



LIGHT DIAGNOSTICS™

ECHOVIRUS 30 MONOCLONAL ANTIBODY

**Para la identificación provisional de aislados de echovirus 30
en cultivos celulares**

Suplemento Español De la Lengua



3315



EMD Millipore Corporation
28820 Single Oak Drive Temecula, CA 92590 • United States
Tel. : +1 (951) 676-8080 • Fax : +1 (951) 676-9209
www.millipore.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanover, Germany

Uso previsto

El **Echovirus 30 Monoclonal Antibody** de **Light Diagnostics™** es un reactivo específico de tipo que está diseñado para utilizarse en la selección por inmunofluorescencia indirecta para la identificación provisional de echovirus 30 obtenidos en cultivos celulares y no se recomienda para análisis directos de muestras humanas.

IVD

Antecedentes e importancia clínica

Los enterovirus, tales como los echovirus, se clasifican dentro de la familia de los picornavirus, pico [pequeño] + RNA [ácido ribonucleico] + virus. Los picornavirus se encuentran entre los virus que contienen ácido ribonucleico (ARN) más pequeños y simples que se conocen (1). Ya se ha clonado el ARN de muchos enterovirus y se han obtenido las secuencias genómicas completas. Los ARN de todos los enterovirus secuenciados hasta el momento son de longitud similar, aproximadamente 7400 nucleótidos y tienen una organización idéntica (1).

El tubo digestivo humano es el sitio predominante para la replicación de los enterovirus, que se aislaron por primera vez a partir de muestras entéricas. Estos virus son la causa de la poliomielitis paralítica, la meningoencefalitis aséptica, la miocarditis, la pleurodinia, la glosopeda (fiebre aftosa), la conjuntivitis y muchos otros síndromes asociados con órganos afectados diferentes del intestino. Existen 67 tipos numerados de enterovirus en esta familia (1): tres poliovirus, veintitrés coxsackievirus A, seis coxsackievirus B, treinta y un echovirus y otros cuatro enterovirus.

Se ha documentado que los enterovirus, incluidos echovirus y coxsackievirus, son los principales agentes etiológicos de la meningitis aséptica (2). También se han documentado síndromes clínicos asociados con infecciones por cada uno de los tipos de enterovirus (3). Los echovirus pueden causar meningitis aséptica, parálisis, encefalitis, ataxia, síndrome de Guillain-Barré, exantema y enfermedades respiratorias. Los echovirus también se han asociado a diarrea, mialgia epidémica, pericarditis, miocarditis y afecciones hepáticas.

Para establecer la asociación entre un enterovirus y la enfermedad particular de un paciente se necesita la confirmación por parte del laboratorio de la infección, normalmente mediante el aislamiento del virus o la comprobación de una respuesta serológica específica en una muestra oportunamente obtenida. La descripción de los principios y procedimientos para el diagnóstico de infecciones

por enterovirus está publicada (4-7). Las técnicas de cultivo celular han posibilitado la detección precisa de enterovirus (8-10) La identificación de los aislados de enterovirus sirve de ayuda en la prevención, el tratamiento y la comprensión de las enfermedades infecciosas e incluso en el descubrimiento de nuevos aislados víricos. Para tipificar aislados de enterovirus generalmente se emplea la neutralización con mezclas de sueros inmunizantes específicas para cada tipo (11). Este método es de larga duración (al menos 7 días) y es caro. Existe la alternativa de tipificar los enterovirus con anticuerpos monoclonales específicos de tipo o con mezclas de anticuerpos monoclonales específicos de grupo mediante inmunofluorescencia indirecta, que es potencialmente más rápida y barata (12-18).

Principio de la prueba

El **Echovirus 30 Monoclonal Antibody** (Echovirus 30 MAb) de **Light Diagnostics™** se puede usar para la identificación de aislados de echovirus 30 en cultivos celulares mediante un IFA (immunofluorescence assay, ensayo de inmunofluorescencia) indirecto. El anticuerpo monoclonal incluido se unirá al antígeno específico del tipo echovirus 30 presente en el portaobjetos con el cultivo celular. El anticuerpo monoclonal que no se ha unido se elimina mediante lavado con PBS (phosphate-buffered saline, solución salina tamponada con fosfato). A continuación se agrega un anticuerpo secundario marcado con FITC (fluorescein isothiocyanate, isotiocianato de fluoresceína) que se unirá al complejo antígeno anticuerpo. El anticuerpo secundario que no se une se elimina mediante lavado con PBS. Al someterse a luz ultravioleta el FITC muestra una fluorescencia de color verde manzana que permite la visualización del complejo mediante microscopía. La fluorescencia de las células indica un resultado positivo. Las células no infectadas se tiñen de color rojo pálido si se utiliza la tinción de contraste con azul de Evans en el anticuerpo secundario marcado con FITC o en alguna otra parte del procedimiento.

Reactivos suministrados

Echovirus 30 Monoclonal Antibody, REF 3315: Un frasco cuentagotas de 1 ml con el anticuerpo monoclonal IgG_{2a} de ratón contra el echovirus tipo 30, estabilizante proteico y 0,1 % de azida de sodio (conservante).

Materiales necesarios no suministrados

- Acetona, calidad reactivo; en envase de vidrio
- Agua destilada o desionizada
- Solución de hipoclorito de sodio al 0,05% (lejía doméstica diluida 1:100)
- Tubos de cultivo o shell vials (frascos especiales para cultivo rápido) estériles con cubreobjetos de 12 mm con una monocapa de una estirpe celular adecuada para el crecimiento de enterovirus
- Medio para cultivo de tejidos como RPMI o EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, medio esencial mínimo de Eagle) con FBS (fetal bovine serum, suero fetal bovino) y antibióticos o equivalentes
- Un medio de transporte vírico que no inhiba a los enterovirus
- NaOH 0,1 N
- HCl 0,1 N
- Portaobjetos no fluorescentes
- Cubreobjetos Núm. 1
- Portaobjetos para controles positivos y negativos
- Anti-Mouse IgG:FITC Conjugate REF 5008
- Normal Mouse Antibody tal como REF 5014 como control negativo
- Phosphate-buffered saline (PBS, 0,01 M, pH entre 7,1 y 7,4 con 0,085% de NaCl y 0,1% de azida de sodio), REF 5087
- 0,05% Tween[®] 20 / 0,1% Sodium Azide Solution (opcional), REF 5037
- Dispositivo aspirador con pipetas Pasteur estériles desechables
- Centrifuga capaz de alcanzar 700-950 x g con cubetas de riesgo biológico y adaptadores para shell vials
- Microscopio de fluorescencia con la combinación de filtros adecuada para FITC (pico de excitación = 490 nm, pico de emisión = 520 nm) con aumento de 100x, 200x y 400x (objetivo seco)
- Pinzas
- Cámara húmeda
- Incubadora, 37 ± 1 °C
- Filtro para jeringas, 0,45 micrómetros

- Baño de agua con ultrasonidos
- Vórtex o agitador por ultrasonidos
- Mounting Fluid REF 5013
- Echovirus Control Slides REF 5074

Advertencias y precauciones

- No se ha determinado la eficacia de Echovirus 30 MAb de **Light Diagnostics™** en muestras directas.
- La azida de sodio presente en el reactivo puede reaccionar con las cañerías de plomo o cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Para desechar las soluciones que contienen azida de sodio deje correr agua en abundancia por la cañería para evitar la acumulación.
- Manipule todas las muestras y los materiales que entran en contacto con ellas como si fueran materiales potencialmente infecciosos. Descontamine con hipoclorito de sodio al 0,05% antes de desechar.
- Evite el contacto con el azul de Evans, si estuviera presente en alguno de los reactivos, ya que se trata de un posible carcinógeno. Si entrara en contacto con la piel enjuague con agua abundante.
- No pipetee los reactivos con la boca.
- No permita que los shell vials o los portaobjetos se sequen en ningún momento durante el proceso de tinción.
- Juntar o alterar reactivos puede mostrar unos resultados erróneos.
- La acetona es sumamente inflamable y su ingestión o inhalación es nociva para la salud. Conserve este producto alejado del calor, chispas o llamas. Evite la inhalación de los vapores. Utilice una ventilación apropiada.
- El Mounting Fluid REF 5013 contiene un amplificador de fluorescencia que puede resultar destructivo para las mucosas. Evite el contacto directo con la piel o las mucosas. Si ocurriera el contacto, enjuague con agua abundante.
- Los portaobjetos que se preparan muy pronto (CPE menor del 25%) o muy tarde (CPE mayor del 95%) pueden resultar difíciles de leer y pueden conducir a resultados negativos falsos.

Estabilidad y almacenamiento

Cuando se almacena a 2° y 8°C, el anticuerpo monoclonal se mantiene estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. No congele ni exponga a temperaturas elevadas. Deseche los reactivos restantes después de la fecha de caducidad.

Toma de muestras

Aunque los procedimientos varían de un laboratorio a otro, se brindan algunas consideraciones acerca del procesamiento de las muestras para el análisis de enterovirus. El tipo de muestra y su procesamiento dependerán del estado clínico del paciente y de la solicitud de análisis del médico especialista. Las muestras para aislamiento de enterovirus se deben transportar en hielo o en paquetes refrigerados y deben cultivarse lo antes posible. Si fuera necesario almacenarlas, hágalo a 2° y 8°C durante un máximo de 48 horas. Si fuera necesario un almacenamiento más prolongado, congele a -70 °C en el medio adecuado (19).

Procesamiento de las muestras

Fluidos corporales. En muestras de fluidos tales como el CSF (cerebrospinal fluid, líquido cefalorraquídeo) inocule entre 0,2 y 0,5 ml de la muestra sin diluir en cada recipiente de cultivo.

Extensiones microbiológicas. Las muestras obtenidas con hisopos, por ejemplo nasofaríngeas, de garganta u oculares, deben agitarse en medio de transporte para despegar las células del hisopo. Inocule entre 0,2 y 0,3 ml en cada recipiente de cultivo.

Materia fecal. Si hubiera materia fecal, agite en un vórtex con entre 2 y 5 ml de medio de transporte vírico o PBS. Deseche el hisopo en una solución de hipoclorito de sodio. Centrifugue a 950 x g durante 10 minutos. Si fuera necesario, filtre el sobrenadante con un filtro para jeringas de 0,45 micrómetros para aclarar la solución. Inocule entre 0,1 y 0,3 ml en cada recipiente de cultivo.

Tejidos sólidos. Tome pequeñas porciones de la muestra de tejido y transfíralas a entre 2 y 3 ml de medio de transporte vírico. Homogeneice con un homogeneizador de tejidos. Centrifugue suavemente para sedimentar los fragmentos. Inocule entre 0,1 y 0,2 ml de sobrenadante en cada recipiente de cultivo.

Procedimiento de inoculación

1. Examine los cultivos celulares inmediatamente antes de sembrar las muestras para verificar que la morfología sea adecuada.
2. Añada el volumen de inóculo adecuado indicado anteriormente para cada tipo de recipiente de cultivo.
3. Colóquelos en una incubadora a 37 ± 1 °C.

Procedimiento de la prueba

Preparación de los portaobjetos:

1. Examine la monocapa diariamente en busca de CPE (cytopathic effect, efecto citopático). Cuando el CPE sea mayor del 25%, aspire el medio del cultivo y enjuague la monocapa suavemente 3 veces con 1 ml de PBS.

Nota: No se deben usar reactivos con azida de sodio o tensoactivos tales como Tween 20 en los procedimientos de aislamiento de virus.

2. Añada 0,5 ml de PBS y rasque el recipiente de cultivo para retirar la monocapa celular, con lo que se resuspenden las células en el PBS.
3. Centrifugue la suspensión de células a 250 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Resuspenda las células sedimentadas en 0,1-0,2 ml de PBS y empléelo para hacer manchas celulares en pocillos de portaobjetos de 6 a 8 mm y deje que el portaobjetos se seque completamente al aire.
5. Fije el portaobjetos en acetona fría (2° y 8°C) durante 10 minutos.
6. Saque el portaobjetos de la acetona y deje que se seque completamente al aire.
7. El portaobjetos debería teñirse lo antes posible. Si fuera necesario almacenarlos, los portaobjetos deberían permanecer a -20°C o menos con un desecante.

Procedimiento (de tinción) inmunofluorescente indirecto sugerido:

1. Permita que el portaobjetos de control fijado en acetona o el portaobjetos de la muestra y los reactivos se equilibren a temperatura ambiente.

Nota: No permita que los portaobjetos se sequen en ningún momento durante el proceso de tinción.

2. Añada suficiente anticuerpo monoclonal o anticuerpo normal de ratón (reactivo de control negativo) para cubrir las células; 1 gota para las manchas de células y entre 4 y 6 gotas para los shell vials.
3. Incube el portaobjetos a 37°C durante 30 minutos en una cámara húmeda.
4. Enjuague el portaobjetos suavemente con una frasco inyector de PBS/Tween 20 entre 10 y 15 segundos para eliminar el exceso de solución de anticuerpo monoclonal, teniendo cuidado de dirigir el chorro lejos del pocillo. Para los shell vials: aspire el reactivo del frasco y lave suavemente cada shell vial 3 veces con 1 ml de PBS/Tween 20.
5. Coloque el portaobjetos en una placa de tinción o en un recipiente de Coplin (con soporte para portaobjetos o equivalente) y cubra con PBS. Enjuague durante 5-10 minutos. Agite suavemente con un agitador magnético o manualmente.
6. Sacuda el exceso de reactivos del portaobjetos y seque cuidadosamente el área que rodea la mancha de células.
7. Añada suficiente FITC-labeled Anti-Mouse IgG Conjugate REF 5008 o equivalente para cubrir las células; 1 gota para las manchas de células y entre 4 y 6 gotas para los shell vials.
8. Repita los pasos 3 a 5.
9. Móntelo bajo un cubreobjetos con Mounting Medium acuoso pH 8,5 REF 5013 o equivalente. Para los shell vials: aspire el PBS/Tween de los shell vials. Levante cada cubreobjetos con una aguja doblada fijada a una jeringa pequeña y retírelo cuidadosamente con unas pinzas. Prepare cada cubreobjetos con el LADO DE LAS CÉLULAS HACIA ABAJO sobre un portaobjetos de vidrio con Mounting Fluid.
10. Seque el exceso de líquido de los bordes del portaobjetos.

Nota: Para obtener mejores resultados examine los portaobjetos inmediatamente después de su preparación. Si los portaobjetos tuvieran que almacenarse después de la tinción, guárdelos a 2-8 °C, en un envase seguro y protegidos de la luz.

11. Examine los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia a 100-200x en busca de células que muestren fluorescencia. Puede realizarse un examen detallado a 400x.

Nota: El buen funcionamiento del microscopio de fluorescencia tiene una importancia crucial para lograr unos resultados del análisis satisfactorios. Dado que los objetivos, la intensidad y potencia de la lámpara y los filtros pueden afectar a los resultados, el empleo de un control positivo verificará el funcionamiento de los reactivos, la metodología de cultivo y el microscopio.

Control de calidad

Siempre deben incluirse controles positivos y negativos en cada prueba para asegurar el funcionamiento adecuado del procedimiento para la identificación de aislados de echovirus 30. El pocillo del control positivo debe contener células cuyos núcleos o citoplasmas presenten fluorescencia color verde manzana. Si se emplea la tinción de contraste con azul de Evans, el pocillo del control negativo deberá mostrar las células teñidas con un color rojo pálido.

Nota: Examine el cubreobjetos o pocillo completo en busca del color verde manzana fluorescente que está presente en los núcleos de las células infectadas por enterovirus.

Los controles positivos pueden prepararse con los aislados adecuados de echovirus o con aislados clínicos positivos conocidos. El control negativo puede utilizar muestras negativas de laboratorio conocidas. EMD Millipore

Corporation suministra los Echovirus Control Slides REF 5074, con pocillos positivos y negativos para echovirus. Los echovirus vivos para los controles positivos pueden obtenerse de la ATCC® (American Type Culture Collection, Colección Americana de Cultivos Tipo), Manassas, VA.

