



CMV Brite™ Turbo Kit

*Rapid CMV pp65 Antigenemia for the
detection of active CMV infection*

REF¹⁰ VIR-CMV 110 **REF** VIR-CMV 110 BDC

IVD CE 0344 **IVD** 510(k) #991650

 110 tests  package insert

Basic UDI-DI: 87179530223VIR-CMVZC

Barcode GS1 (GTIN): 8717953022301

INTERNATIONAL PACKAGE INSERT ELLINIKÁ- ESPAÑOL- ITALIANO

Ελληνικά		3
Español		6
Italiano		9

CMV Brite™ Turbo Kit

Ταχεία Αντιγοναιμία CMV pp65 για την ανίχνευση ενεργούς μόλυνσης CMV

 VIR-CMV110  110 Τεστ  CE 0344
 VIR-CMV 110 BDC  110 Τεστ  510(k) #991650

Επιδιωκόμενη χρήση

Το CMV Brite™ Turbo Kit αποσκοπεί σε ταχύ μη αυτοματοποιημένο ποιοτικό εντοπισμό της πρωτεΐνης χαμηλότερης μεσοκυττάριας ουσίας pp65 CMV μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού, με τη χρήση μικροσκοπίου σε απομονωμένα περιφερικά λευκά αιμοσφαίρια τα οποία έχουν ληφθεί από αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) ή ηπαρίνη αντιπηκτικού ανθρώπινου περιφερικού αίματος. Η ανίχνευση του CMV pp65 σε κύτταρα ανθρώπινου περιφερικού αίματος βοηθά στη διάγνωση της οξείας CMV λοίμωξης ή επανενεργοποίησης.

Περιληψη και επεξήγηση

Οι μολύνσεις με ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (CMV), έναν ιό έρπης ΜΣ, είναι ευρύτατα διαδεδομένες σε ολόκληρο τον κόσμο (ποσοστό επιπολασμού 40-100%). Αν και μια μόλυνση με CMV προοδεύει χωρίς συμπτώματα στην πλειονότητα των ατόμων με ανοσοεπάρκεια, δύναται να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα ή σε περίπτωση που δεν έχει ακόμα αναπτυχθεί πλήρως (ηπατίτιδα, φλεγμονή του αμφιβληστροειδούς, πνευμονία κτλ.). Ο CMV είναι το συχνότερο παθογόνο εκ γενετής μολύνσεων. Περίπου το 10% των παιδιών με εκ γενετής μόλυνση CMV εμφανίζουν συμπτώματα κατά τη γέννηση (ίκτερο, ηπατοσπληνομεγαλία, πετέχεια αιμορραγία και χοριοαμφιβληστροειδίτιδα). Περαιτέρω ομάδες ασθενών στις οποίες μια οξεία μόλυνση CMV αποτελεί σοβαρή απειλή είναι οι λήπτες οργάνων και μοσχευμάτων μυελού των οστών, καθώς επίσης ασθενείς AIDS. Η ανάλυση αντιγοναιμίας CMV έχει αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας κοκτέιλ δυο μονοκλωνικών αντισωμάτων (C10/C11) τα οποία κατευθύνονται εναντίον της pp65 [2]. Η ανάλυση αντιγοναιμίας CMV είναι πολύτιμη στη διάγνωση ενεργούς μόλυνσης CMV. Το κέλυφος των φαιλιδίων καλλιέργειας παρέχουν αποτέλεσμα εντός 1 με 2 ημερών, ωστόσο δεν είναι ευαίσθητα για εντοπισμό CMV σε δείγματα αίματος. Σε αντίθεση, ο εντοπισμός αντιγόνου CMV σε κύτταρα (αντιγοναιμία CMV) πολυμορφονύκρηνου περιφερικού αίματος (PMN) είναι αμφοτέρω ευαίσθητος και ταχύτατος [1, 2]. Η παρούσα τεχνική χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα για να εντοπίσει τις φωσφοροπρωτεΐδες χαμηλότερης μεσοκυττάριας ουσίας (pp65), ένα πρώιμο αντιγόνο αντιγραφής ιού, το οποίο υπάρχει σε αφθονία σε θετικά αντιγόνα PMN [2-5]. Η ανάλυση του CMV Brite Turbo δύναται να ολοκληρωθεί εντός 2 ωρών συλλογής δείγματος.

Αρχή του τεστ - εξέταση ανοσοφθορισμού -

Η μέθοδος CMV Brite™ Turbo αποτελείται από:

- Απευθείας λύση των περιφερικών ερυθρών αιμοσφαιρίων
- Προετοιμασία των κυτταροφυγόκεντρων πλακιδίων
- Καθήλωση και διαπερατότητα
- Έμμεση χρώση ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα, κατευθυνόμενα εναντίον της πρωτεΐνης CMV pp65.
- Ανάγνωση και εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Το πρώτο βήμα στη μέθοδο CMV Brite™ Turbo περιλαμβάνει απευθείας λύση των περιφερικών ερυθρών αιμοσφαιρίων [6]. Μετά τη λύση, τα λευκοκύτταρα κυτταροφυγοκεντρίζονται επάνω σε ένα πλακίδιο, καθοδηγούμενα και με διαπερατότητα, ώστε να επιτρέψει παρεπόμενο εντοπισμό του αντιγόνου pp65. Η παρουσία της pp65 εντοπίζεται από το κοκτέιλ αντισωμάτων C10/C11 και απεικονίζεται μέσω ενός συγκεκριμένου, δευτερεύοντος αντισώματος FITC. Τα λευκοκύτταρα θετικών αντιγόνων CMV παρουσιάζουν ομοιογενή κίτρινη-πράσινη πολυλοβωτή πυρηνική χρώση όταν εξετάζονται με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Ο αριθμός θετικών αντιγόνων κυττάρων CMV καταμετρείται ανά διπλότυπη χρώση.

Το kit περιέχει

Αντιδραστήριο A (10x)	Διάλυμα λύσης ερυθρού αιμοσφαίριου - Διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου, αζίδιο νατρίου < 0,1%. Συμπύκνωση: αραιώση 1:10 με απομεταλλωμένο νερό	200 ml
Αντιδραστήριο B (5x)	Στερεωτικό διάλυμα - φορμαλδεΰδη σε PBS, αζίδιο νατρίου < 0,1%. Συμπύκνωση: αραιώση 1:5 με PBS	290 ml
Αντιδραστήριο Γ (5x)	Διάλυμα διαπερατότητας - Igepal Ca-630, ορός εμβρύου μάχου σε PBS, αζίδιο νατρίου < 0,1%, Συμπύκνωση: αραιώση 1: 5 με PBS	290 ml
Αντιδραστήριο Δ	Μονοκλωνικό αντίσωμα (ποντίκι), Μίγμα C10/C11 (IgG1/IgG1) ενάντια στην πρωτεΐνη χαμηλότερης μεσοκυττάριας ουσίας pp65. αζίδιο νατρίου < 0,1% (Έτοιμο προς χρήση)	4 ml
Αντιδραστήριο E	συζευγμένο με FITC αμνός αντί-ποντίκι νοσοσφαιρίνες με Evans Blue, αζίδιο νατρίου < 0,1%). (Έτοιμο προς χρήση)	4 ml
Πλακίδιο Ελέγχου	πλακίδια μικροσκοπίου για έλεγχο αντιγοναιμίας CMV. Πλακίδιο ελέγχου σε σφραγισμένο θύλακο με αποξηραντικό. (Έτοιμο προς χρήση)	5 x 1

Απαραίτητο εργαστηριακό υλικό που δεν περιλαμβάνεται στο Kit

Εργαστηριακή φυγόκεντρος. Σωλήνες φυγόκεντρου κωνικής βάσης 50 ml. Αποστειρωμένες προχοίδες, μικροπροχοίδες και άκρα. Φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS), pH 7,4, χωρίς Ca, Mg. Αιμοσφαιρίομετρο ή αυτοματοποιημένος μετρητής κυττάρων. Κυτταροφυγόκεντρα πλακίδια. Κυτταροφυγόκεντρος (όπως της Shandon Southern Products, Ltd., μοντέλο Κυτταροφυγόκεντρου 3). Δοχεία Coplin ή δοχεία ιστολογικής χρώσης. Υγρός θάλαμος. Θερμοκοιτίδα 37 °C. Μικροσκόπιο φθορισμού με δυνατότητα μεγέθυνσης από 250x έως 1000x. Μέσο προετοιμασίας πλακιδίου για μελέτη (μη φθορισμού, όπως το CITI FLUOR, διάλυμα Γλυκερόλης PBS, UKC Chem Lab, ή Μέσο Προετοιμασίας Πλακιδίου για Μελέτη Immunoconcept, Κατάλογος # 111). Καλύπτρα Αναθυμιάσεων, Μικρό γυάλινο κάλυμμα. Χρονόμετρο/ Χρονοδιακόπτης.

Προειδοποίηση και προληπτικά μέτρα

- Μην ενσωματώνετε τα αντιδραστήρια. Αποφύγετε την επαφή με τους οφθαλμούς και το δέρμα. Όλα τα δείγματα και τα υλικά που χρησιμοποιούνται για το τεστ θα πρέπει να τυγχάνουν μεταχείρισης όπως εάν ήταν μολυσματικά, λαμβάνοντας κατάλληλα προληπτικά μέτρα ασφαλείας. Κατά την προετοιμασία των Πλακιδίων Ελέγχου CMV Brite™ Turbo, έχουν χρησιμοποιηθεί λευκά αιμοσφαίρια τα οποία λήφθηκαν από υγιή δότη αίματος. Όλα τα δείγματα των δωρητών έχουν εξεταστεί και έχουν βρεθεί μη αντιδραστικά στην παρουσία αντισωμάτων σε HIV-1, HIV-2, HCV και CMV, καθώς επίσης για HBsAg.
- Μη χρησιμοποιείτε την προχοίδα με το στόμα. Σύμφωνα με τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές, φοράτε γάντια, εργαστηριακό χιτώνα και γυαλιά ασφαλείας. Υγρά και μη εύφλεκτα υλικά θα πρέπει να απολυμαίνονται με υποχλωριωδές νάτριο (τελική συμπύκνωση: 3%, χρόνος δράσης τουλάχιστον 30 λεπτά). Τα υγρά απόβλητα τα οποία περιέχουν οξέα θα πρέπει να εξουδετερώνονται προτού απορριφθούν. Όλα τα υλικά που πρόκειται να επαναχρησιμοποιηθούν θα πρέπει να αποστειρώνονται σε κλίβανο για 1 ώρα στους 121 °C.
- Το Αντιδραστήριο B περιέχει φορμαλδεΰδη σε ποσοστό μικρότερο του 9.3 %. Η φορμαλδεΰδη αποτελεί εξαιρετικά τοξικό αλλεργιογόνο και ενδεχομένως καρκινογόνο αντιδραστήριο, το οποίο θα πρέπει να τυγχάνει χειρισμού σύμφωνα με τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές, λαμβάνοντας κατάλληλα προληπτικά μέτρα. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα ή τους οφθαλμούς. Για λεπτομερείς πληροφορίες, ανατρέξτε στο Δελτίο Δεδομένων Ασφαλείας στη διεύθυνση: www.iqproducts.nl.
- Το τεστ πραγματοποιείται υπό ασηπτικές και μικροβιολογικά ελεγχμένες συνθήκες. Παρακαλούμε όπως επικοινωνήσετε με τον κατασκευαστή σε περίπτωση φθοράς του αρχικού τεστ kit.

