



LIGHT DIAGNOSTICS™

SimulFluor® RSV/FLU A DFA KIT

Ensayo de inmunofluorescencia directa

Suplemento Español De la Lengua



3129



125



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

Millipore (UK) Ltd.
Fleming Road, Kirkton Campus • Livingston EH54 7BN
United Kingdom
Tel. +44 1506 404000 • Fax +44 1506 404001

Uso propuesto

El Kit de **Light Diagnostics™ SimulFluor® RSV/Flu DFA** está pensado para uso en las muestras respiratorias tales como torundas de la garganta, nasal y nasofaringe, lavados de la garganta, aspirados, lavados broncoalveolares de pacientes con enfermedad respiratoria febril y después de la amplificación del virus en cultivos celulares. Las muestras negativas en el examen directo deben confirmarse con el cultivo.

IVD

Resumen y explicación

El virus respiratorio sincitial (RSV) ocupa el género *Pneumovirus* en la familia *Paramyxoviridae*. Es un virus pleomórfico, de 100-300 nm de diámetro aproximadamente, con un ARN lineal, no segmentado, monocatenario de sentido negativo. La envoltura contiene proyecciones en la superficie externa compuestas por dos glucoproteínas altamente antigénicas, F y G, y una proteína estructural principal, N, en la nucleocápside. Las proteínas estructurales F, G, y N dividen al VRS en dos grupos antigénicos importantes; las cepas “prototipo” son Long (grupo A) y CH-18537 (grupo B) (1-4). El VRS causa epidemias importantes de enfermedad respiratoria grave durante las estaciones de invierno y primavera en todo el mundo. Ya que la inmunidad natural al VRS es débil, estas epidemias tienden a ocurrir cada año o cada dos años.

El VRS se puede aislar de aspirados nasofaríngeos, de exudados nasales o faríngeos, o de muestras de pulmón tomadas dentro de los primeros días de la enfermedad. El virus crece en las células epiteliales humanas tales como HEP2, células primarias del riñón del mono Rhesus (RMK), A549, MRC-5, y NCI-H292. Los análisis rápidos y directos en muestras clínicas convenientes sirven de diagnóstico para las infecciones de VRS, siempre y cuando se utilicen el reactivo estandarizado y los testigos adecuados. Siempre que sea posible, es preferible la confirmación por el aislamiento del virus.

La ribavirina, administrada como aerosol, ha resultado un tratamiento con éxito para lactantes hospitalizados infectados. Sin embargo, esto requiere cuidado especializado, y no se administra de forma rutinaria (4). La inmunoglobulina está también disponible para el tratamiento. Las vacunas de VRS tienen una larga historia de fracasos, pero todavía están sufriendo un desarrollo intenso.

El virus de la influenza A es un miembro de la familia *Orthomyxoviridae*. Es un virus grande, con envoltura, de 110 nm de diámetro, que contiene un ARN segmentado, monocatenario y que presenta proyecciones de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) que sobresalen a través de la membrana glucoproteica (5-7). El virus de la influenza A presenta una alta frecuencia de mutación y causa

epidemias periódicas mundiales de gripe. Las epidemias son particularmente graves cuando las mutaciones han tenido como resultado cambios drásticos en la estructura de la HA o de la NA, de modo que los anticuerpos circulantes en una comunidad de personas no reconocen las cepas de estos virus (6-8). La especificidad en los virus de la influenza viene determinada por las diferencias antigénicas en dos de las proteínas estructurales principales: la nucleoproteína interna (NP) y la proteína de la matriz (M) (5-8).

Las infecciones por el virus de la influenza se caracterizan por traqueobronquitis, faringitis, mialgia, fiebre, dolor de cabeza y malestar (5,6,9). Una rinitis mínima a menudo distingue la gripe de otras enfermedades respiratorias virales. Es altamente contagiosa entre los adultos y se propaga por gotitas de Pflügge y fomites. Como ocurre con el VRS, un período de incubación de 1 a 4 días ayuda al virus a propagarse rápidamente dentro de las comunidades y dentro de las plantas hospitalarias. La complicación más significativa de la gripe es la neumonía, que ocurre sola o se puede combinar con una neumonía bacteriana. La neumonía ocurre con más frecuencia en los ancianos, en los pacientes con sistemas inmunes debilitados, o en los pacientes con alguna patología subyacente como diabetes, cardiopatía, neumopatía o enfermedad renal crónica. Los niños tienen mayores probabilidades de experimentar síntomas adicionales de dolor gastrointestinal, vómitos, miositis, otitis media, conjuntivitis y crup.

El aumento de las muertes por neumonía durante la “temporada de la gripe” se supone que es debido al virus de la influenza y se utiliza para rastrear las epidemias de gripe y comprobar la eficacia de las vacunas contra la gripe. Las complicaciones menos comunes en los adultos incluyen el síndrome de Reyes u otra implicación del SNC, síntomas cardiacos, sinusitis y otitis media.

La amantadina y su análogo, la rimantadina, son eficaces en la prevención de hasta el 90% de las infecciones por el virus de la influenza A y el 100% de las enfermedades si se toma en forma profiláctica (5,10). Son también eficaces en la terapéutica, ya que reducen la duración de la enfermedad si se toman en los primeros 2 días de la misma. La ribavirina puede ser eficaz en el tratamiento de la gripe por virus de la influenza A cuando se administra por medio de un aerosol. Las vacunas contra el virus de la influenza A constituyen un esfuerzo importante de la salud pública a medida que se identifican nuevas cepas. Las vacunas actuales contra el virus de la influenza tienen generalmente un índice de eficacia entre 70% y 90% (5,7).

Los virus de la influenza pueden cultivarse en RMK, MDCK (riñón canino de Madin-Darby), y de vez en cuando otras estirpes celulares, dependiendo de la estirpe particular del virus (11-13). La tripsina agregada al líquido de cultivo con

una concentración de ~2 µg/ml ayuda mucho en el aislamiento del virus de la influenza en células de MDCK.

Se pueden utilizar tanto los cultivos estándar como los shell vials. Análisis directos, incluyendo la inmunofluorescencia, (FA) y enzimoimmunoanálisis (EIA) (11,14-17).

Las muestras adecuadas incluyen lavados nasales, exudados faríngeos y lavados broncoalveolares. Cualquier análisis directo con reactivos estandarizados es diagnóstico para la infección por influenza, especialmente si se confirma por el aislamiento del virus.

Principio del análisis

El **Kit de Light Diagnostics™ SimulFluor® RSV / Flu A DFA** utiliza un solo reactivo para la detección y la identificación simultáneas de VRS y del virus de la influenza 3. El componente primario, específico para VRS, se unirá a los antígenos de VRS F y de G en las células infectadas por VRS. El componente secundario, específico para el virus de la influenza A, se unirá a la nucleoproteína del virus de la influenza A en las células infectadas por éste. El reactivo que no se ha unido se elimina mediante lavado con PBS (phosphate-buffered saline, solución salina tamponada con fosfato). El complejo antígeno-anticuerpo se puede visualizar por microscopía de fluorescencia. El complejo del antígeno-anticuerpo del VRS mostrará una fluorescencia color verde manzana y el complejo antígeno-anticuerpo del virus de la influenza A será de color amarillo oro. Las células no infectadas se tiñen de un color rojo pálido debido a la presencia en el reactivo de azul de Evans.

Componentes del kit

1. SimulFluor® RSV/Flu A Reagent; **REF** 5245: Un (1) frasco cuentagotas de 5 ml que contiene un componente primario específico para el antígeno VRS y un componente secundario específico para el virus de la influenza A, estabilizador de las proteínas, azul de Evans al 0,005% y azida sódica al 0,1% (conservante).

La cantidad suministrada es suficiente para 125 pruebas. Estimación se basa en las pruebas de caída de 40µL; el número real de las pruebas pueden variar.

2. RSV Control Slides; **REF** 5012: Dos (2) portaobjetos que contienen un pocillo para células infectadas por VRS y un pocillo para células no infectadas.

3. Influenza A & B Control Slides; REF 5010: Dos (2) muestras que contienen un pocillo para células infectadas por virus de la influenza A, un pocillo para células infectadas por virus de la influenza B y dos pocillos para células no infectadas.
4. Phosphate Buffered Saline (PBS); REF 5087: Un (1) envase de las sales para preparar 1 litro de solución salina tamponada con fosfato tras su disolución en agua destilada. Guardar en un envase cerrado y limpio, a la temperatura ambiente.
5. Tween® 20/Sodium Azide Solution (100X); REF 5037: Un (1) frasco de 10 ml que contiene monolaurato de polioxi-etilén sorbitán (Tween 20) y azida sódica (NaN_3) concentrada, para diluir 1:100 en PBS.
6. Mounting Fluid; REF 5013: Un (1) frasco cuentagotas de 10 ml que contiene glicerina tamponada con Tris, un amplificador de la fluorescencia y azida sódica al 0,1% (conservante). Guarde a temperatura entre 2°C y 25°C.