Precaución: Se debe ignorar la tinción fluorescente de los fragmentos celulares, que a menudo se debe a que el conjugado queda atrapado en dichos fragmentos. Si los controles positivo y negativo no se pueden distinguir con claridad, el análisis debe considerarse no válido y repetirse tras haberlo revisado y haber efectuado las correcciones sugeridas en la sección “Resolución de problemas”.

Limitaciones

- Con algunos aislados víricos puede producirse una tinción de fondo de baja intensidad; el Echovirus 30 MAb específico siempre presentó una intensidad de tinción significativamente mayor.
- Este anticuerpo monoclonal no se ha caracterizado respecto al antígeno o epítipo particular de la proteína estructural que reconoce en el echovirus 30.
- El tipo y estado de los instrumentos utilizados influirán sobre el aspecto visual de la imagen obtenida. La reacción para la determinación del punto final puede variar a causa del tipo de microscopio empleado, de la fuente de luz, de la antigüedad de la lámpara, del conjunto de filtros y su espesor, de las diferencias de sensibilidad del sustrato antigénico o del procedimiento de prueba utilizado. Cada laboratorio deberá establecer sus propios criterios para examinar los criterios de valoración mediante los testigos adecuados.
- Dado que el anticuerpo monoclonal se ha preparado con una cepa prototipo, es posible que no detecte todas las variantes antigénicas o nuevas cepas del echovirus 30.
- Los anticuerpos monoclonales pueden no detectar las cepas de echovirus 30 que hayan experimentado pequeños cambios en los aminoácidos de la región del epítipo diana.

Valores esperados

EMD Millipore Corporation no pudo determinar una tasa de frecuencia con base a nuestros estudios. Los tipos de enterovirus documentados con mayor frecuencia en los últimos veinte años han sido los coxsackievirus A9, A16, B2, B3, B4, B5 y los echovirus 4, 6, 9, 11 y 30 (20, 21). Estos serotipos constituyen por lo general cerca del 65% de todos los enterovirus aislados cada año. En un año en particular puede aumentar la predominancia de cada virus, o es posible que otro tipo aumente su frecuencia durante un tiempo.

La frecuencia de las infecciones por enterovirus varía en función de la edad y estado del paciente, del clima y de la época del año. La mayoría de los casos se documentan en niños pequeños. El clima parece ser un factor importante en la circulación y frecuencia de los enterovirus. Por lo general en los climas templados los enterovirus aparecen raramente en invierno y primavera, pero se

aíslan con mucha mayor frecuencia durante el verano y el otoño. Incluso en Estados Unidos, los niños sanos de las ciudades del sur presentan una mayor abundancia de enterovirus que los de edad comparable de las ciudades del norte (20).

En promedio, el echovirus 30 ha representado cerca del 5,95% (entre 0,5 y 19,9%) de los enterovirus aislados distintos de polio documentados en Estados Unidos cada año desde 1970 (20).

Interpretación de los resultados

Una fluorescencia de color **verde manzana brillante** en el núcleo o citoplasma de las células infectadas indica una reacción **positiva**. Una reacción de tinción positiva para el echovirus 30 requiere la presencia de al menos 2 células intactas que presenten fluorescencia específica. La ausencia de fluorescencia, y la presencia de un color **rojo pálido** en caso de haber utilizado la tinción de contraste con azul de Evans, indican una reacción **negativa**. Todos los resultados positivos se deberían identificar y confirmar por neutralización con mezclas de sueros inmunizantes específicas para cada tipo. Un resultado positivo debe registrarse como “el aislado es un posible echovirus 30, necesita confirmación”.

Un resultado negativo no descarta una infección por echovirus 30. El resultado negativo puede deberse a diversos factores tales como: muestra inadecuada, toma y manipulación de la muestra inadecuadas, técnica inadecuada de cultivo y otros factores que se mencionan en la sección “Resolución de problemas”. Todos los resultados negativos deberían registrarse como "No se observa ningún virus" o “No se aisló ningún echovirus 30, se necesitan estudios adicionales”. Resulta útil examinar las células negativas antes que las positivas para determinar si hay tinción inespecífica.

Características de la eficacia diagnóstica

Especificidad y reactividad cruzada:

El anticuerpo monoclonal contra el echovirus 30 identificó correctamente las cepas prototipo y aislados víricos previamente tipificados como echovirus 30 que fueron proporcionados y analizados por el CDC (Center for Disease Control, Centro para el control de enfermedades) y otros tres laboratorios de virología clínica.

Tres laboratorios externos de virología clínica utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos enterovíricos (tanto mezclas de diferentes serotipos como reactivos específicos de tipo) para analizar los aislados víricos en estos estudios. Los laboratorios clínicos estaban en la costa occidental y las regiones sudoeste y sur de Estados Unidos. Las muestras se obtuvieron de pacientes con edades comprendidas entre la lactancia y la vejez. Se cultivó una gran variedad de muestras, entre otras, fluidos (CSF y orina), extensiones microbiológicas (nasales, de garganta, nasofaríngeas y oculares), muestras fecales y extensiones rectales. Las muestras se inocularon en cultivos y se seleccionaron primero con las mezclas de anticuerpos monoclonales y luego se tipificaron mediante un IFA con los componentes monoclonales individuales. Todos los aislados víricos se confirmaron mediante neutralización convencional (22). Todos los laboratorios del estudio usaron anti-Mouse IgG:FITC Conjugate [REF](#) 5008 como el segundo anticuerpo en la totalidad o en parte del estudio. El laboratorio de la costa occidental también utilizó un conjugado de Ig de cabra contra ratón de otro proveedor.

El Echovirus 30 MAb no reaccionó con los demás controles de virus analizados, incluidos coxsackievirus A9, A10, A14, A16, A24, A24v o B1-B6. El Echovirus 30 MAb no reaccionó con ninguno de los demás echovirus, incluidos echo 1, echo 2, echo 3, echo 4, echo 5, echo 6, echo 7, echo 9, echo 11, echo 11', echo 13, echo 14, echo 15, echo 16, echo 18, echo 20, echo 21, echo 22, echo 25, echo 29, echo 32 y echo 34. No se encontró reactividad con los aislados de enterovirus 70 y 71, poliovirus 1, 2 y 3, virus herpes simplex (HSV-1 o HSV-2), adenovirus o rinovirus analizados. Además, se analizaron muestras control de células huésped no infectadas y otros patógenos como parainfluenza 1, 2 y 3, influenza A y B, RSV (respiratory syncytial virus, virus respiratorio sincitial), citomegalovirus (CMV), HHV-6 (human herpes virus-6, virus herpes humano 30), VZV (varicella-zoster virus, virus varicela-zoster), el virus de las paperas, el virus del sarampión, clamidia, EBV-VCA (Epstein-Barr virus - viral capsid antigen, antígeno de la cápside vírica del virus de Epstein-Barr) y adenovirus y no se encontró una reactividad cruzada importante con el Echovirus 30 MAb.

En ocasiones el Echovirus 30 MAb presentó una tinción de fondo de baja intensidad con algunos aislados víricos. Sin embargo, con aislados de echovirus 30 presentó una intensidad de tinción significativamente mayor. Se han ajustado las dosis de los anticuerpos monoclonales para minimizar la reactividad inespecífica.

Evaluación clínica:

Tres laboratorios externos de virología clínica utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos enterovíricos (tanto mezclas de diferentes serotipos como reactivos específicos de tipo) para analizar los aislados víricos. Los aislados víricos, confirmados mediante neutralización convencional (22), se seleccionaron primero con las mezclas y luego se tipificaron con los componentes monoclonales individuales. A continuación se presenta un resumen de los estudios combinados que comparan los estudios estándar de neutralización y el Indirect Fluorescence Assay de **Light Diagnostics™** con el Echovirus 30 MAb.

Positivos por neutralización:	161
Positivos mediante el IFA de Light Diagnostics™ :	149
Sensibilidad relativa:	92,6 %
Intervalo de confianza del 95% para la sensibilidad:	entre 87,3 y 96,1%
Negativos por neutralización:	652
Negativos mediante el IFA de Light Diagnostics™ :	650
Especificidad relativa:	99,7%
Intervalo de confianza del 95% para la especificidad:	entre 98,9 y 100%

Con la excepción de 2 de 33 aislados de echovirus 6, *no se observó ninguna otra reactividad cruzada significativa* con ningún otro aislado clínico. Sin embargo, el Echovirus 30 MAb no pudo reconocer a 12 de los 161 aislados de echovirus 30 analizados. Esto parece indicar que podría existir una variante de la cepa o un bajo porcentaje de aislados de echovirus 30 que no expresan el antígeno que reconoce el Echovirus 30 MAb. Aun así, los resultados anteriores sugieren que el Echovirus 30 MAb es muy sensible y específico.

(Los intervalos de confianza del 95% se calcularon por el Método Exacto (23)).

Resolución de problemas

La preparación de las muestras depende mucho de la técnica y puede afectar a los resultados que se obtengan. Para poder solucionar posibles problemas de eficacia, es necesario examinar todos los pasos del proceso.

Una disminución muy marcada de la fluorescencia podría indicar:

- 1) Un deterioro de los reactivos
 - 2) Problemas relacionados con la microscopía
 - 3) Otros problemas del equipo o de la técnica
- Verifique la fecha de caducidad de todos los reactivos empleados.
 - Si los reactivos no hubieran caducado, verifique el funcionamiento del microscopio y vuelva a examinar los portaobjetos control.
 - Si aún no se determinara el problema, verifique la operación de todo el equipo según el folleto y repita el análisis.

Para solicitar asistencia, llame al Servicio Técnico de **EMD Millipore Corporation**. Para encontrar la oficina más cercana, visite www.millipore.com/offices.

La sección de “Bibliografía” de este folleto informativo de IVD de **Light Diagnostics™** aparece solamente en la versión completa en inglés. Consulte esta versión acerca de los detalles específicos del producto.

Glosario de Símbolos

Símbolo	Se utiliza para	Símbolo	Se utiliza para
	Número de catálogo		El uso por parte AAAA-MM-DD o AAAA MM-
	Fabbricante		Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Precaución, consulte los documentos adjuntos		Contenido suficiente para <n> pruebas
	Diagnóstico in vitro de dispositivos médicos		Límites de temperatura
	Consulte las instrucciones de uso		Los riesgos biológicos
	Control		El control negativo
	El control positivo		

GARANTÍA Y LIMITACIÓN DE RESPONSABILIDAD:

1. Millipore garantiza que sus productos cumplirán con sus especificaciones publicadas cuando sean usados de acuerdo con sus instrucciones durante un período de un año desde el envío de los productos.
2. El Cliente inspeccionará los Productos cuando éstos le sean entregados. Cualquier reserva relativa a defectos obvios o a falta de Productos, debidos a una posible falta por Millipore Iberica, S.A, debe ser notificada inmediatamente por escrito al transportista y por correo certificado a Millipore Iberica, S.A, durante los tres (3) días laborables siguientes a la entrega, o como muy tarde, durante los diez (10) días naturales siguientes a la fecha de facturación, en el caso de que se trate de una falta de Productos.
3. No puede devolverse un producto sin el previo acuerdo de Millipore Iberica, S.A, y sin seguir sus indicaciones al respecto. Cualesquiera de los Productos devueltos sin previo acuerdo de Millipore Iberica, S.A no serán abonados en la cuenta del Cliente.
4. Millipore Iberica, S.A no será responsable por el deterioro de los Productos adquiridos por el Cliente como consecuencia de las incorrectas condiciones de almacenamiento. A este efecto, el Cliente se obliga a respetar las especificaciones y condiciones de uso de dichos Productos; en caso de incumplimiento, no será aplicable ninguna de las garantías otorgadas por Millipore Iberica, S.A.
5. En el supuesto de incumplimiento de dicha garantía, Millipore únicamente estará obligado a reparar o reemplazar, a su elección, el producto o parte de éste. Si después de realizar esfuerzos razonables al efecto Millipore no es capaz de reparar o reemplazar el producto o parte de éste, entonces Millipore deberá devolver al cliente todo el dinero satisfecho por dicho producto o parte de éste.
6. Con carácter general, cualquier garantía otorgada por Millipore Iberica, S.A no es aplicable en los siguientes casos: instalación, uso y mantenimiento incorrectos de los Productos, sin cumplir con las instrucciones dadas por Millipore Iberica, S.A. desgastes ocasionados por uso ordinario de los Productos o falta del adecuado mantenimiento.
7. Millipore no será reputado responsable por perjuicios indirectos como perjuicio comercial, pérdida de clientela, pérdida de Pedidos, otros problemas comerciales, daño emergente, daños a su propiedad o marcas, sufridos por cualquier cliente como consecuencia del uso de los productos.
8. Cualesquiera acciones dirigidas contra el Cliente por un tercero constituye un perjuicio indirecto y no produce derecho alguno a compensación.
9. En cualquier caso, las multas y sanciones que puedan ser atribuidas a Millipore Iberica, S.A en supuestos en que la responsabilidad de ésta se haya reconocido, quedarían limitadas a una cantidad igual a las sumas efectivamente satisfechas a Millipore Iberica, S.A por el Cliente en concepto de la compra del producto del que se derive la responsabilidad de Millipore Iberica, S.A.

Tween® es una marca comercial de ICI Americas Inc.

ATCC® es una marca comercial de la American Type Culture Collection Corporation.

©2019 EMD Millipore Corporation, una división de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. Todos los derechos reservados. EMD, EMD Millipore, Millipore, la marca M, Light Diagnostics y todas las demás marcas comerciales, a menos que específicamente identificados anteriormente en el texto como perteneciente a un tercero, son propiedad de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania.



LIGHT DIAGNOSTICS™

ECHOVIRUS 30 MONOCLONAL ANTIBODY

**Für die präsumptive Identifizierung von Echo-Virus 30-
Isolaten in Zellkultur**
Deutsche Sprachenergänzung



3315



EMD Millipore Corporation
28820 Single Oak Drive Temecula, CA 92590 • United States
Tel. : +1 (951) 676-8080 • Fax : +1 (951) 676-9209
www.millipore.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanover, Germany

Verwendungszweck

Light Diagnostics™ Echovirus 30 Monoclonal Antibody ist ein typspezifisches Reagenz für indirekte Immunfluoreszenz-Siebstests zur präsumptiven Identifizierung des in Zellkultur angezüchteten Echo-Virus 30 und nicht für direkte Tests an Humanproben konzipiert.

IVD

Hintergrund und klinische Signifikanz

Enteroviren, wie z. B. Echo-Viren, sind in der Familie der Picornaviren klassifiziert: pico [klein] + RNA [Ribonukleinsäure] + Virus. Picornaviren gehören zu den kleinsten und einfachsten Ribonukleinsäure enthaltenden Viren, die bekannt sind (1). Die RNA zahlreicher Enteroviren wurde inzwischen geklont, und es wurden vollständige Genomsequenzen entschlüsselt. Die RNA aller sequenzierten Enteroviren hat etwa die gleiche Länge von ca. 7400 Nukleotiden und ist identisch strukturiert (1).

Die Replikation der Enteroviren findet hauptsächlich im menschlichen Verdauungstrakt statt, und diese Viren wurden zuerst aus Darmproben isoliert. Diese Viren verursachen paralytische Poliomyelitis, abakterielle Meningoenzephalitis, Myokarditis, Pleurodynie, Hand-Fuß-Mund-Krankheit, Konjunktivitis sowie zahlreiche andere, mit extraintestinalen Zielorganen verbundene Syndrome. In der Familie der Enteroviren gibt es 67 durchnummerierte Enteroviren-Typen (1): drei Polio-Viren, dreiundzwanzig Coxsackie-Viren der Subgruppe A, sechs Coxsackie-Viren der Subgruppe B, einunddreißig Echo-Viren sowie vier andere Enteroviren.

