilenzahl <200/mm<sup>3</sup>) sind zur Testdurchführung mindestens 10ml Blut erforderlich.

### Materialien und Reagenzien des Testkits

• CMV Brite™ Turbo	Reagenz A	200 ml
• CMV Brite™ Turbo	Reagenz B	290 ml
• CMV Brite™ Turbo	Reagenz C	290 ml
• CMV Brite™ Turbo	Reagenz D	4,0 ml
• CMV Brite™ Turbo	Reagenz E	4,0 ml
• CMV Brite™ Turbo	Kontroll-Präparate	5 Objekt-träger

### Zusätzlich erforderliche Materialien und Ausrüstung

- Laborzentrifuge
- konische 50 ml-Zentrifugenröhrchen, steril
- Pipetten
- Mikropipetten und Spitzen
- Phosphatpuffer (PBS), Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> frei, pH 7,4
- destilliertes (demineralisiertes) Wasser
- Hämozytometer oder Coulter Counter
- Zytozentrifugen-Objektträger
- Zytozentrifuge
- Diamantstift o.ä. Marker

- Färbeküvette für die Histologie (Glasküvette für bis zu 10 Objektträgern)
- feuchte Kammer
- 37 °C Inkubator
- Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung 250 - 1000 x) mit Filterkombination für FITC
- Einschlußmedium
- Abzug
- Deckgläser
- Stoppuhr/ Zeitschaltuhr

## TESTDURCHFÜHRUNG

*Hinweis: Wenn nicht anders beschrieben Reagenzien, einschließlich PBS, vor Testdurchführung auf Raumtemperatur (20-25 °C) bringen.*

### I. Vorbereitung der Leukozytensuspension

*Hinweis: Die Probenaufbereitung sollte geeignete Kontrollmaßnahmen enthalten.*

- Reagenz A 1:10 mit entmineralisiertem (destilliertem) Wasser verdünnen und auf 4 °C herunterkühlen.
- 2 ml Vollblut mit 30 ml verdünntem (1:10) Reagenz A (+ 4 °C) in einem konischen 50 ml-Röhrchen mischen und 5 Min. bei + 4 °C inkubieren.
- 2 Min. bei 1000 x g (ca. 2500 UpM) zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- Die genannten Schritte können bei nicht ausreichender Lyse der Erythrozyten wiederholt werden.
- Zellsediment in 30 ml PBS resuspendieren, dann 2 Min. bei 1000 x g (ca. 2500 UpM) zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Das Zellsediment in 1 ml PBS resuspendieren. Bei Patienten mit schwerer Neutropenie das Volumen auf bis zu 0,2 ml verringern.

## II. Zellzählung, Einstellung der Zellzahl

- Die Zellen im Hemozytometer oder im Automaten zählen.
- Zellzahl durch Verdünnung mit PBS auf  $2,0 \times 10^6$  Zellen/ml einstellen.

## III. Zytozentrifugation

- 100 µl der auf  $2,0 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellten Suspension 4 Min. bei  $54 \times g$  (ca. 600 UpM.) auf Objektträger zentrifugieren.
- Von jeder Patientenprobe mind. drei Präparate anfertigen (zwei für den Test, ein weiteres als Reserve).
- Für mind. 5 Minuten trocknen lassen.
- Das Zellareal mit einem Marker oder Diamantstift umranden, um beim Färbeprozess das Zerfließen der Antikörperlösung zu vermeiden.
- Die Präparate können jetzt bei Raumtemperatur über Nacht aufbewahrt werden.

## IV. Fixierung und Permeabilisierung

- Fixativ (Reagenz B) 1:5 mit PBS (Waschlösung) unter dem Abzug unmittelbar vor Gebrauch verdünnen.
- Permeabilisations-Lösung (Reagenz C) 1:5 mit PBS unter dem Abzug verdünnen. (Nicht wiederverwenden.)
- 2 Präparate für 5 Min. bei Raumtemperatur unter einem Abzug in verdünntes (1:5) Reagenz B tauchen.
- Präparate dreimal kurz in PBS tauchen, anschließend 3 Min. in derselben Lösung stehenlassen.
- Präparate für 1 Min. bei Raumtemperatur in verdünntes Reagenz C tauchen.
- Präparate dreimal kurz in PBS (Waschlösung) tauchen, dann 5 Min. (bis max. 60 Min.) in frischer Waschlösung (PBS) stehenlassen.

## Lagerung der Objektträger:

Präparate ca. 15 Sek. mit destilliertem (demineralisiertem) Wasser waschen und anschließend mit einem Ventilator trocknen lassen (ca. 20 Min.).

Die Präparate können für max. 24 Stunden bei  $2-8\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert werden. Bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  sind die Objektträger, dicht in Alufolie verpackt, ca. 3 Monate haltbar. Eingefrorene Präparate in der Folie für 1-2 Stunden auftauen lassen und anschließend trocknen.

## V. Immunfluoreszenzfärbung

- Als Kontrolle einen der mitgelieferten Kontroll-Objektträger oder eine Zellpräparation eines CMV-Antigenämie positiven Patienten verwenden.
- Einen Kontroll-Objektträger 1-2 Min. in einer Küvette in PBS rehydrieren. (Dies gilt gleichermaßen für zuvor gelagerte Präparate von Patienten).
- Bei den nachfolgenden Schritten dürfen die Objektträger nicht trocken werden! Immer nur je einen Objektträger aus der Glasküvette entnehmen. Den Bereich um die fixierten Zellen vorsichtig abtupfen.
- 35 µl Reagenz D (C1O/C11 monoklonaler AK) auf die fixierten Zellen pipettieren und 20 Min. bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  in einer feuchten Kammer inkubieren.
- Objektträger dreimal in PBS tauchen, dann 3 Min. in frischer Waschlösung (PBS) stehenlassen.
- Immer nur jeweils einen Objektträger aus der Küvette entnehmen und den Bereich um die fixierten Zellen vorsichtig abtupfen.

- 35 µl Reagenz E (Konjugat) auf die fixierten Zellen pipettieren und 20 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- Objektträger 2x mit frischem PBS waschen und danach 3x in Leitungswasser tauchen, 1-2 Tropfen Einschlußmedium auf die fixierten Zellen tropfen und Deckglas auflegen.

### VI. Mikroskopische Auswertung

Die Präparate baldmöglichst auswerten, um eine Abschwächung der Fluoreszenz zu vermeiden (Lagerung bei 4 °C im Dunkeln bis zu 8 Stunden möglich).

Die Beurteilung erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Durch eine stärkere Vergrößerung (1000fach) kann eine bessere Auflösung erreicht werden.

Die gesamte Fläche mit den fixierten Zellen muß durchgemustert werden. Zwei "Spots" pro Patient sollten untersucht werden.

Positive Zellen zeigen eine homogene, gelb-grüne polylobuläre Kernfluoreszenz.

Negative Zellen zeigen keine gelb-grüne Fluoreszenz der Kerne.

Nicht eindeutig ablesbare durch Artefakte bedingte Färbung ist selten (< 5%):

- Häufigster Artefakt ist eine unspezifische cytoplasmatische Fluoreszenz bei Eosinophilen, ggf. mit schwarzen Stellen. Die Fluoreszenz erscheint matt und mehr gelblich. Der Grund hierfür sind vielfach Eosinophile, die sich nicht ausreichend mit Evans Blue angefärbt haben. Anhand der Färbemuster lassen sich diese Artefakte von positiven Zellen gut unterscheiden.

- Ein seltenes Artefakt bei bestimmten Patiententypen sind grünlich scheinende Zellen.
- Eine typische grünliche Fluoreszenz nur der randständigen Zellen des Präparates ist als negativ zu werten. Sie kann auftreten, wenn das Zellareal während des Färbeprozesses austrocknet.

Sind die Präparate nicht auswertbar, werden die Reservepräparate gefärbt oder eine neue Probe aufbereitet.