Materiales necesarios no suministrados

- Acetona, grado reactivo o mejor; en envase de vidrio
- Agua destilada o desionizada
- Testigos de cultivo del virus (las cepas de los virus VRS y de la influenza 3 de referencia están disponibles en ATCC® (American Type Culture Collection, Colección Americana de Cultivos Tipo), Manassas, VA.
- Solución de hipoclorito de sodio al 0,05% (lejía doméstica diluida 1:100)
- Estirpes celulares susceptibles a los virus VRS e influenza A como HEp-2, MRC-5, PMK, estirpes celulares MDCK (14,15,16) u otras estirpes celulares susceptibles al virus de la influenza A (por ejemplo LLC-MK2, etc). Se pueden obtener estirpes celulares apropiadas de ATCC® (American Type Culture Collection, Colección Americana de Cultivos Tipo), Manassas, VA.
- 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 bovino fetal) y antibióticos o equivalentes

- Medio de transporte viral que no sea inhibitorio para VRS o para virus de la influenza A (solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) con antibióticos, o equivalente)
- Portaobjetos de vidrio limpiados con acetona, no fluorescentes
- Cubreobjetos del N° 1
- Dispositivo aspirador con pipetas Pasteur estériles desechables
- Centrifugadora capaz de alcanzar 700 a 950 x g con cubetas de riesgo biológico y adaptadores para shell vials
- Microscopio de fluorescencia con una lámpara de mercurio o halógena de 100 vatios, la combinación de filtros adecuada para FITC (pico de excitación = 490 nm, pico de emisión = 520 nm) con un aumento de 160-200x y 400x (objetivo seco)
- Opcional: combinación de filtros para TRITC (pico de excitación = 550 nm, pico de emisión = 570 nm)
- Pinzas
- Cámara húmeda
- Incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Una jeringa y aguja u otro instrumento para extraer el cubreobjetos del shell vial
- Baño de agua con ultrasonido
- Vórtex o agitador por ultrasonido

Advertencias y precauciones

- La azida sódica usada como conservante en el reactivo **SimulFluor®**, el disolución PBS/Tween 20 y el líquido de montaje es tóxica si se ingiere. La azida sódica puede reaccionar con tuberías de plomo o cobre para formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desechar estos materiales, enjuagar con agua abundante para evitar su acumulación en las tuberías.
- La mezcla o alteración de cualquiera de los reactivos puede ocasionar resultados erróneos.
- No sustituir con los reactivos de otros fabricantes.

- Si los tiempos y temperaturas de incubación son diferentes de los especificados se pueden obtener resultados erróneos. El usuario deberá validar estos cambios.
- No permita que los shell vials o los portaobjetos se sequen en ningún momento durante el proceso de tinción.
- Manipule todas las muestras y los materiales que entren en contacto con ellas como materiales potencialmente infecciosos y deséchelos con las precauciones adecuadas. Descontamine con 0,05% de hipoclorito de sodio.
- 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.
- No pipetee los reactivos con la boca.
- Evite el contacto con el azul de Evans (presente en el reactivo **SimulFluor®** RSV/Flu A Reagent REF 5245), ya que se trata de un posible carcinógeno. Si entrara en contacto con la piel, enjuague con agua abundante.
- 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.

Estabilidad y almacenamiento

Si se almacena entre 2° y 8°C, el **Kit de Light Diagnostics™ SimulFluor® RSV/Flu A DFA** es estable hasta la fecha de caducidad que está impresa en la etiqueta del kit. No congele ni exponga a temperatura elevada. Deseche los restos de reactivos después de la fecha de caducidad del kit.

Obtención de muestras

La extracción, el transporte, el procesamiento y el almacenamiento apropiados de la muestra son de importancia fundamental para el aislamiento y confirmación de las infecciones por VRS y por el virus de la influenza A. Los aspirados de las secreciones respiratorias son las muestras de elección, aunque también pueden utilizarse las torundas nasofaríngeas o de la garganta (18).

Los lavados nasales y los aspirados nasofaríngeos o traqueales son ideales para el examen directo de la muestra ya que proporcionan abundantes células epiteliales. Las muestras de lavados nasofaríngeos se obtienen poniendo de 3 a 5 ml de suero salino en la ventana de la nariz con el paciente en posición supina.

Se succiona suavemente el suero salino usando una jeringa, una pera de goma o un catéter conectado a un atrapador de moco.

Las torundas nasofaríngeas, de la garganta o nasales con frecuencia no contienen una cantidad adecuada de células epiteliales ciliadas o cilíndricas, que son esenciales para la detección directa del VRS o del virus de la influenza A.

Transportar la muestra al laboratorio, en hielo o en un paquete frío, inmediatamente después de la obtención. Las muestras que se van a procesar para el examen directo no se deben congelar ya que el proceso de congelación y descongelación rompe las células e inutiliza las muestras. La muestra para VRS se debe procesar e inocular en los cultivos celulares cuanto antes tras recibirla. Las muestras que se van a utilizar para el aislamiento en cultivo se deben congelar a -70 °C si el proceso no se realiza en un plazo de 72 horas después de la obtención. Evitar los ciclos repetidos de congelación y descongelación.

La información detallada sobre las técnicas de obtención de las muestras se puede encontrar en el Manual of Clinical Microbiology, Balows, A. *et al.*, eds. 5ª ed. (1991). *American Society for Microbiology, Washington, D.C.*, Influenza Viruses, Ch. 81; Respiratory Syncytial Virus, Ch. 83; Animal and Animal Cell Culture Systems, Ch. 19 and Clinical Microbiology Procedures Handbook, Volume 2, Isenberg, H.D. ed. (1992). *American Society for Microbiology, Washington, D.C.*, Selection, Collection and Transport of Specimens for Viral and Rickettsial Cultures, Section 8.2.

Para el transporte apropiado de las muestras, consultar 42 CFR (Code of Federal Regulations) part 72.

Proceso de muestras

Antes de procesar las muestras, comprobar que hayan sido obtenidas y transportadas correctamente. La manipulación incorrecta de las muestras puede causar resultados erróneos.

Procesamiento de las muestras para el examen directo:

1. Saque la muestra del envase original y colóquela en un tubo de centrifugar estéril de 10 a 15 ml.
2. Centrifugue entre 300 y 500 x g, a 2° y 8°C, durante 10 minutos.
3. Extraiga el sobrenadante para los procedimientos de aislamiento vírico.

Nota: Consultar en “Procesamiento de las muestras para cultivo / aislamiento” las instrucciones completas.

4. Lavar el sedimento celular mediante suave resuspensión en 4 a 8 ml de PBS.
5. Centrifugue entre 300 y 500 x g, a 2° y 8°C, durante 10 minutos.
6. Si la muestra contiene moco, éste formará una capa sobre el sedimento celular. Retirar cuidadosamente el sobrenadante y el moco con una pipeta Pasteur. Si todavía hay moco, repetir los pasos 4 a 6 hasta que desaparezca.
7. Resuspenda las células sedimentadas en 0,1 a 0,2 ml de PBS estéril para obtener una suspensión ligeramente turbia. La calidad de la preparación depende de la concentración de células en la suspensión. Las suspensiones densas son difíciles de leer y no proporcionan preparaciones de alta calidad. Las suspensiones que no contienen suficientes células dan lugar a pérdida de sensibilidad.
8. Ponga una gota de la suspensión celular sobre el número deseado de pocillos en los portaobjetos previamente limpios.
9. Espere a que el portaobjetos se seque al aire.
10. Fije los portaobjetos en acetona fría (2° y 8°C) durante 10 minutos. No deje que la acetona se contamine con agua y sales. Esto puede producir una tinción nebulosa.
11. Espere a que los portaobjetos se sequen al aire tras la fijación. Los portaobjetos deben teñirse lo antes posible. Si es necesario guardarlos, coloque los portaobjetos en un contenedor con desecante a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
12. Proceda con la sección del “Procedimiento de la inmunofluorescencia” después de terminar la sección de la “Preparación del reactivo”.

Procesamiento de las muestras para cultivo/aislamiento:

Aspirado nasofaríngeo, aspirado traqueal, lavado nasal, lavado bronquial:

1. Saque la muestra del envase original y colócala en un tubo de centrifugar estéril de 10 a 15 ml
2. Agregue suficiente PBS frío para alcanzar un volumen de 2,0 a 2,5 ml
3. Mezcle agitando en el vórtex. Si la muestra se utiliza únicamente para el aislamiento viral, proceda con la etapa 4.

***Nota:** Las muestras que se van a utilizar para examen directo o para el aislamiento vírico deben centrifugarse entre 300 y 500 x g, a 2° y 8°C durante 10 minutos. Se extrae el sobrenadante que se usará para el aislamiento vírico. Si el sedimento celular es suficientemente grande, una porción del mismo se puede agregar al sobrenadante para aumentar la*

recuperación vírica. Consultar, por favor, en “Procesamiento de las muestras para el examen directo” las instrucciones completas.