Enteroviren, z. B. Echo-Viren und Coxsackie-Viren, haben sich als wichtige ätiologische Agenzien für abakterielle Meningitis herausgestellt (2). Außerdem wurde über klinische Syndrome im Zusammenhang mit allen Typen des Enterovirus berichtet (3). Echo-Viren können abakterielle Meningitis, Paralyse, Enzephalitis, Ataxie, das Guillain-Barré-Syndrom, Exantheme und Atemwegserkrankungen hervorrufen. Echo-Viren wurden außerdem mit Diarrhoe, epidemischer Pleurodynie, Perikarditis, Myokarditis und hepatischen Krankheiten in Verbindung gebracht.

Um einen Zusammenhang zwischen einem Enterovirus und einer bestimmten Krankheit eines Patienten herzustellen, ist ein Labornachweis der Infektion erforderlich, entweder durch die Isolierung des Virus oder durch die

Dokumentation einer spezifischen serologischen Reaktion in einer Einzelprobe zum richtigen Zeitpunkt. Es sind ausführliche Beschreibungen der Prinzipien und Verfahren für die Diagnose von Enterovirus-Infektionen veröffentlicht worden (4-7). Durch Zellkulturmethoden wurde die präzise Erkennung von Enteroviren möglich (8-10). Die Identifizierung der Enterovirus-Isolate erleichtert die Prävention, Behandlung und das Verständnis der Enterovirus-Krankheiten, und sogar die Entdeckung neuer Virusisolate. Die Typisierung von Enterovirus-Isolaten erfolgt im Allgemeinen durch die Neutralisierung mit typspezifischen Pools von Immunsera (11). Diese Methode ist zeitaufwändig (mindestens 7 Tage) und kostspielig. Als Alternative kann die Typisierung von Enteroviren mit Pools von typspezifischen monoklonalen Antikörpern und/oder gruppenspezifischen monoklonalen Antikörpern mithilfe von IFA (indirect fluorescence assay, indirekter Fluoreszenztest) wahrscheinlich schneller und kostengünstiger durchgeführt werden (12-18).

Testprinzip

Mit **Light Diagnostics™ Echovirus 30 Monoclonal Antibody** (Echovirus 30 MAb) können Echo-Virus 6-Isolate mit einem IFA (indirect fluorescence assay, indirekter Fluoreszenztest) in Zellkultur identifiziert werden. Die monoklonalen Antikörper binden sich an das auf dem Zellkultur-Objektträger vorhandene typspezifische Echo-Virus 30-Antigen. Ungebundener monoklonaler Antikörper wird durch Waschen mit PBS (phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung) entfernt. Anschließend wird ein sekundärer FITC-markierter (Fluoresceinisothiocyanat) Antikörper hinzugefügt, der an den Antigen-Antikörper-Komplex anbindet. Der ungebundene sekundäre Antikörper wird durch Waschen mit PBS entfernt. FITC weist bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht eine apfelgrüne Fluoreszenz auf; daher kann der Komplex mithilfe von Mikroskopie sichtbar gemacht werden. Ein positives Ergebnis ist durch Zellfluoreszenz gekennzeichnet. Wenn im sekundären FITC-markierten Antikörper oder anderen Phasen des Verfahrens eine Evans-Blau-Gegenfärbung verwendet wird, weisen nicht infizierte Zellen eine mattrote Färbung auf.

Mitgeliefertes Reagenz

Echovirus 30 Monoclonal Antibody – REF 3315: Ein 1-ml-Tropffläschchen mit monoklonalem Maus-IgG_{2a}-Antikörper gegen Echo-Virus Typ 30, Protein-Stabilisator und 0,1% Natriumazid (Konservierungsmittel).

Zusätzlich erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

- Azeton, Reinheitsgrad; in Glasbehälter
- Destilliertes Wasser oder deionisiertes Wasser
- Natriumhypochloritlösung, 0,05% (1:100-Verdünnung handelsüblichen Chlor-Bleichmittels)
- Sterile Röhrchen für Gewebekulturen oder Shell-Vials mit 12-mm-Deckgläsern, die einen für das Anzüchten von Enteroviren geeigneten Zelllinien-Monolayer enthalten
- Gewebekulturmedien wie RPMI oder Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) mit fötalem bovines Serum (FBS) und Antibiotika, oder Äquivalent
- Virustransportmedium, das sich auf Enteroviren nicht wachstumshemmend auswirkt
- 0,1 N NaOH
- 0,1 N HCl
- Mikroskop-Objektträger, nicht fluoreszierend
- Deckgläser Nr. 1
- Objektträger für Negativ- und Positivkontrolle
- Anti-Mouse IgG/FITC Conjugate [REF](#) 5008
- Normal Mouse Antibody, z. B. [REF](#) 5014 als Negativkontrolle.
- Phosphate Buffered Saline (PBS, 0,01 M, pH 7,1 bis 7,4 mit 0,085% NaCl und 0,1% Natriumazid), [REF](#) 5087
- 0,05% Tween® 20 / 0,1% Natriumazidlösung (optional), [REF](#) 5037
- Absauggerät mit sterilen Pasteur-Einwegpipetten
- Zentrifuge mit max. Schwerefeld von 700-950 x g mit Biogefahr-sicheren Bechern und Adaptern für Shell-Vials
- Fluoreszenzmikroskop mit für FITC geeigneter Kombination von Filtern (Anregungsmaximum = 490 nm, Emissionsmaximum = 520 nm) mit 100-, 200-, 400-facher Vergrößerung (Trockenobjektiv)

- Pinzette
- Feuchte Kammer
- Inkubator, $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Spritzenfilter, 0,45 Mikrometer
- Ultraschall-Wasserbad
- Vortex-Mischer oder Ultraschallgerät
- Mounting Fluid REF 5013.
- Echovirus Control Slides REF 5074.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Die Leistung von **Light Diagnostics™** Echovirus 30 MAb wurde nicht mit direkten Einzelproben bestimmt.
- Das im Reagenz vorhandene Natriumazid kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und potenziell explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung von Lösungen, die Natriumazid enthalten, die Wasserrohre mit viel Wasser nachspülen, um Ablagerungen zu vermeiden.
- Alle Einzelproben und Materialien, die damit in Kontakt geraten, als potenziell infektiöse Materialien behandeln. Vor dem Entsorgen mit 0,05% Natriumhypochlorit dekontaminieren.
- Kontakt mit Evans-Blau vermeiden, sofern in einem der Reagenzien vorhanden, da es potenziell krebserregend ist. Bei Hautkontakt mit großen Mengen Wasser nachspülen.
- Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren.
- Shell-Vials oder Objektträger dürfen während des Färbungsverfahrens nicht trocken werden.
- Die gemeinsame Verwendung bzw. die Abänderung von Reagenzien kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Azeton ist extrem entzündlich und schädlich, wenn es verschluckt oder eingeatmet wird. Von Hitze, Funken oder Flammen fern halten. Das Einatmen der Dämpfe vermeiden. Für ausreichende Belüftung sorgen.
- Mounting Fluid REF 5013 enthält einen Fluoreszenz-Enhancer, der die Schleimhäute angreifen kann. Direkten Kontakt mit der Haut oder den

Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt mit großen Mengen Wasser nachspülen.

- Wenn Objektträger zu früh (<25% CPE) oder zu spät (>95% CPE) vorbereitet werden, können sie möglicherweise schlecht gelesen werden und zu falschen negativen Ergebnissen führen.

Stabilität und Lagerung

Bei einer Lagerung bei 2° bis 8°C ist der monoklonale Antikörper bis zu dem Ablaufdatum auf dem Etikett stabil. Nicht einfrieren oder hohen Temperaturen aussetzen. Nach dem Ablaufdatum alle verbliebenen Reagenzien entsorgen.

Sammlung von Einzelproben

Da die Verfahren von Labor zu Labor unterschiedlich sind, werden im Folgenden einige Vorgehensweisen zur Verarbeitung von Einzelproben für die Enterovirus-Analyse vorgeschlagen. Die Art der Probe und der Verarbeitung hängt vom klinischen Zustand des Patienten und der Laboranforderung des behandelnden Arztes ab. Proben zur Enterovirus-Isolierung sollten in Eiswasser oder Kühlkissen transportiert und so schnell wie möglich kultiviert werden. Eine Lagerung, sofern notwendig, sollte bei 2° bis 8°C und höchstens für 48 Stunden erfolgen. Wenn eine längere Lagerung erforderlich ist, die Proben in gefrorener Form bei -70°C in den entsprechenden Medien lagern (19).

Probenverarbeitung

Körperflüssigkeiten – Bei flüssigen Einzelproben wie Liquor cerebrospinalis 0,2 bis 0,5 ml unverdünnter Probe in jedem Kulturgefäß inokulieren.

Abstriche – Proben im Transportmedium, z. B. Nasenrachenraum-, Rachen- oder Augenabstriche, sollten aufgerührt oder gevortext werden, um Zellen vom Abstrich zu trennen. 0,2 bis 0,3 ml in jedem Kulturgefäß inokulieren.

Stuhl – Bei festen Stuhlproben in 2 bis 5 ml Virustransportmedium oder PBS vortexieren. Den Abstrich mittels Natriumhypochloritlösung entsorgen. 10 Minuten bei 950 x g zentrifugieren. Falls erforderlich, den Überstand zum Klären durch einen 0,45 Mikrometer-Spritzenfilter filtern. 0,1 bis 0,3 ml in jedem Kulturgefäß inokulieren.

Feste Gewebe – Kleine Teile der Gewebeprobe in 2 bis 3 ml Virustransportmedium legen. Das Gewebe mit einem Gewebehomogenisator zerkleinern. Behutsam zentrifugieren, um Ablagerungen zu sedimentieren. 0,1 bis 0,2 ml Überstand in jedem Kulturgefäß inokulieren.

Inokulationsverfahren

1. Zellkulturen unmittelbar vor der Inokulation von Einzelproben auf ordnungsgemäße Morphologie überprüfen.
 2. Jedem Kulturgefäß wie oben angegeben das entsprechende Volumen an Inokulum hinzufügen.
 3. In einen $37 \pm 1^\circ\text{C}$ -Inkubator legen.
-

Testverfahren

Vorbereitung der Objektträger:

1. Den Monolayer täglich auf CPE (cytopathic effect, zytopathischer Effekt) untersuchen. Wenn der CPE $>25\%$ ist, das Medium von der Kultur absaugen und den Monolayer behutsam 3 Mal mit 1 ml PBS spülen.
Hinweis: Bei Verfahren zur Virusisolierung sollten keine Reagenzien verwendet werden, die Natriumazid oder Tenside enthalten, wie z. B. Tween 20.
2. 0,5 ml PBS hinzufügen und den Zell-Monolayer durch Schaben aus dem Kulturgefäß entfernen, so dass die Zellen in PBS resuspendiert werden.
3. Die Zellsuspension bei $250 \times g$ 10 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugieren.
4. Das Zellpellet in 0,1-0,2 ml PBS resuspendieren, mit dieser Suspension Zellen auf 6-8 mm-Objektträgervertiefungen punktförmig auftragen und den Objektträger vollständig lufttrocknen lassen.
5. Den Objektträger in gekühltem Azeton (2° bis 8°C) 10 Minuten lang fixieren.
6. Den Objektträger aus dem Azeton entfernen und vollständig lufttrocknen lassen.

7. Der Objektträger sollte so schnell wie möglich angefärbt werden. Wenn eine Lagerung erforderlich ist, sollten die Objektträger bei ≤ -20 °C mit Trockenmittel aufbewahrt werden.

Empfohlenes Verfahren für Indirekte Immunfluoreszenz (Anfärben):

1. Warten, bis der mit Azeton fixierte Kontroll- und/oder Testobjektträger und die Reagenzien Raumtemperatur angenommen haben.

Hinweis: Die Objektträger dürfen während des Färbungsverfahrens nicht trocken werden.

2. Ausreichend monoklonalen Antikörper oder normalen Maus-Antikörper (Reagenz für Negativkontrolle) hinzufügen, so dass die Zellen damit bedeckt sind: Für Zellauftrag 1 Tropfen und für Shell-Vials 4-6 Tropfen.
3. Den Objektträger 30 Minuten lang bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren.
4. Den Objektträger 10-15 Sekunden lang behutsam mit einer Spritzflasche spülen, die PBS/Tween 20 enthält, um die überschüssige monoklonale Antikörperlösung zu entfernen, und darauf achten, dass der Strahl nicht auf die Vertiefung trifft. Für Shell-Vials: Das Reagenz vom Vial absaugen und jedes Shell-Vial 3 Mal mit 1 ml PBS/Tween 20 waschen.
5. Den Objektträger in eine Färbewanne oder einen Coplin-Färbetrog (mit Objektträrgestell oder entsprechender Vorrichtung) legen und mit PBS bedecken. 5 - 10 Minuten spülen. Behutsam mit einem Magnetrührstab oder per Hand rühren.
6. Überschüssige Reagenzien vom Objektträger abschütteln und den Bereich um den Zellauftrag sorgfältig trocknen.
7. Ausreichend FITC-markiertes Anti-Mouse IgG Conjugate REF 5008 oder ein äquivalentes Produkt hinzufügen, so dass die Zellen damit bedeckt sind: Für Zellauftrag 1 Tropfen und für Shell-Vials 4-6 Tropfen.
8. Die Schritte 3-5 wiederholen.
9. Das Produkt unter einem Deckglas mit wässrigem Mounting Medium pH 8,5 REF 5013 oder äquivalentes Produkt eindecken. Für Shell-Vials: Das PBS/Tween von den Shell-Vials absaugen. Jedes Deckglas mit einer an einer kleinen Spritze befestigten gebogenen Nadel anheben und das Produkt mit einer Pinzette entfernen. Jedes Deckglas MIT DER ZELLESENTE

NACH UNTEN auf einem gläsernen Objektträger mit Mounting Fluid bedecken.

10. Überschüssiges Eindeckmittel von den Kanten des Objektträgers abwischen.

Hinweis: Um optimale Ergebnisse zu erzielen, die Objektträger direkt nach der Vorbereitung lesen. Wenn die Objektträger nach dem Anfärben gelagert werden sollen, sind sie bei 2° bis 8°C in einem sicheren Behälter in Dunkelheit zu lagern.

11. Die Objektträger mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 100-200-facher Vergrößerung auf Zellen untersuchen, die Fluoreszenz aufweisen. Eine detaillierte Untersuchung kann bei 400-facher Vergrößerung ausgeführt werden.


Hinweis: Die Leistung des Fluoreszenzmikroskops ist für das Erreichen befriedigender Testergebnisse von entscheidender Bedeutung. Da sich Objektive, Lampenstärke, Wattzahlen und Filter auf die Ergebnisse auswirken können, wird durch eine Positivkontrolle die Funktion von Reagenzien, der Kulturmethodologie und des Mikroskops überprüft.

Qualitätskontrolle

In jeden Test sollten Positiv- und Negativkontrollen einbezogen werden, um die ordnungsgemäße Funktion der Verfahren bei der Identifizierung der Echo-Virus 30-Isolate zu gewährleisten. Die Vertiefung der Positivkontrolle sollte Zellen enthalten, die eine apfelgrüne Fluoreszenz des Zellkerns und/oder Zytoplasmas aufweisen. Bei Verwendung einer Evans-Blau-Gegenfärbung sollte die Vertiefung für die Negativkontrolle Zellen mit einer mattroten Färbung aufweisen.

Hinweis: Das gesamte Deckglas bzw. die gesamte Objektträgervertiefung auf die fluoreszierende apfelgrüne Farbe in den mit Enterovirus infizierten Zellkernen untersuchen.

Positivkontrollen sollten mit den entsprechenden Echo-Virus-Isolaten oder mit bekannten positiven klinischen Isolaten vorbereitet werden. Für die Negativkontrolle können bekannte negative Laborproben verwendet werden.