### Qualitätskontrolle

Die im Kit enthaltenen Kontrollpräparate dienen nur zur Überwachung der Färbetechnik und haben keinen Einfluss auf den diagnostischen Wert des Kits. Eine ausreichende Färbung der positiven Kontrolle ist Voraussetzung für die Auswertung der Patientenproben. Die positive Kontrolle sollte eine homogene gelb-grüne Fluoreszenz der positiven Zellen mit runder Morphologie zeigen (Zellkern ist nicht sichtbar), dementsprechend fehlt diese bei der negativen Kontrolle. Trotz der Tatsache, dass die Qualitätsvorschriften strikt befolgt werden, könnten sich einzelne positive Zellen in der negativen Kontrolle befinden. In solchen Fällen sollte die Färbung für ungültig erklärt werden. Die positiven Einzelzellen auf der Negativkontrolle bedeuten nicht, dass die Objektträger mit Patientenproben nicht interpretiert werden können.

## Ergebnisse

### 1. Auswertung und Interpretation

Die Auswertung der Patientenproben erfolgt qualitativ. Eine klinische Signifikanz eines Anstiegs oder Abfalls der Anzahl der positiven Zellen kann für den Einzelpatienten nicht abgeleitet werden. Infolgedessen wird die untersuchte Patientenprobe nach folgender Definition als positiv oder negativ beurteilt:

**Positives Ergebnis:** *Mindestens eine CMV-Antigen positive Zelle in einem der beiden parallel gefärbten Objektträgern ist nachweisbar.*

**Negatives Ergebnis:** *In keinem der beiden parallel gefärbten Objektträgern ist eine CMV-Antigen positive Zelle nachweisbar.*

Für die Beurteilung eines Resultats als negativ sollten mindestens 50.000 Zellen vorliegen. Ist aufgrund von Artefakten keine eindeutige Auswertung beider Parallelproben möglich, sollten die Resultate nicht interpretiert werden.

### 2. Wahl des Mikroskops

Die vom Mikroskophersteller angegebene Filterkombination für Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ist zu verwenden, z.B. Olympus BX40 oder BX60 mit folgenden Einstellungen:

Fluoreszenzfilter:	U-MNB
Anregungswellenlänge:	470-490 nm
Emissionswellenlänge:	> 515 nm

## Einschränkungen der Methode

- 1) Der Nachweis des CMV pp65 Lower Matrix Strukturproteins sollte in einem Labor mit Erfahrung in immunocytochemischen Techniken erfolgen.
- 2) Die Herstellung der Leukozytenpräparate ist von Fachkräften mit Erfahrung in steriler Arbeitsweise auszuführen.
- 3) Die Aussagefähigkeit des **CMV Brite™ Turbo Kits** wurde nur mit humanen Leukozyten untersucht.
- 4) Die Test-Charakteristika wurden mit Heparin und EDTA als Antikoagulanzen am **CMV Brite™ Kit** geprüft. Die Validierung erfolgte mit dem **CMV Brite™ Turbo Kit** (ausschließlich EDTA) durch interne Studien.
- 5) Der **CMV Brite™ Turbo Kit** ist für die Durchfluß-Cytometrie nicht geeignet.
- 6) Typ und Ausstattung der verwendeten Geräte beeinflusst das optische Erscheinungsbild der Ergebnisse. Die Reaktionen variieren möglicherweise aufgrund des verwendeten Mikroskops, der Lichtquelle, des Alters der Materialien, der Filterkombination und -dicke, der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Antigensubstrate oder der angewandten Untersuchungsmethode. Jedes Labor sollte mittels geeigneter Kontrollmaßnahmen eigene Kriterien für die Auswertung der Patientenproben aufstellen.
- 7) Der Nachweis des CMV pp65 Lower Matrix Strukturproteins in peripheren Blutleukozyten ist nicht der Beweis einer symptomatischen Erkrankung, da die Viren über einen langen Zeitraum nach einer akuten Infektion persistieren können, und da Patienten mit CMV-Antigenämie

(insbesondere mit niedrigen Werten) einen asymptomatischen Krankheitsverlauf aufzeigen können.

- Veröffentlichte Berichte beschreiben auch Patienten, die Antigenämie-negativ und Virämie-positiv sind; einige dieser Patienten können dennoch erkrankt sein. Folglich schließt ein negativer Antigenämie-Test eine CMV-Infektion oder eine CMV-Erkrankung nicht völlig aus.
- 8) Der **CMV Brite™ Turbo** Kit ist nicht zum Nachweis des Monitorings einer antiviralen Therapie geeignet.
  - 9) Die Test-Charakteristika wurden nicht an neonatalen Proben geprüft.
  - 10) Die Zahl der Antigen-positiven Zellen je Objektträger kann durch Lagerung der heparinisierten Blutprobe abnehmen (15-17). Deshalb empfiehlt es sich, die Objektträger baldmöglichst nach der Blutentnahme herzustellen. Angaben zur maximal möglichen Lagerdauer von Proben bei Raumtemperatur können nicht gemacht werden.
  - 11) Bei Patienten mit schwerer Neutropenie (absolute Neutrophilenzahl  $<200/\text{mm}^3$ ) sind zur Testdurchführung mindestens 10 ml Blut erforderlich.
  - 12) Da die monoklonalen Antikörper mittels eines typischen Stammes hergestellt wurden, besteht die Möglichkeit, daß neue CMV-Varianten nicht erfaßt werden. Stämme mit einem Aminosäureaustausch in der Zielregion der Antikörper bleiben evtl. unerkant.
  - 13) Die Test-Charakteristika wurden nicht für heparinisierte Proben geprüft.

## Statistische Daten

Die Prüfung des CMV Brite™ Kits erfolgte in zwei geographisch/ örtlich getrennten Laboratorien für klinische Virologie (Knochenmark- und Festorgan-Transplantate) und einem Behandlungszentrum für AIDS (20). Insgesamt 300 venöse Blutproben von Transplantat-Empfängern (159 allogene Knochenmarks- und 47 Festorgan-Transplantate), von 85 HIV Positiven/ AIDS-Patienten und von 9 immunkompetenten Patienten wurden zusammengestellt. Deren Untersuchung mit dem CMV Brite™ Kit ergab 92 CMV-positive Proben (30,7%). Bei Anwendung des CMV Brite™ Kits an randomisierten Blutspendergruppen testete war die Anzahl der für CMV-Antigen reaktiven Proben wie erwartet 0%.

## Spezifische Testcharakteristika

*Hinweis: Die Test-Charakteristika wurden mit dem CMV Brite™ Kit geprüft. Die Validierung erfolgte mit dem CMV Brite™ Turbo Kit durch interne Studien.*

Der CMV Brite™ Kit wurde der CMV Viruserfassung in herkömmlichen Kulturen (HK) und Deckglaskulturen (DK) unter Verwendung von peripheren Leukozyten aus humanem Blut gegenübergestellt. Insgesamt 300 klinische Proben sind zu diesem Zweck im Vergleich mit herkömmlichen und Deckglaskulturen geprüft worden.



Vergleich von CMV Brite™ Kit mit HK und DK  
(1. Klinisches Gebiet)

Test CMV Brite™

HK/ DK	+	-	Gesamtanzahl
+	3	0	3
-	45	103	148
Gesamtanzahl	48	103	151

- Sensitivität  $31/34 = 91,2 \%$   
(95% CI = 76,3 bis 98,1 %)
- Spezifität  $205/266 77,1 \%$   
(95% CI = 70,2 bis 81,1 %)

Vergleich von CMV Brite™ Kit mit HK und DK  
(2. Klinisches Gebiet)

Test CMV Brite™

HK/ DK	+	-	Gesamtanzahl
+	28	3	31
-	16	102	118
Gesamtanzahl	44	105	149

Vergleich von CMV Brite™ Kit mit HK und DK  
(Gebietskombination)

Test CMV Brite™

HK/ DK	+	-	Gesamtanzahl
+	31	3	34
-	61	205	266
Gesamtanzahl	92	208	300

Die Fehlerhaftigkeit/Unschärfe von CMV-Kulturen (herkömmliche und Deckglaskulturen) im Vergleich zum CMV-Antigentest, ist in der Literatur beschrieben (20). Abweichende Ergebnisse scheinen durch antivirale Therapien oder Probenunterschiede bedingt zu sein. Doch gilt die Bestimmung von CMV-Antigenen als eindeutiger Nachweis einer aktiven CMV Infektion neben den herkömmlichen und Deckglaskulturen (4th International CMV Workshop; Paris, April 19-21, 1993).