Ρυθμιστικό καθεστώς

Προς το παρόν, το kit CMV Brite™ Turbo έχει καταχωριστεί ως «ιατροτεχνολογική συσκευή διάγνωσης in vitro» στην Αυστραλία, τη Βραζιλία, το Περού, τη Σαουδική Αραβία, τη Σιγκαπούρη, τη Νότια Κορέα, τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και στις χώρες που ανήκουν στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα. Σε όλες τις άλλες χώρες θα πρέπει να φέρει την ένδειξη «μόνο για ερευνητική χρήση». Το προϊόν αυτό δεν έχει εγκριθεί από για χρήση σε δοκιμές (π.χ. έλεγχο) σε δότες αίματος ή πλάσματος.

Αποθήκευση

Κατά την παραλαβή, αποθηκεύστε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία 2-8 °C. Αποφύγετε την άμεση επαφή με το φως του ηλίου. Τα αντιδραστήρια που αποθηκεύονται σύμφωνα με τις παρούσες οδηγίες αποθήκευσης είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην επικετα. Για επαναλαμβανόμενα τεστ, αποθηκεύστε τα αντιδραστήρια αμέσως μετά από κάθε χρήση σε θερμοκρασία 2-8 °C.

Επεξεργασία του δείγματος αίματος

Συλλέξτε περίπου 3 έως 5 ml φλεβικού αίματος σε σωλήνα συλλογής EDTA, χρησιμοποιώντας ασηπτική φλεβοπαράκνηση. Αποστείλετε το δείγμα στο εργαστήριο χωρίς καθυστέρηση. Το δείγμα αίματος πρέπει να διατηρηθεί σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) μέχρι την επεξεργασία του. Η επεξεργασία πρέπει να λάβει χώρα εντός 6 με 8 ωρών από τη συλλογή του δείγματος, καθώς έχει αποδειχθεί ότι κατόπιν αποθήκευσης παρουσιάζεται μείωση των θετικών αντιγόνων κυττάρων (συλλογή σε ηπαρίνη) [7-8, 11]. Συνεπώς, θα πρέπει να επιχειρείται πάντα άμεση προετοιμασία των πλακιδίων. Σε ασθενείς με σοβαρή ουδετεροπενία (τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα είναι λιγότερα από 200/mm³) απαιτούνται τουλάχιστον 10 ml αίματος. Σε περίπτωση που τα δείγματα πρόκειται να μεταφερθούν, θα πρέπει να συσκευαστούν σύμφωνα με τις νομικές προϋποθέσεις περί μεταφοράς μολυσματικών υλικών.

Διαδικασία Τεστ

Το πρωτόκολλο πρέπει να τηρηθεί κατά γράμμα. Εκτός και υπάρξει διαφορετική δήλωση, τα αντιδραστήρια (συμπεριλαμβανομένου του PBS) θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου όταν χρησιμοποιούνται στη διαδικασία του τεστ. Η θερμοκρασία δωματίου ορίζεται στους 20-25 °C. Αφήστε τις πλάκες ελέγχου να εξισορροπηθούν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από το άνοιγμα.

I. Προετοιμασία ελαιωρήματος λευκών αιμοσφαιρίων

- Αραίωση Αντιδραστήριου A 1:10 σε απομεταλλωμένο (απεσταγμένο) νερό και αφήστε το να κρυσταλλώσει σε θερμοκρασία 2-8 °C.
- Αναμίξτε 2 ml αίματος με 30 ml κρύου (2-8 °C) αραιωμένου διαλύματος λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων σε σωλήνα κωνικής βάσης 50 ml και επώστε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 2 - 8 °C.
- Φυγοκεντρώστε για 2 λεπτά σε 1000xg (2500 rpm). Απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό.
- Επαναλάβετε το βήμα κρύας λύσης σε περίπτωση που η λύση ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν είναι επαρκής μετά την πρώτη φορά.

- Ενωιρήστε εκ νέου το σβώλο κυττάρου σε 30 ml PBS
- Φυγοκεντρήστε για 2 λεπτά σε 1000xg (2500 rpm). Απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό.
- Ενωιρήστε εκ νέου το σβώλο σε 1 ml PBS. (Σε ασθενείς με σοβαρή ουδετεροπενία, ενδέχεται να απαιτείται εκ νέου ενωιρήση σε μόλις 0,2 ml).

II. Καταμέτρηση κυττάρων

- Καταμέτρηση κυττάρων χρησιμοποιώντας αιμοσφαιριόμετρο ή αυτοματοποιημένο μετρητή κυττάρων.
- Προσαρμόστε τη συμπύκνωση σε $2,0 \times 10^6$ κύτταρα/ml με αραιώση σε PBS.

III. Προετοιμασία κυτταροφυγόκεντρων πλακιδίων

- Φυγοκεντρήστε 100 μ l του ενωιρήματος $2,0 \times 10^6$ κύτταρα/ml σε περίπου 600 rpm (54x g) για 4 λεπτά σε γυάλινα πλακίδια με κυτταροφυγόκεντρο.
- Προετοιμάστε τουλάχιστον 3 πλακίδια ανά δείγμα ασθενούς (2 για εξέταση και ένα πρόσθετο πλακίδιο για εφεδρικό).
- Αφήστε τα πλακίδια να στεγνώσουν για περίπου 5 λεπτά.
- Κυκλώστε την περιοχή των κυττάρων επάνω στο πλακίδιο χρησιμοποιώντας εργαστηριακό μαρκαδόρο.
- Τα πλακίδια δύνανται να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύχτας πριν την καθήλωση.

IV. Καθήλωση και διαπερατότητα

- Αραίωση του μονιμοποιητικού (αντιδραστήριο B) 1: 5 σε PBS σε καλύπτρα αναθυμιάσεων πριν τη χρήση.
 - Αραίωση του διαλύματος διαπερατότητας (αντιδραστήριο Γ) 1: 5 σε PBS σε καλύπτρα αναθυμιάσεων πριν τη χρήση. (Μην επαναχρησιμοποιείτε).
 - Βυθίστε 2 πλακίδια σε αραιωμένο αντιδραστήριο B για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στην καλύπτρα αναθυμιάσεων.
 - Εμβυθίστε τα πλακίδια 3 φορές σε PBS (διάλυμα πλύσης) και αφήστε τα στο διάλυμα πλύσης για 3 λεπτά.
 - Βυθίστε τα πλακίδια σε αραιωμένο αντιδραστήριο Γ για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Εμβυθίστε τα πλακίδια 3 φορές σε διάλυμα πλύσης και τοποθετήστε τα σε καθαρό διάλυμα πλύσης για 5 λεπτά (ή για όσο χρόνο επιθυμείτε μέχρι 60 λεπτά). Σε περίπτωση που η χρώση με μονοκλωνικό αντίσωμα πρέπει να ακολουθήσει απευθείας, τότε προχωρήστε το βήμα V.
- Αποθήκευση πλακιδίων:**
Εάν τα πλακίδια πρόκειται να αποθηκευτούν, ξεπλύνετε τα με απομεταλλωμένο (απεσταγμένο) νερό για 15 δευτερόλεπτα. Αφήστε τα πλακίδια να στεγνώσουν κάτω από τη συσκευή αερισμού για περίπου 20 λεπτά. Μόλις στεγνώσουν, τα πλακίδια πρέπει να συσκευαστούν σε φύλλο αλουμινίου και να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία 2-8 °C για 24 ώρες, ή να ψυχθούν στους -80 °C.

V. Χρώση ανοσοφθορισμού

- Από αυτό το σημείο και έπειτα, μην επιτρέψετε στα παρασκευάσματα κυττάρων να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια του υπολοίπου της διαδικασίας χρώσης.
- Πλακίδιο Ελέγχου CMV Brite™ Turbo. Ενωδατώστε εκ νέου το πλακίδιο ελέγχου σε PBS για 1 ή 2 λεπτά.
- Αφαιρέστε ένα πλακίδιο τη φορά από το διάλυμα πλύσης και στεγνώστε προσεκτικά την περιοχή που περιβάλλει το σημείο του κυττάρου.
- Τοποθετήστε 35 μ l διαλύματος C10/C11 MoAb (αντιδραστήριο Δ) και επωάστε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 37 °C σε υγρό θάλαμο.
- Εμβυθίστε τα πλακίδια 3 φορές σε διάλυμα PBS και τοποθετήστε τα σε νέο διάλυμα πλύσης για 3 λεπτά.
- Αφαιρέστε ένα πλακίδιο τη φορά από το διάλυμα πλύσης και στεγνώστε προσεκτικά την περιοχή που περιβάλλει το σημείο του κυττάρου.
- Τοποθετήστε 35 μ l συζεύκτη (αντιδραστήριο Ε) και επωάστε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 37 °C σε υγρό θάλαμο.
- Πλύνετε το δυο φορές σε νέο PBS και ξεπλύνετε το προσεκτικά με νερό βρύσης (3 φορές) και τοποθετήστε το με μέσο προετοιμασίας πλακιδίου για μελέτη και μικρό γυάλινο κάλυμμα.

VI. Ανάγνωση

Πραγματοποιήστε ανάγνωση το συντομότερο δυνατόν. Τα πλακίδια δύνανται να αποθηκευτούν μέχρι και 8 ώρες σε θερμοκρασία 2-8 °C, καλυμμένα καλά, προς ελαχιστοποίηση του ξεθωριάσματος. Εκτελέστε μικροσκοπική αξιολόγηση χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 400x. Δύνανται να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη μεγέθυνση 1000x για αύξηση της ανάλυσης. (Ανατρέξτε στο σημείωμα συστάσεων για μικροσκόπια και κύβους φθορισμού στο "Εργαστηριακό υλικό και εξοπλισμός"). Ανιχνεύστε ολόκληρη την επιφάνεια του σημείου. Ανά ασθενή θα πρέπει να ανιχνεύονται δυο σημεία. Τα θετικά κύτταρα παρουσιάζουν κίτρινη-πράσινη πολυλοβωτή πυρηνική χρώση. Τα αρνητικά κύτταρα δεν παρουσιάζουν κίτρινη-πράσινη πυρηνική χρώση.

Σε σπάνιες περιπτώσεις (λιγότερο από 5%) ενδέχεται να προκύψουν διαφορετικές αναγνώσεις λόγω τεχνητών προϊόντων. Το πιο συχνό τεχνητό προϊόν οφείλεται σε ηωσινόφιλα. Αναγνωρίζονται από μη συγκεκριμένη κυτταροπλασματική χρώση, με σφαιροειδή εμφάνιση σαν μαύρες οπές, συχνά σε σχήμα διόπτρας. Το κυτταροπλασμα ενδέχεται να είναι θαμπό και πιο κίτρινο. Σε περίπτωση που κάποια κύτταρα είναι πράσινα, είναι ένδειξη τεχνητού προϊόντος, το οποίο ενδέχεται να σχετίζεται με κάποιους τύπους ασθενών και είναι εξαιρετικά σπάνιο. Η πράσινη χρώση των κυττάρων μόνο στην περιφέρεια του σημείου δεν θεωρείται θετική. Αυτό ενδέχεται να συμβεί σε περίπτωση που το σημείο έχει αρχίσει να στεγνώνει κατά τη

διάρκεια της επώασης, είτε με διάλυμα μονοκλωνικού αντισώματος είτε με διάλυμα σύζευξης. Πραγματοποιήστε επώαση σε υγρό θάλαμο και βεβαιωθείτε ότι ολόκληρο το σημείο του κυττάρου καλύπτεται από το αντιδραστήριο. Σε περίπτωση που τα πλακίδια δεν είναι επιδεκτικά ερμηνείας λόγω τεχνητών προϊόντων, πραγματοποιήστε χρώση στο εφεδρικό πλακίδιο(α) ή σε περίπτωση που δεν λύνεται το πρόβλημα, πραγματοποιήστε λήψη και εξετάστε ένα πρόσθετο δείγμα.