Echovirus Control Slides  5074 mit Echo-Virus-positiven und -negativen Vertiefungen sind bei EMD Millipore Corporation erhältlich. Lebende Echo-

Viren für die Positivkontrolle können von der American Type Tissue Culture Collection ATCC® , Manassas, VA, bezogen werden.

Vorsicht: Eine fluoreszente Färbung von Zellfragmenten, oft dadurch bedingt, dass das Konjugat in solchen Zerfallsprodukten eingeschlossen wird, sollte ignoriert werden. Wenn Positiv- und Negativkontrollen nicht deutlich voneinander unterschieden werden können, sollte der Test als ungültig betrachtet und nach einer Überprüfung und der Durchführung der im Abschnitt „Problembehandlung“ vorgeschlagenen Korrekturen wiederholt werden.

Einschränkungen

- Stellenweise kann bei einigen Isolaten eine Hintergrundfärbung schwacher Intensität auftreten, der spezifische Echovirus 30 MAb wies jedoch stets eine deutlich stärkere Färbungsintensität auf.
- Dieser monoklonale Antikörper wurde bezüglich des bestimmten auf dem Echo-Virus 30 nachgewiesenen Strukturprotein-Antigens oder Epitops nicht charakterisiert.
- Die Art und der Zustand der verwendeten Instrumente wirkt sich auf die visuelle Darstellung des erhaltenen Bildes aus. Die endgültige Reaktion kann je nach Typ des verwendeten Mikroskops, der Lichtquelle, dem Alter der Lampe, der Filterzusammenstellung und der Filterstärke, Unterschieden in der Empfindlichkeit des Antigensubstrats oder des verwendeten Assayverfahrens variieren. Jedes Labor sollte eigene Kriterien für das Lesen der Endpunkte mithilfe entsprechender Kontrollen festlegen.
- Da der monoklonale Antikörper mithilfe eines Prototyp-Stamms vorbereitet wurde, können möglicherweise nicht alle Antigen-Varianten oder neuen Stämme von Echo-Virus 30 nachgewiesen werden.
- Monoklonale Antikörper können möglicherweise keine Stämme von Echo-Virus 30 nachweisen, bei denen geringfügige Änderungen der Aminosäure in der Epitop-Zielregion aufgetreten sind.

Erwartete Werte

EMD Millipore Corporation konnte anhand unserer Studien keine Prävalenzrate bestimmen. Die in den letzten 20 Jahren am häufigsten aufgetretenen Enterovirus-Typen waren Coxsackie-Virus A9, A16, B2, B3, B4, B5 und Echo-

Virus 4, 6, 9, 11 und 30 (20, 21). Diese Serotypen machen im Allgemeinen ungefähr 65% aller in einem Jahr isolierten Enteroviren aus. In einzelnen Jahren kann ein einzelnes Virus deutlicher überwiegen, oder ein anderer Typ kann für einige Zeit häufiger vorkommen.

Die Häufigkeit von Enterovirus-Infektionen kann durch das Alter oder die Konstitution der Patienten, das Klima und die Jahreszeit beeinflusst werden. Die meisten Fälle wurden bei Kleinkindern berichtet. Das Klima stellt einen anscheinend wichtigen Faktor bei der Verbreitung und dem Vorkommen von Enteroviren dar. In gemäßigten Klimazonen kommen Enteroviren im Winter und Frühling im Allgemeinen in geringer Zahl vor, werden aber im Sommer und Herbst wesentlich häufiger isoliert. Sogar in den Vereinigten Staaten tragen gesunde Kinder in den Städten des Südens das Enterovirus viel häufiger in sich als Kinder vergleichbaren Alters in den Städten des Nordens (20).

Bei durchschnittlich etwa 5,95% (Wertebereich 0,5% bis 19,9%) der in den Vereinigten Staaten seit 1970 jährlich als isoliert berichteten nicht-polio-Enteroviren handelte es sich um Echo-Virus 30 (20).

Interpretation der Ergebnisse

Eine **positive** Reaktion ist durch eine Fluoreszenz in **hellem Apfelgrün** im Zellkern und/oder dem Zytoplasma der infizierten Zellen gekennzeichnet. Eine positive Färbung für Echo-Virus 30 stellt sich im Vorhandensein von mindestens 2 intakten Zellen dar, die die spezifische Fluoreszenz aufweisen. Eine **negative** Reaktion ist durch das Fehlen von Fluoreszenz und das Vorhandensein einer **mattroten** Farbe aufgrund einer Evans-Blau-Gegenfärbung, sofern verwendet, gekennzeichnet. Alle positiven Ergebnisse sollten durch Neutralisierung mit typspezifischen Pools von Immunsera bestätigt werden. Ein positives Ergebnis sollte mit dem Vermerk „präsumptives Echo-Virus 30-Isolat, Bestätigung erforderlich“ versehen werden.

Ein negatives Ergebnis schließt eine Infektion mit Echo-Virus 30 nicht aus. Das negative Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht worden sein, z. B.: unzureichende Proben, unsachgemäße Sammlung und Behandlung von Einzelproben, unzulängliche Kulturtechniken oder andere Faktoren, die im Abschnitt „Problembehandlung“ erwähnt werden. Alle negativen Ergebnisse sollten mit dem Vermerk „Kein Virus beobachtet“ oder „Kein Echo-Virus 30 isoliert, weitere Untersuchungen erforderlich“ versehen werden. Es bietet sich an, die negativen Zellen vor den positiven Zellen zu untersuchen, um zu bestimmen, ob eine unspezifische Färbung vorliegt.

Spezifische Leistungsmerkmale

Spezifität und Kreuzreaktionen:

Der gegen Echo-Virus 30 gerichtete monoklonale Antikörper hat die Echo-Virus 30-Prototyp-Stämme ordnungsgemäß identifiziert, sowie auch zuvor typisierte Virusisolate, die vom Center for Disease Control (CDC) und drei weiteren klinischen Virologielabors bereitgestellt und getestet wurden.

In diesen Studien wurden mithilfe monoklonaler Antikörper, die gegen enterovirale Antigene gerichtet sind (sowohl Mischungen verschiedener Serotypen wie auch typspezifische Reagenzien), Virusisolate durch drei externe klinische Virologielabors getestet. Die klinischen Labors befanden sich an der Westküste, dem Südwesten und den südlichen Regionen der Vereinigten Staaten. Es wurden Einzelproben von Patienten aus allen Altersgruppen von Säuglingen bis Senioren genommen. Ein breites Spektrum an Einzelproben wurde kultiviert, einschließlich Flüssigkeiten wie CSF und Urin, Abstrichen, z. B. von Nase, Rachen, Nasenrachenraum und Auge, Stuhlproben und Rektalabstriche. Die Einzelproben wurden in Kultur inokuliert und zuerst mit den Mischungen der MAb (monoklonalen Antikörper) einem Siebttest unterzogen und dann mit den individuellen monoklonalen Komponenten mithilfe von IFA typisiert. Alle Virusisolate wurden durch konventionelle Neutralisierung bestätigt (22). In allen

Labors der Studie wurde das Anti-Mouse IgG/FITC Conjugate REF 5008 als zweiter Antikörper für die gesamte oder einen Teil der Studie verwendet. Im Labor an der Westküste wurde außerdem Ziege-Anti-Maus Ig-Konjugat aus einer anderen handelsüblichen Quelle verwendet.

Der Echovirus 30 MAb wies keine Reaktion mit anderen Viren auf, einschließlich der Coxsackie-Viren A9, A10, A14, A16, A24, A24v und des Coxsackie-Virus B1-6. Der Echovirus 30 MAb wies keine Reaktion mit anderen Echo-Viren auf, einschließlich Echo 1, Echo 2, Echo 3, Echo 4, Echo 5, Echo 7, Echo 9, Echo 11, Echo 11', Echo 13, Echo 14, Echo 15, Echo 16, Echo 18, Echo 20, Echo 21, Echo 22, Echo 25, Echo 29, Echo 32 und Echo 34. Es wurde keine Reaktivität mit den getesteten Isolaten von Enterovirus 70 und 71, Polio 1, Polio 2, Polio 3, HSV-1 und HSV-2 (Herpes-simplex-Virus), Adenovirus und Rhinovirus gefunden. Zusätzlich dazu wurden Kontroll-Objektträger mit nicht infizierten Wirtszellenkulturen und anderen Pathogenen wie Parainfluenza 1, 2 und 3, Influenza A und B, RSV (Respiratory Syncytial Virus), CMV (cytomegalovirus, Zytomegalie-Virus), HHV-6 (humaner Herpes-Virus 6), VZV (Varicella-Zoster-

Virus), Mumps, Masern, Chlamydia, EBV-VCA (Epstein-Barr-Virus-Viruskapsid-Antigen bzw. viral capsid antigen), sowie einem anderen Adenovirus getestet, und es wurde keine signifikante Kreuzreaktion mit dem Echovirus 30 MAb gefunden.

Echovirus 30 MAb wies bei einigen Isolaten stellenweise eine Hintergrundfärbung schwacher Intensität auf, doch wurde bei Echo-Virus 30-Isolaten stets eine deutlich stärkere Färbungsintensität verzeichnet. Die monoklonalen Antikörper wurden titriert, um jede unspezifische Reaktivität zu minimieren.

Klinische Auswertung:

Mithilfe von monoklonalen Antikörpern, die gegen enterovirale Antigene gerichtet sind (sowohl Mischungen verschiedener Serotypen wie auch typspezifische Reagenzien) wurden Virusisolate durch drei externe klinische Virologielabors getestet. Die Virusisolate, die durch konventionelle Neutralisierung bestätigt wurden (22), wurden zuerst mit den Mischungen einem Siebttest unterzogen und dann mit den individuellen monoklonalen Komponenten typisiert. Eine Zusammenfassung der Studien mit einem Vergleich der Ergebnisse der Standardneutralisierung und des **Light Diagnostics™** Indirect Fluorescence Assay mit dem Echovirus 30 MAb ist unten aufgeführt.

Positiv durch Neutralisierung:	161
Light Diagnostics™ IFA, positiv:	149
Relative Sensitivität:	92,6%
95%-Konfidenzintervall-Sensitivität:	87,3% - 96,1%
Negativ durch Neutralisierung:	652
Light Diagnostics™ IFA, negativ:	650
Relative Spezifität:	99,7%
95%-Konfidenzintervall-Spezifität:	98,9% - 100%

Von 2 von 33 Echo-Virus 6-Isolaten abgesehen, wurde *keine andere signifikante Kreuzreaktion* mit anderen klinischen Isolaten beobachtet. Jedoch wurden 12 von 161 getesteten Echo-Virus 30-Isolaten durch den Echovirus 30 MAb nicht erkannt. Dies scheint darauf hinzuweisen, dass eine Stammvariante oder ein geringer Prozentsatz von Echo-Virus 30-Isolaten vorhanden ist, die das durch den Echo-Virus 30-MAb erkannte Antigen nicht anzeigen. Aus den oben angeführten Ergebnissen ist jedoch erkennbar, dass der Echovirus 30 MAb höchst empfindlich und sehr spezifisch ist.

(95%-Konfidenzintervalle wurden mit der Exakt-Methode (23) berechnet.)

Problembehandlung

Die Vorbereitung der Proben hängt von der jeweils verwendeten Methode ab und kann sich auf die erzielten Ergebnisse auswirken. Um Fragen zur Leistungsfähigkeit zu beantworten, müssen alle Schritte des Verfahrens analysiert werden.










Eine deutliche Reduzierung der Fluoreszenz kann folgende Ursachen haben:

- 1) Reagenzzerfall
 - 2) Mikroskopische Probleme
 - 3) Auswirkung anderer Geräte oder Methoden
- Das Ablaufdatum aller verwendeten Reagenzien überprüfen.
 - Wenn das Ablaufdatum eines Reagenz nicht überschritten wurde, die Mikroskopleistung überprüfen und die die Positivkontrolle erneut lesen.
 - Wenn die Ursache des Problems weiterhin nicht gefunden werden kann, die Arbeitsweise der gesamten Ausstattung anhand der Beipackzettel überprüfen und den Test erneut durchführen.

Für zusätzliche technische Hilfe wenden Sie sich bitte an den Technischen Kundendienst von **EMD Millipore Corporation**. Ihre nächstgelegene Niederlassung finden Sie online unter: www.millipore.com/offices.

Die Abschnitte bezüglich der literaturen referenzen diese Beipackzettel zur **Light Diagnostics** IVD sind nur in den vollständigen englischsprachigen Versionen aufgeführt. Bitte entnehmen Sie diesen Versionen die produkt-spezifischen Details.

Glossar der Symbole

Symbole	Verwendet für	Symbole	Verwendet für
	Katalog-Nummer		DIE Nutzung durch JJJJ-MM-DD oder YYYY-MM
	Fabrikant		Autorisierte Vertretung in der Europ äischen Gemeinschaft
	Achtung, Beglitedokumente		Inhalausreichend fü r<n>ansätze
	In-vitro-Diagnostikum		Temperaturbegrenzung
	Gebrauchsanweisung beachten		BiologischenRisiken
	Kontrolle		Negative Kontrolle
	Positive Kontrolle		

GEWÄHRLEISTUNG UND HAFTUNG

1. Nur die Produkteigenschaften, welche von Millipore in den maßgeblichen Spezifikationen auf der Website (www.millipore.com) veröffentlicht wurden, gelten als die vertraglich vereinbarte Beschaffenheitsmerkmale der verkauften Waren. Andere öffentliche Aussagen von Millipore über die Produkteigenschaften, insbesondere in der Werbung, sind nicht Bestandteil der vertraglich vereinbarten Beschaffenheitsmerkmale der verkauften Waren. Die Gewährleistung entfällt, wenn die Ware nicht gemäß den Vorgaben hierfür eingesetzt wurde. Die Ansprüche des Kunden wegen eines Mangels verjähren innerhalb von einem Jahr ab dem gesetzlichen Verjährungsbeginn. Jegliche weitergehende Gewährleistung wird ausgeschlossen.
2. Der Kunde hat die Ware bei Anlieferung unverzüglich gemäß § 377 HGB zu untersuchen. Der Kunde hat etwaige offensichtliche Mängel zum Erhalt der Gewährleistungsansprüche unverzüglich, spätestens bis zum Ablauf des 3. Werktages nach Anlieferung, schriftlich Millipore und, sofern der Mangel auch auf dem Transport aufgetreten sein kann, auch dem Frachtführer anzuzeigen. Fehlende Ware ist entsprechend spätestens binnen 10 Kalendertagen ab Rechnungsdatum anzuzeigen.
3. Außer im Falle einer berechtigten Rückabwicklung des Vertrages darf der Kunde Waren nicht ohne ausdrückliche schriftliche Zustimmung von Millipore zurücksenden.
4. Millipore haftet nicht für eine Wertminderung der vom Kunden erworbenen Ware aufgrund unzureichender Aufbewahrungsbedingungen. Der Kunde verpflichtet sich diesbezüglich, die Spezifikationen, Nutzungs- und Lagerbedingungen der relevanten Ware zu berücksichtigen. Bei Nichtbeachtung dieser Spezifikationen, Nutzungs- und Lagerbedingungen ist eine Gewährleistung von Millipore ausgeschlossen.
5. Sofern dem Kunden ein gesetzlicher Anspruch auf Nacherfüllung zusteht, kann Millipore als Nacherfüllung nach eigener Wahl die Beseitigung des Mangels oder die Lieferung einer mangelfreien Sache anbieten. Bei form- und fristgerecht vorgebrachten, sachlich gerechtfertigten Beanstandungen und Fehlschlägen der Nacherfüllung hat der Kunde das Recht, angemessene Kaufpreisminderung zu verlangen, vorbehaltlich des Rechts von Millipore, stattdessen die bemängelte Ware zurückzunehmen und den Kaufpreis zu erstatten. Schadenersatzansprüche des Kunden wegen eines Sachmangels sind ausgeschlossen, es sei denn, es liegt einer der in Abs. 7 genannten Fälle vor.
6. Gewährleistungsansprüche des Kunden gegen Millipore bestehen nicht im Falle:
fehlerhafter Installation, Nutzung oder Wartung der Waren entgegen den entsprechenden Vorgaben von Millipore;
normaler Abnutzung der Waren oder aufgrund fehlender ordnungsgemäßer Wartung.
Gewährleistungsansprüche des Kunden bestehen ebenfalls nicht im Falle eines unerheblichen Mangels.
7. Millipore haftet bei Vorsatz oder grober Fahrlässigkeit unbeschränkt. Ebenfalls unbeschränkt haftet Millipore im Falle einer fahrlässigen Pflichtverletzung, sofern Ansprüche aus der Verletzung des Lebens, des Körpers oder der Gesundheit betroffen sind. Im Übrigen haftet Millipore bei einfacher Fahrlässigkeit nur, wenn eine wesentliche Vertragspflicht verletzt worden ist. In diesem Fall ist die Haftung von Millipore auf einen Höchstbetrag, der dem Kaufpreis entspricht, und auf solche Schäden begrenzt, mit deren Eintritt bei Vertragsschluss vernünftigerweise zu rechnen war. Die Haftung von Millipore für Verzug wird bei einfacher Fahrlässigkeit ganz ausgeschlossen. Eine Haftung von Millipore nach den Vorschriften des Produkthaftungsgesetzes, wegen Arglist oder einer Garantie bleibt unberührt.
8. Millipore haftet nicht für Verlust oder Beschädigung der Waren auf dem Transport. Der Kunde hat hieraus resultierende Schadenersatzansprüche gegen den Frachtführer zu richten.