Abweichende Ergebnisse wurden durch die Bestimmung einer CMV-Infektion an verschiedenen Organen der Patienten, z.B. Positiv-Kulturen bei Proben aus Urin, Kehle, Bronchuslavage (broncho alveolar lavage, BAL) im Vergleich zu den klinischen Befunden über eine CMV-Infektion in der Anamnese der Patienten geklärt. Darüber hinaus wurde der Nachweis einer CMV-Infektion mittels Histologie und Biopsie-Kulturen und/ oder CMV IgG oder IgM Serologie (nicht bei Patienten mit Knochenmarks-Transplantaten und AIDS-Patienten) und/ oder Referenz-CMV-Antigentest-ergebnisse (intern validiert, unverkäuflich) durchgeführt.

Vergleich von CMV Brite™ Kit mit anderen Nachweismethoden für die CMV-Infektion  
(1. Klinisches Gebiet)

Test CMV Brite™

Erwartete CMV	+	-	Gesamtanzahl
+	47	6	53
-	1	97	98
Gesamtanzahl	48	103	151

Vergleich von CMV Brite™ Kit mit anderen Nachweismethoden für die CMV-Infektion  
(2. Klinisches Gebiet)

Test CMV Brite™

Erwartete CMV	+	-	Gesamtanzahl
+	42	3	45
-	2	102	104
Gesamtanzahl	44	105	149

Vergleich von CMV Brite™ Kit mit anderen Nachweismethoden für die CMV-Infektion  
(Gebietskombination)

Test CMV Brite™

Erwartete CMV	+	-	Gesamtanzahl
+	89	9	98
-	3	199	202
Gesamtanzahl	92	208	300

19 der 64 abweichenden Ergebnisse entstanden auf Basis des CMV-Antigen-Referenztests in Verbindung mit CMV Serologie.

- **Ermittelte Sensitivität 89/98 = 90,8 %**  
(95 % CI = 83,3 bis 95,7 %)
- **Ermittelte Spezifität 199/202 = 98,5 %**  
(95 % CI = 95,7 bis 99,7 %)
- **Positiv prädiktiver Wert 89/92 = 96,7 %**  
(95 % CI = 90,8 bis 99,3 %)
- **Negativ prädiktiver Wert 199/208 = 95,7 %**  
(95 % CI = 91,6 bis 97,9 %)

Die Leistungsdaten des CMV Brite™ Turbo Kits wurden in einer Studie von 183 Patientenproben validiert. Diese Proben entstammten 173 Patienten mit Organtransplantationen, 9 immunkompetenten Patienten und einem HIV Patienten. Jede Patientenprobe wurde parallel mit CMV Brite™ Kit und CMV Brite™ Turbo Kit getestet. Das Ergebnis dieser Validierungsstudie ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Test CMV Brite™

CMV Brite™ Turbo Kit	+	-	Gesamtanzahl
+	43	7	50
-	6	127	133
Gesamtanzahl	49	134	183

## Kreuzreaktivität

Untersuchungen zur Kreuzreaktivität wurden mit Einzelisolaten von solchen Viren durchgeführt, die Ähnlichkeit mit dem CMV haben, d.h. auch ähnliche klinische Symptome hervorrufen und/oder im peripheren Blut vorkommen (HSV-1 wurde mit 7 Isolaten getestet). Klinische Isolate folgender Viren wurden untersucht:

- Herpesvirus Typ 1 und Typ 2
- Varicella zoster Virus
- Adenovirus 2, 4 und 5
- Parainfluenza Virus 1, 2 und 3
- Respiratory syncytial virus (RSV)
- Polio Virus 3 (Wildtyp 3)
- Echovirus 11 und 30
- Epstein-Barr Virus (Laborstamm P3HR1)\*
- Humanes Herpes Virus Typ 6 (Laborkette GS)\*
- HIV (Typ 1, kommerziell erhältliche IF Objektträger)\*\*

\* National Institute of Public Health and Environmental Protection, The Netherlands

\*\* Institut Virion, Schweiz

Es wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt, außer einer schwach positiven Reaktion mit 6 der 7 HSV-1-Isolate in der Shell Vial Culture. Die schwache Färbung, die bei den 6 HSV-1 Isolaten beobachtet werden konnte, ist cytoplasmatischen Ursprungs (d.h. nur außerhalb des Kerns an wenigen Stellen in geringer Anzahl erkennbar). Sie könnte auf Fc-Rezeptoren, die von HSV-1 infizierten Zellen im SV-Test exprimiert wurden, zurückzuführen sein und ist vergleichbar mit dem Muster von HSV-1 monoklonalen Antikörpern. Weitergehende Untersuchungen schlossen eine Kreuzreaktion zwischen HSV und dem CMV-Antigenämie Test bei Verwendung des monoklonalen C10/C11 Antikörper-Mix aus.



## CMV Brite™ Turbo Kit

Test d'antigénémie CMV pp65 pour la  
mise en évidence d'une infection active  
à CMV

Code produit: VIR-CMV 110  
CE0344 Dispositif médical de diagnostic in vitro

### NOTICE

110 Tests

<b>ελληνικά</b>	Οι μεταφράσεις των Οδηγιών Χρήσης αυτού του προϊόντος (IFU)/ του Φύλλου Οδηγιών Χρήσης και του Δελτίου Δεδομένων Ασφαλείας Υλικού βρίσκονται στον Παγκόσμιο Ιστό στο <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . Μπορείτε επίσης να ζητήσετε αντίγραφα, στέλνοντας αίτημα μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου στο <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> ή κατόπιν επικοινωνίας με τον διανομέα προϊόντος της περιοχής σας.
<b>Español</b>	Las traducciones de las instrucciones de uso (IFU), del prospecto y de la SDS (hoja de datos de seguridad del material) del producto pueden obtenerse en Internet en <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . También puede solicitar copias enviando una solicitud por correo electrónico a <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> o contactando con su distribuidor local de productos.
<b>Italiano</b>	Le versioni tradotte delle Istruzioni per l'Uso/Foglietto Illustrativo e la Scheda di Sicurezza di questo prodotto sono disponibili sulla rete Internet all'indirizzo <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . Le copie possono essere richieste anche inviando una mail a <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> o contattando il distributore locale.
<b>Português</b>	As traduções das Instruções para Utilização (IFU) / Inserção do Produto e SDS deste produto podem ser encontrados na Internet em <a href="http://www.iqproducts.nl">www.iqproducts.nl</a> . Também poderão ser solicitadas cópias enviando um pedido de e-mail para <a href="mailto:orders@iqproducts.nl">orders@iqproducts.nl</a> ou contactando o seu distribuidor de produto local.

# Test CMV Brite™ Turbo

## But de test

Le test CMV Brite™ est destiné à la détection de la protéine matricielle pp65 du cytomegalovirus (CMV) par immunofluorescence indirecte sous microscope, dans des leucocytes isolés de sang périphérique provenant de sang humain hépariné ou prélevé sur acide éthylènediamine-tétracétique (EDTA). La détection de la pp65 du CMV dans les cellules du sang humain périphérique est une aide au diagnostic d'infection aiguë ou de réactivation d'infection par le CMV. Ce produit n'est pas approuvé par la FDA pour une utilisation dans les tests (dépistage par exemple) des donneurs de sang ou de plasma.