4. Sonique la muestra de 8 a 12 Kc/seg durante 30 a 60 segundos para disgregar las células y liberar las partículas víricas.
5. Centrifugue la muestra entre 300 y 500 x g, a 2° y 8°C durante 10 minutos, para sedimentar los restos celulares.
6. Separe el sobrenadante de los restos celulares.
7. El sobrenadante se puede mezclar con solución antibiótica, 10X, y dejarlo a 2° y 8°C durante 30-60 minutos antes de la inoculación para evitar el sobrecrecimiento bacteriano.

Torundas nasofaríngeas, de la garganta y nasales:

1. Agite la muestra vigorosamente, o en el vórtex, para separar las células de la torunda.
2. Para una mayor recuperación vírica, agregar algunas perlas de vidrio estériles a la muestra y agitar en el vórtex durante un minuto, o sonique de 8 a 12 Kc/seg, durante 30 a 60 segundos.
3. Deseche la torunda en una solución de hipoclorito de sodio.
4. Centrifugue la muestra entre 300 y 500 x g, a 2° y 8°C durante 10 minutos.
5. Utilice el sobrenadante como material de inoculación.

Aislamiento y preparación de los cultivos para tinción:

Siembra de tubos estándar o de shell vials:

1. Examine los cultivos celulares inmediatamente antes de sembrar las muestras para verificar que la morfología sea adecuada.
2. Aspire el medio del crecimiento de los tubos o de los shell vials que se inocularán.
3. Agregue entre 0,2 y 0,5 ml del inóculo en cada tubo o shell vial.
4. Inocule las muestras en las estirpes celulares apropiadas.
5. Centrifugue los shell vials a temperatura ambiente durante 30 minutos entre 500 y 700 x g.
6. Fije el inóculo por adsorción sobre las monocapas del tubo estándar por la incubación en un soporte inclinado a 35-37°C durante 1 hora.

7. Después de la adsorción o centrifugación, aspire el inóculo y agregue suficiente medio de mantenimiento para cubrir completamente la monocapa de células.
8. Incuba a 35-37°C en tambores giratorios o soportes fijos.
9. La monocapa se puede enjuagar suavemente 2 ó 3 veces con medio de mantenimiento previamente equilibrado si la muestra pudiera resultar tóxica para la monocapa.
10. Renueve el medio de cultivo cada 3 a 5 días.

Nota: Se debe sembrar una muestra de cada lote de las estirpes celulares empleadas para el cultivo celular con cepas representativas de VRS y del virus de la influenza A para establecer la susceptibilidad a la infección por influenza y el desarrollo posterior de CPE. Los cultivos celulares no inoculados también deben crecerse y examinarse diariamente en busca de virus y micoplasma. Estos funcionarán como testigo de la morfología celular normal y pueden resultar útiles para detectar un CPE temprano. A menos que estos cultivos celulares testigo tengan un crecimiento adecuado, los resultados del aislamiento en cultivo celular deben considerarse inválidos.

Preparación de cultivo tisular para tinción:

1. Examine los tubos de cultivo tisular o los shell vials diariamente en busca de efecto citopático. Los shell vials pueden teñirse cuando el CPE está presente o a los tiempos óptimos que determine cada laboratorio. Si se observa CPE, las células se pueden raspar o tripsinizar del tubo (o de los shell vials) y un portaobjetos multipocillos y prepararlas para su tinción.
2. Para preparar portaobjetos multipocillos, aspire el medio del tubo (o del shell vial). Guarde el medio de cultivo que no se ha usado a 2-8 °C hasta que se haya terminado la prueba. Si fuera necesario repetir el análisis, se puede intentar aislar al virus de este medio.
3. Lave el cultivo celular suavemente, tres veces, con 1-2 ml de HBSS. Deseche todos los lavados en una solución de hipoclorito de sodio.
4. Agregue un décimo del volumen de cultivo original de tripsina y deje reposar durante 30 segundos. Golpee suavemente el recipiente de cultivo para desprender las células. Suspnda nuevamente las células con 2 ml de HBSS. Centrifugue la suspensión de células entre 300 y 500 x g durante 10 minutos. Resuspenda las células sedimentadas en 0,3 ml de PBS estéril para obtener una suspensión ligeramente turbia. Para ser considerados

adecuados para la detección, los portaobjetos deben contener al menos dos células por campo a un aumento de 250x.

Nota: Una alternativa es simplemente despegar la monocapa de células del tubo con una varilla de vidrio o una pipeta estéril. Suspenda nuevamente y centrifugue las células según lo descrito anteriormente.

5. Manche con la suspensión celular un portaobjetos limpiado con acetona y dejarlo secar. Fije el portaobjetos en acetona fría (2° y 8°C) durante 10 minutos y séquelo al aire completamente. Guarde los portaobjetos no utilizados con desecante a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

Procedimiento de tinción

Preparación del reactivo:

Solución de PBS/ Tween 20 -_Disolver el contenido del paquete de PBS en 950 ml de agua desionizada o destilada. Agregar el contenido del frasco de Tween 20/azida sódica al PBS. Mezclar a fondo; c.s.p. un litro con agua desionizada o destilada. Transferir a un envase para almacenamiento, limpio y etiquetado, cerrarlo bien y guardarlo a la temperatura ambiente. Desechar el PBS/Tween si se torna turbio o presenta precipitados.

El resto de los reactivos se suministran listos para su uso.

Procedimiento (de tinción) inmunofluorescente directo sugerido:

1. Permita que los portaobjetos de testigo fijados en acetona, la muestra y los reactivos alcancen la temperatura ambiente.

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

2. Agregue suficiente **SimulFluor® RSV/Flu A Reagent** REF 5245 para cubrir las células: 1 gota por mancha celular y 4 a 6 gotas para los shell vials.
3. Incube el portaobjetos a 37°C durante 15 minutos en una cámara húmeda.
4. Enjuague el portaobjetos suavemente con una piseta de PBS/Tween 20 durante 10 a 15 segundos para eliminar el exceso de solución de anticuerpo monoclonal, tenga cuidado de dirigir el chorro lejos del pocillo. Para shell vials: aspire el reactivo del frasco y lave suavemente cada shell vial 3 veces con 1 ml de PBS/Tween 20.
5. Sacuda el exceso de reactivos del portaobjetos.

6. Prepare bajo un cubreobjetos con Mounting Fluid acuoso pH 8,5 REF 5013 o equivalente). Para shell vials: aspire el PBS/Tween de los shell vials. Levante cada cubreobjetos con una aguja doblada fijada a una jeringa pequeña y sáqueelo cuidadosamente con pinzas. Prepare cada cubreobjetos con el LADO DE LAS CÉLULAS HACIA ABAJO sobre un portaobjetos de vidrio con líquido de preparación.
7. Seque el exceso de líquido de los bordes del portaobjetos.

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

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

Nota: El buen funcionamiento del microscopio de fluorescencia tiene una importancia crucial para lograr resultados de 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 testigo positivo verificará el funcionamiento de los reactivos, la metodología de cultivo y el microscopio.

Interpretación de los resultados

Control de calidad

Con cada lote de muestras hay que probar los portaobjetos de testigo. Los portaobjetos de testigo proporcionados en el kit son para demostrar el funcionamiento apropiado de los componentes del kit y del procedimiento de tinción inmunofluorescente.

También se pueden probar preparaciones de testigo de células infectadas por VRS o por el virus de la influenza A y de células no infectadas para asegurar la idoneidad de los procedimientos de tinción para el análisis directo de la muestra. Además, hay que mantener y probar tubos estándar o shell vials inoculados con cepas de referencia de VRS y del virus de la influenza A, y cultivos no inoculados para asegurar la idoneidad de los procedimientos de cultivo, aislamiento y tinción.

Nota: Examinar bien en todo el portaobjetos la presencia de fluorescencia asociada a las células.

Muestra directa:

Se deben examinar los shell vials o los portaobjetos testigo preparados a partir de células infectadas por VRS, virus de la influenza A y células no infectadas para asegurar procedimientos de tinción apropiados durante el análisis directo de la muestra.

Cuando se visualiza con un microscopio de fluorescencia, una fluorescencia color verde manzana brillante en el núcleo y/o citoplasma de las células infectadas indica una reacción positiva para VRS. Una fluorescencia color amarillo oro en el núcleo y/o citoplasma de las células infectadas indica una reacción positiva para el virus de la influenza A.

Una reacción de tinción positiva para el VRS o el virus de la influenza A requiere la presencia de al menos 2 o células intactas que presenten fluorescencia específica. Un resultado presumiblemente negativo está indicado por la ausencia de fluorescencia en un muestreo mínimo de 20 células epiteliales. Una muestra que contiene menos de 20 células epiteliales se considera inadecuada, y la prueba inválida.