Twenn® ist eine eingetragene Marke von ICI Americas, Inc.

ATCC® ist eine Marke der American Type Culture Collection Corporation.

©2019 EMD Millipore Corporation, eine Sparte der Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland. Alle Rechte vorbehalten. EMD, EMD Millipore, Millipore, der Markierung M, Light Diagnostics und alle anderen Marken, sofern nicht ausdrücklich oben im Text identifiziert, wie die Zugehörigkeit zu einer dritten Partei, von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland gehört.



LIGHT DIAGNOSTICS™

ECHOVIRUS 30 MONOCLONAL ANTIBODY

Per l'identificazione presunta degli isolati dell'ecovirus 30
in coltura cellulare

Supplemento Italiano Di Lingua

REF 3315

IVD **CE**



EMD Millipore Corporation
28820 Single Oak Drive Temecula, CA 92590 • United States
Tel. : +1 (951) 676-8080 • Fax : +1 (951) 676-9209
www.millipore.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanover, Germany

Uso previsto

Echovirus 30 Monoclonal Antibody Light Diagnostics™ è un reagente tipo-specifico destinato allo screening a immunofluorescenza indiretta per l'identificazione presunta di ecovirus 30 ottenuti in coltura cellulare e non è destinato a test diretti su campioni umani.

IVD

Background e significato clinico

Gli enterovirus, come gli ecovirus, sono classificati come appartenenti alla famiglia dei picornavirus, pico [piccolo] + RNA [ribonucleic acid, acido ribonucleico] + virus. I picornavirus sono tra gli acidi ribonucleici più piccoli e semplici contenenti virus che si conoscano (1). Gli RNA di molti enterovirus sono stati clonati ed è stata ottenuta la sequenza genomica completa. Gli RNA di tutti gli enterovirus di cui si è ottenuta la sequenza, sono di lunghezza simile, circa 7400 nucleotidi e hanno una organizzazione identica (1).

Il tubo digerente umano è il sito predominante della replicazione degli enterovirus e questi virus furono isolati per la prima volta da campioni enterici. Questi virus sono la causa di poliomielite paralizzante; meningite o encefalite asettica; miocardite; pleurodinia; malattia mano, piede, bocca; congiuntivite e numerose altre sindromi associate con organi bersaglio non intestinali. Nella famiglia degli enterovirus sono numerati 67 tipi di enterovirus (1): 3 virus della poliomielite, 23 virus coxsackie A, 6 virus coxsackie B, 31 ecovirus e 4 altri enterovirus.

Gli enterovirus, compresi gli ecovirus e i virus coxsackie, sono stati riportati come i maggiori agenti eziologici della meningite asettica (2). Sono state anche riportate sindromi cliniche associate a infezioni causate da ciascun tipo di enterovirus (3). Gli ecovirus possono causare meningite asettica, paralisi, encefalite, atassia, sindrome di Guillain-Barre, esantema e malattie respiratorie. Gli ecovirus sono stati anche associati con diarrea, mialgia epidemica, pericardite, miocardite e disturbi epatici.

La determinazione di un'associazione tra un enterovirus e una particolare patologia in un paziente necessita di una conferma di laboratorio dell'infezione attraverso l'isolamento del virus o la documentazione di una specifica risposta sierologica in un campione correttamente programmato. Sono state pubblicate descrizioni dettagliate dei principi e delle procedure per la diagnosi delle infezioni da enterovirus (4-7). Le tecniche di coltura cellulare hanno reso

possibile l'accurato rilevamento degli enterovirus (8-10). L'identificazione degli isolati degli enterovirus contribuisce alla prevenzione, al trattamento e alla comprensione delle malattie infettive e anche alla scoperta di nuovi isolati di virus. La caratterizzazione degli isolati degli enterovirus, in genere si compie attraverso la neutralizzazione con pool tipospecifici di sieri immuni (11). Questo metodo richiede molto tempo (7 giorni o più) ed è costoso. Come alternativa, la caratterizzazione degli enterovirus con anticorpo monoclonale tipospecifico e/o pool di anticorpi monoclonali gruppospecifici con l'IFA (Indirect Immunofluorescence, test a immunofluorescenza indiretta) è potenzialmente più rapida e meno costosa (12-18).

Principi del test

Echovirus 30 MAb (**Echovirus 30 Monoclonal Antibody Light Diagnostics™**) può essere usato per identificare isolati virali degli ecovirus 30 in coltura cellulare usando l'IFA. L'anticorpo monoclonale fornito si lega all'antigene tipospecifico dell'ecovirus 30 presente sul vetrino della coltura cellulare. L'anticorpo monoclonale non legato viene rimosso per mezzo di lavaggio con PBS (phosphate-buffered saline, soluzione salina tampone fosfato). Viene poi aggiunto un anticorpo secondario marcato con FITC (fluorescein isothiocyanate, isotiocianato di fluoresceina) che si lega al complesso antigene-anticorpo. Il lavaggio con PBS rimuove l'anticorpo secondario non legato. Il FITC presenta una fluorescenza verde mela quando viene illuminato da luce ultravioletta, permettendo la visualizzazione del complesso con microscopia. Un risultato positivo è indicato dalla fluorescenza cellulare. Le cellule non infette presentano una colorazione rosso spento, se si usa il mezzo di contrasto Evans Blue nell'anticorpo secondario marcato con FITC o altrove nella procedura.

Reagente fornito

Echovirus 30 Monoclonal Antibody - REF 3315: Una fiala con contagocce contenente 1 ml di anticorpo monoclonale di topo IgG_{2a} contro l'ecovirus tipo 30, stabilizzatore proteico e sodio azide 0,1% (conservante).

Materiali necessari, ma non forniti

- Acetone, reagent grade (a elevata purezza); conservato in vetro
- Acqua distillata o deionizzata

- Soluzione di ipocloruro di sodio 0,05% (diluizione 1:100 di candeggina per uso domestico)
- Provette per coltura di tessuti o shell vial (provette per minicolture), sterili, con vetrini coprioggetto da 12 mm contenenti monostrato di linea cellulare, adatti per la crescita di enterovirus
- Terreni per la coltura dei tessuti come RPMI o EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, terreno essenziale minimo di Eagle) con FBS (fetal bovine serum, siero fetale di bovino) e antibiotici o equivalenti
- Terreno di trasporto virale che non inibisca gli enterovirus
- NaOH 0,1 N
- HCl 0,1N
- Vetrini per microscopio, non a fluorescenza
- N. 1 vetrino coprioggetto
- Vetrini di controllo negativi e positivi
- Anti-Mouse IgG/FITC Conjugate REF 5008
- Anticorpo di topo normale, come il REF 5014, quale controllo negativo
- Phosphate-Buffered Saline (PBS 0,01 M a pH 7,1-7,4 con NaCl 0,085% e sodio azide 0,1%), REF 5087
- 0,05% Tween® 20 / 0,1% Sodium Azide Solution (opzionale), REF 5037
- Aspiratore con pipette Pasteur sterili usa e getta
- Centrifuga in grado di raggiungere 700-950 x g con rotore adibito per materiale a rischio biologico e adattatori per shell vial
- Microscopio a fluorescenza con combinazione di filtro adatta per FITC (picco di eccitazione = 490 nm, picco di emissione = 520 nm) con ingrandimento 100x, 200x, 400x (obiettivo secco)
- Pinze
- Camera umida
- Incubatore, 37 ± 1°C
- Filtro per siringa da 0,45 micron
- Bagno a ultrasuoni
- Vortex o agitatore a ultrasuoni

- Mounting Fluid REF 5013
- Echovirus Control Slides REF 5074

Avvertenze e precauzioni

- La prestazione di Echovirus 30 MAb **Light Diagnostics™** non è stata ancora stabilita su campioni diretti.
- La sodio azide presente nel reagente, può reagire con le tubature di piombo e rame formando azoturi di metallo potenzialmente esplosivi. Quando si eliminano soluzioni che contengono sodio azide, far scorrere abbondanti quantità di acqua per prevenirne l'accumulo.
- Maneggiare tutti i campioni e i materiali che vengono a contatto con tali soluzioni come potenzialmente infettivi. Prima della eliminazione, decontaminare con ipocloruro di sodio a 0,05%.
- Evitare il contatto con l'Evans Blue, se presente in qualche reagente, poiché è potenzialmente carcinogeno. In caso di contatto con la pelle, sciacquare abbondantemente la zona interessata.
- Non risucchiare con la bocca i reagenti in pipetta.
- Non lasciare che le shell vial o i vetrini si asciughino durante la procedura di colorazione.
- Il deposito o l'alterazione di qualsiasi reagente può causare risultati errati.
- L'acetone è estremamente infiammabile e dannoso se ingerito o inalato. Tenere lontano da calore, scintilla o fiamme. Evitare di respirarne i vapori. Usare una ventilazione adeguata.
- Il Mounting Fluid REF 5013 contiene un potenziatore di fluorescenza che può distruggere le mucose. Evitare il contatto diretto con la pelle o le mucose. In caso di contatto, far scorrere abbondanti quantità di acqua sulla zona interessata.
- Vetrini preparati troppo presto (<25% CPE) o troppo tardi (>95% CPE) possono essere difficili da leggere e possono portare a risultati falsi negativi.

Stabilità e conservazione

Se conservato alla temperatura di 2° - 8°C, l'anticorpo monoclonale è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Non congelare né esporre a temperature elevate. Eliminare qualsiasi reagente dopo la data di scadenza.

Raccolta dei campioni

Anche se le procedure variano da laboratorio a laboratorio, sono proposte alcune indicazioni sulla modalità di trattamento dei campioni per le analisi degli enterovirus. Il tipo di campione e il metodo di trattamento dipendono dallo stato clinico del paziente e dalla richiesta del laboratorio del consulente medico. I campioni per l'isolamento degli enterovirus vanno trasportati in ghiaccio o in involucri freddi e messi in coltura appena possibile. Se è necessario conservarli, mantenerli a 2° - 8°C fino a un massimo di 48 ore. Se è necessario conservarli più a lungo, congelarli alla temperatura di -70°C in terreni appropriati (19).

Trattamento dei campioni

Fluidi organici – Per campioni liquidi, quali CSF (cerebrospinal fluid, liquido cerebrospinale), inoculare 0,2-0,5 ml di campione non diluito in ciascun recipiente da coltura.

Tamponi – Campioni, quali tamponi rinofaringei, faringo-tonsillari od oculari, in terreni di trasporto devono essere agitati o centrifugati per rimuovere le cellule dal tampone. Inoculare 0,2-0,3 ml in ciascun recipiente di coltura.

Materiale fecale – Se è presente materiale fecale solido, agitare con il vortex in 2-5 ml di terreno di trasporto virale o PBS. Eliminare il tampone in una soluzione di ipocloruro di sodio. Centrifugare a 950 x g per 10 minuti. Se necessario, filtrare il sovrantante attraverso un filtro per siringa da 0,45 micron per chiarificare. Inoculare 0,1-0,3 ml in ciascun recipiente di coltura.

Tessuti solidi – Prendere piccole porzioni di campione di tessuto e porle in 2-3 ml di terreno di trasporto virale. Triturare il tessuto con un tritatessuto. Centrifugare delicatamente per fare sedimentare i detriti. Inoculare 0,1-0,2 ml di sovrantante in ciascun recipiente di coltura.

Procedura di inoculo

1. Immediatamente prima di inoculare il campione, esaminare le colture cellulari per verificare la corretta morfologia.
2. Aggiungere il volume appropriato di inoculo, come indicato sopra, a ciascun recipiente di coltura.
3. Porre in un incubatore a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Procedura di analisi

Preparazione dei vetrini:

1. Esaminare ogni giorno il monostrato per verificare eventuali CPE (cytopathic effect, effetti citopatici). Quando il CPE è $> 25\%$, aspirare il terreno dalla coltura e risciacquare delicatamente il monostrato per 3 volte con 1 ml di PBS.

Nota: reagenti contenenti sodio azide o disinfettanti del tipo Tween 20 non devono essere usati nelle procedure di isolamento virale.

2. Aggiungere 0,5 ml di PBS e raschiare il recipiente di coltura per rimuovere il monostrato cellulare, sospendendo di nuovo le cellule nel PBS.
3. Centrifugare la sospensione cellulare a $250 \times g$ per 10 minuti a temperatura ambiente.
4. Risospendere il pellet di cellule in 0,1-0,2 ml di PBS, utilizzarlo per creare uno spot di cellule nei pozzetti dei vetrini da 6-8 mm e lasciare che i vetrini si asciughino completamente all'aria.
5. Fissare il vetrino in acetone freddo ($2^\circ - 8^\circ\text{C}$) per 10 minuti.
6. Rimuovere il vetrino dall'acetone e lasciar asciugare completamente all'aria.
7. Il vetrino deve essere colorato appena possibile. Se è necessario conservare i vetrini, tenerli a una temperatura $\leq 20^\circ\text{C}$, con essiccante.

Procedura per immunofluorescenza indiretta (colorazione) consigliata:

1. Lasciare che il vetrino di controllo fissato con l'acetone e/o il vetrino per il test e i reagenti si equilibrino a temperatura ambiente.

Nota: non lasciare che i vetrini si asciughino durante la procedura di colorazione.

2. Aggiungere un quantitativo di anticorpo monoclonale o anticorpo di topo normale (reagente di controllo negativo) sufficiente a coprire le cellule; 1 goccia per lo spot cellulare e 4-6 gocce per le shell vial.
3. Incubare il vetrino a 37°C per 30 minuti in camera umida.
4. Sciacquare delicatamente il vetrino con un flacone con spruzzatore di PBS/Tween 20 per 10-15 secondi per rimuovere l'eccesso di soluzione di anticorpo monoclonale, facendo attenzione a dirigere il getto lontano dal pozzetto. Per le shell vial: aspirare il reagente dalla fiala e lavare delicatamente ciascuna shell vial per 3 volte con ml di PBS/Tween 20.
5. Mettere il vetrino in una vaschetta per colorazione o vaschetta Coplin (con portavetrino o equivalente) e coprire con PBS. Sciacquare per 5-10 minuti. Agitare delicatamente con una frusta magnetica o a mano.
6. Eliminare il reagente in eccesso dal vetrino e asciugare bene l'area che circonda lo spot cellulare.
7. Aggiungere un quantitativo di FITC-labeled Anti-Mouse IgG Conjugate **REF** 5008 o equivalente sufficiente a coprire le cellule; 1 goccia per lo spot cellulare e 4-6 gocce per le shell vial.
8. Ripetere le fasi da 3 a 5.
9. Fissare sotto un vetrino coprioggetto, usando un Mounting Medium acquoso a pH 8,5 **REF** 5013 o equivalente. Per le shell vial: aspirare il PBS/Tween dalle shell vial. Sciacquare ciascun vetrino coprioggetto usando un ago ricurvo fissato su una piccola siringa e rimuovere attentamente con le pinze. Montare ciascun vetrino coprioggetto con il LATO DELLE CELLULE RIVOLTO VERSO IL BASSO su un vetrino di vetro con Mounting Medium.
10. Asciugare il liquido in eccesso dal bordo del vetrino.