Έλεγχος Ποιότητας

Τα θετικά (σταθερά CMV πρωτεΐνη κατώτερης μήτρας pp65 αντιγόνο-θετικά κύτταρα αναμειγμένα με αντιγονοαρνητικά λευκοκύτταρα) και αρνητικά (σταθερά λευκοκύτταρα αρνητικά στο αντιγόνο CMV) πλακίδια ελέγχου παρέχονται με το κιτ. Τα πλακίδια χρησιμοποιούνται μόνο για τον έλεγχο της διαδικασίας χρώσης και δεν επηρεάζουν τη διαγνωστική αξία του κιτ. Θα πρέπει να γίνεται έλεγχος του θετικού μάρτυρα κατά τη διάρκεια της χρώσης, πριν την αξιολόγηση των δειγμάτων των ασθενών. Ο θετικός μάρτυρας θα πρέπει να επιδείξει ομοιογενή κίτρινο-πράσινη χρώση θετικών κυττάρων με στρογγυλή μορφολογία (ο πυρήνας δεν είναι ορατός). Ο αρνητικός μάρτυρας θα πρέπει να δείχνει κίτρινη-πράσινη χρώση. Παρά το γεγονός ότι οι διαδικασίες μπορεί να ακολουθούνται αυστηρά, ένα θετικό κύτταρο θα μπορούσε να παρατηρηθεί στον αρνητικό μάρτυρα. Σε τέτοιες περιπτώσεις η χρώση δεν πρέπει να θεωρείται άκυρη. Τα θετικά κύτταρα στον αρνητικό μάρτυρα, δε δείχνουν πως το πλακίδιο του ασθενούς δεν μπορεί να αξιολογηθεί.

Επιλογή μικροσκοπίου

Η επιλογή του σωστού κύβου φίλτρου, ο οποίος ταιριάζει στη φθορίζουσα ένωση που χρησιμοποιείται ως χρωστική, είναι σημαντική. Διαφέρει για κάθε κατασκευαστή μικροσκοπίων. Επιλέξτε το σωστό συνδυασμό για χρήση FITC, όπως το μικροσκόπιο Olympus BX-40 ή BX-60 με: Κύβο φθορισμού (U-MNB), Μήκος κύματος διέγερσης (470-490 nm), Μήκος κύματος εκπομπής (> 515 nm).

Ανάγνωση και ερμηνεία αποτελέσματος

Τα αποτελέσματα αξιολόγησης πλακιδίων δειγμάτων ασθενών είναι ποιοτικά. **Θετικό αποτέλεσμα:** ένα ή περισσότερα θετικά αντιγόνα κύτταρα CMV ανά διπλότυπη χρώση. **Αρνητικό αποτέλεσμα:** κανένα θετικό αντιγόνο κύτταρο CMV ανά διπλότυπη χρώση. Για να θεωρηθεί ότι ένα αποτέλεσμα είναι αρνητικό, απαιτείται παρούσα τουλάχιστον 50.000 δειγμάτων κυττάρων, κατά προσέγγιση. Σε περίπτωση που προκύψουν διαφορούμενες αναγνώσεις λόγω τεχνητών προϊόντων σε αμφότερα τα διπλότυπα χρώσης, τα αποτελέσματα δεν πρέπει να ερμηνευθούν. Πραγματοποιήστε χρώση στα εφεδρικά πλακίδια ή λάβετε και εξετάστε ένα πρόσθετο δείγμα ασθενούς.

Περιορισμοί της διαδικασίας

Εντοπισμός χαμηλότερης μεσοκυττάριας ουσίας CMV pp65, πρόωρης δομικής πρωτεΐνης πρέπει να εκτελεστεί από εργαστήρια τα οποία διαθέτουν εμπειρία σε ανοσοκυτταροχημικές τεχνικές.

Η προετοιμασία λευκών αιμοσφαιρίων πρέπει να εκτελείται από προσωπικό με εμπειρία σε αseptικές τεχνικές. Η αποτελεσματικότητα του CMV Brite™ Turbo Kit με δείγματα διαφορετικά από λευκά αιμοσφαίρια ανθρώπινου αίματος δεν έχει εξακριβωθεί. Τα χαρακτηριστικά της απόδοσης του τεστ έχουν εξακριβωθεί χρησιμοποιώντας το CMV Brite™ Kit (δείγματα EDTA και ηπαρίνης) και έχει αξιολογηθεί σε εσωτερικές μελέτες χρησιμοποιώντας το CMV Brite™ Turbo Kit (μόνο δείγματα EDTA). Το CMV Brite™ Turbo Kit προορίζεται μόνο για χρήση σε μικροσκόπηση ανοσοφθορισμού και όχι για χρήση με ροή κυτταρομετρίας. Ο τύπος και η κατάσταση των οργάνων που χρησιμοποιούνται θα επηρεάσουν την οπτική εμφάνιση της εικόνας που λαμβάνεται. Η αντίδραση ενδέχεται να διαφέρει λόγω του τύπου μικροσκοπίου που χρησιμοποιείται, της πηγής φωτός, της ηλικίας της λυχνίας, της συναρμογής του φίλτρου και του πάχους του φίλτρου, τις διαφορές στην ευαισθησία του υποστρώματος του αντιγόνου ή τη διαδικασία ανάλυσης που χρησιμοποιείται. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθιερώσει δικά του κριτήρια για την ανάγνωση των δειγμάτων ασθενών, χρησιμοποιώντας κατάλληλους ελέγχους. Ο εντοπισμός και η επιβεβαίωση χαμηλότερης μεσοκυττάριας ουσίας CMV pp65, πρόωρη δομική πρωτεΐνη σε λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος δεν αποτελεί διάγνωση συμπτωμάτων συγκεκριμένης νόσου, καθώς το CMV pp65 δύνανται να υπάρχει για μεγάλη χρονική περίοδο μετά από οξεία μόλυνση και οι ασθενείς με αντιγοναιμία CMV (ιδιαιτέρα χαμηλά επίπεδα) να νοσούν χωρίς συμπτώματα. Υπάρχει πλήθος δημοσιευμένων αναφορών για ασθενείς οι οποίοι είναι αρνητικοί στην αντιγοναιμία και θετικοί στην ιαμία, και μέρος των συγκεκριμένων ασθενών ενδέχεται να έχει τη νόσο CMV. Συνεπώς, ένα αρνητικό τεστ αντιγοναιμίας δεν αποκλείει απολύτως το ενδεχόμενο μόλυνσης ή νόσου CMV. Το CMV Brite™ Turbo Kit δεν προορίζεται για παρακολούθηση αντιβιοτικών φαρμάκων. Τα χαρακτηριστικά της απόδοσης του τεστ δεν έχουν εξακριβωθεί χρησιμοποιώντας νεογνικά δείγματα. Ενδέχεται να σημειωθεί μείωση θετικών αντιγόνων κυττάρων (συλλογή σε ηπαρίνη) ανά πλακίδιο μετά την αποθήκευση [7-8, 11]. Συνεπώς, θα πρέπει να επιχειρείται πάντα άμεση προετοιμασία των πλακιδίων. Ο μέγιστος χρόνος αποθήκευσης των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου δεν έχει καθοριστεί. Σε ασθενείς με σοβαρή ουδετεροπενία (τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα είναι λιγότερα από 200/mm³) απαιτούνται τουλάχιστον 10 ml αίματος.

Καθώς τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν προετοιμαστεί χρησιμοποιώντας πρωτότυπο στέλεχος, δεν δύνανται να εντοπιστούν όλες οι περιπτώσεις αντιγοναιμίας ή νέα στελέχη CMV. Για παράδειγμα, τα μονοκλωνικά αντισώματα ενδέχεται να μην εντοπίσουν στελέχη CMV τα οποία έχουν υποστεί ελάσσονες αλλαγές αμινοξέων στην επίτοπη περιοχή στόχου. Τα χαρακτηριστικά της απόδοσης του τεστ δεν έχουν εξακριβωθεί χρησιμοποιώντας δείγματα που συλλέχθηκαν σε ηπαρίνη.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Το CMV Brite™ Kit συγκρίθηκε με τον εντοπισμό ιού CMV σε συμβατικό περιβάλλον (CC και κέλυφος φιαλιδίων καλλιέργειας) (SV

χρησιμοποιώντας ανθρώπινα λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος. Εξετάστηκαν 300 κλινικά δείγματα σε σύγκριση με συμβατικό περιβάλλον (CC) και κέλυφος φιαλιδίων καλλιέργειας (SV) [9]. Συνολικά, συγκεντρώθηκαν 300 δείγματα φλεβικού αίματος από λήπτες μοσχευμάτων (159 αλλογενετικού μυελού των οστών και 47 οργάνων), 85 ασθενείς φορείς HIV/AIDS και 9 ανοσοεπαρκείς ασθενείς. 92 δείγματα (30,7%) εξακριβώθηκε ότι ήταν θετικά σε CMV με το CMV Brite™ Kit. Σε τυχαίους πληθυσμούς δωρητών αίματος, ο αριθμός δειγμάτων που βρέθηκαν επαναλαμβανόμενα αντιδραστικοί σε αντιγοναιμία CMV από CMV Brite™ Kit είναι συνήθως 0%. Σημείωση: Τα χαρακτηριστικά απόδοσης έχουν εξακριβωθεί χρησιμοποιώντας το CMV Brite™ Kit και έχουν αξιολογηθεί σε εσωτερικές μελέτες χρησιμοποιώντας το CMV Brite™ Turbo Kit.

Σύγκριση του CMV Brite™ Kit με CC και SV

	CMV Brite Kit		
	+	-	σύνολο
CC/SV	31	3	34
+	61	205	266
-	92	208	300

Ευσαιθησία: 31/34 = 91,2% (95% CI = 81.4 έως 100%)
Ειδικότητα: 205/266 = 77,1% (95% CI = 71.9 έως 82.2%)

Η απόδοση του CMV Brite™ Turbo Kit αξιολογήθηκε σε μελέτη 183 δειγμάτων ασθενών. Τα δείγματα ασθενών περιελάμβαναν 173 ασθενείς με μεταμόσχευση οργάνων, 9 ανοσοεπαρκείς ασθενείς και 1 δείγμα ασθενούς φορέα HIV. Κάθε ασθενής εξετάστηκε παράλληλα με το CMV Brite™ και το CMV Brite™ Turbo Kit. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης αξιολόγησης παρατίθενται στον κάτωθι πίνακα.