Precaución: *Debe ignorarse la fluorescencia de fragmentos celulares debida a atrapamiento del reactivo en dichos restos. Si los testigos positivo y negativo no pueden ser claramente distinguidos, la prueba se debe considerar inválida.*

Si se desea, puede utilizarse un sistema de filtros para TRITC para confirmar la reacción de tinción. Las células infectadas por VRS ya no serán visibles, mientras que las células infectadas por el virus de la influenza A exhibirán una tinción de fluorescencia color rosa brillante.

Aislamiento y confirmación del cultivo celular:

Hay que mantener y probar tubos estándar o shell vials inoculados con cepas de referencia de VRS y del virus de la influenza A, y cultivos no inoculados para asegurar la idoneidad de los procedimientos de cultivo, aislamiento y tinción.

Cuando se visualizan con un microscopio de fluorescencia con un sistema de filtros para FITC, una fluorescencia color verde manzana brillante en el núcleo y/o citoplasma de las células infectadas indica una reacción positiva para VRS. Una fluorescencia color amarillo oro en el núcleo y/o citoplasma de las células infectadas indica una reacción positiva para el virus de la influenza A.

Una reacción de tinción positiva para el VRS o el virus de la influenza A requiere la presencia de al menos 2 o células intactas que presenten fluorescencia específica. La ausencia de fluorescencia y la presencia de un color rojo pálido debido a la tinción de contraste con azul de Evans, indican una reacción negativa provisional.

Un resultado negativo no descarta una infección por VRS o por el virus de la influenza A o ambos. Un resultado negativo puede deberse a diversos factores como: una muestra inadecuada, incorrecta obtención y manipulación de la muestra, técnica de cultivo incorrecta, estirpe celular o temperatura inadecuadas durante el aislamiento u otros factores mencionados en la sección de “Resolución de problemas”. Todos los resultados negativos provisionales deben informarse como “No se observa ningún virus”.

Limitaciones

- Un resultado negativo en la muestra directa no descarta la infección por VRS, por el virus de la influenza A o ambos. Un resultado negativo puede deberse a diversos factores como: momento de obtención durante la infección, muestra inadecuada, tipo de muestra, una obtención y manejo inadecuados de la muestra y otros factores que se mencionan en la sección “Resolución de problemas”. Hay que inocular la muestra al cultivo celular y monitorizar la infección.
- Un resultado negativo en los cultivos celulares no descarta una infección por VRS o por el virus de la influenza A o ambos. Un resultado negativo puede deberse a diversos factores como: momento de la obtención en el curso de la infección, incorrecta obtención y manipulación de la muestra, técnica de cultivo incorrecta, estirpe celular o temperatura inadecuadas durante el aislamiento u otros factores mencionados en la sección de “Resolución de problemas”.
- El uso de un objetivo de 10x (ampliación 100x) puede no proporcionar los suficientes aumentos para visualizar la morfología de las células y el patrón de la tinción, particularmente en las células infectadas por el virus de la influenza A.
- Los anticuerpos monoclonales usados en este kit se prepararon con una cepa prototipo y es posible que no detecten todas las variantes antigénicas o nuevas cepas de VRS o del virus de la influenza A.
- Los anticuerpos monoclonales pueden no detectar las cepas de VRS y del virus de la influenza A que hayan experimentado pequeños cambios en los aminoácidos de la región diana del epítipo.
- Los procedimientos de tinción directa de la muestra detectan el antígeno de VRS o del virus de la influenza A y no pueden utilizarse para determinar la viabilidad de estos virus.
- La proteína A, producida por determinadas bacterias se une a la porción de Fc de los anticuerpos monoclonales usados en el **Light Diagnostics™**

SimulFluor® RSV / Flu A DFA Kit. Se podría identificar una contaminación bacteriana en un aislado de cultivo y tales muestras se deben eliminar del análisis. Sin embargo, la tinción podría diferenciarse por el tamaño y la morfología. La presencia del *Staphylococcus aureus* (que produce la proteína A) dará lugar a la fluorescencia de la pared de la célula que es brillante, pequeña (0,8 a 1,0 μm) y esférica.

- El buen funcionamiento del microscopio de fluorescencia tiene una importancia crucial para lograr resultados de análisis satisfactorios. Dado que los objetivos, la intensidad y potencia de la lámpara y los filtros pueden afectar a los resultados, el empleo de los testigos adecuados verificará el funcionamiento de los reactivos, la metodología de cultivo y el microscopio.
- No se han establecido las características del funcionamiento de esta prueba para la monitorización del tratamiento.
- No se han establecido totalmente las características del funcionamiento de esta prueba para tipos de muestras tales como los aspirados nasofaríngeos o muestras de biopsia del aparato respiratorio.

Especificidad y reactividad cruzada

Los anticuerpos monoclonales conjugados usados en el reactivo **SimulFluor® RVS/Flu A** se probaron contra una variedad de virus y de bacterias encontrados en las vías respiratorias, y las estirpes celular utilizado comúnmente para aislar los virus RVS e influenza A. En la tabla siguiente se indican los resultados.

Tabla 1a. Reactividad cruzada contra virus comunes

Microorganismos	SimulFluor® RSV/Flu A
Virus	
Adenovirus; AD-75 CDC V5-002	-
Coxsackievirus A9; ATCC VR-186	-
Coxsackievirus B1; NIH	-
Citomegalovirus; aislado clínico	-
Enterovirus 70; ATCC VR-836	-
Enterovirus 71; ATCC VR-784	-
Echovirus 4; ATCC VR-34	-
Echovirus 6; ATCC VR-36	-
Echovirus 9; ATCC VR-39	-
Echovirus 11; ATCC VR-41	-
Echovirus 30; ATCC VR-322	-
Virus del herpes simple tipo 1; aislado clínico	-
Virus del herpes simple tipo 2; aislado clínico	
Influenza A: H1N1: 6 cepas H2N2: 1 cepa H3N2: 8 cepas	+
Influenza B; 6 cepas	-
Virus de la parotiditis;	-
Virus del sarampión	-
Parainfluenza 1; CDC V6-004	-
Parainfluenza 2; CDC V7-003	-
Parainfluenza 3; CDC V5-003	-
Parainfluenza 4A; VR1378 cepa M-25	-
Virus respiratorio sincitial; aislados clínicos - 6 Cepa Long Cepa 'B'	+
<i>Pneumocystis carinii</i> , pulmón de rata	-
Virus varicela-zoster; aislado clínico	-

Tabla 1b. Reactividad cruzada contra las bacterias y las estirpes celulares comunes

Microorganismos	SimulFluor® RSV/Flu A
Bacterias	
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ; ATCC 10580	-
<i>Bordetella pertussis</i> ; ATCC 9340	-
<i>Branhamella catarrhalis</i> ; ATCC 25238	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> ; ATCC	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ; ATCC 13812	-
<i>Legionella micdadei</i> ; ATCC 33204	-
<i>Legionella pneumophila</i> ; ATCC 33156	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; ATCC 25177	-
<i>Mycoplasma hominis</i> ; ATCC 23114	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ; ATCC 15531	-
<i>Neisseria meningitidis</i> ; ATCC 13077	-
Estirpes celulares	
HEp-2	
RMK	-
MRC5	-
A549	-
Vero	-
LLC-MK2	-

Valores esperados

Se recibieron quinientas veintisiete muestras en 2 sitios entre septiembre de 1997 y marzo de 1998, 253 de la región sureste de Estados Unidos y 274 del noreste.

En el sureste, se identificó el VRS por muestra directa o cultivo en 52 muestras con una frecuencia del 20,6%, mientras que el virus de la influenza A se aisló en 31 muestras (12,3% de frecuencia). Todos los pacientes en los que se identificó el VRS eran menores de 3 años de edad. Por el contrario, 19 de 31 (61,3%) pacientes positivos para el virus de la influenza A eran mayores de 10 años de edad.

En el noreste, se identificó el VRS en 111 muestras (40,5% de frecuencia) y el virus de la influenza A en 23 muestras (8,4% de frecuencia). A excepción de 11 exudados faríngeos tomados de adultos en una clínica de reposo, todas las muestras eran aspirados nasofaríngeos de niños. Se observó para las infecciones por VRS y por el virus de la influenza A una distribución similar, en cuanto a la edad, a la que se halló en el otro sitio del estudio. Todos los pacientes en los que se identificó el VRS eran menores de 3 años de edad, mientras que 3 de los 23 aislados de virus de la influenza A pertenecían a pacientes mayores.

Tabla 2. Frecuencia de VRS y del virus de la influenza A en el este de Estados Unidos en niños menores de 3 años de edad.