Nota: per ottenere migliori risultati, leggere i vetrini immediatamente dopo la preparazione. Se i vetrini devono essere conservati dopo la colorazione, tenere alla temperatura di 2° - 8°C, in un contenitore sicuro, al buio.

11. Esaminare i vetrini, usando un microscopio a fluorescenza a 100-200x per eventuali cellule che mostrano fluorescenza. Un esame dettagliato può essere fatto a ingrandimento di 400x.

***Nota:** la prestazione del microscopio a fluorescenza è di importanza cruciale per ottenere risultati del test soddisfacenti. Poiché obiettivi, intensità e numero di watt della lampada e filtri possono influenzare i risultati, l'uso di un controllo positivo permette di verificare il funzionamento dei reagenti, la metodologia della coltura e il microscopio.*

Controllo di qualità

In ogni test vanno sempre inclusi controlli positivi e negativi per assicurare la corretta prestazione della procedura per la identificazione del/degli isolato/i dell'ecovirus 30. Il pozzetto del controllo positivo deve mostrare cellule fluorescenza verde mela nel nucleo e/o nel citoplasma. Il pozzetto del controllo negativo deve mostrare cellule con una colorazione rosso spento, se si usa un contrasto Evans Blue.

***Nota:** scansionare tutto il vetrino coprioggetto o il pozzetto del vetrino per eventuale colore fluorescente verde mela presente nei nuclei delle cellule infette da enterovirus.*

I controlli positivi vanno sempre preparati con gli isolati degli ecovirus appropriati o con isolati clinici positivi noti. Il controllo negativo può utilizzare campioni di laboratorio negativi noti. Echovirus Control Slides REF 5074 con pozzetti positivi e negativi per gli ecovirus sono disponibili presso la EMD Millipore Corporation. Ecovirus vivi per controllo positivo si possono ottenere dalla American Type Tissue Culture Collection ATCC[®], Manassas, VA.

***Attenzione:** la colorazione a fluorescenza di frammenti cellulari, spesso dovuta a coniugato intrappolato in questi detriti, va ignorata. Se non possono essere chiaramente distinti controlli positivi e negativi, il test va considerato non valido e va ripetuto dopo aver fatto un esame e aver apportato le correzioni suggerite nella sezione "Ricerca e risoluzione dei problemi".*

Limitazioni

- Con alcuni isolati virali si può presentare una occasionale colorazione di fondo a bassa intensità, lo specifico Echovirus 30 MAb ha sempre mostrato una intensità di colorazione significativamente maggiore.

- Questo anticorpo monoclonale non è ancora stato caratterizzato per quanto riguarda il particolare antigene proteico strutturale o epitopo rilevato sull'ecovirus 30.
- Il tipo e le condizioni della strumentazione usata, influenzano l'aspetto visivo dell'immagine ottenuta. La reazione finale può variare a seconda del tipo di microscopio impiegato, della fonte luminosa, dell'età della lampada, dell'assemblaggio e dello spessore del filtro, delle differenze di sensibilità del substrato antigene o della procedura di analisi usata. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri criteri per la lettura finale usando i controlli appropriati.
- Dal momento che l'anticorpo monoclonale è stato preparato usando un ceppo prototipo, può non rilevare tutte le varianti di antigene o nuovi ceppi dell'ecovirus 30.
- Gli anticorpi monoclonali possono non riuscire a rilevare ceppi del virus dell'ecovirus 30 che hanno subito cambiamenti di aminoacidi di scarsa importanza nella regione epitopo bersaglio.

Valori attesi

La EMD Millipore Corporation non è stata in grado di stabilire un tasso di prevalenza sulla base dei nostri studi. I tipi di enterovirus riportati più di frequente negli ultimi 20 anni sono stati i virus coxsackie A9, A16, B2, B3, B4, B5 e gli ecovirus 4, 6, 9, 11 e 30 (20, 21). Questi sierotipi in genere costituiscono circa il 65% di tutti gli enterovirus isolati ogni anno. Ogni anno la predominanza di ciascun virus può essere più marcata o un altro tipo può aumentare la frequenza per un certo tempo.

La frequenza di infezioni da enterovirus è influenzata dall'età e dalle condizioni dei pazienti, dal clima e dal periodo dell'anno. La maggior parte di casi riportati è in bambini piccoli. Il clima sembra essere un fattore importante nella circolazione e nella prevalenza degli enterovirus. Nei climi temperati gli enterovirus sono in genere presenti a bassi livelli in inverno e primavera, ma sono isolati molto più frequentemente in estate e autunno. Anche negli Stati Uniti, bambini sani che vivono in città del sud presentano più enterovirus di quelli della stessa età che vivono in città del nord (20).

L'ecovirus 30 ha raggiunto una media di circa 5,95% (gamma da 0,5% a - 19,9%) degli isolati degli enterovirus non polio riportati ogni anno negli Stati Uniti a partire dal 1970 (20).

Interpretazione dei risultati

Una reazione **positiva** è indicata da una fluorescenza **verde mela brillante** nel nucleo e/o nel citoplasma delle cellule infette. La colorazione positiva per l'ecovirus 30 è rappresentata dalla presenza di almeno 2 o più cellule intatte che mostrano fluorescenza specifica. Una reazione **negativa** è indicata dall'assenza della fluorescenza e dalla presenza di un colore **rosso spento** dovuta al mezzo di contrasto Evans Blue, se usato. Tutti i risultati **positivi** devono essere confermati per mezzo di neutralizzazione con pool tipospecifici di sieri immuni. Un risultato positivo va riportato come "Isolato presunto per ecovirus 30, deve seguire conferma".

Un risultato negativo non esclude un'infezione da ecovirus 30. Il risultato negativo può essere dovuto a una serie di fattori come: campione inadeguato, raccolta e manipolazione del campione non corrette, tecnica di coltura non corretta o altri fattori citati nella sezione "Ricerca e risoluzione dei problemi". Tutti i risultati negativi vanno riportati come "Nessun virus osservato" o "Nessun ecovirus 30 isolato, devono seguire ulteriori studi". È utile esaminare le cellule negative prima di quelle positive per stabilire se c'è colorazione non specifica.

Caratteristiche specifiche della prestazione

Specificità e reattività crociata:

L'anticorpo monoclonale contro l'ecovirus 30 identificava correttamente i ceppi prototipo e gli isolati virali dell'ecovirus 30 precedentemente caratterizzati, forniti e testati dal CDC (Center for Disease Control, Centro per il controllo delle malattie) e da 3 laboratori esterni di virologia clinica.

In questi studi sono stati usati anticorpi monoclonali diretti contro antigeni enterovirali (sia miscele di diversi sierotipi sia reagenti tipospecifici) per testare isolati virali di 3 laboratori di virologia clinica. I laboratori clinici erano situati nelle regioni della costa occidentale del sud est e del sud degli Stati Uniti. I campioni sono stati ottenuti da pazienti le cui età andavano dalla fanciullezza alla vecchiaia. Sono stati coltivati una grande varietà di campioni, compresi fluidi (CSF e urina), tamponi (nasali, faringo-tonsillari, rinofaringei e oculari), campioni di feci e tamponi rettali. I campioni sono stati inoculati nella coltura e sottoposti a un primo screening con le miscele MAb e poi caratterizzati mediante l'IFA con i singoli componenti monoclonali. Tutti gli isolati virali sono stati confermati con neutralizzazione convenzionale (22). Tutti i laboratori di questo studio come anticorpo secondario hanno usato Anti-Mouse IgG/FITC Conjugate

REF 5008 per tutto lo studio o per una parte di esso. Il laboratorio della costa occidentale ha utilizzato anche il Goat anti-Mouse Ig Conjugate di un'altra fonte commerciale.

Echovirus 30 MAb non reagiva con altri virus compresi i virus coxsackie A9, A10, A 14, A16, A24, A24v o il virus coxsackie B1-6. Eco 30 MAb non reagiva con altri ecovirus compresi eco 1, eco 2, eco 3, eco 4, eco 5, eco 7, eco 9, eco 11, eco 11', eco 13, eco 14, eco 15, eco 16, eco 18, eco 20, eco 21, eco 22, eco 25, eco 29, eco 30, eco 32 e eco 34. Non è stata trovata alcuna reattività con isolati testati dell'enterovirus 70 e 71, di polio 1, polio 2, polio 3, dell'HSV-1 o HSV-2 (herpes simplex virus, virus dell'herpes simplex), dell'adenovirus o del rinovirus. Inoltre sono stati testati vetrini di controllo di colture cellulari ospiti non infette e altri patogeni quali parainfluenza 1, 2 e 3, influenza A e B, RSV (respiratory syncytial virus, virus respiratorio sinciziale), CMV (cytomegalovirus, citomegalovirus), HHV-6 (human herpes virus - 6, virus dell'herpes umano 6), VZV (Varicella-Zoster Virus, virus della varicella zoster), parotite, morbillo, clamidia, EBV-VCA (Epstein-Barr Virus - Viral Capsid Antigen, virus Epstein-Barr antigene del capside virale) e adenovirus e non è stata trovata alcuna reattività crociata significativa con Echovirus 30 MAb.

Echovirus 30 MAb mostrava una occasionale colorazione di fondo a bassa intensità con alcuni isolati virali, ma con isolati degli ecovirus 30 mostrava coerentemente una intensità di colorazione significativamente maggiore. Gli anticorpi monoclonali sono stati titolati per minimizzare qualsiasi reattività non specifica.

Valutazione clinica:

Sono stati usati anticorpi monoclonali diretti contro antigeni enterovirali (sia miscele di diversi sierotipi sia reagenti tipospecifici) per testare isolati virali di 3 laboratori di virologia clinica. Gli isolati virali, confermati da neutralizzazione convenzionale (22), sono stati sottoposti a un primo screening con miscele e poi caratterizzati con i singoli componenti monoclonali. Di seguito è riportato un sommario degli studi combinati che confrontano i risultati della neutralizzazione standard e il test a fluorescenza indiretta **Light Diagnostics™** con Echovirus 30 MAb.

Positivo con neutralizzazione:	161
Positivo con Light Diagnostics™ mediante IFA:	149
Sensibilità relativa:	92,6%
Intervallo fiduciale al 95% per la sensibilità:	87,3%-96,1%

Negativo con neutralizzazione:	652
Negativo con Light Diagnostics™ mediante IFA:	650
Specificità relativa:	99,7%
Intervallo fiduciale al 95% per la specificità:	98,9%-100%

Fatta eccezione per 2 dei 33 isolati dell'ecovirus 6, non è stata notata *alcuna altra reattività crociata* con altri isolati clinici. Echovirus MAb 30 però non riusciva a riconoscere 12 dei 161 ecovirus 30 testati. Ciò sembra indicare che c'è un ceppo variante o una bassa percentuale degli isolati dell'ecovirus 30 che non esprimono l'antigene riconosciuto da Echovirus 30 MAb. Tuttavia i risultati che precedono indicano che Echovirus 30 MAb è molto sensibile e specifico.

(Gli intervalli fiduciali al 95% sono stati calcolati con il metodo esatto [23].)

Ricerca e risoluzione dei problemi

La preparazione dei campioni dipende dalla tecnica e può influenzare i risultati finali. Per risolvere eventuali problemi relativi alle prestazioni, è necessario analizzare tutte le fasi del processo.


Una notevole riduzione della fluorescenza può indicare:

- 1) Il deterioramento del reagente
 - 2) Un problema al microscopio
 - 3) L'effetto di un altro strumento o tecnica.
- Verificare la data di scadenza di tutti i reagenti usati.
 - Se i reagenti non sono scaduti, verificare la prestazione del microscopio; rileggere il controllo positivo.
 - Se il problema non è ancora stabilito, verificare tutto il funzionamento della strumentazione secondo quanto riportato sulle confezioni e ripetere il test.

Per ulteriore supporto, contattare l'Assistenza tecnica **EMD Millipore Corporation**. L'indirizzo della sede EMD Millipore Corporation più vicina è disponibile c/o www.millipore.com/offices.

I riferimenti bibliografici di questi foglietti illustrativi per prodotti IVD della **Light Diagnostics™** sono solo nella versione inglese. Consultare tale versione per i dettagli specifici.

Glossario dei simboli

Simboli	Utilizzato per	Simboli	Utilizzato per
	Numero di catalogo		Uso della parte AAAA-MM-GG o AAAA-MM
	Fabbricante		Representante autorizzato della Comunità europea
	Attenzione, consultare la documentazione allegata		Contenuto sufficiente per $< n >$ test
	Nel dispositivo medico-diagnostico in vitro		Temperature limite
	Consultare le istruzioni per l'uso		Rischi biologici
	Controllo		Controllo negativo
	Controllo positivo		

GARANZIE E LIMITAZIONI DELLA RESPONSABILITÀ

1. Millipore garantisce che i suoi Prodotti sono conformi alle specifiche indicate nel sito ad essi riferibili, purché utilizzati secondo le istruzioni applicabili, per un periodo di un anno dalla spedizione dei Prodotti. Millipore non fornisce, espressamente o tacitamente, alcuna ulteriore garanzia.
2. Il Cliente è tenuto a controllare i Prodotti al momento della consegna. Qualunque riserva in relazione a difetti evidenti per causa imputabile a Millipore, deve essere comunicata immediatamente per iscritto al corriere e tramite lettera raccomandata a Millipore, al massimo entro tre (3) giorni lavorativi dal ricevimento ovvero, in caso di mancata consegna dei Prodotti, entro i dieci (10) giorni di calendario successivi alla data di fatturazione.
3. L'eventuale restituzione dei Prodotti dovrà avvenire solamente con il preventivo consenso di Millipore, e secondo le modalità dalla stessa stabilite. Eventuali restituzioni dei Prodotti senza il preventivo consenso di Millipore non saranno accreditate al Cliente.
4. Millipore non risponderà del deterioramento dei Prodotti acquistati dal Cliente dovuto alle inadeguate condizioni di stoccaggio. A tal fine, il Cliente si impegna a rispettare le specifiche e le condizioni d'uso di tali Prodotti. In caso di inadempimento a tale obbligo, non sarà applicabile alcuna garanzia fornita da Millipore.
5. Nel caso di violazione della suddetta garanzia, Millipore sarà esclusivamente obbligata a riparare o sostituire, a sua discrezione, il Prodotto in questione o una parte dello stesso. Nel caso in cui, in seguito a sforzi ragionevoli, Millipore non fosse in grado di riparare o sostituire il Prodotto o parte del Prodotto, Millipore dovrà restituire al Cliente tutte le somme versate per tale Prodotto o parte del Prodotto.
6. In generale, le garanzie cui Millipore è di regola tenuta, non si applicano in caso di: installazione, uso o manutenzione scorrette dei Prodotti, eseguiti in violazione delle istruzioni fornite da Millipore.
normale usura dei Prodotti o mancanza di conservazione o manutenzione adeguata.
7. Millipore non risponderà di ogni eventuale danno indiretto - quali il danno commerciale, la perdita della clientela, la perdita delle Ordinanze, il danno alle cose o al marchio - che dovessero essere subiti da chiunque in relazione all'uso dei Prodotti.
8. Eventuali danni ai Prodotti o la perdita dei Prodotti dovuti al trasporto non comportano la responsabilità di Millipore. Ogni richiesta in relazione a detti danni o perdita dovrà essere inoltrata dal Cliente al corriere.
9. Eventuali azioni promosse nei confronti del Cliente da parte di terzi costituiscono danni indiretti e pertanto non danno luogo a risarcimento.
10. In ogni caso, eventuali multe o sanzioni imputabili a Millipore, nell'ipotesi in cui sia accertata una responsabilità di quest'ultima, sono limitate alle somme effettivamente versate a Millipore dal Cliente per l'acquisto originario del Prodotto che ha dato luogo alla responsabilità di Millipore.