## Résumé et explication

Le cytomegalovirus humain (CMV) est un virus à ADN, d'environ 200 nm de diamètre, appartenant à la famille des herpesvirus. Il se compose d'une nucléocapside, constituée d'un ADN double brin au centre d'une capsid de 162 capsomères, et d'une enveloppe (1). L'infection à CMV est banale et, chez un hôte sain, généralement infra-clinique. Toutefois, chez le sujet immunodéprimé et le foetus, cette infection peut provoquer une maladie locale ou générale. Elle revêt alors différentes formes cliniques, du type pneumonie, rétinite, hépatite, entérite et neuropathie. Malgré l'amélioration des thérapeutiques, l'infection à CMV peut entraîner une morbidité et une mortalité significatives chez les transplantés, les patients

atteints de SIDA et de cancer, surtout ceux avec des leucémies et des lymphomes. Les risques peuvent résulter aussi bien d'une CMV primo-infection que de la réactivation d'une infection latente (2-4). Le diagnostic rapide et précoce de l'infection à CMV est d'une grande importance pour éviter un traitement immunodépresseur excessif et guider le traitement antiviral.

Toutefois, il peut s'avérer difficile de différencier une réplication virale asymptomatique et une maladie franche demandant un traitement. Il est démontré que l'isolement du CMV à partir de prélèvements sanguins (virémie) est corrélé avec la maladie au stade clinique, alors que ce virus est souvent isolé à partir de la salive et de l'urine sans maladie apparente. Les méthodes sérologiques classiques d'isolement du CMV sont sensibles, mais demandent souvent plusieurs semaines avant d'obtenir un résultat. Les cultures rapides en bouteilles Falcon donnent un résultat en 1 ou 2 jours, mais ne sont pas sensibles pour la détection du CMV dans des échantillons sanguins. En revanche, la détection d'antigène du CMV dans les leucocytes polynucléaires (PN) du sang périphérique (antigénémie) est sensible et rapide (5, 6). Cette technique met en œuvre des anticorps monoclonaux pour détecter la phosphoprotéine matricielle inférieure du CMV (pp65), antigène précoce de la réplication virale, présent en abondance dans les PN positifs pour l'antigène (6-9). La technique du **CMV Brite™ Turbo** peut être effectuée en deux heures à

partir de la collecte de l'échantillon. La recherche de l'antigénémie virale s'est révélée utile dans le diagnostic et le suivi de l'infection à CMV active chez les patients ayant bénéficié de greffes d'organes et de moelle osseuse (1, 2, 10-13, 19). Selon certaines publications, la présence d'antigène pp65 est également corrélée à un certain degré avec la maladie à CMV chez les patients atteints de SIDA (4, 18).

## Principe du test

Le test d'antigénémie CMV Brite utilise un mélange de deux anticorps monoclonaux (C10/ C11) dirigés contre la protéine matricielle pp65 du CMV (6). La trousse **CMV Brite™ Turbo** contient un test d'antigénémie CMV rapide dérivant du test CMV BRITE précédemment développé (test enregistré à l'Agence du médicament et agréé par la FDA) Les deux tests mettent en œuvre le mélange C10/C11 dans un marquage par immunofluorescence indirecte. Il est effectué sur des préparations de leucocytes du sang périphérique, cytocentrifugés (cytopspin). La procédure du **CMV Brite™ Turbo** est réalisable en deux heures à partir de l'échantillon; elle permet donc un gain de temps et un diagnostic rapide pour le technicien.

Les étapes de cette méthode sont les suivantes:

- Lyse directe des globules rouges du sang périphérique.
- Préparation des lames après centrifugation.
- Fixation et perméabilisation.
- Marquage par immunofluorescence indirecte avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine pp65 du CMV.
- Lecture et évaluation des résultats.





La première étape de cette nouvelle procédure implique une lyse directe des érythrocytes(22). Les leucocytes sont ensuite cytocentrifugés sur une lame, puis fixés et perméabilisés pour permettre la détection ultérieure de l'antigène pp65 du CMV. La présence de cet antigène est détectée par les anticorps monoclonaux C10/ C11 et visualisée au moyen d'un anticorps secondaire spécifique marqué au FITC. Les leucocytes porteurs d'antigènes pp65 présentent une coloration jaune-vert homogène du noyau plurilobé au microscope à fluorescence. Le nombre de cellules CMV+ est compté sur les échantillons en double exemplaire.

La totalité de la procédure est réalisable en deux heures environ. La lyse directe des érythrocytes du sang total, en évitant la sédimentation sur dextran, a permis de diminuer considérablement le temps total d'analyse. Un gain de temps a aussi été apporté en raccourcissant certaines étapes individuelles du protocole, ce qui a permis au final, de diminuer de 50% le temps nécessaire pour réaliser la nouvelle procédure d'antigénémie CMV par rapport à celle du CMV BRITE.

## Réactifs

### Matériel et réactifs fournis

Réactifs pour 110 tests incluant 5 lames de contrôles

<b>CMV Brite™ Turbo</b> Réactif A	Solution de lyse des érythrocytes - Solution de chlorure d'ammonium; conservateur: azide de sodium < 0,1% (10x). (A diluer avant emploi dans de l'eau distillée.)  <b>AVERTISSEMENT</b>	200 ml
<b>CMV Brite™ Turbo</b> Réactif B	Solution de fixation - Formaldéhyde en tampon PBS; conservateur: azide de sodium < 0,1% (5x). (A diluer avant emploi dans du PBS.)    <b>DANGER</b>	290 ml
<b>CMV Brite™ Turbo</b> Réactif C	Solution de perméabilisation - Igepal Ca 630 et sérum de veau nouveau en tampon PBS; conservateur: azide de sodium < 0,1% (5x). (A diluer avant emploi dans du PBS.)	290 ml
<b>CMV Brite™ Turbo</b> Réactif D	Anticorps monoclonal de souris C10/C11 (immunoglobulines G (IgG) complètes de souris, toutes deux de la sous-classe IgG1) dirigés contre la protéine matricielle pp65 du CMV; conservateur: azide de sodium < 0,1%. (Prêt à l'emploi.)	4.0 ml
<b>CMV Brite™ Turbo</b> Réactif E	Immunoglobulines de mouton anti-IgG de souris conjuguées au FITC dans du Bleu Evans; conservateur: azide de sodium < 0,1%. (Prêt à l'emploi.)	4.0 ml
<b>CMV Brite™ Turbo</b> Lames témoins	Lames de contrôle de l'antigénémie pp65 pour microscope, dans un sachet scellé, avec déshydratant. (Prêtes à l'emploi.)	5 lames

Chaque lame contient une tache servant de témoin négatif (leucocytes CMV négatifs fixés) et une tache servant de témoin positif (cellules CMV positives mélangées à des leucocytes CMV négatifs). Avant d'ouvrir les sachets, laisser les lames revenir à température ambiante.

Dès réception, conserver les réactifs au réfrigérateur (2-8 °C). Éviter la lumière solaire directe. Conservés dans les conditions indiquées, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette.



La trousse Test **CMV Brite™ Turbo** est disponible en conditionnement de 110 tests contenant 5 lames témoins. Les quantités de réactifs sont suffisantes pour la réalisation d'un minimum de 110 tests; ou, 100 tests sur des prélèvements et 5 lames de contrôle. Il est conseillé d'effectuer le test d'antigénémie en double pour chaque échantillon clinique de sang.

## Mises en garde et précautions d'emploi

### STRICTEMENT RESERVE AU DIAGNOSTIC IN VITRO


Lames témoins **CMV Brite™ Turbo** pour microscopie

Pour la préparation des lames témoins **CMV Brite™ Turbo**, on a utilisé des leucocytes humains prélevés chez un donneur sain. Chaque unité de sang a fait l'objet de tests homologués par la FDA et a donné des résultats négatifs aux tests suivants: recherche d'anticorps contre le VIH-1, le VIH-2, le HCV et le CMV et d'antigène Hbs. Quoique ces méthodes soient d'une grande exactitude, aucune ne donne des résultats garantis à 100%.

Ce produit peut également contenir d'autres substances d'origine humaine pour lesquelles il n'existe pas de test homologué. Aucun test connu ne pouvant garantir de manière absolue l'absence de VIH-1, de VIH-2, de HCV, de HBV, de CMV ou d'autres agents infectieux, tous ces réactifs doivent être manipulés conformément aux règles des bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées, décrites dans Biosafety in Microbial and Biomedical Laboratories, 2ème Ed. 1988.