	Sureste de EE.UU.			Noreste de E.E.U.U.		
	Total	Positiva	% < 3 años	Total	Porcentaje	% < 3 años
VRS	52/253	20,6%	100%	111/274	40,5%	100%
Influenza A	31/253	12,3%	38,7%	23/274	8,4%	13,0%

Se recibieron cinco tipos diferentes de muestras para realizar análisis en los dos sitios del estudio. Los números de las muestras y de la tasa de positividad para VRS o para el virus de la influenza A se resumen a continuación. Los exudados nasales y aspirados nasofaríngeos resultaron ser los mejores tipos de muestra para el aislamiento del virus.

Tabla 3. Muestras recibidas para detección de VRS y del virus de la influenza A

	TS	NS	TW	NPA	Sput	Bronch	Otro
Nº de muestras	63	137	17	263	37	2	3
Nº positivas	15	70	4	134	13	0	0
% positivas	23,8	51,1	23,5	50,9	35,1	0	0

TS = exudados faríngeos; NS = exudados nasales; TW = lavados faríngeos; Sput = esputo; Bronch = lavados bronquiales; O = otro

Características del funcionamiento

SITIO 1

Se recibieron doscientas cincuenta y tres muestras para la detección de VRS y del virus de la influenza A en un laboratorio de referencia del sudeste de Estados Unidos. Las muestras, que incluyeron exudados nasales, exudados faríngeos, lavados nasales, etc., fueron tanto de niños como de adultos. Se prepararon portaobjetos con cada muestra y se tiñeron con el reactivo **SimulFluor® RSV/Flu A** y los resultados se compararon con los de un Dispositivo previamente evaluado y registrado para análisis de la fluorescencia. Las muestras también se inocularon en el cultivo para el aislamiento del virus. Se prepararon portaobjetos de los cultivos inoculados y se tiñeron con el reactivo **SimulFluor® RSV/Flu A** y un Dispositivo previamente evaluado y registrado para el análisis de la fluorescencia.

Se aislaron veintiséis virus distintos del VRS y del virus de la influenza A, incluyendo rinovirus (9), CMV (6), adenovirus (4), enterovirus (2) y 1 virus de la parainfluenza 2. También se identificaron cuatro infecciones duales, una por cada una de las siguientes combinaciones CMV/adeno, influenza A/adeno, CMV/VRS y CMV/parainfluenza 3.

Detección de VRS

Se detectó VRS en 52 muestras de pacientes mediante análisis directo de la muestra y aislamiento en cultivo. De éstos, sólo 13 fueron positivos únicamente mediante cultivo. El reactivo **SimulFluor® RSV/Flu A** coincidía con el Dispositivo previamente evaluado y registrado tanto en el análisis directo de la muestra como en la confirmación del cultivo.

La sensibilidad y la especificidad relativas del reactivo **SimulFluor® RSV/Flu A** fueron del 100% respectivamente para la confirmación del cultivo, mientras que la sensibilidad y la especificidad relativas de la prueba directa de la muestra fueron del 100% y del 83,8% respectivamente en comparación con el cultivo.

Tabla 4. Detección del VRS en muestras directas y en cultivo

SimulFluor® RSV/Flu A/ Dispositivo previamente evaluado y registrado	Positivo por muestra directa	Negativo por muestra directa	Positivo por cultivo	Negativo por cultivo
Positivo por SimulFluor® RSV/Flu A	52	0	13	0
Negativo por SimulFluor® RSV/Flu A	0	201	0	240
Total	52	201	13	240

Sensibilidad relativa de la Muestra directa vs. Cultivo = 100% (13/13)
(Intervalo de confianza del 95%: 33,5 -95,9%)

Especificidad relativa de la Muestra directa vs. Cultivo = 83,8% (201/240)
(Intervalo de confianza del 95%: 83,7 -91,8%)

Sensibilidad relativa de la confirmación del cultivo = 100% (13/13)
(Intervalo de confianza del 95%: 27,6 -86,2%)

Especificidad relativa de la confirmación del cultivo = 100% (240/240)
(Intervalo de confianza del 95%: 91,4 -97,2%)

Detección del virus de la influenza A

El virus de la influenza A se aisló en cultivo de 31 de las 253 muestras. El **SimulFluor® RSV/Flu A** y el Dispositivo previamente evaluado y registrado tuvieron una correlación completa para la confirmación de el cultivo. De las muestras positivas por cultivo, solamente 16 eran también positivas por prueba por muestra directa con el **SimulFluor® RSV/Flu A** y 15 con el Dispositivo previamente evaluado y registrado.

Tabla 5 Detección del virus de la influenza A en muestras directas y en cultivo

SimulFluor® RSV/Flu A/ Dispositivo previamente evaluado y registrado	Positivo por muestra directa	Negativo por muestra directa	Positivo por cultivo	Negativo por cultivo
Positivo por SimulFluor® RSV/Flu A	15	1	31	0
Negativo por SimulFluor® RSV/Flu A	0	237	0	222
Total	15	238	31	222

Sensibilidad relativa de la Muestra directa vs. Cultivo = 48,4% (15/31)
(Intervalo de confianza del 95%: 33,5 -95,9%)

Especificidad relativa de la Muestra directa vs. Cultivo = 100% (222/222)
(Intervalo de confianza del 95%: 89,7 – 96,3%)

Sensibilidad relativa de la confirmación del cultivo = 100% (31/31)
(Intervalo de confianza del 95%: 82,1 -163%)

Especificidad relativa de la confirmación del cultivo = 100% (222/222)
(Intervalo de confianza del 95%: 83,7 -91,8%)

SITIO 2

Se recibieron doscientas setenta y cuatro muestras en un laboratorio hospitalario desde noviembre de 1997 a marzo de 1998. A excepción de 11 exudados faríngeos tomados de adultos en una clínica de reposo, todas las muestras eran aspirados nasofaríngeos de niños. Se prepararon portaobjetos a partir de las muestras y se analizó la presencia de VRS y del virus de la influenza A mediante el **SimulFluor® RSV/Flu A** y para VRS mediante un EIA de membrana disponible comercialmente. Las 11 muestras de adultos se analizaron en busca del virus de la influenza A mediante una membrana EIA disponible comercialmente. Cada muestra también se inoculó en cultivos celulares para el aislamiento y la detección del virus de la influenza A y de VRS por medio de un reactivo de inmunofluorescencia disponible comercialmente.

Se aislaron de las muestras veintidós virus distintos del VRS y del virus de la influenza A. Entre éstos se encontraron 9 CMV (incluyendo una coinfección con el virus influenza A y 4 con VRS), 8 adenovirus (incluyendo 3 coinfecciones con VRS), 3 enterovirus (2 coinfecciones con VRS) y 1 HSV.

DetECCIÓN DE VRS

Treinta y dos muestras fueron inadecuadas para análisis directo de la muestra mediante el **SimulFluor® RSV/Flu A**; 4 fueron posteriormente positivas para VRS por cultivo y 1 fue positiva para el virus de la influenza A. El VRS se identificó por tinción directa con **SimulFluor® RSV/Flu A** en 106 muestras. De éstas, 36 eran positivas según la prueba de membrana de EIA previamente evaluada y registrada, pero negativas en cultivo.

Tabla 6. Comparación de **SimulFluor® RSV/Flu A** vs. la Membrana de EIA previamente evaluada y registrada

SimulFluor® RSV/Flu A/ Dispositivo previamente evaluado y registrado	Positivo por EIA	Negativo por EIA	Total
Positivo por SimulFluor® RSV/Flu A	82 (97)	24 (9)*	106 (108)
Negativo por SimulFluor® RSV/Flu A	2	122	124
Total	82(99)	146(131)	230

*15 muestras negativas según la prueba de la membrana EIA resultaron positivas en cultivo

() indica valores ajustados después de la confirmación del cultivo

Sensibilidad relativa: (97/99) 98,0% (intervalo de confianza del 95%: 92,9-99,7%)

Especificidad relativa: (122/131) 93,1% (intervalo de confianza del 95%: 87,4-96,8%)

Tabla 7. Comparación de **SimulFluor® RSV/Flu A** vs. la Dispositivo previamente evaluado y registrado

SimulFluor® RSV/Flu A/ Dispositivo previamente evaluado y registrado	Positivo por cultivo	Negativo por cultivo	Total
Positivo por SimulFluor® RSV/Flu A	88	2*	90
Negativo por SimulFluor® RSV/Flu A	0	183	184
Total	88	185	274

*1 muestra también resultó positiva mediante la membrana EIA

Sensibilidad relativa: (88/90) 97,8% (intervalo de confianza del 95%: 92,2-99,7%)

Especificidad relativa: (183/185) 98,9% (intervalo de confianza del 95%: 96,1-99,9%)

Cuatro muestras fueron positivas para los virus VRS y de la influenza A. Tres de ellas se identificaron mediante el reactivo **SimulFluor® RSV/Flu A** en la muestra directa, y los cuatro VRS se identificaron mediante ambos reactivos en el cultivo.