Tween® è un marchio registrato di ICI Americas, Inc.

ATCC® è un marchio di American Type Culture Collection.

©2019 EMD Millipore Corporation. una divisione di Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Tutti i diritti riservati. Nessuna parte di queste opere può essere riprodotta in alcuna forma senza permesso scritto. EMD, EMD Millipore, Millipore, M marca, Light Diagnostics è un marchio registrato di Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



LIGHT DIAGNOSTICS™

ANTICORPS MONOCLONAL DIRIGE CONTRE LES ECHOVIRUS 30

Pour l'identification présomptive des isolats
d'Échovirus 30 dans les cultures cellulaires
Supplément Français De Langue



3315



CE



EMD Millipore Corporation
28820 Single Oak Drive Temecula, CA 92590 • United States
Tel. : +1 (951) 676-8080 • Fax : +1 (951) 676-9209
www.millipore.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanover, Germany

Application

L'**anticorps monoclonal dirigé contre l'Échovirus 30 Light Diagnostics™** est un réactif d'un type destiné au dépistage indirect par immunofluorescence dans le cadre de l'identification présomptive des échovirus 30 obtenus dans des cultures cellulaires ; il n'est pas destiné à l'analyse directe de spécimens humains.

IVD

Historique et signification clinique

Les entérovirus, dont font partie les échovirus, sont classés parmi les picornavirus, pico [petit] + ARN [acide ribonucléique] + virus. Les picornavirus font partie des virus connus les plus petits et les plus simples renfermant de l'acide ribonucléique (ARN) [1]. L'ARN de nombreux entérovirus a désormais été cloné et leur séquence génomique complète est connue. L'ARN de tous les entérovirus séquencés présente une longueur similaire d'environ 7 400 nucléotides ainsi qu'une organisation identique [1].

Le tube digestif humain, à partir duquel les entérovirus ont été isolés pour la première fois des spécimens entériques, constitue le site prédominant de la réplication des entérovirus. Ces virus sont à l'origine de nombreuses maladies comme la poliomyélite paralytique, la méningo-encéphalite aseptique, des myocardites, la pleurodynie, la maladie mains-pieds-bouche, des conjonctivites et de nombreux autres syndromes associés à des organes cibles extra-intestinaux. La famille des entérovirus compte 67 types d'entérovirus [1] : trois poliovirus, vingt-trois coxsackievirus A, six coxsackievirus B, trente et un échovirus et quatre autres entérovirus.

Les entérovirus, parmi lesquels les échovirus et les coxsackievirus, sont considérés comme les agents étiologiques principaux des méningites aseptiques [2]. Des syndromes cliniques associés à des infections par chaque type d'entérovirus ont également été signalés [3]. Les échovirus peuvent provoquer des méningites aseptiques, des paralysies, des encéphalites, des ataxies, un syndrome de Guillain-Barré, des exanthèmes et des affections respiratoires. Ils ont également été associés à des diarrhées, des myalgies épidémiques, des péricardites, des myocardites et des troubles hépatiques.

L'établissement d'une association entre un entérovirus et une affection précise chez un patient nécessite la confirmation de l'infection par isolation du virus dans un laboratoire ou la documentation de réponses sérologiques spécifiques

sur un spécimen prélevé au moment opportun. Les descriptions détaillées des principes et des procédures de diagnostic des infections à entérovirus ont été publiées [4-7]. Les techniques de culture cellulaire ont rendu possible la détection précise des entérovirus [8-10]. L'identification des isolats d'entérovirus participe à la prévention, au traitement et à la compréhension des maladies infectieuses, ainsi qu'à la découverte de nouveaux isolats viraux. Le typage des isolats d'entérovirus est en général réalisé par neutralisation à l'aide de pools de sérums immuns spécifiques d'un type [11]. Cette méthode est longue (7 jours ou plus) et onéreuse. Le typage des entérovirus à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique d'un type et/ou d'un(de) pool(s) d'anticorps monoclonaux spécifiques d'un groupe par l'intermédiaire d'un dosage par immunofluorescence indirecte peut constituer une méthode alternative plus rapide et moins onéreuse [12-18].

Principe du test

L'anticorps monoclonal dirigé contre les Échovirus 30 (MAb Échovirus 30 Light Diagnostics™ peut être utilisé pour identifier les isolats d'échovirus 30 dans des cultures cellulaires en utilisant un dosage par immunofluorescence indirecte (IFA). Les anticorps monoclonaux fournis se lient à l'antigène d'échovirus 30 spécifique du type présent sur la lame de culture cellulaire. L'anticorps monoclonal non lié est éliminé par rinçage avec une solution saline tamponnée avec du phosphate (PBS). Un anticorps secondaire, marqué par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), est alors ajouté et vient se lier au complexe antigène-anticorps. L'anticorps secondaire non lié est éliminé par rinçage avec de la PBS. Le FITC présente une fluorescence vert pomme quand il est soumis à un rayonnement ultraviolet, ce qui permet la visualisation du complexe au microscope. La fluorescence des cellules indique un résultat positif. Les cellules non infectées présentent une coloration rouge terne si une coloration de contraste au bleu Evans a été employée dans l'anticorps secondaire marqué par le FITC ou à tout autre endroit de la procédure.

Réactif fourni

Anticorps monoclonal dirigé contre les Échovirus 30 - REF 3315 : Un flacon compte-gouttes de 1 ml, contenant un anticorps monoclonal IgG_{2a} de souris dirigé contre l'échovirus 30, un stabilisateur des protéines et de l'azide de sodium 0,1 % (conservateur).

Matériel requis mais non fourni

- Acétone, de qualité réactif ; conservée dans un flacon de verre
- Eau distillée ou eau désionisée
- Solution d'hypochlorite de sodium 0,05 % (dilution au 1:100 d'eau de Javel du commerce)
- Tubes pour cultures tissulaires ou flacons à échantillons cylindriques stériles munis de lamelles couvre-objet de 12 mm contenant une monocouche de lignée cellulaire adaptée à la croissance des entérovirus
- Milieux de culture tissulaire de type RPMI ou Eagle's MEM (EMEM) avec sérum fœtal bovin (FBS) et antibiotiques, ou équivalents
- Milieu de transport viral n'inhibant pas les entérovirus
- NaOH 0,1N
- HCl 0,1N
- Lames de microscope non fluorescentes
- Lamelles couvre-objet n°1
- Lames de contrôle négatives et positives
- Conjugué IgG:FITC anti-souris REF 5008
- Anticorps de souris normal REF 5014 en tant que contrôle négatif
- Solution saline tamponnée avec du phosphate (PBS, 0,01 M, pH 7,1 à 7,4 avec NaCl 0,085 % et azide de sodium 0,1 %) REF 5087
- Tween® 20 0,05 % / Azide de sodium 0,01 % (optionnel)
REF 5037
- Dispositif d'aspiration et pipettes Pasteur stériles jetables
- Centrifugeuse pouvant atteindre 700 à 950 g, équipée de réservoirs permettant l'élimination des matières présentant un danger biologique et d'adaptateurs pour flacons à échantillons cylindriques
- Microscope à fluorescence équipé d'une combinaison de filtres adaptée au FITC (pic d'excitation = 490 nm, pic d'émission = 520 nm), avec un grossissement de 100x, 200x et 400x (objectif sec)
- Pinces
- Chambre humide

- Incubateur, $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Filtre de seringue, 0,45 micron
- Bain à ultrasons
- Mélangeur vortex ou sonicateur
- Liquide de montage REF 5013
- Lames de contrôle Échovirus REF 5074

Mise en garde et précautions

- Les performances du MAb Échovirus 30 **Light Diagnostics™** n'ont pas été déterminées sur des spécimens directs.
- L'azide de sodium présent dans le réactif est susceptible de réagir avec le plomb et le cuivre des tuyauteries pour former des azides métalliques potentiellement explosifs. Pour éviter la formation de tels azides métalliques, rincer abondamment les tuyauteries avec un grand volume d'eau lors de l'élimination de solutions contenant de l'azide de sodium.
- Manipuler tous les spécimens et les matériaux ayant été en contact avec eux comme s'il s'agissait de matières potentiellement infectieuses. Avant élimination, procéder à une décontamination avec de l'hypochlorite de sodium à 0,05 %.
- Éviter le contact avec le bleu Evans présent dans les réactifs en raison de son potentiel carcinogène. En cas de contact avec la peau, rincer abondamment avec un grand volume d'eau.
- Ne pas pipeter les réactifs à la bouche.
- Ne jamais laisser sécher les flacons à échantillons cylindriques ou les lames au cours de la procédure de coloration.
- Le mélange de réactifs ou leur altération est susceptible de conduire à des résultats erronés.
- L'acétone est un produit extrêmement inflammable et nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Tenir à distance des sources de chaleur, des étincelles ou des flammes. Ne pas inhaler les vapeurs. Manipuler dans un local convenablement ventilé.
- Le liquide de montage REF 5013 renferme un activateur de fluorescence susceptible de détruire les membranes muqueuses. Éviter tout contact avec

la peau et les muqueuses. En cas de contact, rincer abondamment avec un grand volume d'eau.

- Les lames préparées trop précocement (CPE < 25 %) ou trop tardivement (CPE > 95 %) peuvent être difficiles à lire et sont susceptibles de conduire à des résultats faussement négatifs.

Stabilité et conservation

Conservé entre 2° et 8°C, l'anticorps monoclonal est stable jusqu'à la date de péremption inscrite sur l'étiquette. Ne pas congeler ou exposer à des températures élevées. Éliminer tout réactif ayant atteint sa date de péremption.

Prélèvement des spécimens

Comme les procédures varient d'un laboratoire à un autre, il est nécessaire de prendre en considération un certain nombre de points relatifs au traitement des spécimens destinés à l'analyse des entérovirus. Le type de spécimen et son traitement dépendent de l'état clinique du patient et de l'analyse de laboratoire demandée par le médecin traitant. Les spécimens destinés à l'isolement des entérovirus doivent être transportés sur de la glace sèche ou des blocs de congélation et mis en culture dès que possible. Conserver entre 2° et 8°C pendant 48 heures, si nécessaire. Si un stockage plus prolongé est nécessaire, l'échantillon doit être conservé congelé à -70°C dans un milieu approprié [19].

Traitement des spécimens

Liquides corporels – Pour les spécimens liquides comme le liquide céphalorachidien (CSF), inoculer 0,2 à 0,5 ml d'échantillon non dilué dans chaque boîte de culture.

Écouvillons – Les spécimens tels que les prélèvements nasopharyngés, de gorge ou oculaires réalisés sur des écouvillons baignant dans un milieu de transport doivent être agités ou passés au vortex pour déloger les cellules de l'écouvillon. Inoculer 0,2 à 0,3 ml de spécimen dans chaque boîte de culture.

Matières fécales – En présence de matières fécales solides, passer le spécimen au vortex dans 2 à 5 ml de milieu de transport viral ou de PBS. Éliminer l'écouvillon dans une solution d'hypochlorite de sodium. Centrifuger à 950 g pendant 10 minutes. Filtrer le surnageant, si nécessaire, pour le clarifier, au travers d'un filtre de seringue de 0,45 micron. Inoculer 0,1 à 0,3 ml de spécimen dans chaque boîte de culture.

Tissus solides – Prélever un petit morceau de spécimen tissulaire et le placer dans 2 à 3 ml de milieu de transport viral. Broyer le tissu dans un broyeur. Centrifuger doucement pour sédimenter les débris. Inoculer 0,1 à 0,2 ml du surnageant dans chaque boîte de culture.

Procédure d'inoculation

1. Immédiatement avant l'inoculation du spécimen, examiner la morphologie des cultures cellulaires.
 2. Ajouter un volume approprié d'inoculum comme indiqué au-dessus de chaque boîte de culture.
 3. Placer dans l'incubateur à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
-

Procédure d'analyse

Préparation des lames :

1. Examiner la monocouche cellulaire quotidiennement pour rechercher un effet cytopathique (CPE). Quand le CPE est $> 25\%$, aspirer le milieu depuis la culture et rincer délicatement la monocouche 3 fois avec 1 ml de PBS.

***Remarque:** Les réactifs qui contiennent de l'azide de sodium ou un agent de surface comme le Tween 20 ne doivent pas être utilisés au cours des procédures d'isolement viral.*

2. Ajouter 0,5 ml de PBS, gratter la boîte de culture pour détacher la monocouche cellulaire et remettre les cellules en suspension dans la PBS.
3. Centrifuger la suspension cellulaire pendant 10 minutes à 250 g à température ambiante.
4. Remettre en suspension le culot cellulaire dans 0,1 à 0,2 ml de PBS et utiliser cette suspension pour réaliser des spots cellulaires dans des puits sur une lame de 6 à 8 mm et laisser la lame sécher complètement à l'air.
5. Fixer la lame dans de l'acétone réfrigérée (2° et 8°C) pendant 10 minutes.
6. Retirer la lame de l'acétone et la laisser sécher complètement à l'air.
7. La lame doit être colorée dès que possible. Si un stockage est nécessaire, les lames doivent être conservées à une température $\leq -20^\circ\text{C}$ en présence d'un déshydratant.

Suggestion de procédure (coloration) par immunofluorescence indirecte:

1. Laisser la lame de contrôle fixée par l'acétone et/ou la lame de test et les réactifs s'équilibrer à température ambiante.

Remarque: Ne jamais laisser sécher les lames au cours de la procédure de coloration.

2. Ajouter un anticorps monoclonal ou un anticorps normal de souris en quantité suffisante (réactif de contrôle négatif) pour recouvrir les cellules ; 1 goutte pour les spots cellulaires et 4 à 6 gouttes pour les flacons à échantillons cylindriques.
3. Incuber la lame à 37 °C pendant 30 minutes dans une chambre humide.
4. Rincer délicatement la lame à l'aide d'un flacon pissette de PBS/Tween 20 pendant 10-15 secondes pour éliminer la solution d'anticorps monoclonal en excès en prenant soin de ne pas diriger le jet vers le puits. Dans le cas des flacons à échantillons cylindriques : aspirer le réactif depuis le flacon et laver délicatement les flacons à échantillons cylindriques 3 fois avec 1 ml de PBS/Tween 20.
5. Placer la lame dans un bac de coloration ou une cuvette de Coplin (avec le support pour lames ou son équivalent) et recouvrir de PBS. Rincer pendant 5 à 10 minutes. Agiter délicatement avec un agitateur magnétique ou manuellement.
6. Éliminer le réactif en excès de la lame et sécher soigneusement la zone située autour du spot cellulaire.
7. Ajouter une quantité suffisante de conjugué IgG anti-souris marqué par le FITC REF 5008 ou équivalent pour recouvrir les cellules ; 1 goutte pour les spots cellulaires et 4 à 6 gouttes pour les flacons à échantillons cylindriques.
8. Répéter les étapes 3 à 5.
9. Monter sous une lamelle couvre-objet en utilisant un milieu de montage aqueux à pH 8,5 REF 5013 ou équivalent. Dans le cas des flacons à échantillons cylindriques : aspirer la PBS/le Tween depuis les flacons à échantillons cylindriques. Soulever les lamelles couvre-objet à l'aide d'une aiguille courbe fixée à une petite seringue et les enlever délicatement avec des pinces. Monter les lamelles couvre-objet LE CÔTÉ PORTANT LES CELLULES VERS LE BAS sur une lame de verre avec du liquide de montage.
10. Essuyer le liquide en excès des bords de la lame.