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

Ευσαιθησία: 43/49 = 87.8% (95% CI = 78.4 έως 97.1%)
Ειδικότητα: 127/134 = 94.8% (95% CI = 90.9 έως 98.6%)

Διασταυρούμενη δραστηριότητα

Για την ανάλυση της διασταυρούμενης δραστηριότητας, εξετάστηκαν οι κλινικοί διαχωρισμοί των ακόλουθων ιών: Ιός έρπης τύπος 1 και τύπος 2, ιός Ανεμευλογιάς ζωστήρα, Αδενοϊός 2, 4 και 5, Παραγριπικός ιός 1, 2 και 3, Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός, ιός της Πολιομυελίτιδας 3 (άγριος τύπος 3), εντεροϊός Echo 11, εντεροϊός Echo 30, ιός Epstein-Barr (εργαστηριακό στέλεχος P3HR1), ιός ανθρώπινου έρπη τύπος 6 (εργαστηριακό στέλεχος GS), Ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας (τύπος 1 εμπορικά διαθέσιμα πλακίδια IF). Δεν εντοπίστηκε διασταυρούμενη δραστηριότητα, εκτός από μια ασθενή θετική αντίδραση σε έξι από τους επτά διαχωρισμούς HSV-1 στο κέλυφος φιαλιδίου ανάλυσης. Η ασθενής χρώση που παρατηρήθηκε στους έξι διαχωρισμούς HSV-1 ήταν κυτταροπλασματική (δηλαδή, ορατή μόνο εκτός του πυρήνα, σε περιορισμένο αριθμό μικρών εστιών), παρόμοια με το πρότυπο IF που εντοπίζεται συνήθως σε μονοκλωνικά αντισώματα HSV-1. Η ασθενής χρώση που παρατηρήθηκε ενδέχεται να οφείλεται στους υποδοχείς Fc, οι οποίοι συμβολίζονται από τα μολυσμένα κύτταρα HSV-1 στο κέλυφος φιαλιδίου ανάλυσης. Παρεπόμενη ανάλυση αποφάνθηκε ότι δεν υπάρχουν αποδείξεις διασταυρούμενης δραστηριότητας μεταξύ της ανάλυσης αντιγοναιμίας HSV και CMV, χρησιμοποιώντας το κοκτέιλ μονοκλωνικών αντισωμάτων C10/C11.

Βιβλιογραφία

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Ho, S.K.N., Lo, C-Y., Cheng, I.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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. ISO 15223-1:2021 Ιατρικές συσκευές – Σύμβολα που πρέπει να χρησιμοποιούνται με τις πληροφορίες που πρέπει να παρέχονται από τον

κατασκευαστή - Μέρος 1: Γενικές απαιτήσεις.Niubò, J., Pérez, J.L., Carvajal, A., Ardanuy, C. and Martín, R. (1994). Effect of delayed processing of blood samples on performance of cytomegalovirus antigenemia assay. J.Clin.Microbiology **32**, 1119-1120.

11. ISO 15223-1:2021/Amd 1:2025 Medical devices - Symbols to be used with information to be supplied by the manufacturer - Part 1: General requirements - Amendment 1: Addition of defined term for authorized representative and modified EC REP symbol to not be country or region specific.

Επεξήγηση των συμβόλων που χρησιμοποιούνται^{10,12}

	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Αριθμός καταλόγου
	Επαρκές για
	ιατροτεχνολογικό βοήθημα που χρησιμοποιείται για διάγνωση in vitro
	Προσοχή
	Κρατήστε το μακριά από ηλιακή ακτινοβολία
	Βιολογικοί κίνδυνοι
	Περιορισμοί θερμοκρασίας (°C)
	Μόνο για ερευνητική χρήση
	Κωδικός Παρτίδας
	Χρήση μέχρι yyyy-mm-dd
	Κατασκευαστής
	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα

Στοιχεία επικοινωνίας

IQ Products BV
www.iqproducts.nl

Rozenburglaan 13a
9727 DL Groningen
The Netherlands
T +31 (0)50 5757000
marketing@iqproducts.nl

©2026 - IQ Products BV. Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται. Κανένα από τα τμήματα των έργων αυτών δεν μπορεί να αναπαραχθεί σε οποιαδήποτε μορφή χωρίς δικαιώματα.

CMV Brite™ Turbo Kit

Rapid CMV pp65 Antigenemia para la detección de infección activa de CMV

REF VIR-CMV 110 110 Pruebas IVD CE 0344
 REF VIR-CMV 110 BDC 110 Pruebas IVD 510(k) #991650

Uso intencionado

El CMV Brite™ Turbo Kit sirve para la detección rápida no automatizada cualitativa de la proteína pp65 de matriz baja virus citomegalo humano (CMV) por inmunofluorescencia indirecta utilizando un microscopio en leucocitos aislados de sangre periférica obtenida de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) o sangre humana periférica anti coagulada de heparina. La detección de CMV pp65 en células sanguíneas periféricas humanas ayuda en el diagnóstico de la infección aguda o reactivada por CMV.

Resumen y explicación

Las infecciones con el virus citomegalo humano (CMV), un virus herpes β están extendidas en todo el mundo (velocidad de prevalencia 40-100%). Mientras una infección con CMV continua asintóticamente en la mayoría de las personas inmuno-competentes, puede llevar a complicaciones graves en personas cuyo sistema inmunológico está debilitado o no está totalmente desarrollado (hepatitis, retinitis, neumonía etc). MV es el patógeno más frecuente de las infecciones congénitas. Alrededor del 10% de los niños infectados congénitamente con CMV demuestran síntomas al nacer (íctero, hepatosplenomegalia, sangramiento petequiaco y coriorretinitis). Otros grupos de pacientes para los que la infección grave de CMV representa una seria amenaza son los pacientes con un trasplante de órgano o de médula y los enfermos de SIDA. El ensayo de antigenemia CMV se ha desarrollado utilizando una mezcla de dos anticuerpo monoclonales (C10/C11) dirigidos contra pp65 [2]. El ensayo de antigenemia CMV es valioso en el diagnóstico de una infección con CMV activo. Los cultivos en probetas proporcionan resultado en 1 o dos días, pero no son sensibles a la detección de CMV en especímenes sanguíneos. Por el contrario, la detección de antígeno CMV en células polimorfonucleares en sangre periférica (antigenemia CMV) es precisa a la vez que rápida [1,2]. Esta técnica utiliza anticuerpos monoclonales para detectar la fosfoproteína (pp65) de matriz baja CMV, un antígeno temprano en replicación de virus, que suele abundar en antígeno positivo PMNs [2-5]. El ensayo CMV Brite Turbo se puede completar con dos horas de toma de muestras.

Principio de la prueba: prueba inmunofluorescente

El método CMV Brite™ consiste en:

- Lisamiento directo de los eritrocitos de la sangre periférica
- Preparación de las láminas citocentrífugas
- Fijación y permeabilización
- Tintado inmunofluorescente indirecto utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína pp65 de CMV.
- Lectura y evaluación de los resultados

El primer paso en el método CMV Brite™ Turbo implica el lisamiento directo de los eritrocitos de la sangre periférica [6]. Después del lisamiento los leucocitos se citocentrifugan en una lámina, se fijan y permeabilizan para poder detectar a continuación el antígeno pp65. La presencia del pp65 se detecta por la mezcla de los anticuerpos C10/C11 y se visualiza por medio de un determinado anticuerpo secundario etiquetado FITC. Los leucocitos antígeno positivos de CMV muestran un tinto homogéneo amarillo-verdoso de núcleo polilobato cuando se observan utilizando un microscopio fluorescente. El número de células de antígeno positivo CMV se cuenta por tinte duplicado.

El kit contiene

Reactivo A (10x)	Solución para lisar eritrocito - Solución de clorido amónico, azida de sodio < 0,1%. Concentrado: diluir 1:10 con agua desmineralizada.	200 ml
Reactivo B (5x)	Solución fijadora - formaldehído en PBS, azida de sodio < 0,1%. Concentrado: diluir 1:5 con PBS	290 ml
Reactivo C (5x)	Solución permeabilizadora - Igepal Ca-630, suero de ternero recién nacido en PBS azida de sodio < 0,1%. Concentrado: diluir 1:5 con PBS	290 ml
Reactivo D	Anticuerpo monoclonal (ratón) - Mezcla de C10/C11 (IgG1/IgG1) contra proteína pp65 de matriz baja, azida de sodio < 0,1% (Lista para su uso)	4 ml
Reactivo E	Anticuerpo de oveja inmunoglobulinas - de ratón conjugadas en FITC con Evans Blue, azida de sodio < 0,1%. (Lista para su uso)	4 ml
Lámina de control	Láminas de microscopio para control de antigenemia CMV. Lámina de control en una bolsa sellada con desecante. (Lista para su uso)	5 x 1

Material de laboratorio necesario y no incluido en el Kit

Centrifugadora de laboratorio; tubos de 50 ml cónicos; pipetas esterilizadas, micropipetas y puntas; solución salina de fosfato tamponado (PBS), pH 7,4, Ca, Mg libre; hemocitómetro o contador celular automático, láminas citocentrífugas; Citocentrifugadora (como la Shandon Southern Products SRL, modelo Cytospin 3);

Jarras de Coplin o jarras de tintado histológico; Cámara húmeda; incubadora de 37 °C; microscopio fluorescente con una capacidad de aumento de entre 250x a 1000x; Medio de montaje (no fluorescente, como CITI FLUOR, solución de glicerol PBS, Laboratorio Químico UKC; o medio de montaje de inmunocemento, catálogo # 111), campana de aire; Cristal de cubierta de microscopio; Cronómetro.

Advertencia y precauciones

- No incorpore reactivos. Evite el contacto con los ojos y la piel. Todas las muestras y materiales para las pruebas tienen que ser tratados como sustancias potencialmente infecciosas y se deben tomar las medidas de seguridad apropiadas. En la preparación de las láminas de control CMV Brite™ Turbo, se han usado leucocitos de sangre humana de un donante sano. Cada muestra de donante ha sido probada y se ha constatado que no es reactiva a la presencia de los anticuerpos de HIV-1, HIV-2, HCV y CMV así como de HbsAg.
- No utilice la pipeta con la boca. Siguiendo una buena práctica de laboratorio lleve guantes, bata de laboratorio y gafas protectoras. Hay que descontaminar los materiales líquidos e inflamables con hipoclorito de sodio (concentración final: 3%, tiempo de actividad cada 30 minutos). Hay que neutralizar los residuos líquidos que contengan ácidos antes de desecharlos. Hay que meter en el autoclave todos los materiales que se vuelvan a utilizar durante 1 hora a 121 °C.
- Reactivo B contiene menos del 9.3% de formaldehído. El formaldehído es un reactivo altamente tóxico-alérgico y potencialmente cancerígeno, y por lo tanto tiene que ser tratado de acuerdo con una buena práctica de laboratorio utilizando las medidas de seguridad convenientes. Evite el contacto con la piel o los ojos. Para obtener información detallada, consulte la ficha de datos de seguridad en: www.iqproducts.nl.
- Las pruebas se realizan en condiciones asépticas y de control microbiológico. Por favor contacte con el fabricante si el kit de prueba original está dañado.

Estado administrativo

En este momento, el CMV Brite™ Turbo Kit está registrado como "dispositivo médico de diagnóstico in vitro" en Australia, Brasil, Perú, Arabia Saudita, Singapur, Corea del Sur, Estados Unidos de América y los países pertenecientes a la Comunidad Europea. En todos los otros países debe ser etiquetado "se utilice sólo para la investigación". Este producto no está aprobado para su uso en las pruebas (por ejemplo, el chequeo) de los donantes de sangre o plasma.