Detección del virus de la influenza A

Veintitrés muestras fueron positivas para el virus de la influenza A mediante el Dispositivo previamente evaluado y registrado en cultivo; una muestra fue positiva mediante el reactivo **SimulFluor® RSV/Flu A** en análisis directo y en cultivo, pero negativa por cultivo mediante el Dispositivo previamente evaluado y registrado. Tres muestras resultaron positivas para VRS y para el virus de la influenza A en el cultivo, y se identificó 1 infección dual con CMV. De las 32 muestras, que fueron inadecuadas para un análisis mediante **SimulFluor® RSV/Flu A**, sólo 1 fue positiva para el virus de la influenza A en cultivo.

Tabla 8. Detección del virus de la influenza A en muestras directas y en cultivo

SimulFluor® RSV/Flu A/ Dispositivo previamente evaluado y registrado	Positivo por muestra directa	Negativo por muestra directa	Positivo por cultivo	Negativo por cultivo
Positivo por SimulFluor® RSV/Flu A	20	4	23	1
Negativo por SimulFluor® RSV/Flu A	2	216	0	250
Total	22	220	23	251

Sensibilidad relativa de la Muestra directa vs. Cultivo = 83,3% (20/24)
(Intervalo de confianza del 95%: 62,6-95,3%)

Especificidad relativa de la Muestra directa vs. Cultivo = 98,1% (216/220)
(Intervalo de confianza del 95%: 95,4-99,5%)

Sensibilidad relativa de la confirmación del cultivo = 95,8% (23/24)
(Intervalo de confianza del 95%: 78,9-99,9%)

Especificidad relativa de la confirmación del cultivo = 99,6% (250/251)
(Intervalo de confianza del 95%: 97,8-100%)

Se examinaron once torundas de la garganta de adultos que eran residentes de una clínica de reposo mediante una Membrana de EIA previamente evaluada y registrada para la presencia del virus de la influenza A. El reactivo **SimulFluor® RSV/Flu A** coincidía completamente con el cultivo e identificó el virus de la influenza A en 3 muestras, mientras que la Membrana de EIA previamente evaluada y registrada identificó 1 muestra con el virus de la influenza A.

Tabla 9. Comparación de **SimulFluor® RSV/Flu A** vs. la Membrana de EIA previamente evaluada y registrada

SimulFluor® RSV/Flu A/ Dispositivo previamente evaluado y registrado	Positivo por muestra directa	Negativo por muestra directa	Total
Positivo por SimulFluor® RSV/Flu A	1(3)	2*(0)	3
Negativo por SimulFluor® RSV/Flu A	0	8	8
Total	1(3)	10	11

*Ambas se confirmaron positivas para el virus de la influenza A en cultivo

() indica valores ajustados después de la confirmación del cultivo

Sensibilidad relativa: (3/3) 100% (intervalo de confianza del 95%: 29,2-100%)

Especificidad relativa: (11/11) 100% (intervalo de confianza del 95%: 71,5-100%)

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-
	Fabricante		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.

©2012 EMD Millipore Corporation, una división de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. Todos los derechos reservados. EMD, EMD Millipore, Millipore, la marca M, Light Diagnostics, SimulFluor 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™

SimulFluor® RSV/Flu A DFA KIT

Ein Direkter Immunfluoreszenz-Assay

Deutsche Sprachenergänzung



3129



125



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



Millipore (UK) Ltd.
Fleming Road, Kirkton Campus • Livingston EH54 7BN
United Kingdom
Tel. +44 1506 404000 • Fax +44 1506 404001

Verwendungszweck

Der **Light Diagnostics™ SimulFluor® RSV/Flu A DFA Kit** ist für respiratorische Einzelproben, z. B. Rachen-, Nasenrachenraum- und Nasenabstriche, Rachenspülungen, Absaugungen und BALs (bronchoalveoläre Lavagen) von Patienten mit fiebrigen respiratorischen Erkrankungen und die anschließende Amplifikation des Virus in Zellkultur konzipiert. Wenn Proben bei direkter Untersuchung als negativ befunden wurden, muss das Ergebnis durch Zellkultur bestätigt werden.

IVD

Zusammenfassung und Erläuterung

RSV (respiratory syncytial virus) gehört dem Genus *Pneumovirus* in der Familie der *Paramyxoviridae* an. Es handelt sich um ein pleomorphes Virus mit 100 bis 300 nm Durchmesser und einer linearen, unsegmentierten, einzelsträngigen Antisense-RNA. Die Außenfläche der Hülle weist Projektionen auf, die aus den beiden Antigen-Glykoproteinen F und G sowie dem Hauptstrukturprotein N im Nukleokapsid bestehen. RSV wird durch die Strukturproteine F, G und N in zwei Antigen-Hauptgruppen unterschieden: Die Prototyp-Stämme sind Long (Gruppe A) und CH-18537 (Gruppe B) (1-4). RSV verursacht im Winter und Frühjahr in der ganzen Welt Epidemien schwerwiegender respiratorischer Erkrankungen mit großer Verbreitung. Da die natürliche Immunität gegen RSV schwach ist, pflegen diese Epidemien jedes Jahr bzw. jedes zweite Jahr erneut aufzutreten.

RSV kann aus nasopharyngealen Absaugungen, Nasen- und Rachenabstrichen oder Lungenproben isoliert werden, die innerhalb der ersten Tage der Erkrankung entnommen wurden. Das Virus vermehrt sich in humanen Epithelzellen wie HEP2, primären RMK-Zellen (rhesus monkey kidney, Rhesusaffeniene) A549-, MRC-5- und NCI-H292-Zellen. RSV-Infektionen können mithilfe schneller und direkter Tests mit geeigneten klinischen Einzelproben diagnostiziert werden, wenn ein Standardreagenz und angemessene Kontrollen verwendet werden. Wann immer möglich sollte eine Bestätigung durch Virusisolierung erfolgen.

Stationär eingewiesene, RSV-infizierte Säuglinge wurden erfolgreich mit Ribavirin behandelt, das als Spray verabreicht wurde. Diese Behandlung erfordert jedoch besondere Sorgfalt und erfolgt nicht routinemäßig (4). Für die Behandlung steht auch Immunglobulin zur Verfügung. RSV-Impfstoffe weisen

eine lange Geschichte von Fehlschlägen auf, doch wird die Entwicklung intensiv weiterverfolgt.

Das Influenza A-Virus gehört zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Es handelt sich um ein großes, behülltes Virus mit 110 nm Durchmesser, das eine segmentierte einzelsträngige RNA sowie HA-Projektionen (Hämagglutinin) und NA-Projektionen (Neuraminidase) enthält, die durch die Glykoprotein-Membran dringen (5-7). Influenza A mutiert mit einer hohen Frequenz und verursacht weltweit periodische Grippeepidemien. Die Epidemien sind besonders schwerwiegend, wenn die Mutationen zu drastischen Änderungen der HA- oder NA-Struktur geführt haben, so dass die in einer Bevölkerungsgruppe im Umlauf befindlichen Antikörper den Virusstamm nicht erkennen (6-8). Bei Influenza-Viren wird die Spezifität durch Antigen-Unterschiede in zwei Hauptstrukturproteinen bestimmt, dem internen Nukleoprotein (NP) und dem Matrixprotein (M) (5-8).

Influenza-Infektionen sind durch Tracheobronchitis, Pharyngitis, Myalgie, Fieber, Kopfschmerzen und Unwohlsein gekennzeichnet (5,6,9). Influenza unterscheidet sich häufig durch minimalen Schnupfen von anderen respiratorischen Viruserkrankungen. Sie ist unter Erwachsenen höchst ansteckend und wird durch Sprühtropfen und Infektionsträger übertragen. Wie bei RSV erleichtert eine Inkubationszeit von 1 bis 4 Tagen die schnelle Verbreitung des Virus in Gemeinden und Krankenhäusern. Die signifikanteste Komplikation bei Influenza ist Pneumonie, die alleine oder zusammen mit bakterieller Pneumonie auftritt. Pneumonie tritt am häufigsten bei älteren Personen, bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem oder bei Patienten auf, die schon an Diabetes, Herz- oder Lungenerkrankungen oder chronischen Nierenerkrankungen leiden. Bei Kindern ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass sie an zusätzlichen Symptomen mit Schmerzen im Magen-Darm-Trakt, Erbrechen, Myositis, Mittelohrentzündung, Konjunktivitis und Krupp leiden.

Die höhere Anzahl an Todesfällen durch Pneumonie während „Grippezeiten“ wird auf das Influenza-Virus zurückgeführt und als Indikator zum Verfolgen von Grippe-Epidemien sowie zum Überprüfen der Wirksamkeit von Grippe-Impfstoffen verwendet. Zu den weniger häufigen Komplikationen bei Erwachsenen zählen das Reye-Syndrom und andere ZNS-Beteiligungen, Herzsymptome, Nebenhöhlen- und Mittelohrentzündung.