Remarque: Pour obtenir de meilleurs résultats, lire les lames immédiatement après leur préparation. Si les lames doivent être stockées après coloration, les conserver dans un récipient fermé et dans l'obscurité, entre 2° et 8°C.

11. Examiner les lames, avec un microscope à fluorescence à 100-200x pour rechercher les cellules qui présentent une fluorescence. Un examen détaillé à 400 x peut être réalisé.

Remarque: Les performances du microscope à fluorescence jouent un rôle crucial dans l'obtention de résultats d'analyse satisfaisants. Comme les objectifs, l'intensité et la puissance des lampes ainsi que les filtres sont susceptibles d'influencer les résultats, l'utilisation d'un contrôle positif permet de vérifier le bon fonctionnement des réactifs, de la méthodologie de culture et du microscope.

Contrôle de qualité

Des contrôles positifs et négatifs doivent toujours accompagner les analyses afin de garantir les performances de la procédure d'identification de(des) l'(s)isolat(s) d'échovirus 30. Le puits du contrôle positif doit contenir des cellules qui présentent une fluorescence vert pomme du noyau et/ou du cytoplasme. Si le bleu Evans a été employé comme colorant de contraste, le puits du contrôle négatif présente des cellules colorées en rouge terne.

Remarque: Rechercher la fluorescence vert pomme présente dans les noyaux des cellules infectées par les entérovirus sur la totalité de la lamelle couvre-objet ou du puits de la lame.

Les contrôles positifs peuvent être préparés avec des isolats d'échovirus appropriés ou avec des isolats cliniques positifs. Les contrôles négatifs peuvent utiliser des échantillons provenant du laboratoire et dont la négativité a été

établie. Les lames de contrôle Échovirus REF 5074 avec des puits positifs et négatifs pour les échovirus sont disponibles auprès de EMD Millipore Corporation Des échovirus vivants, permettant de réaliser des contrôles positifs, peuvent être obtenus auprès de de l'American Type Tissue Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA.

Attention : Il ne faut pas tenir compte de la coloration par fluorescence des fragments cellulaires, souvent due au piégeage du conjugué par de tels débris. Si les contrôles positifs et négatifs ne peuvent être clairement distingués, l'analyse doit être considérée comme invalide et être répétée après examen et application des corrections suggérées dans la section « Dépannage ».

Limites

- Un bruit de fond coloré de faible intensité peut parfois apparaître avec certains isolats viraux, le MAb spécifique d'Échovirus 30 présentant toujours une intensité de coloration significativement plus importante.
- Cet anticorps monoclonal n'a pas été caractérisé par rapport à l'antigène protéique structural particulier ou à l'épitope détecté sur le virus échovirus 30.
- Le type et l'état de l'instrumentation utilisée influencent l'aspect visuel de l'image obtenue. La réaction finale peut varier selon le type de microscope employé, la source lumineuse, l'âge de la lampe, l'assemblage et l'épaisseur du filtre, les différences de sensibilité des substrats antigéniques ou selon la procédure de dosage utilisée. Chaque laboratoire devra établir ses propres critères de lecture des réactions finales à l'aide de contrôles appropriés.
- Comme l'anticorps monoclonal a été préparé à l'aide d'une souche prototype, il peut ne pas détecter tous les variants antigéniques ou les nouvelles souches d'échovirus 30.
- Les anticorps monoclonaux peuvent ne pas détecter les souches d'échovirus 30 ayant subi des modifications mineures des acides aminés de la région de l'épitope cible.

Valeurs de référence

EMD Millipore Corporation n'a pas pu déterminer un taux de prévalence sur la base de nos études. Les types d'entérovirus les plus fréquemment signalés au cours des vingt dernières années ont été les coxsackievirus A9, A16, B2, B3, B4, B5 et les échovirus 4, 6, 9, 11 et 30 [20, 21]. Ces sérotypes représentent environ 65 % de tous les entérovirus isolés chaque année. Au cours d'une année, la prédominance d'un virus donné peut être plus marquée ou la fréquence d'un autre type peut augmenter pour un temps.

La fréquence des infections par les entérovirus est influencée par l'âge et l'état des patients, le climat et la période de l'année. La plupart des cas signalés concernent les jeunes enfants. Le climat semble représenter un facteur important de la circulation et de la prévalence des entérovirus. Sous les climats tempérés, les entérovirus sont généralement présents à de faibles niveaux en hiver et au printemps et sont beaucoup plus communément isolés en été et en automne. Aux

États-Unis, les enfants en bonne santé des villes du Sud hébergent un plus grand nombre d'entérovirus que ceux d'âge comparable des villes du Nord [20].

L'échovirus 30 représente, en moyenne, environ 5,95 % (de 0,5 à 19,9 %) des entérovirus non poliomyélitiques isolés chaque année aux États-Unis depuis 1970 [20].

Interprétation des résultats

Une réaction **positive** est signalée par une **vive** fluorescence **vert pomme** dans le noyau et/ou le cytoplasme des cellules infectées. Une coloration vis-à-vis des échovirus 30 est considérée comme positive en présence d'au moins 2 deux cellules intactes présentant une fluorescence spécifique. Une réaction **négative** est signalée par l'absence de fluorescence et par la présence d'une coloration **rouge terne** due au colorant de contraste, le bleu Evans, s'il a été utilisé. Tous les résultats positifs doivent être confirmés par neutralisation à l'aide de pools de sérums immuns spécifiques d'un type. Un résultat positif doit être noté comme « isolat susceptible de renfermer un échovirus 30, confirmation à suivre ».

Un résultat négatif ne permet pas d'exclure une infection par les échovirus 30. Un résultat négatif peut être dû à divers facteurs tels que : échantillon inadéquat, prélèvement et manipulation du spécimen incorrects, technique de culture incorrecte ou d'autres facteurs mentionnés dans la section « Dépannage ». Tous les résultats négatifs doivent être notés comme « Pas de virus observé » ou « Pas d'échovirus 30 isolé, études complémentaires à suivre ». Il est utile d'examiner les cellules négatives avant les cellules positives afin de déceler la présence d'une coloration non spécifique.

Caractéristiques des performances spécifiques

Spécificité et réactivité croisée :

L'anticorps monoclonal dirigé contre l'échovirus 30 a correctement identifié les souches prototypes d'échovirus 30 et les isolats viraux antérieurement typés fournis et testés par les Centers for Disease Control (CDC) et trois laboratoires de virologie clinique externes.

Au cours de ces études, des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes entéroviraux (mélanges de divers sérotypes et de réactifs spécifiques d'un type) ont été utilisés pour analyser les isolats viraux dans trois laboratoires de virologie clinique externes. Ces laboratoires étaient situés sur la côte ouest, dans

les régions sud-ouest et sud des États-Unis. Les spécimens ont été recueillis chez des patients de tous les âges, depuis les nourrissons jusqu'aux personnes âgées. Une grande diversité de spécimens ont été cultivés : des liquides (CSF et urine), des écouvillons (avec prélèvements nasaux, de gorge, nasopharyngés et oculaires), des échantillons fécaux et des écouvillons rectaux. Les spécimens ont été inoculés dans des cultures et ont été tout d'abord dépistés à l'aide de mélanges de MAb puis typés par IFA avec les composants monoclonaux individuels. Tous les isolats viraux ont été confirmés par neutralisation conventionnelle [22]. Tous les laboratoires participant à l'étude ont utilisé le conjugué anti-souris IgG/FITC REF 5008 comme anticorps secondaire au cours de la totalité ou de certaines parties de l'étude. Le laboratoire situé sur la côte ouest a également utilisé un conjugué de chèvre anti-souris Ig d'une autre provenance.

Le MAb Échovirus 30 n'a pas réagi avec les autres virus parmi lesquels les coxsackievirus A9, A10, A14, A16, A24, A24v ou les coxsackievirus B1-6. Le MAb Échovirus 30 n'a réagi avec aucun échovirus parmi lesquels les écho 1, écho 2, écho 3, écho 4, écho 5, écho 6, écho 7, écho 9, écho 11, écho 11', écho 13, écho 14, écho 15, écho 16, écho 18, écho 20, écho 21, écho 22, écho 25, écho 29, écho 32 et écho 34. Aucune réactivité n'a été retrouvée avec les isolats d'entérovirus 70 et 71, de virus de la poliomyélite Polio 1, 2 et 3, Herpes Simplex (HSV-1 ou 2), d'adénovirus ou de rhinovirus testés. De plus, les lames de contrôle de cultures de cellules hôtes non infectées et d'autres pathogènes comme parainfluenza 1, 2 et 3, influenza A et B, virus syncytiaux respiratoires (RSV), cytomégalovirus (CMV), virus de l'herpès humain - 6 (HHV-6), virus Varicella-Zoster (VZV), virus des oreillons, virus de la rougeole, chlamydia, virus d'Epstein-Barr – antigène de la capsid virale (EBV-VCA) et adénovirus ont été analysées et aucune réactivité croisée significative n'a été trouvée avec le MAb Échovirus 30.

Le MAb Échovirus 30 présente parfois un bruit de fond coloré de faible intensité avec certains isolats viraux, toutefois, avec des isolats d'échovirus 30, il présente une intensité de coloration significativement plus importante. Les anticorps monoclonaux ont été titrés de façon à minimiser toute réactivité non spécifique.

Évaluation clinique :

Des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes entéroviraux (mélanges de divers sérotypes et de réactifs spécifiques d'un type) ont été utilisés pour analyser les isolats viraux dans trois laboratoires de virologie clinique externes. Les isolats viraux confirmés par neutralisation conventionnelle [22] ont été tout d'abord été dépistés à l'aide de mélanges puis typés avec les composants monoclonaux individuels. Un résumé des études combinées comparant la neutralisation standard et le dosage par fluorescence indirecte **Light Diagnostics™** avec le MAb Échovirus 30 est présenté ci-dessous.

Positif par neutralisation :	161
Positif par IFA Light Diagnostics™ :	149
Sensibilité relative :	92,6 %
Sensibilité (intervalle de confiance de 95 %) :	87,3 % - 96,1 %

Négatif par neutralisation :	652
Négatif par IFA Light Diagnostics™ :	650
Spécificité relative :	99,7 %
Spécificité (intervalle de confiance à 95 %) :	98,9 % - 100 %

À l'exception de 2 isolats sur 33 échovirus 6, *aucune réactivité croisée significative* avec un autre isolat clinique n'a été notée. Cependant, le MAb Échovirus 30 n'est pas parvenu à détecter 12 des 161 isolats d'échovirus 30 testés. Ceci semble indiquer qu'il existe une souche variante ou un faible pourcentage des isolats d'échovirus 30 qui n'expriment pas l'antigène reconnu par le mélange MAb Échovirus. Pourtant, les résultats ci-dessus indiquent que le mélange MAb Échovirus 30 est très sensible et très spécifique.

(Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés par la méthode exacte [23]).

Dépannage

La préparation des prélèvements repose sur des gestes techniques dont la bonne réalisation détermine la qualité des résultats obtenus. Afin de résoudre les éventuels problèmes de performance, chacune des étapes du processus doit être analysée.

L'obtention d'une fluorescence nettement atténuée peut être le signe :

- 1) d'une détérioration des réactifs,
 - 2) de problèmes liés au microscope,
 - 3) d'autres défaillances matérielles ou techniques.
- Vérifier la date de péremption de tous les réactifs utilisés.
 - Si les réactifs n'ont pas dépassé leur date de péremption, vérifier les performances du microscope ; faire une nouvelle lecture des lames de contrôle positives.
 - Si la cause du problème n'a toujours pas pu être déterminée, vérifier le fonctionnement de tous les appareils comme indiqué sur la notice et répéter l'analyse.

Contactez les services techniques de **EMD Millipore Corporation** pour toute assistance supplémentaire. Pour trouver les coordonnées de la filiale la plus proche, rendez-vous sur www.millipore.com/offices.

Les parties références bibliographiques de ces notices de produit de diagnostic in vitro **Light Diagnostics™** ne sont données en version intégrale qu'en anglais. Consulter ces versions pour tout ce qui concerne les détails spécifiques à ces produits.

Glossaire des Symboles

Symboles	Utilisé pour	Symboles	Utilisé pour
	Le numéro de catalogue		Utilisation par les AAAA-MM-JJ ou AAAA-MM
	Fabricant		Représentant autorisé dans la Communauté européenne
	Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement		Contenu suffisant pour <n> les tests
	De diagnostic in vitro dispositif médical		Limitation de la température
	Consulter les instructions pour l'utilisation		Les risques biologiques
	Contrôle		Contrôle Négatif
	Contrôle positif		

GARANTIE ET LIMITATIONS DE RESPONSABILITÉ

1. Millipore SAS s'engage à ce que ses produits correspondent aux conditions applicables publiées par elle, sous réserve qu'ils soient utilisés conformément aux instructions données. Cette garantie joue pendant un délai d'un an à partir de l'expédition des produits. Aucune autre garantie, expresse ou implicite, n'est fournie.
2. Le client est tenu d'inspecter les produits lors de leur livraison. Toutes les réserves relatives à des vices apparents ou à des produits manquants dus à un éventuel manquement de la part de Millipore SAS doivent être notifiées immédiatement par écrit au transporteur et par lettre recommandée avec avis de réception à Millipore SAS au plus tard dans les trois (3) jours ouvrés suivant leur réception ou au plus tard dans les dix (10) jours calendaires suivant la date de facturation, dans l'hypothèse de produits manquants.
3. Un éventuel retour des produits ne peut être réalisé qu'avec l'accord de Millipore SAS, et selon ses instructions. Les produits renvoyés à Millipore SAS sans son accord ne seront pas crédités au compte du client.
4. Millipore SAS ne saurait être tenue responsable de la détérioration des produits acquis par le client du fait de mauvaises conditions de stockage. A ce titre, le client s'engage à respecter les spécifications et conditions d'utilisation desdits produits. A défaut, toute garantie de Millipore SAS sera exclue.
5. En cas de non-respect de la garantie énoncée ci-dessus, la seule obligation de Millipore SAS consiste à réparer ou remplacer, à sa discrétion, le produit ou la partie du produit en cause. Si, après avoir fait ses meilleurs efforts, Millipore SAS est dans l'impossibilité de réparer ou remplacer le produit ou la partie du produit en cause, Millipore SAS devra rembourser le client des sommes engagées pour l'achat de ce produit ou de sa partie.
6. D'une manière générale, toute garantie de Millipore SAS est exclue en cas:
 - de mauvaise installation, utilisation ou entretien des produits, en violation des instructions de Millipore SAS ;
 - d'usure normale des produits;
7. Millipore SAS ne saurait être tenue responsable des préjudices indirects qui seraient subis par un client du fait de l'utilisation du produit, tels qu'un préjudice commercial, une perte de clientèle, une perte de commandes, tout autre problème de nature commerciale, une perte de profits, une atteinte aux biens ou une atteinte au droit des marques.
8. Aucun dommage causé aux produits et aucune perte de ceux-ci résultant de leur transport n'engage la responsabilité de Millipore SAS. Le client doit adresser toutes les réclamations relatives à de tels dommages ou perte au transporteur.
9. Toutes les actions engagées contre le client par une tierce partie constituent un préjudice indirect et n'ouvrent donc pas droit à réparation.
10. Dans tous les cas, les amendes et sanctions qui peuvent être infligées à Millipore SAS dans le cas où sa responsabilité serait reconnue sont expressément limitées à un montant égal aux sommes effectivement versées à Millipore SAS par le client à l'occasion du premier achat du produit qui a conduit à engager la responsabilité de Millipore SAS.

Tween® est une marque déposée de ICI Americas Inc.

ATCC® est une marque de American Type Culture Collection Inc.

©2019 EMD Millipore Corporation, une division de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne. Tous droits réservés. EMD, EMD Millipore, Millipore, la marque M, Light Diagnostics et toutes les autres marques, sauf indication contraire ci-dessus dans le texte comme appartenant à un tiers, sont la propriété de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne.



3315

March 2019
Revision 2.0; 3315CESUPPMAN