Almacenamiento

Guarde los reactivos a 2-8 °C al recibirlos. Evite la exposición directa al sol. Los reactivos almacenados de acuerdo a las instrucciones de almacenamiento son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Para repetidas pruebas almacene los reactivos inmediatamente después de usarlos a 2-8 °C.

Procesamiento de la muestra de sangre

Recoja entre 3 y 5 ml de sangre venosa en un tubo tratado con EDTA, utilizando una extracción venosa aséptica. Envíe la muestra al laboratorio inmediatamente. La muestra de sangre tiene que guardarse a temperatura ambiente (20-25 °C) hasta su procesamiento. Se tiene que efectuar el procesamiento en un tiempo de entre 6 u 8 horas tras la extracción de sangre ya que está demostrado que hay una disminución de las células positivas antígenas (en heparina) después de su almacenamiento [7-8, 11]. Por lo tanto se tiene que intentar siempre la preparación inmediata de las láminas. En pacientes con neutropenia grave (con una cantidad absoluta de neutrófilos de menos de 200/mm³) se necesitan al menos 10 ml de sangre. Si hay que transportar las muestras hay que empaquetarlas de acuerdo con las exigencias legales para el transporte de material infeccioso.

Procedimiento de la prueba

Hay que seguir el protocolo al pie de la letra.

A no ser que se diga explícitamente los reactivos (incluido el PBS) tienen que estar a temperatura ambiente cuando se utilicen en el procedimiento de prueba. La temperatura ambiente se define como de 20 a 25 °C. Deje que los portaobjetos de control alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlos.

I. Preparación de la suspensión de leucocitos

- Disuelva el reactivo A 1:10 en agua desmineralizada (destilada) y deje que se enfrie hasta 4 °C.
- Mezcle 2 ml de sangre con 30 ml de solución de lisamiento eritrocito diluida fría (2-8 °C) en un tubo cónico de 50 ml e incúbelo durante 5 minutos a 2-8 °C.
- Centrifúguela durante 2 minutos a 1000xg (2500 rpm). Retire el sobrenadante.
- Repita el paso de lisamiento en frío si el lisamiento de los eritrocitos no es suficiente después de la primera vez.
- Vuelva a suspender la tableta de la célula en 30 ml de PBS
- Centrifúguela durante 2 minutos a 1000xg (2500 rpm). Retire el sobrenadante.
- Vuelva a suspender la tableta de la célula en 1 ml de PBS. (En pacientes con una neutropenia grave puede que sea necesario volver a suspender en una mezcla de 0,2 ml).

II. Cuenta de las células

- La cuenta de las células utilizando un hemocitómetro o contador celular automático.
- Ajuste la concentración a 2,0 x10⁶ células/ml diluyéndola en PBS.

III. Preparación de las láminas citocentrífugas

- Centrifugue 100 µl del 2,0 x 10⁶ células por suspensión en milímetros a alrededor de 600 rpm (54 xg) durante 4 minutos contra las láminas de cristal por medio de un citocentrífugo.
- Prepare al menos 3 láminas por espécimen de paciente (2 para prueba más una extra de reserva).
- Deje que las láminas se sequen durante 5 minutos.
- Haga un círculo alrededor del área de la célula utilizando un rotulador de laboratorio.
- Se pueden almacenar las láminas a temperatura ambiente por la noche antes de fijarlas.

IV. Fijación y permeabilización

- Diluya el fijador (reactivo B) en 1:5 de PBS en un campana de aire antes de utilizarlo.
- Diluya la solución permeabilizadora (reactivo C) en 1:5 de PBS en una campana de aire antes de utilizarlo. (No vuelva a utilizarlo).
- Sumerja 2 láminas en el reactivo diluido B durante 5 minutos a temperatura ambiente en la campana de aire.
- Sumerja las láminas 3 veces en una solución de lavado PBS y déjelas en esta solución durante tres minutos.
- Sumerja las láminas en el reactivo diluido C durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Sumerja las láminas 3 veces en la solución de lavado y colóquelas en una solución de lavado recién preparada durante cinco minutos (o cualquier tiempo hasta 60 minutos). Si se consigue el tinto con anticuerpo monoclonal inmediatamente vaya al punto V.

Para almacenar las láminas:

Si se guardan las láminas limpiélas en agua desmineralizada (destilada) durante 15 segundos. Deje que las láminas se sequen bajo el ventilador durante aproximadamente 20 minutos. Una vez que estén secas, se deberían envolver en papel de aluminio y guardarlas a 2-8 °C durante 24 horas, o congelarlas a -80 °C.

V. Tintado inmunofluorescente

- A partir de este punto, no permita que las preparaciones de las células se sequen durante el resto del procedimiento de tintado.
- Lámina de control CMV Brite™ Turbo. Vuelva a hidratar la lámina de control en PBS durante 1 ó 2 minutos.
- Retire cada lámina una a una de la solución de limpieza, seque con cuidado la zona alrededor del punto de la célula.
- Aplique 35 µl de solución Mab C10/C11 (reactivo D) e incúbela durante 20 minutos en una cámara húmeda a 37 °C.
- Sumerja las láminas 3 veces en la solución de lavado (PBS) y colóquelas en una solución de lavado recién preparada durante 3 minutos.
- Retire cada lámina una a una de la solución de limpieza, seque con cuidado la zona alrededor del punto de la célula.
- Aplique 35 µl de conjugado (reactivo E) e incúbela durante 20 minutos en una cámara húmeda a 37 °C.
- Lávelo dos veces en una solución PBS recién preparada y enjuáguelo con cuidado con agua del grifo (3 veces). Móntelo con medio de montaje y un cristal de cubierta para microscopio.

VI. Lectura

Efectúe la lectura tan pronto como sea posible. Las láminas se pueden guardar hasta 8 horas a 2-8 °C y se pueden ajustar las tapas para minimizar que se disuelvan. Efectúe una evaluación microscópica utilizando un microscopio inmunofluorescente con un aumento de 400 x. Para aumentar la resolución se puede utilizar un aumento mayor de 1000x. (Consulte la nota sobre recomendaciones para microscopios y cubos fluorescentes en la sección "Material de laboratorio y equipo"). Recorra con la vista toda la superficie del punto. Hay que mirar dos puntos por paciente. Las células positivas muestran un tinto homogéneo nuclear polilobato amarillo verdoso. Las células negativas no muestran un tinto amarillo verdoso. Las lecturas erróneas debido a artefactos ocurren muy raramente (menos del 5%).

El artefacto más común es debido a eosinófilo. Se reconocen por un tinto citoplasmático no específico, con el núcleo con apariencia de agujero negro y normalmente con forma de gafas. El citoplasma puede aparecer apagado y más amarillo. Si todas las células son verdes, esto indica un artefacto, que puede estar asociado con algunos tipos de pacientes y es muy raro.

Un tinto verdoso de las células periféricas del punto solo no está considerado como positivo. Esto puede ocurrir si el punto ha empezado a secarse durante la incubación ya sea con la solución de anticuerpo monoclonal o con la solución conjugada.

Esté seguro de incubar en una cámara húmeda y compruebe que el punto de la célula está cubierto en su totalidad con el reactivo. Si las láminas no se pueden interpretar debido a una lectura errónea de los artefactos, tinte las láminas de reserva y si el resultado no es claro vuelva a probar con un espécimen extra.

Control de calidad

Las Láminas de control positivo (células positivas al antígeno pp65 de la proteína de la matriz inferior del CMV fijadas mezcladas con leucocitos negativos al antígeno) y negativo (leucocitos negativos al antígeno CMV fijados) se proporcionan con el kit. Las Láminas se utilizan únicamente para comprobar el procedimiento de tinción y no influyen en el valor diagnóstico del kit. El control positivo debe demostrar una tinción apropiada antes de que puedan ser evaluadas las muestras de pacientes. El control positivo debería mostrar una tinción homogénea amarillo-verdosa de células positivas con morfología redonda (de núcleo no visible). El control negativo no debería mostrar tinción amarillo-verdosa. A pesar del hecho de que los procedimientos de calidad son estrictamente seguidos, podrían

observarse células positivas individuales en el control negativo. En tales casos, la prueba de tinción **no** debería ser considerada inválida. Las células positivas individuales en el control negativo no significan que la placa con el material del paciente no pueda ser interpretada.

Elección de microscopio

Es importante la selección de la configuración correcta para el filtro adecuado de cubo que debe compaginarse con el fluorocromo que se utilice. Esto puede variar según el fabricante del microscopio. Seleccione la combinación correcta para uso de FITC, como el microscopio Olympus BX-40 o BX-60 con: Cubo fluorescente (U-MNB), longitud de ondas de excitación (470-490 nm), emisión de la longitud de ondas (> 515 nm).

Lectura y evaluación del resultado

Los resultados de la evaluación de las láminas con espécimen del paciente son cualitativas. **Resultado positivo:** una o más células con antígeno positivo CMV por mancha duplicada. **Resultado negativo:** ninguna célula con antígeno positivo CMV por mancha duplicada. Hacen falta un mínimo de alrededor de 50.000 células del espécimen para determinar que el resultado es negativo. Si se hace una lectura equívoca debido a artefactos en ambas manchas duplicadas, no se deben interpretar los resultados. Aplique tinte en las láminas de reserva o vuelva a obtener y probar un espécimen extra del paciente.

Limitaciones del procedimiento

Se debe efectuar la detección de la pp65 de matriz baja CMV, proteína estructural temprana en laboratorios con experiencia en técnicas inmunocitoquímicas.

La preparación de los leucocitos tiene que llevarla a cabo personal experimentado en técnicas asépticas. No se ha establecido la eficacia del CMV Brite™ Turbo Kit con otras muestras diferentes a los leucocitos de sangre humana. Las características de la realización de la prueba se han establecido usando el Kit CMV Brite™ (especímenes EDTA y heparina) y se ha validado en estudios internos utilizando únicamente el Kit the CMV Brite™ Turbo (únicamente especímenes EDTA). El Kit the CMV Brite™ Turbo es para uso exclusivo con microscopio inmunofluorescente y no para uso con citometría de flujo. El tipo y la condición del instrumental utilizado influirá la apariencia visual de la imagen obtenida. La reacción puede variar debido al tipo de microscopio empleado, la fuente de luz, tiempo de la bombilla, ensamblaje y grosor del filtro, diferencias en sensibilidad del sustrato del antígeno o el procedimiento de ensayo utilizado. Cada laboratorio tiene que establecer su propio criterio para la lectura de los especímenes del paciente utilizando los controles adecuados. La detección y confirmación de la pp65 de matriz baja CMV, proteína estructural temprana en leucocitos de sangre periférica no es un diagnóstico de una enfermedad sintomática, ya que la pp65 CMV puede estar presente durante un periodo tras una infección aguda y los pacientes con antigenemia CMV (especialmente con niveles bajos) pueden presentar una enfermedad asintomática. Hay muchos informes publicados de pacientes con una antigenemia negativa y viremia positiva y algunos de estos pacientes pueden tener la enfermedad CMV. Por lo tanto una prueba de antigenemia negativa no excluye totalmente una infección o enfermedad CMV. El Kit CMV Brite™ Turbo no es para el seguimiento de medicación antiviral. No se han establecido las características de la actuación de la prueba utilizando especímenes de neonatos. Se puede apreciar una disminución de las células positivas de antígeno (recogidas en heparina) por lámina después de su almacenamiento [7-8, 11]. Por lo tanto se tiene que intentar siempre la preparación inmediata de las láminas. No se ha determinado el tiempo de almacenamiento máximo del espécimen a temperatura ambiente. En pacientes con neutropenia grave (con una cantidad absoluta de neutrófilos de menos de 200/mm³) se necesitan al menos 10 ml de sangre. Ya que los anticuerpos monoclonales se han preparado utilizando un prototipo puede que no detecten todos los antigenemas y secuencias de CMV. Por ejemplo puede que los anticuerpos monoclonales no detecten que las secuencias de CMV hayan sufrido unos cambios menores en los amino ácidos en la región epítopo. No se han establecido las características de la actuación de la prueba utilizando especímenes en heparina.