Wenn Amantadin und dessen Analog Rimantadin prophylaktisch eingenommen werden, können sie bis zu 90 Prozent der Influenza A-Infektionen und 100 Prozent der Erkrankungen verhindern. Sie sind auch therapeutisch wirksam,

da sie die Dauer der Erkrankung verringern, wenn sie innerhalb der ersten zwei Tage der Erkrankung eingenommen werden. Ribavirin kann bei der Behandlung von Influenza A wirkungsvoll sein, wenn es als Spray verabreicht wird. Die mit der Identifizierung neuer Stämme einhergehende Entwicklung von Impfstoffen gegen Influenza A stellt einen wesentlichen Bestandteil der Aktivitäten des staatlichen Gesundheitswesens dar. Die Wirksamkeit der aktuellen Grippe-Impfstoffe liegt im Allgemeinen bei 70–90 Prozent (5,7).

Influenza-Viren können je nach dem Stamm des Virus in RMK-, MDCK-Zelllinien (Madin-Darby canine kidney, Madin-Darby Hunde-Nierenzellen) und zuweilen auch in anderen Zelllinien angezüchtet werden (11-13). Die Isolierung des Influenza-Virus in MDCK-Zellen wird durch Hinzufügen von Trypsin in einer Konzentration von ~2 µg/ml stark unterstützt.

Es können sowohl Standard-Kulturen als auch Shell-Vials sowie direkte Tests, einschließlich FA (fluorescence assay, Fluoreszenztest) und EIA (enzyme immunoassay, Enzym-Immunoassay) (11,14-17), verwendet werden.

Geeignete Einzelproben sind Nasenspülungen, Rachenabstriche und BALs (bronchoalveoläre Lavagen). Die Diagnose einer Influenza-Infektion kann durch jeden direkten Test mit Standard-Reagenzien erfolgen, insbesondere, wenn er durch Virusisolierung bestätigt wird.

Testprinzip

In **Light Diagnostics™ SimulFluor® RSV/Flu A DFA Kit** wird ein einziges Reagenz eingesetzt, um gleichzeitig RSV und Influenza A nachzuweisen und zu identifizieren. Die primäre, für RSV spezifische Komponente bindet sich an RSV F- und G-Antigene in RSV-infizierten Zellen. Die sekundäre, für Influenza A spezifische Komponente bindet sich an das Influenza A-Nukleoprotein in Influenza A-infizierten Zellen. Ungebundener monoklonaler Antikörper wird durch Waschen mit PBS (phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung) entfernt. Der Antigen-Antikörper-Komplex kann mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Der RSV-Antigen-Antikörper-Komplex weist eine apfelgrüne Fluoreszenz und der Influenza A-Antigen-Antikörper-Komplex eine goldgelbe Fluoreszenz auf. Aufgrund des im Reagenz vorhandenen Evans-Blau weisen nicht infizierte Zellen eine mattrote Färbung auf.

Kit-Komponenten

1. SimulFluor® RSV/Flu A Reagent – REF 5245: Ein (1) 5 ml-Tropffläschchen mit einer primären, für RSV spezifischen und einer sekundären, für Influenza A spezifischen Komponente, Protein-Stabilisator, 0,005% Evans-Blau und 0,1 % Natriumazid (Konservierungsmittel).

Bereitgestellte Betrag ist ausreichend für 125 Tests. Schätzung basiert auf Tests von 40 ul Tropfen beruhen; tatsächliche Anzahl der Tests können variieren.


2. RSV Control Slides – REF 5012: Zwei (2) Objektträger, die eine Vertiefung mit RSV-infizierten Zellen und eine Vertiefung mit nicht infizierten Zellen aufweisen.
3. Influenza A/B Control Slides – REF 5010: Zwei (2) Objektträger, die eine Vertiefung mit Influenza A-infizierten Zellen, eine Vertiefung mit Influenza B-infizierten Zellen und zwei Vertiefungen mit nicht infizierten Zellen besitzen.
4. Phosphate-Buffered Saline (PBS) – REF 5087: Ein (1) Packung Phosphate Buffered Saline-Salze ergibt nach Auflösen in destilliertem Wasser 1 Liter. In einem sauberen, verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur lagern.
5. Tween® 20/Sodium Azide Solution (100X) – REF 5037: Ein (1) 10 ml-Fläschchen mit einem Konzentrat von Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaurat (Tween 20) und Natriumazid (NaN_3), in PBS 1:100 zu verdünnen.
6. Mounting Fluid – REF 5013: Ein (1) 10 ml-Tropffläschchen mit Tris-gepuffertem Glycerin, einem Fluoreszenz-Enhancer und 0,1 % Natriumazid (Konservierungsmittel). Bei temperatur lagern bei 2°C - 25°C.

Zusätzlich erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

- Azeton, chemisch rein oder besser; in Glasbehälter
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Viruskulturkontrollen (Referenz-RSV und Influenza A-Stämme, die von der American Type Tissue Culture Collection ATCC[®], Manassas, VA, bezogen werden können).
- Natriumhypochloritlösung, 0,05 % (1:100-Verdünnung handelsüblichen Chlor-Bleichmittels)
- RSV und Influenza-anfällige Zelllinien wie HEp-2-, MRC-5-, PMK- (primary monkey kidney, primäre Affennierenzellen), MDCK-Zelllinien (14,15,16) oder andere Influenza-anfällige Zelllinien (z. B. LLC-MK2 usw.). Entsprechende Zelllinien können von der American Type Tissue Culture Collection ATCC[®], Manassas, VA, bezogen werden können).
- Gewebekulturmedien wie RPMI oder Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) mit fötalem bovines Serum (FBS) und Antibiotika, oder Äquivalent
- VTM (viral transport medium, Virustransportmedium), das sich nicht hemmend auf RSV auswirkt (HBSS (Hank's balanced salt solution) mit Antibiotika, oder Äquivalent)
- Azeton-gereinigte Objektträger aus Glas, nicht fluoreszierend
- Deckgläser Nr. 1
- 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 100 Watt-Quecksilber- oder Halogenlampe und für FITC geeigneter Filterkombination (Anregungsmaximum = 490 nm, Emissionsmaximum = 520 nm) mit 160- bis 200facher und 400facher Vergrößerung (Trockenobjektiv)
- Optional: Filterkombination für TRITC (Anregungsmaximum = 550 nm, Emissionsmaximum = 570 nm)
- Pinzette

- Feuchte Kammer
- Inkubator, $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Spritze und Nadel oder anderes Hilfsmittel zum Entfernen des Deckglases vom Shell-Vial
- Ultraschall-Wasserbad
- Vortex-Mischer oder Ultraschallgerät

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Das im **SimulFluor**[®]-Reagenz, in PBS/Tween 20 -Lösung und der Mounting Fluid zur Konservierung verwendete Natriumazid ist giftig, wenn es verschluckt wird. Natriumazid kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hoch explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit viel Wasser nachspülen, um die Anlagerung von Aziden zu vermeiden.
- Die gemeinsame Verwendung bzw. die Abänderung von Reagenzien kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller verwenden.
- Andere Inkubationszeiten oder -temperaturen als die hier angegebenen können zu falschen Ergebnissen führen. Jede dieser Änderungen muss vom Benutzer überprüft werden.
- Shell-Vials und Objektträger dürfen während des Färbungsverfahrens nicht trocken werden.
- Alle Einzelproben und Materialien, die damit in Kontakt geraten, als potenziell infektiöse Materialien behandeln und mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen entsorgen. Mit 0,05 % Natriumhypochlorit dekontaminieren.
- Azeton ist extrem entzündlich und schädlich, wenn es verschluckt oder eingeatmet wird. Von Hitze, Funken oder Flammen entfernt halten. Das Einatmen der Dämpfe vermeiden. Für ausreichende Belüftung sorgen.
- Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren.
- Kontakt mit Evans-Blau (im **SimulFluor**[®] RSV/Flu A Reagent  5245 vorhanden) vermeiden, da es potenziell krebserregend ist. Bei Hautkontakt mit großen Mengen Wasser nachspülen.

- Mounting Fluid REF 5013 enthält einen Fluoreszenz-Enhancer, der die Schleimhäute angreifen kann. Direkten Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Wenn ein Kontakt erfolgt, mit großen Mengen Wasser nachspülen.

Stabilität und Lagerung

Bei Lagerung bei 2° bis 8°C ist der **SimulFluor® RSV/Flu A DFA Kit** bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Ablaufdatum stabil. Nicht einfrieren oder hohen Temperaturen aussetzen. Nach dem Ablaufdatum alle verbliebenen Reagenzien entsorgen.