Publication HHS n° (CDC) 88-8395 du Centers for Disease Control. Les lames de contrôle fournies dans la trousse **CMV Brite™ Turbo** sont déjà fixées et perméabilisées.

#### Attention!

- Les réactifs contenant de l'azide de sodium peuvent réagir avec les canalisations en plomb ou en cuivre pour former des azides métalliques explosifs. Après avoir jeté les réactifs, rincer à grande eau pour empêcher la formation d'azide.
- Tous les réactifs doivent être manipulés conformément aux règles des bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées. Par ailleurs, manipuler tous les échantillons cliniques avec les précautions requises. Ne jamais pipeter à la bouche.
- Le réactif A (Slution de lyse des érythrocytes) contient chlorure d'ammonium.  
 **AVERTISSEMENT**  
H302 Nocif en cas d'ingestion; H319 Provoque une sévère irritation des yeux.  
P305 + P351 + P338 **EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX:** rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
- Le réactif B (solution de fixation) contient moins de 9,5 % de formaldéhyde, composé extrêmement toxique, allergénique et potentiellement carcinogène, qui doit être manipulé conformément aux règles des bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées. Éviter tout contact avec les yeux ou la peau.

 **DANGER**

H301 + H311 + H331 Toxique par ingestion,

par contact cutané ou par inhalation; H314 Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves; H317 Peut provoquer une allergie cutanée; H335 Peut irriter les voies respiratoires; H351 Susceptible de provoquer le cancer; H370 Risque avéré d'effets graves pour les organes. P260 Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols; P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. P301 + P310 EN CAS D'INGESTION: appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un Médecin; P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer; P310 Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

- Le réactif E contient du Bleu Evans. Eviter tout contact avec les yeux, la peau, les vêtements. Garder le récipient hermétiquement fermé. Se laver soigneusement les mains après toute manipulation.

## Recueil et préparation des échantillons

Traitement de l'échantillon sanguin Prélever 3 à 5 ml de sang veineux dans un tube hépariné ou traité à l'EDTA, par ponction veineuse aseptique. Envoyer immédiatement le prélèvement au laboratoire. L'échantillon doit être conservé à température ambiante (20-25 °C) jusqu'à l'essai. La technique doit être effectuée dans les 6 à 8 heures qui suivent le prélèvement. Le nombre de cellules positives pour l'antigène CMV (sang prélevé sur héparine)

par lame diminuée après la conservation (15- 17). Le temps de conservation maximum à température ambiante n'a pas été déterminé. Il faut donc toujours s'efforcer de préparer immédiatement les lames. Chez les patients sévèrement neutropéniques (nombre de neutrophiles <200/mm<sup>3</sup>), il peut être nécessaire de disposer d'au moins 10 ml de sang.

### *Matériel et appareillage nécessaires (mais non fournis)*

- Centrifugeuse de laboratoire
- Tubes de centrifugation à fonds coniques de 50 ml, stériles
- Pipettes
- Micropipette et embouts
- Tampon PBS à pH 7,4, sans Ca ni Mg
- Eau déminéralisée (distillée)
- Hémocytomètre ou compteur automatique de cellules
- Lames de cyto-centrifugation
- Cytocentrifugeuse (type Cytospin 3, Shandon Southern Products, Ltd)
- Stylo marqueur de laboratoire (DAKO#52002)
- Bouteilles de Coplin ou récipient pour marquage cytologique
- Chambre humide
- Incubateur à 37 °C
- Microscope à immunofluorescence pouvant grossir de 250 x à 1000 x
- Milieu de montage (non fluorescent, type CITI FLUOR, solution de PBS-glycérol, UKC Chem Lab. ou Immunoconcept Mounting Media, Réf. n° 111)
- Hotte
- Lames de verre
- Chronomètre

## MODE OPERATOIRE

Remarque: Sauf indication contraire, les réactifs (PBS compris) doivent être manipulés à température ambiante, c'est-à-dire 20-25 °C.

### I. Préparation de la suspension de leucocytes

Remarque: Cette procédure doit comporter des témoins appropriés

- Diluer le réactif A au 1/10ème dans de l'eau déminéralisée (distillée) refroidie à +4°C.
- Mélanger 2 ml de sang avec 30 ml de solution de lyse diluée froide (+4°C dans un tube à fond conique de 50 ml et incubé 5 minutes à +4°C.
- Centrifuger pendant 2 minutes à 1000 g (2500 rpm). Jeter le surnageant.
- Répéter l'étape de lyse si la lyse des érythrocytes n'est pas suffisante après la première étape.
- Resuspendre le culot de cellules dans 30 ml de PBS.
- Centrifuger pendant 2 minutes à 1000 g (2500 rpm). Jeter le surnageant.
- Remettre en suspension le culot dans 1 ml de PBS. (Chez les patients sévèrement neutropéniques il peut être nécessaire de resuspendre dans un volume de PBS bien plus faible - jusqu'à 0,2 ml).

### II. Comptage des cellules

- Compter les cellules à l'aide de l'hémocytomètre ou du compteur automatique.
- Ajuster la concentration à  $2 \times 10^6$  cellules/ml avec du PBS.

### III. Préparation des lames de cyto centrifugation

- Centrifuger 100 µl de la suspension à  $2 \times 10^6$  cellules/ml à 600 rpm environ (54x g) pendant

4 minutes sur les lames de verre dans une cyto centrifugeuse.

- Préparer au moins trois lames par échantillon clinique (deux pour le test, plus au moins une de réserve).
- Délimiter la zone contenant les cellules avec un marqueur adapté.
- Laisser sécher les lames pendant environ 5 minutes.
- Les lames peuvent être laissées une nuit à température ambiante avant la fixation.

### IV. Fixation et perméabilisation

- Diluer la solution de fixation (réactif B) au 1/5ème dans du PBS sous hotte avant utilisation.
- Diluer la solution de perméabilisation (réactif C) au 1/5ème dans du PBS sous hotte avant utilisation (ne pas réutiliser).
- Plonger les 2 lames dans le réactif B dilué et les y laisser 5 minutes à température ambiante, sous hotte.
- Tremper 3 fois les lames dans du PBS, puis les laisser dans la même solution pendant 3 minutes.
- Plonger les lames dans le réactif C dilué, pendant 1 minute à température ambiante.
- Tremper les lames 3 fois dans du PBS puis les laisser dans du PBS frais pendant 5 minutes (ou plus, le temps ne devant pas excéder 60 minutes).

Si les lames doivent être conservées, on les rincera dans de l'eau déminéralisée distillée pendant 15 secondes.

On laissera sécher les lames sous la hotte pendant 20 minutes environ. Une fois sèches, les lames devront être colorées immédiatement ou conservées à 4°C pendant 24 heures ou congelées à -80°C.

### V. Marquage par immunofluorescence

- A partir de cette étape: ne pas laisser sécher l'échantillon sur la lame jusqu'à la fin de la procédure de marquage.
- Rehydrater la lame de contrôle du **CMV Brite™ Turbo** dans du PBS pendant 1 ou 2 minutes.
- Retirer une lame à la fois de la solution de PBS, sécher soigneusement la zone entourant la tache cellulaire.
- Déposer 35 µl de solution d'Anticorps Monoclonal C10/C11(Réactif D) et laisser incuber 20 minutes à 37 °C en chambre humide.
- Tremper les lames 3 fois dans du PBS et les laisser dans de la solution fraîche pendant 3 minutes.
- Retirer une lame à la fois de la solution de PBS, sécher soigneusement la zone entourant la tache cellulaire.
- Déposer 35 µl de conjugué (réactif E) et laisser incuber 20 minutes à 37 °C en chambre humide.
- Laver deux fois dans du PBS frais et rincer soigneusement à l'eau du robinet (5 fois), puis monter dans du milieu de montage et recouvrir d'une lamelle de verre.

### VI. Lecture

Effectuer la lecture le plus rapidement possible. Les lames peuvent être conservées 8 heures à 4 °C, recouvertes hermétiquement pour minimiser l'affaiblissement de la coloration.

Observer au microscope à immunofluorescence à un grossissement de 400 x. On peut utiliser un grossissement supérieur de 1000 x pour augmenter la résolution.