Características de la actuación

El Kit CMV Brite™ se ha comparado con el detectar el virus CMV en un cultivo convencional (CC) y cultivo de probeta utilizando leucocitos de sangre periférica humana [9]. Se evaluaron 300 muestras clínicas en comparación con un cultivo convencional (CC) y cultivo de probeta. Se recogió un total de 300 muestras de sangre venosa de pacientes con trasplante (159 de médula alogénea y 47 con órgano sólido) 85 con virus del sida/pacientes del SIDA y 9 pacientes inmunocompetentes. 92 muestras (30,7%) dieron un resultado positivo CMV con el CMV Brite™ Kit. En poblaciones de donantes de sangre arbitrarias el número de especímenes que reaccionaban repentinamente al antigenemia CMV con el CMV Brite™ Kit CMV ha sido de 0%. Nota: Las características de la realización de la prueba se han establecido usando el Kit CMV Brite™ y se ha validado en estudios internos utilizando únicamente el Kit the CMV Brite™ Turbo.

Comparación del CMV Brite™ Kit con el Cultivo convencional y el Cultivo de probeta

Cultivo convencional/probeta	CMV Brite Kit		
	+	-	total
+	31	3	34
-	61	205	266
total	92	208	300

Sensibilidad: 31/34 = 91.2% (95% CI = 81.4 to 100%)

Especialidad: 205/266 = 77.1% (95% CI = 71.9 to 82.2%)

Se validó la actuación del CMV Brite™ Turbo Kit en un estudio de muestras de 183 pacientes. Las muestras de cada paciente incluían muestras de 173 pacientes con transplante de órganos, 9 pacientes inmunocompetentes y 1 paciente del virus del sida. Se realizaron pruebas en paralelo de cada paciente con los Kits CMV Brite™ t CMV Brite™ Turbo. Los resultados de este estudio de validación aparecen en la siguiente tabla.

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

Sensibilidad: $43/49 = 87.8\%$ (95% CI = 78.4 to 97.1%)

Especialidad: $127/134 = 94.8\%$ (95% CI = 90.9 to 98.6%)

Reactividad cruzada

Para el análisis de la reactividad cruzada, se probaron aislados clínicos de los siguientes virus: Herpes tipo 1 y 2, Varicella-Zoster, Adenovirus 2, 4 y 5, Parainfluenza 1, 2 y 3, Virus respiratorio sincitial, Virus de la polio 3 (tipo salvaje 3), ecovirus 11, ecovirus 30, virus de Epstein-Barr (secuencia de laboratorio P3HR1), Virus de herpes humana tipo 6 (secuencia de laboratorio GS), Virus de inmunodeficiencia humana (ti po 1, en venta en láminas IF). No se observó ninguna reactividad cruzada excepto por una reacción positiva débil con seis o siete aislados HSV-1 en el ensayo en probeta. El tintado débil observado con los seis aislados HSV-1 era citoplasmático (es decir que se veían solamente fuera del núcleo en un número limitado de pequeños focos), similar al esquema IF que normalmente se encuentra en anticuerpos monoclonales HSV-1. El leve tintado observado puede ser debido a receptores Fc que se expresan a través de las células infectadas HSV-1 en el ensayo de probeta. Se concluyó después de análisis posteriores que no había evidencia de reactividad cruzada entre HSV y el ensayo de antigenemia CMV utilizando la mezcla de anticuerpo monoclonal C10/C11.

Bibliografía

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ho, S.K.N., Lo, C-Y., Cheng, I.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.
- 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.
- 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.
- 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.
- NEN EN ISO 15223-1 Dispositivos médicos - Símbolos que se utilizarán con etiquetas de dispositivos médicos, el etiquetado y la información a suministrar - Parte 1: Requisitos generales.
- Niubò, J., Pérez, J.L., Carvajal, A., Ardanuy, C. and Martín, R. (1994). Effect of delayed processing of blood samples on performance of cytomegalovirus antigenemia assay. J.Clin.Microbiology 32, 1119-1120.
- ISO 15223-1:2021/Amd 1:2025 Medical devices - Symbols to be used with information to be supplied by the manufacturer - Part 1: General requirements - Amendment 1: Addition of defined term for authorized representative and modified EC REP symbol to not be country or region specific.

Explicación de los símbolos usados^{10,12}

	Consulte las instrucciones de uso
	Número de catálogo
	Suficiente para
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Atención, ver instrucciones de uso
	Mantener fuera de la luz (solar)
	Riesgos biológicos
	Límite de temperatura (°C)
	Para uso exclusivo en investigación
	Código de lote
	Fecha de caducidad
	Fabricante
	Representante autorizado en la Comunidad

Información del contacto

IQ Products BV

www.iqproducts.nl

Rozenburglaan 13a
9727 DL Groningen
The Netherlands
T +31 (0)50 5757000
marketing@iqproducts.nl

© 2026 - IQ Products bv. Reservados todos los derechos. Ninguna parte de estas obras pueden ser reproducidas en ninguna forma sin permisos.

CMV Brite™ Turbo Kit

Antigenemia per pp65 CMV rapida per l'individuazione di infezione da CMV attiva

[REF] VIR-CMV110 ▼ 110 Test [IVD] C€ 0344
 [REF] VIR-CMV 110 BDC ▼ 110 Test [IVD] 510(k) #991650

Uso previsto

Il CMV Brite™ Turbo Kit è inteso per la rapida e non automatizzata individuazione qualitativa della proteina di matrice inferiore pp65 del citomegalovirus umano (CMV) tramite immunofluorescenza diretta, utilizzando la microscopia in leucociti isolati di sangue periferico ottenuti da sangue periferico anticoagulato con EDTA (acido etilendiaminetetracetico) o con eparina. La determinazione della proteina pp65 del CMV nelle cellule del sangue periferico umano aiuta nella diagnosi di infezione acuta o riattivata dal CMV.

Sintesi e spiegazione

Le infezioni da citomegalovirus umano (CMV), un virus β -herpes, sono ampiamente diffuse in tutto il mondo (tasso di prevalenza 40-100%). Mentre un'infezione da CMV procede senza sintomi nella maggioranza dei soggetti immunocompetenti, può portare a serie complicazioni in soggetti il cui sistema immunitario sia indebolito o non ancora completamente sviluppato (epatiti, reniti, pneumonia, etc.). Il CMV è l'agente patogeno più frequente di infezioni congenite. Circa il 10% di bambini con infezione congenita da CMV mostrano sintomi alla nascita (ittero, epatosplenomegalia, emorragia petecchiale e corioretinite). Altri gruppi di pazienti per cui un'infezione acuta da CMV rappresenta una grave minaccia sono i trapiantati di organi e midollo osseo e pazienti affetti da AIDS. Il test dell'antigenemia per CMV è stato sviluppato utilizzando un mix di due anticorpi monoclonali (C10/C11) diretti contro i pp65 [2]. Le analisi di antigenemia per CMV sono preziose nella diagnosi di un'infezione attiva da CMV. Le "shell vial culture" offrono un risultato entro 1-2 giorni, ma non sono sensibili all'individuazione di CMV in campioni di sangue. Al contrario, l'individuazione di antigene di CMV in cellule polimorfonucleari (PMN) di sangue periferico (antigenemia per CMV) è sensibile e rapida [1, 2]. La tecnica utilizza anticorpi monoclonali per individuare la fosfoproteina (pp65) di matrice inferiore del CMV, un antigene in replicazione virale abbondantemente presente nei PMN antigeni positivi [2-5]. Il test CMV Brite Turbo può essere eseguito in 2 ore di raccolta campioni.

Principio del test – test di immunofluorescenza -

Il metodo CMV Brite™ Turbo consta di:

- lisi diretta di eritrociti di sangue periferico
- preparazione di vetrini cytospin
- fissazione e permeabilizzazione
- colorazione immunofluorescente indiretta utilizzando anticorpi monoclonali diretti contro la proteina pp65 del CMV.
- lettura e valutazione dei risultati

La prima fase del metodo CMV Brite™ Turbo contempla la lisi diretta degli eritrociti di sangue periferico [6]. Dopo la lisi, i leucociti vengono centrifugati in un vetrino, fissati e permeabilizzati per consentire la successiva individuazione dell'antigene pp65. La presenza di pp65 è rilevata dal mix di anticorpi C10/C11 e visualizzata per mezzo di uno specifico anticorpo secondario marcato con FITC. I leucociti con antigene positivo del CMV mostrano una colorazione nucleare polilobata giallo-verde se osservati con un microscopio a fluorescenza. Il numero di cellule antigeni positive del CMV è calcolato per colorazione doppia.

Il kit contiene

Reagente A (10x)	Soluzione lisante per eritrociti - soluzione al cloruro di ammonio, sodio azide < 0,1%. Concentrata: diluire 1:10 con acqua demineralizzata	200 ml
	 AVVERTIMENTO	
Reagente B (5x)	Soluzione fissativa - formaldeide in PBS, sodio azide < 0,1%) Concentrata: diluire 1:5 con PBS.	290 ml
	 AVVERTIMENTO	
Reagente C (5x)	Soluzione di permeabilizzazione - Igepal Ca-630, siero di vitello neonato in PBS, sodio azide < 0,1%). Concentrata: diluire 1:5 con PBS	290 ml
	 AVVERTIMENTO	
Reagente D	Anticorpo monoclonale (topo), mix di C10/C11 (IgG1/IgG1) contro proteina a matrice inferiore pp65, sodio azide < 0,1% (pronto per l'uso)	4 ml
Reagente E	Immunoglobuline anti-mouse sviluppate in pecora marcate con FITC con blu di Evans, sodio azide < 0,1% (pronto per l'uso)	4 ml
Vetrino di controllo	Vetrino da microscopio di controllo dell'antigenemia per CMV. Il vetrino di controllo è in una bustina sigillata con dessiccante. (pronto per l'uso)	5 x 1

Materiale di laboratorio necessario e non in dotazione con il kit

Centrifuga da laboratorio; provette da centrifuga a fondo conico da 50 ml; pipette sterili, micropipette e punte; soluzione salina di tampone fosfato (PBS), pH 7,4, senza Ca e Mg; emocitometro o contatore automatico di cellule; vetrini da citocentrifuga; citocentrifuga (ad es. il modello Cytospin 3 di Shandon Southern Products, Ltd.); vaschetta di Coplin o vaschetta per colorazione istologica; camera umida; incubatore a 37 °C; microscopio a fluorescenza con capacità di magnificazione a 250x fino a 1000x;

strumento di supporto (non fluorescente, ad es. CITI FLUOR, soluzione PBS al glicerolo, UKC Chem Lab; o Immunoconcp Mounting medium, numero di catalogo 111); cappa per fumi; vetri copri oggetto; orologio a stop/timer.

Avvertimenti e precauzioni

- Non incorporare i reagenti. Evitare il contatto con gli occhi e la pelle. Tutti i campioni e materiali usati per il test andranno trattati come materiali potenzialmente infettivi e dovranno essere adottate adeguate misure di sicurezza. Nella preparazione dei vetrini di controllo CMV Brite™ Turbo, i leucociti utilizzati sono stati ottenuti da donatore di sangue umano sano. Ogni campione del donatore è stato testato e riscontrato non reattivo alla presenza di anticorpi HIV-1, HIV-2, HCV e CMV, oltre che HbsAg.
- Non aspirare alla pipetta con la bocca. Come da corretta pratica di laboratorio, indossare guanti, tuta da laboratorio e occhiali protettivi. I liquidi e i materiali non combustibili dovranno essere decontaminati con ipocloruro di sodio (concentrazione finale: 3%, tempo di azione almeno 30 minuti). I rifiuti liquidi contenenti acidi dovranno essere neutralizzati prima di essere smaltiti. Tutti i materiali riutilizzabili dovranno essere trattati in autoclave per 1 ora a 121 °C.
- Reagente B contiene meno del 9.3% di formaldeide. Il formaldeide è un allergenico altamente tossico e un reagente potenzialmente cancerogeno da trattare secondo le corrette procedure di laboratorio, adottando adeguate precauzioni. Evitare il contatto con pelle o occhi. Per informazioni dettagliate consultare la scheda di sicurezza su: www.iqproducts.nl.
- Il test sarà eseguito da un operatore di laboratorio autorizzato e competente. Il test sarà eseguito in condizioni asettiche e microbiologicamente controllate. Rivolgersi al produttore se il kit originale è danneggiato.

Stato normativo

Attualmente, il CMV Brite™ Turbo Kit è registrato come "dispositivo medico diagnostico in vitro" in Australia, Brasile, Perù, Arabia Saudita, Singapore, Corea del Sud, Stati Uniti d'America e nei paesi appartenenti alla Comunità Europea. In tutti gli altri paesi dovrebbe essere etichettato "solo per uso di ricerca". Questo prodotto non è approvato per il test di screening di sangue o plasma dei donatori.

Conservazione

Al momento della consegna, conservare i reagenti a 2-8 °C. Evitare l'esposizione diretta alla luce solare. I reagenti conservati conformemente alle istruzioni rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Per test ripetuti, conservare i reagenti immediatamente dopo l'uso a 2-8 °C.

Elaborazione del campione di sangue

Raccogliere 3-5 ml di sangue venoso in una provetta trattata con EDTA tramite prelievo venoso asettico. Inviare immediatamente il campione al laboratorio. Il campione di sangue dovrà essere conservato a temperatura ambiente (20-25 °C) fino all'elaborazione. L'elaborazione dovrà essere eseguita entro 6-8 ore dalla raccolta del campione in quanto è stato dimostrato che dopo la conservazione può essere riscontrato un calo delle cellule antigeni positive (raccolte in eparina) [7-8, 11]. Pertanto, si dovrà sempre eseguire la preparazione immediata dei vetrini. In pazienti affetti da neutropenia grave (conteggio dei neutrofili assoluti inferiore a 200/mm³) sono necessari almeno 10 ml di sangue. Se è necessario trasportare i campioni, imballarli in conformità con le norme legislative in materia di trasporto di materiali infettivi.

Procedura del test

Il protocollo sarà seguito scrupolosamente. A meno che diversamente indicato, i reagenti (PBS compreso) dovranno essere a temperatura ambiente quando vengono utilizzati per il test. La temperatura ambiente è di 20-25 °C. Lasciare che i vetrini di controllo raggiungano la temperatura ambiente prima dell'apertura.

I. Preparazione della sospensione di leucociti

- Diluire il reagente A con rapporto 1:10 in acqua demineralizzata (distillata) e lasciar raffreddare a 4 °C.
- Mescolare 2 ml di sangue con 30 ml di soluzione lisante per eritrociti diluita fredda (2-8 °C) in una provetta a fondo conico da 50 ml e incubare per 5 minuti a 2-8 °C.
- Centrifugare per 2 minuti a 1000xg (2500 g/m). Rimuovere il surnatante.
- Ripetere il passaggio della lisi a freddo se la lisi degli eritrociti non è sufficiente dopo il primo ciclo.
- Sospendere nuovamente il pellet di cellule in 30 ml di PBS.
- Centrifugare per 2 minuti a 1000xg (2500 g/m). Rimuovere il surnatante.
- Sospendere nuovamente il pellet in 1 ml di PBS (in pazienti affetti da neutropenia grave potrebbe essere necessaria la risospensione in 0,2 ml).

II. Conta delle cellule

- Contare le cellule con un emocitometro o un contatore automatico di cellule.
- Regolare la concentrazione a 2.0 x 10⁶ cellule/ml diluendo con PBS.

III. Preparazione dei vetrini per citocentrifuga

- Centrifugare 100 µl della sospensione 2.0 x 10⁶ cellule/ml a ca. 600 g/m (54x g) per 4 minuti tramite citocentrifuga.
- Preparare almeno 3 vetrini per campione di paziente (2 per il test ed un vetrino supplementare di riserva).
- Lasciar asciugare i vetrini per circa 5 minuti.

- Circondare l'area delle cellule sul vetrino utilizzando un pennarello da laboratorio.
- I vetrini possono essere lasciati una notte a temperatura ambiente prima di procedere con la fissazione.

IV. Fissazione e permeabilizzazione

- Diluire il fissante (reagente B) con PBS 1: 5 in una cappa per fumi, prima dell'uso.
- Diluire la soluzione permeabilizzante (reagente C) con PBS 1: 5 in una cappa per fumi, prima dell'uso (non riutilizzare).
- Immergere 2 vetrini nel reagente B diluito per 5 minuti a temperatura ambiente nella cappa per fumi.
- Bagnare i vetrini 3 volte in PBS (soluzione di lavaggio) e lasciarli nella soluzione di lavaggio per 3 minuti.
- Immergere i vetrini nel reagente C diluito per 1 minuto a temperatura ambiente.
- Bagnare i vetrini 3 volte nella soluzione di lavaggio e metterli nella soluzione di lavaggio fresca per 5 minuti (o ogni volta fino a 60 minuti). Se la colorazione con anticorpi monoclonali va eseguita direttamente, procedere al passo V.

Per conservare i vetrini

Se i vetrini vanno conservati, sciacquarli in acqua demineralizzata (distillata) per 15 secondi. Lasciar asciugare i vetrini sotto il ventilatore per circa 20 minuti. Una volta asciutti, i vetrini potranno essere avvolti in pellicola d'alluminio e conservati a 2-8 °C per 24 ore, o congelati a -80 °C.

V. Colorazione immunofluorescente

- Da questo momento, non lasciar asciugare le preparazioni cellulari nel corso della procedura di colorazione.
- Vetrino di controllo CMV Brite™ Turbo. Reidratare il vetrino di controllo in PBS per 1 o 2 minuti.
- Rimuovere un vetrino alla volta dalla soluzione di lavaggio e asciugare con cura l'area che circonda lo spot di cellule.
- Applicare 35 µl di soluzione di MoAb C10/C11 (reagente D), incubare a 37 °C per 20 minuti in una camera umida.
- Bagnare i vetrini 3 volte in PBS (soluzione di lavaggio) e metterli nella soluzione di lavaggio fresca per 3 minuti.
- Rimuovere un vetrino alla volta dalla soluzione di lavaggio e asciugare con cura l'area che circonda lo spot di cellule.
- Applicare 35 µl di coniugato (reagente E), incubare a 37 °C per 20 minuti in una camera umida.
- Lavare due volte in PBS fresco e sciacquare con cura con acqua di rubinetto (3 volte); montare con strumento di supporto e vetro copri oggetto.

VI. Lettura

Procedere alla lettura appena possibile. I vetrini possono essere conservati fino a 8 ore a 2-8 °C purché accuratamente coperti per ridurre al minimo la perdita di colore. Eseguire la valutazione microscopica utilizzando un microscopio a immunofluorescenza con magnificazione a 400x. Una magnificazione maggiore (1000x) può essere utilizzata per aumentare la risoluzione (cfr. nota di raccomandazione per il microscopio e il cubo di fluorescenza alla voce "Materiale e attrezzature di laboratorio"). Analizzare l'intera superficie dello spot. Possono essere analizzati due spot per paziente. Le cellule positive presentano una colorazione nucleare poliolobata omogenea giallo-verde. Le cellule negative non presentano alcuna colorazione nucleare giallo-verde. Eventuali errori di lettura in seguito a artefatti sono rari (meno del 5%).

L'artefatto più comune è dovuto a eosinofili, riconoscibili da una colorazione citoplasmatica non specifica, con il nucleo che appare un buco nero, spesso a forma di occhiali. Il citoplasma può apparire opaco e più giallo. La colorazione verdastra di tutte le cellule indica un artefatto, forse associato ad alcuni tipi di paziente e molto raro.

La colorazione verdastra delle cellule solo alla periferia dello spot non è considerata positiva. Può verificarsi se lo spot ha iniziato ad asciugarsi durante l'incubazione con la soluzione di anticorpi monoclonali o la soluzione coniugata.

Accertarsi di incubare in una camera umida e verificare che l'intero spot di cellule sia coperto di reagente.

Se i vetrini non sono interpretabili a causa di letture ambigue o artefatti, sottoporre a colorazione il/i vetrino/i di riserva o, se l'azione non risultasse risolutiva, richiedere e testare un campione supplementare.

Controllo di qualità

I vetrini di controllo positivo (cellule positive all'antigene pp65 della proteina della matrice inferiore del CMV fissate mescolate con leucociti negativi all'antigene) e negativo (leucociti negativi per l'antigene CMV fisso) vengono forniti con il kit. (Le diapositive) I vetrini vengono utilizzati solo per controllare la procedura di colorazione e non influenzano il valore diagnostico del kit. Il controllo positivo (deve) dovrebbe mostrare una colorazione appropriata prima (di) che i campioni dei pazienti (può essere) vengano valutati. Il controllo positivo deve presentare colorazione omogenea giallo-verde per le cellule positive con morfologia rotondeggiante (round) (il nucleo non è visibile). Il controllo negativo non (deve) dovrebbe mostrare alcuna colorazione giallo-verde.

Nonostante che la qualità della procedura sia strettamente seguita (il fatto che le procedure di qualità sono seguite strettamente), singole cellule positive potrebbero essere osservate nel controllo negativo. In questi casi il ciclo di colorazione non dovrebbe essere considerato non valido. Le singole cellule positive sul controllo negativo non significa che (la slitta) il vetrino con il materiale del paziente non (può) possa essere interpretato.

Scelta del microscopio

Selezionare la giusta configurazione del cubo filtro che coincida con il fluorocromo in uso è molto importante e può variare per ciascun produttore di microscopio. Selezionare la giusta combinazione per uso con FITC, ad es. il microscopio Olympus BX-40 o BX-60 con: cubo fluorescente (U-MNB), lunghezza d'onda di eccitazione (470-490 nm), lunghezza d'onda di emissione (> 515 nm).