Parcourir *toute* la surface de la tache. Deux taches devraient être analysées par patient

Les cellules positives présentent une coloration jaune-vert homogène du *noyau* plurilobé.

Les cellules négatives ne présentent pas de coloration jaune-vert du *noyau*.

*Les lectures peuvent parfois être ambiguës, en raison d'artefacts (moins de 5%):*

- L'artefact le plus courant est dû aux éosinophiles. Ils sont reconnus par un marquage cytoplasmique non spécifique; le noyau montre des lobes noirs en forme de "lunettes". Le cytoplasme peut apparaître terne et plus jaune.
- Si toutes les cellules sont verdâtres, il s'agit d'artefacts qui peuvent être associés à certains types de patients, ce phénomène est très rare.
- Si les cellules présentent une coloration verdâtre typique uniquement sur le pourtour de la tache, le test n'est pas considéré comme positif. Ceci peut survenir lorsque le spot a commencé à sécher au cours de l'incubation avec la solution d'Anticorps Monoclonal ou la solution de conjugué. Veillez à incuber dans une chambre humide et vérifiez que la totalité du spot soit bien recouverte par le réactif.

Si les lames ne sont pas interprétables en raison de lectures ambiguës et d'artefacts, marquer la (les) lame(s) de réserve; si les résultats restent incertains, prélever un autre échantillon et refaire le test.

## Contrôle de Qualité

Les lames de contrôle positives et négatives sont fournies avec le kit. Les lames ne sont utilisées que pour contrôler la procédure de coloration et ne pas influencer sur la valeur diagnostique de la trousse. Le contrôle positif doit présenter une fluorescence appropriée afin que les échantillons de patients puissent être évalués. Le contrôle positif doit présenter une coloration homogène jaune-vert des cellules positives à la morphologie ronde (le noyau n'est pas visible). Le contrôle négatif ne doit pas présenter de coloration jaune-vert. Bien que les procédures de qualité soient strictement suivies, des cellules individuelles et positives peuvent être observées dans le contrôle négatif. Dans ce cas, la série de tests ne doit pas être considéré comme invalide. La présence de cellules individuelles positives dans le contrôle négatif ne signifie pas que les lames d'échantillon à tester ne puissent pas être interprétées.

## Resultats

### 1. Lecture et Interprétation

Les résultats de l'évaluation des lames des patients sont qualitatifs. La signification clinique de l'augmentation ou de la diminution dans le temps, du nombre de cellules positives chez un patient n'a pas été déterminée. Par conséquent les résultats sont à rapporter uniquement comme "Positif" ou "Négatif", selon les définitions suivantes:

**Positif** *présence d'au moins une cellule antigène CMV-positive dans les deux lames d'essai.*

**Négatif** *aucune cellule antigène CMV-positive dans les deux lames d'essai.*

L'échantillon doit compter au minimum 50.000 cellules approximativement, pour affirmer qu'un résultat est négatif. Si les lectures sont ambiguës en raison d'artefacts sur les deux lames d'essai, les résultats ne doivent pas être interprétés. Marquer les lames de réserve ou refaire le test sur un autre prélèvement du patient.

Exemples de valeurs normales de cellules positives pour une infection primaire à CMV. Durant une infection active à CMV, un patient peut avoir entre 1 et plusieurs milliers de leucocytes positifs (pour l'antigène pp65 du CMV) par tache. Ceci est vrai pour une infection primaire ou secondaire à CMV.

### 2. Choix du Microscope

Il est important de sélectionner la bonne configuration de cube contenant le filtre correspondant au fluorochrome utilisé dans la technique. Ceci varie avec chaque marque de microscope. Il faut donc sélectionner la bonne combinaison correspondant au FITC utilisé. Les microscopes Olympus BX-40 ou BX-60 par exemple donnent de bons résultats de lecture avec:

*Cube de fluorescence: U-MNB*

*Longueur d'onde d'excitation: 470-490 nm*

*Longueur d'onde d'émission: > 515 nm*

## Limites du test

1. La détection de l'antigène pp65, protéine structurale précoce du CMV, doit être effectuée par des laboratoires expérimentés en immunocytochimie.
  2. La préparation des leucocytes doit être effectuée par des laboratoires maîtrisant bien les manipulations en conditions stériles.
  3. L'efficacité du test **CMV Brite™ Turbo** avec des échantillons autres que des leucocytes humains n'est pas établie.
  4. Les performances du test avec des anticoagulants autres que l'héparine et l'EDTA ne sont pas déterminées.
  5. Le test **CMV Brite™ Turbo** ne doit être utilisé qu'en microscopie par immunofluorescence et non en cytométrie de flux.
  6. Le type et l'état du matériel utilisé influenceront l'aspect de l'image obtenue. La réaction peut varier selon le type de microscope utilisé, la source de lumière, l'âge de l'ampoule, le système de filtres et l'épaisseur des filtres, les différences de sensibilité du substrat antigénique ou la méthode de test appliquée. Chaque laboratoire devrait établir ses propres critères de lecture des échantillons cliniques, avec les témoins appropriés.
  7. La détection et la confirmation de la présence d'antigène pp65 du CMV dans les leucocytes du sang périphérique ne constitue pas un diagnostic de maladie clinique, puisque le CMV peut être présent assez longtemps après l'infection aiguë et que les patients porteurs de l'antigène (surtout si l'antigénémie est faible) peuvent ne présenter aucun symptôme. Toutes les études publiées font état de patients avec une antigénémie négative et une virémie positive; certains d'entre eux peuvent présenter la maladie clinique. Ainsi, une recherche négative d'antigène pp65 n'exclut pas de manière absolue la présence d'une infection ou d'une maladie à CMV.
  8. Le kit **CMV Brite™ Turbo** n'est pas destiné au contrôle de l'efficacité d'un traitement antiviral.
  9. Les performances du test ne sont pas établies chez le nouveau-né.
  10. On peut noter que le nombre de cellules antigènes CMV positives (sang prélevé sur héparine) par lame diminue pendant la conservation (15-17). Il faut donc, dans la mesure du possible, préparer immédiatement les lames. La durée maximum de la conservation à température ambiante n'a pas été déterminée.
  11. Chez les patients sévèrement neutropéniques (nombre de neutrophiles  $<200/\text{mm}^3$ ), il peut être nécessaire de disposer d'au moins 10 ml de sang.
  12. Comme les anticorps monoclonaux ont été préparés à partir d'une lignée prototype, il est possible qu'ils ne détectent pas toutes les nouvelles souches de CMV.
- Par exemple:** Les anticorps monoclonaux peuvent ne pas détecter les souches de CMV présentant de petites modifications d'acides aminés dans la région de l'épitope cible.

## Valeurs usuelles

Le kit CMV Brite™ a été évalué dans des laboratoires de virologie clinique de centres de transplantation d'organes ou de moelle osseuse ou de centres de traitement du SIDA, situés dans deux régions distinctes (20). Au total, 300 échantillons de sang veineux ont été prélevés chez 206 patients transplantés (159 greffes de moelle allogénique et 47 greffes d'organes), 85 patients séropositifs pour le VIH ou atteints de SIDA et 9 patients immunocompétents. Le test CMV Brite™ a été positif dans 92 cas (30,7%). La prévalence dans une population de patients asymptomatiques mais séropositifs pour le CMV n'est pas établie.

## Performances du test

Le kit CMV Brite™ a été comparé à la détection du virus CMV en culture classique (CC) et à la détection d'antigènes précoces en culture rapide centrifugée (CR) sur des leucocytes de sang humain périphérique. Trois cents échantillons cliniques ont été évalués en comparaison avec les deux méthodes.