Letture e interpretazione del risultato

I risultati di valutazione dei vetrini con campione di paziente sono di natura qualitativa. Risultato positivo: una o più cellule antigene positive di CMV presentano colorazione doppia. Risultato negativo: nessuna cellula antigene positiva di CMV presenta colorazione doppia. Un minimo di ca. 50.000 cellule campione devono essere presenti per determinare che un risultato sia negativo. Se per entrambe le colorazioni si verificano letture ambigue in seguito a artefatti, i risultati non dovranno essere interpretati. Procedere alla colorazione dei vetrini di riserva o richiedere e testare un campione supplementare del paziente.

Limiti della procedura

L'individuazione di proteina strutturale a matrice inferiore pp65 di CMV dovrà essere eseguita da laboratori con esperienza nelle tecniche immunocitochimiche.

La preparazione dei leucociti sarà eseguita da personale esperto in tecniche asettiche. L'efficacia del CMV Brite™ Turbo Kit con campioni diversi da leucociti di sangue umano non è stata definita. Le caratteristiche di efficacia del test sono state definite usando il CMV Brite™ Kit (campioni EDTA e eparina) e convalide in studi interni utilizzando il CMV Brite™ Turbo Kit (solo campioni EDTA). Il CMV Brite™ Turbo Kit è inteso per l'uso esclusivo con il microscopio a immunofluorescenza e non per l'uso con citometria a flusso. Il tipo e le condizioni della strumentazione usata avrà influenza sull'aspetto visivo dell'immagine ottenuta. La reazione può variare a seconda del tipo di microscopio utilizzato, la fonte di luce, l'età della lampadina, il gruppo di filtro e lo spessore del filtro, le differenze di sensibilità del substrato antigene o la procedura applicata. Ciascun laboratorio definirà propri criteri di lettera dei campioni del paziente utilizzando adeguati controlli. L'individuazione e la conferma di proteina strutturale a matrice inferiore pp65 di CMV in leucociti del sangue periferico non rappresenta alcuna diagnosi di malattia sintomatica in quanto il pp65 di CMV potrebbe essere presente per un certo periodo in seguito a infezione acuta e i pazienti affetti da antigenemia per CMV (soprattutto a bassi livelli) potrebbero presentare malattia asintomatica. Ci sono molti rapporti pubblicati di pazienti negativi all'antigenemia e positivi alla viremia e alcuni di essi potrebbero avere malattie da CMV. Pertanto, un test negativo all'antigenemia non esclude assolutamente un'infezione o malattia da CMV. Il CMV Brite™ Turbo Kit non è inteso per il monitoraggio di farmaci antivirali. Le caratteristiche di efficacia del test non sono state definite utilizzando campioni di neonati. Un calo di cellule antigene positive (raccolte in eparina) può essere osservato su un vetrino dopo la conservazione [7-8, 11]. Pertanto, si dovrà sempre eseguire la preparazione immediata dei vetrini. Il tempo massimo di conservazione dei campioni a temperatura ambiente non è stato definito. In pazienti affetti da neutropenia grave (conteggio dei neutrofili assoluti inferiore a 200/mm³) sono necessari almeno 10 ml di sangue. Poiché gli anticorpi monoclonali sono stati preparati usando un ceppo prototipo, potrebbero non individuare tutti i ceppi antigenemici o nuovi di CMV. Ad es., gli anticorpi monoclonali potrebbero non individuare ceppi di CMV che abbiano subito mutazioni minori di aminoacidi nella regione dell'epitopo bersaglio. Le caratteristiche di efficacia del test non sono state definite utilizzando campioni raccolti in eparina.

Caratteristiche di efficacia

Il CMV Brite™ Kit è stato confrontato con l'individuazione di virus CMV in cultura convenzionale (CC) e "shell vial culture" (SV) usando leucociti di sangue periferico umano. 300 campioni clinici sono stati valutati confrontandoli con la cultura convenzionale (CC) e la "shell vial culture" (SV) [9]. Un totale di 300 campioni di sangue venoso sono stati raccolti da pazienti trapiantati (159 di midollo osseo allogenico e 47 di organi solidi), 85 pazienti sieropositivi (HIV) o affetti da AIDS e 9 pazienti immunocompetenti. 92 campioni (30,7%) sono stati individuati come positivi al CMV dal CMV Brite™ kit. In popolazioni random di donatori di sangue, il numero di campioni riscontrati ripetutamente reattivi all'antigenemia per CMV dal CMV Brite™ Kit è stato in genere lo 0%. Nota: le caratteristiche di efficacia sono state definite utilizzando il CMV Brite™ Kit e confermate in studi interni utilizzando il CMV Brite™ Kit Turbo Kit.

Confronto del CMV Brite™ Kit con CC e SV

CC/SV	CMV Brite Kit		totale
	+	-	
+	31	3	34
-	61	205	266
totale	92	208	300

Sensibilità: $31/34 = 91.2\%$ (95% CI = 81.4 to 100%)

Specificità: $205/266 = 77.1\%$ (95% CI = 71.9 to 82.2%)

L'efficacia del CMV Brite™ Turbo Kit è stata convalidata in uno studio su 183 campioni di pazienti. I campioni di pazienti comprendevano 173 pazienti trapiantati, 9 immunocompetenti ed 1 paziente sieropositivo (HIV). Ogni paziente è stato sottoposto a test parallelamente con il Kit CMV Brite™ e il Kit CMV Brite™ Turbo. I risultati dello studio di convalida sono riportati nella tabella sottostante.

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

Sensibilità: 43/49 = 87.8% (95% CI = 78.4 to 97.1%)

Specificità: 127/134 = 94.8% (95% CI = 90.9 to 98.6%)

Reattività incrociata

Per l'analisi della reattività incrociata sono stati sottoposti a test isolati clinici dei seguenti virus: virus Herpes tipo 1 e 2, virus Varicella-zoster, Adenovirus 2, 4 e 5, virus Parainfluenza 1, 2 e 3, virus sinciziale respiratorio, Poliovirus 3 (wild type 3), Echovirus 11, Echovirus 30, virus Epstein-Barr (ceppo di laboratorio P3HR1), virus herpes umano tipo 6 (ceppo di laboratorio GS), virus da immunodeficienza umana (tipo 1, vetrini IF disponibili in commercio). Non è stata rilevata alcuna reattività incrociata eccetto che per una debole reazione positiva con sei dei sette isolati HSV-1 nel test "shell vial". La debole colorazione osservata con i sei isolati HSV-1 era citoplasmatica (ovvero, rilevata solo all'esterno del nucleo, in un numero limitato di piccoli foci) simile agli schemi IF generalmente riscontrati con anticorpi monoclonali HSV-1. La debole colorazione rilevata può essere dovuta ai recettori FC espressi dalle cellule infette con HSV-1 nel test "shell vial". Analisi successive hanno concluso che non vi è alcuna prova di reattività incrociata tra il test dell'HSV e dell'antigenemia per CMV usando il mix di anticorpi monoclonali C10/C11.

Bibliografia

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Ho, S.K.N., Lo, C-Y., Cheng, I.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.
7. 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.
8. 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.
9. Landry, M.L., Ferguson, D., Stevens-Ayers, T., De Jonge, M.W.A., and Boeckh, M. (1996). Evaluation of CMV Brite TM Kit for detection of Cytomegalovirus pp65 antigenemia in peripheral blood leukocytes by immunofluorescence. J.Clin.Microbiology 34, 1337-1339.
10. ISO 15223-1:2021 Medical devices – Symbols to be used with information to be supplied by the manufacturer - Part 1: General requirements.
11. Niubó, J., Pérez, J.L., Carvajal, A., Ardanuy, C. and Martín, R. (1994). Effect of delayed processing of blood samples on performance of cytomegalovirus antigenemia assay. J.Clin.Microbiology 32, 1119-1120.
12. ISO 15223-1:2021/Amd 1:2025 Medical devices - Symbols to be used with information to be supplied by the manufacturer - Part 1: General requirements - Amendment 1: Addition of defined term for authorized representative and modified EC REP symbol to not be country or region specific.

Legenda dei simboli^{10,12}

	Consultare le Istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Sufficiente per
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Attenzione, consultare il documento allegato
	Conservare al riparo dalla luce (solare)
	Rischio biologico
	Limiti di temperatura (°C)
	Ad esclusivo uso di ricerca
	Codice del lotto
	Utilizzare entro aaaa-mm-gg
	Fabbricante
	Mandatario nella Comunità Europea

Informazioni sui contatti

IQ Products BV
www.iqproducts.nl

Rozenburglaan 13a
9727 DL Groningen
The Netherlands
T +31 (0)50 5757000
marketing@iqproducts.nl

© 2026 - IQ Products bv. Tutti i diritti riservati. Nessuna parte di queste opere può essere riprodotta in nessuna forma senza autorizzazioni.

Current version + release date	Version 6 21-01-2026 (DD-MM-YYYY)
Previous version	Version 5
Changes	1. added ISO 15223-1:2021/Amd 1:2025 to bibliography 2. replaced symbol EC-REP for XX-REP
Justification	1. and 2. Publication of ISO 15223-1:2021/Amd 1:2025
Current version + release date	Version 5 01-11-2025 (DD-MM-YYYY)
Previous version	Version 4
Changes	1. The CE symbol is no longer shown in italics 2. hazard symbols of reagent B have been updated 3. re-arranged information on front page 4. Lay-out of table 'Kit content' has been updated 5. the word 'non-automated' was added to the intended use. 6. removed CE from table with Explanation of used symbols
Justification	1. In response to a non-conformity raised by the notified body. 2. In response to the CLP analysis performed for the IVDR Technical Documentation. 3. Increase readability 4. Remove non-existing symbols 5. IVDR requirements for components of an intended use. 6. CE is not a symbol, but an abbreviation
Current version + release date	Version 4 February 2025
Previous version	Version 3
Changes	1. Sentence "This product is not FDA cleared (approved) for use in testing (i.e. screening) of blood or plasma donors." Was moved from sections Intended use to section Regulatory status. Applicability of the sentence has been broadened by removing the FDA part. 2. Added Australia, Peru, Saudi-Arabia and Singapore as country in which this product is registered as IVD.
Justification	1. Regulatory information is not supposed to be mentioned in the Intended Use. This product is not intended to be used for screening in the entire world, meaning that the specification for the FDA is redundant. 2. Registration in these countries is complete.
Current version + release date	Version 3 December 2024
Previous version	Version 2
Changes	1. Moved heading 'Regulatory status'. 2. Correct CI of CMV Brite and added sensitivity and specificity (including CI) for CMV Brite Turbo.
Justification	1. Making this information more visible. 2. Described CI of CMV Brite could not be reproduced. Information on CMV Brite Turbo missed, but was requested for registration of this product in Singapore.

Current version + release date	Version 2 March 2024
Previous version	Version 1
Changes	GTIN and UDI-DI code on front page have been corrected.
Justification	Wrong codes were included.

Current version + release date	Version 1 April 2023
Previous version	N/A
Changes	1. Created this online version with translations of the international booklet which is printed and included with every kit. The online version includes Greek, Spanish and Italian, whereas the international booklet includes English and Portuguese.
Justification	1. Environmental reasons.