*Comparaison du test CMV Brite™ avec la CC et la CR (centre d'étude n° 1)*

### Test CMV Brite™

CC/CR	+	-	Total
+	3	0	3
-	45	103	148
Total	48	103	151

*Comparaison du test CMV Brite™ avec la CC et la CR (centre d'étude n° 2)*

### Test CMV Brite™

CC/CR	+	-	Total
+	28	3	31
-	16	102	118
Total	44	105	149

*Comparaison du test CMV Brite™ avec la CC et la CR (cumul des deux centres)*

### Test CMV Brite™

CC/CR	+	-	Total
+	31	3	34
-	61	205	266
Total	92	208	300

- **Sensibilité:**  $31 / 34 = 91,2\%$   
(IC 95 %: 76,3 - 98,1%)
- **Spécificité:**  $205 / 266 = 77,1\%$   
(IC 95 %: 70,2 - 81,1%)

L'imprécision comparée de la culture du CMV (CC et CR) et de la recherche de l'antigénémie a été étudiée et documentée (20). Les discordances semblent être la conséquence du traitement antiviral ou de la variabilité des échantillons (12). Par ailleurs, la détection de l'antigénémie CMV a été reconnue comme preuve claire d'une infection active à CMV, en complément de la culture en bouteille et de la culture classique (4ème Atelier International sur le CMV, Paris, 19-21 avril 1993).

Les discordances ont été résolues en recherchant la preuve de l'infection à CMV dans d'autres milieux biologiques ou sites du patient, p. ex. dans les urines, la gorge, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA), et en examinant les antécédents du patient pour rechercher d'autres signes cliniques indiquant une infection à CMV. Par ailleurs, la preuve d'une infection à CMV a été apportée par l'histologie, la culture de biopsies et/ou la présence d'IgG ou d'IgM anti-CMV en sérologie (pas chez les patients atteints du SIDA ou ayant bénéficié d'une greffe de moelle osseuse) et/ou par les résultats de tests d'antigénémie CMV de référence (tests internes validés, non commercialisés).

*Comparaison du test CMV Brite™ avec d'autres méthodes de détection de l'infection à CMV (centre d'étude n°1)*

#### Test CMV Brite™

CMV attendu	+	-	Total
+	47	6	53
-	1	97	98
Total	48	103	151

*Comparaison du test CMV Brite™ avec d'autres méthodes de détection de l'infection à CMV (centre d'étude n°2)*

#### Test CMV Brite™

CMV attendu	+	-	Total
+	42	3	45
-	2	102	104
Total	44	105	149

*Comparaison du test CMV Brite™ avec d'autres méthodes de détection de l'infection à CMV*

*(cumul des deux centres)*

#### CMV Brite™ Kit

CMV attendu	+	-	Total
+	89	9	98
-	3	199	202
Total	92	208	300

Sur les 64 résultats discordants, 19 ont été résolus en s'appuyant sur les résultats du test d'antigénémie CMV de référence, en conjonction avec la sérologie CMV.

- Sensibilité résolue: 89/ 98 = 90,8%  
(IC 95%: 83,3 - 95,7%)
- Spécificité résolue: 199/202 = 98,5%  
(IC 95%: 95,7 - 99,7%)
- Valeur prédictive Positifs: 89/ 92 = 96,7%  
(IC 95%: 90,8 - 99,3%)
- Valeur prédictive Négatifs: 199/208 = 95,7%  
(IC 95%: 91,6 - 97,9%)



Les performances de la trousse **CMV Brite™ Turbo** ont été évaluées (par comparaison avec la trousse **CMV Brite**), sur 183 prélèvements sanguins de patients à risque d'infection **CMV** active.

### INFORMATIONS SUR LES PATIENTS

Type de Patients	Nombre	
Greffés d'organes:	173	(95%)
- Rein	80	
- Foie	38	
- Poumon	55	
Immunocompétents	9	(5%)
VIH Positifs	1	(<1%)
Total	183	(100%)

Le choix des patients devait permettre d'obtenir entre 20 et 30% de prélèvements positifs pour l'antigénémie **CMV pp65** (**CMV pp65 Ag+**).

### Résultats de comparaison des trousses **CMV Brite™ Turbo** et **CMV Brite™**

Trousse <b>CMV Brite™ Turbo</b>	Trousse <b>CMV Brite™</b>		Total
	+	-	
+	43	7	50
-	6	127	133
Total	49	134	183

Au total, 49 échantillons (26,8%) ont été déterminés positifs (**CMV pp65 Ag+**) avec la trousse **CMV Brite™**, conformément à ce qui était attendu.

Au total, 7 prélèvements (3,8%) ont donné un marquage positif avec le test **CMV Brite™ Turbo**, et un marquage négatif avec le test **CMV Brite™**. Inversement, 6 prélèvements (3,3%) ont été déterminés négatifs avec le test **CMV Brite™ Turbo** et positifs avec le test **CMV Brite™**.

Selon les méthodes statistiques standard utilisées, ces deux valeurs de pourcentages sont inférieures à 5%, et sont donc acceptables par rapport aux exigences du protocole défini pour l'étude.

Tous les résultats discordants ont été obtenus dans des cas où les lames comportaient des nombres extrêmement faibles de cellules à **CMV pp65 Ag+** (i.e. en présence de 0 ou 1 cellule / lame dupliquée). Ce fait a été observé à la fois pour le test **CMV Brite™** et pour le test **CMV Brite™ Turbo**.

Par conséquent, on peut considérer que les discordances observées correspondent à des variations statistiques non significatives des résultats. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse des résultats.

Les données de cette étude montrent que les trousses **CMV Brite™ Turbo** et **CMV Brite™** ont des caractéristiques de performances équivalentes.

## Étude de reproductibilité

Les études de reproductibilité effectuées afin de tester la trousse CMV Brite Turbo ont montré que celle-ci est hautement reproductible lorsque différents lots sont testés sur le même échantillon de patient (Voir tableau 1).

## Reactivité croisée

Les études de réactivité croisée ont été conduites avec les réactifs du test CMV Brite™ et des isolats uniques de virus (à l'exception du HSV-1 qui a été testé avec 7 isolats) apparentés au CMV, provoquant des symptômes cliniques analogues et/ou isolés du sang périphérique. Comme le mélange d'anticorps et le conjugué sont les mêmes dans les trouses CMV Brite™ Turbo et CMV Brite™, les résultats de réactivité croisée s'appliqueront aux deux trouses. Sauf indication contraire, les isolats cliniques des virus suivants ont été testés:

- Virus herpès simplex 1 (HSV-1)
- Virus herpès simplex 2 (HSV-2)
- Virus zona-varicelle
- Adénovirus 2
- Adénovirus 4
- Adénovirus 5
- Virus parainfluenzae 1
- Virus parainfluenzae 2
- Virus parainfluenzae 3
- Virus syncytial respiratoire
- Poliovirus 3 (type sauvage 3)
- Echovirus 11
- Echovirus 30
- Virus d'Epstein-Barr (souche de laboratoire P3HR1)\*
- Herpesvirus humain type 6 (souche de laboratoire GS)\*\*
- Virus de l'immunodéficience type 1 (lames IF du commerce)\*\*

\* Institut National de Santé Publique et de Protection de l'Environnement, Pays-Bas

\*\* Virion, Suisse.

Tableau 1: Résultats de l'étude de reproductibilité de la trousse CMV Brite™ Turbo

N° de lot des trouses	Date du test	Prélèvement du patient. Nbre de cellules CMV Ag+ cellules positives	Prélèvement du patient Moyenne du nbre de
L9018	8 avril 1999	65; 58; 69; 54; 69	X = 63
L9019	8 avril 1999	65; 68; 59; 73; 62	X = 65
L9020	8 avril 1999	51; 79; 70; 81; 59	X = 68

Aucune réactivité croisée n'a été observée, à l'exception d'une réaction faiblement positive avec six des sept isolats de HSV-1 dans le test sur bouteilles Falcon. Ce faible marquage était cytoplasmique (observée uniquement à l'extérieur du noyau, dans un nombre limité de petits foyers) et similaire au profil d'IF habituellement observé avec les anticorps monoclonaux anti-HSV-1. Il est possible que le faible marquage observé soit dû à l'expression de récepteurs Fc exprimés par les cellules infectées par le HSV-1 dans ce type de test. Une analyse ultérieure a conclu à l'absence de réactivité croisée entre le HSV et le test d'antigénémie CMV Brite™ avec le mélange d'anticorps monoclonaux C10/C11.

# Bibliography

1. Van Son, W.J. and The, T.H. (1989). Cytomegalovirus infection after organ transplantation: an update with special emphasis on renal transplantation. *Transpl. Int.* 2, 147-164.
2. The, T.H., Van der Bij, W., Van den Berg, A.P., Van der Giessen, M., Weits, J., Sprenger, H. and Van Son, W.J. (1990). Cytomegalovirus antigenemia. *Rev. Inf. Dis.* 12, S737-744.
3. Boeckh, M., Bowden, R.A., Goodrich, J.M., Pettinger, M., Meyers, J.D. (1992). Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 80, 1358 - 1364.
4. Mazzulli, T., Rubin, R.H., Ferraro, M.J., D'Aquila, R.T., Doveikis, S.A., Smith, B.R., The, T.H. and Hirsch, M.S. (1993). Cytomegalovirus antigenemia: clinical correlations in transplant recipients and in persons with AIDS. *J.Clin. Microbiology* 31, 2824-2827.
5. Van der Bij, W., Schirm, J., Torensma, R., Van Son, W.J., Tegzess, A.M., The, T.H. (1988) Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J. Clin. Microbiology* 26, 2531 - 2535.
6. Grefte, J.M.M., Van der Gun, B.T.F., Schmolke, S., Van der Giessen, M., Van Son, W.J. and The, T.H. (1992). The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J.Gen.Virol.* 73, 2923-2932.
7. Gerna, G., Revello, M.G., Percivalle, E., Zavattoni, M., Parea, M., Battaglia, M. (1990). Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. *J. Clin. Microbiology* 28, 2681 - 2688.
8. Revello, M.G., Percivalle, E., Di Matteo, A., Morini, F., Gerna, G. (1992). Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viremic patients. *J. Gen Virol* 73, 437 - 442.
9. Gerna, G., Revello, M.G., Percivalle, E., Morini, F. (1992). Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. *J. Clin. Microbiology* 30, 1232 - 1237.
10. Van den Berg, A.P., Van der Bij, W. Van Son, W.J., Anema, J., Van der Giessen, M., Schirm, J., Tegzess, A.M., The, T.H. (1989). Cytomegalovirus antigenemia as a useful marker of symptomatic cytomegalovirus infection after renal transplantation: a report of 130 consecutive patients. *Transplantation* 48, 991 - 995.
11. Van den Berg, A.P., Klompmaker, I.J., Haagsma, E.B., Scholten-Sampson, A., Bijleveld, C.M.A., Schirm, J., Van der Giessen, M., Slooff, M.J.H., The, T.H. (1991). Antigenemia in the diagnosis and monitoring of active cytomegalovirus infection after liver transplantation. *J. Infect. Dis.* 164, 265 - 270.

12. Gerna, G., Zipeto, D., Parea, M., Revello, M.G., Sillini, E., Percivalle, E., Zavattoni, M., Milanese, G. (1991). Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia antigenemia and DNAemia. *J. Infect. Dis.* 164, 488 - 498.
13. The, T.H., van der Ploeg, M., Van der Berg, A.P., Vlieger, A.M., Van der Giessen, M., Van Son, W.J. (1992). Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes - a review of the antigenemia assay and the polymerase chain reaction. *Transplantation* 54, 193 - 198.
14. Landry, M.L. and Ferguson D. (1993). Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *J.Clin.Microbiology* 31, 2851-2856.
15. Boeckh, M., Woogerd, P.M., Stevens-Ayers, T., Ray, C.G., and Bowden, R.A. (1994). Factors influencing detection of quantitative Cytomegalovirus antigenemia. *J.Clin.Microbiology* 32, 832-834.
16. Landry, M.L., Ferguson D., Cohen, S., Huber, K., and Wetherill, P. (1995). Effect of delayed specimen processing on Cytomegalovirus antigenemia test results. *J.Clin.Microbiology* 33, 257-259.
17. Niubò, J., Pérez, J.L., Carvajal, A., Ardanuy, C., and Martin, R. (1994). Effect of delayed processing of blood samples on performance of cytomegalovirus antigenemia assay. *J.Clin.Microbiology* 32, 1119-1120.
18. Gerna, G., Parea, M., Percivalle, E., Zipeto, D., Sillini, E., Barbarini, G., and Milanese, G. (1990). Human cytomegalovirus viraemia in HIV-1 seropositive patients at various clinical stages of infection. *AIDS* 4, 1027 - 1031.
19. Koskinen, P.K., Nieminen, M.S., Mattila, S.P., Häyry, P.J., and Lautenschlager, I.T. (1993). The correlation between symptomatic CMV infection and CMV antigenemia in heart allograft recipients. *Transplantation*, 55, 547-551.
20. Landry, M.L., Ferguson, D., Stevens-Ayers, T., De Jonge, M.W.A., and Boeckh, M. (1996). Evaluation of CMV Brite™ Kit for detection of Cytomegalovirus pp65 antigenemia in peripheral blood leukocytes by immunofluorescence. *J.Clin. Microbiology* 34, 1337-1339.
21. Erice, A., Holm, M.A., Gill, P.C., Henry, S.A. et al (1992). Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay is more sensitive than shell vial cultures rapid detection of CMV in polymorphonuclear blood leukocytes. *J. Clin. Microbiology* 30, 2822-2825.
22. Ho, S.K.N., Lo, C-Y., Cheng, J.K.P. and Chan, T-M., (1998) Rapid cytomegalovirus pp65 antigenemia assay by direct Erythrocyte Lysis and Immunofluorescence Staining. *J. Clin.Microbiology.* 36, 638-640.

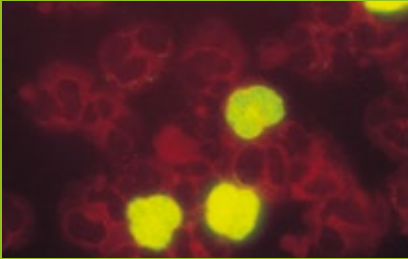
# Transplantation Products

PRODUCT	APPLICATION	NO. OF TESTS	PRODUCT CODE	REGULATORY STATUS
CMV Brite™ Turbo Kit	Complete kit for the diagnosis of an active CMV infection (2 hours)	110	VIR-CMV 110 VIR-CMV110 BDC	IVD C €0344 510(k) #k991650 USA
CMV Brite™ Kit	Complete kit for the diagnosis of an active CMV infection (4 hours)	100	VIR-CMV 100 VIR-BDC100	IVD C €0344 510(k) #k951550 USA
CMV C10/C11 cocktail	Mix of 2 CMV pp65 monoclonal antibodies	200	VIR-CMV C10/C11	IVD C €0344
FITC Conjugate	Sheep anti-mouse-FITC	200	VIR-FITC	IVD C €0344
CMV Control slides	CMV pp65 positive and negative cytopots	set of 5	VIR-CMV CS05	IVD C €0344



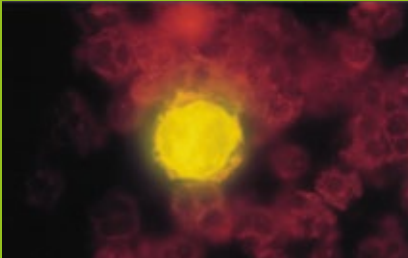


Figure 1



Human peripheral blood leukocytes from a patient with an active CMV infection, stained with the **cmv Brite™ Turbo** antigenemia Kit. Immunofluorescence staining of CMV pp65 antigen positive polymorphonuclear cells. Negative cells are counterstained (red) with Evans Blue.

Figure 2



Control slide with the **cmv Brite™ Turbo kit** showing green immunofluorescence staining of a CMV pp65 antigen positive cell. The negative cells are normal human leukocytes counterstained with Evans Blue.



IQ Products

Rozenburglaan 13a

9727 DL Groningen

Netherlands

Tel: +31 (0) 50 5757 000

Fax: +31 (0) 50 5757 002

Email: [marketing@iqproducts.nl](mailto:marketing@iqproducts.nl)

[www.iqproducts.nl](http://www.iqproducts.nl)