Sammlung von Einzelproben

Ordnungsgemäße Verfahren bei Sammlung, Transport, Verarbeitung und Lagerung der Einzelproben sind für die Isolierung und den Nachweis einer RSV- und Influenza A-Infektion von grundlegender Bedeutung. Absaugungen von respiratorischen Sekreten sind die bevorzugten Proben, Nasenrachenraum- oder Rachenabstriche können jedoch ebenfalls verwendet werden (18).

Nasenspülungen und nasopharyngeale bzw. tracheale Absaugungen sind für die direkte Untersuchung der Einzelproben ideal, da so eine große Anzahl an Epithelzellen gewonnen werden kann. Einzelproben von Nasenrachenraum-Spülungen werden gesammelt, indem 3–5 ml Kochsalzlösung in das Nasenloch des Patienten geträufelt werden, wobei sich der Patient in einer zurückgelehnten Position befindet. Die Salzlösung wird mit einer Spritze, einem Gummisaugball oder einem Katheter, das an einer Schleimauffangvorrichtung angebracht ist, behutsam abgesaugt.

Nasenrachenraum-, Rachen- oder Nasenabstriche enthalten oftmals keine genügende Anzahl an Flimmer- oder säulenförmigen Epithelzellen, die für den direkten Nachweis von RSV und Influenza A unbedingt erforderlich sind.

Proben sofort nach der Sammlung in Eiswasser oder Kühlkissen in das Labor transportieren. Für die direkte Untersuchung zu verarbeitende Proben sollten nicht eingefroren werden, da die Zellen durch das Einfrieren und anschließende Auftauen aufgebrochen und die Proben dadurch unbrauchbar werden. Einzelproben für RSV sollten so schnell wie möglich nach Erhalt verarbeitet und inokuliert werden. Proben für die Kulturoisolierung sollten bei –70 C eingefroren

werden, wenn die Verarbeitung nicht innerhalb von 72 Stunden nach der Entnahme erfolgt. Wiederholte Einfrier-/Auftau-Zyklen vermeiden.

Weitere Informationen über Verfahren für die Probensammlung siehe The Manual of Clinical Microbiology, Balows, A. *et al.*, eds. 5th ed. (1991). American Society for Microbiology, Washington, D.C., Influenza Viruses, Ch. 81; Respiratory Syncytial Virus, Ch. 83; Animal and Animal Cell Culture Systems, Ch. 19 und Clinical Microbiology Procedures Handbook, Volume 2, Isenberg, H.D. ed. (1992). American Society for Microbiology, Washington, D.C., Selection, Collection and Transport of Specimens for Viral and Rickettsial Cultures, Section 8.2.

Informationen über den fachgerechten Transport der Proben sind dem 42 CFR (Code of Federal Regulations), Part 72, zu entnehmen.

Probenverarbeitung

Vor der Verarbeitung der Einzelproben überprüfen, ob sie ordnungsgemäß gesammelt und transportiert wurden. Eine unsachgemäße Behandlung der Einzelproben kann zu falschen Ergebnissen führen.

Verarbeiten von Einzelproben für die direkte Untersuchung:

1. Die Probe aus dem Originalbehälter nehmen und in ein steriles Zentrifugenröhrchen von 10 bis 15 ml geben.
2. 10 Minuten bei 300 bis 500 x g und einer Temperatur von 2° bis 8°C zentrifugieren.
3. Den Überstand für Verfahren zur Virusisolierung sammeln.

***Hinweis:** Vollständige Anweisungen sind dem Abschnitt „Verarbeiten von Einzelproben für die Kultur/Isolierung“ zu entnehmen.*

4. Das Zellpellet durch behutsame Resuspendierung in 4 bis 8 ml PBS waschen.
5. 10 Minuten bei 300 bis 500 x g und einer Temperatur von 2° bis 8°C zentrifugieren.
6. Eventuell vorhandener Schleim bildet eine Schicht über dem Zellpellet. Den Überstand und den Schleim vorsichtig mit einer Pasteurpipette entfernen. Wenn weiterhin Schleim vorhanden ist, die Schritte 4 bis 6 wiederholen, bis der Schleim entfernt wurde.

7. Das Zellpellet in 0,1 bis 0,2 ml PBS resuspendieren, um eine leicht trübe Suspension zu erhalten. Die Qualität des Objektträgers hängt von der Zellkonzentration in der Suspension ab. Suspensionen mit zu hoher Zellkonzentration können schwer gelesen werden und ergeben keine qualitativ hochwertigen Objektträger. Zellsuspensionen, die nicht genügend Zellen enthalten, resultieren in einem Verlust an Sensitivität.
8. Auf vorgereinigten Objektträgern einen Tropfen der Zellsuspension in die gewünschte Anzahl von Vertiefungen geben.
9. Objektträger an der Luft trocknen lassen.
10. Objektträger in gekühltem Azeton (2° bis 8°C) 10 Minuten lang fixieren. Das Azeton darf nicht durch Wasser und Salze verunreinigt werden. Dies kann eine trübe Färbung verursachen.
11. Die Objektträger nach der Fixierung an der Luft trocknen lassen. Die Objektträger sollten so schnell wie möglich angefärbt werden. Wenn eine Lagerung erforderlich ist, die Objektträger bei ≤ -20 °C in einen Behälter mit Trocknungsmittel legen.
12. Nach der Bearbeitung des Abschnitts „Reagenzvorbereitung“ mit dem Abschnitt „Immunfluoreszenzverfahren“ fortfahren.

Verarbeiten von Einzelproben für die Kultur/Isolierung:

Nasopharyngeale Absaugung, tracheale Absaugung, nasale Spülung, bronchiale Spülung:

1. Die Probe aus dem Originalbehälter nehmen und in ein steriles Zentrifugenröhrchen von 10 bis 15 ml geben.
2. Genügend kalte PBS hinzufügen, um das Volumen auf 2,0 bis 2,5 ml aufzufüllen.
3. Zum Mischen vortexieren. Wenn die Einzelprobe ausschließlich für die Virusisolierung verwendet werden soll, mit Schritt 4 fortfahren.

***Hinweis:** Wenn die Einzelprobe sowohl für die direkte Untersuchung als auch für die Virusisolierung verwendet werden soll, sollte sie mit 300 bis 500 x g bei 2 ° bis 8 °C 10 Minuten lang zentrifugiert werden. Der Überstand wird entfernt und für die Virusisolierung verwendet. Wenn das Zellpellet genügend groß ist, kann ein Teil davon dem Überstand hinzugefügt werden, um die Virusgewinnung zu steigern. Vollständige Anweisungen sind dem*

Abschnitt „Verarbeiten von Einzelproben für die direkte Untersuchung“ zu entnehmen.

4. Bei 8 bis 12 kHz 30 bis 60 Sekunden mit Ultraschall behandeln, um die Zellen aufzuschließen und Viruspartikel freizusetzen.
5. Die Einzelprobe mit 300 bis 500 x g bei 2° bis 8°C für 10 Minuten zentrifugieren, um Zelltrümmer abzuscheiden.
6. Den Überstand von den Zelltrümmern abgießen.
7. Der Überstand kann vor der Inokulation mit 10facher antibiotischer Lösung gemischt und bei 2° bis 8°C 30 bis 60 Minuten stehen gelassen werden, um ein Überwachsen mit Bakterien zu verhindern.

Nasenrachenraum-Abstrich, Rachenabstrich, Nasenabstrich:

1. Die Probe heftig vortexieren oder rühren, um die Zellen vom Abstrich zu trennen.
2. Der Einzelprobe zur gesteigerten Virusgewinnung einige sterile Glaskügelchen hinzufügen und eine Minute lang vortexieren oder 30 bis 60 Sekunden mit Ultraschall bei 8 bis 12 kHz behandeln.
3. Den Tupfer in Natriumhypochloritlösung entsorgen.
4. Die Einzelprobe 10 Minuten mit 300 bis 500 x g bei 2° bis 8°C zentrifugieren.
5. Den Überstand als Inokulationsmaterial verwenden.

Kultur/Isolierung und Vorbereitung für die Färbung

Inokulation von Standardröhrchen oder Shell-Vials:

1. Zellkulturen unmittelbar vor der Inokulation mit Einzelproben auf ordnungsgemäße Morphologie überprüfen.
2. Das Wachstumsmedium aus den für die Inokulation vorgesehenen Standardröhrchen oder Shell-Vials absaugen.
3. Jedem Röhrchen oder Shell-Vial 0,2 bis 0,5 ml Inokulum hinzufügen.
4. Einzelproben in die entsprechenden Zelllinien inokulieren.

5. Shell-Vials bei Raumtemperatur 30 Minuten bei 500 bis 700 x g zentrifugieren.
6. Das Inokulum auf Standardröhrchen-Monolayer adsorbieren, indem das Inokulum eine Stunde auf einem Gestell mit Neigung bei 35–37°C inkubiert wird.
7. Nach der Adsorption oder Zentrifugierung das Inokulum absaugen und genügend Aufbewahrungsmedium hinzufügen, um den Zell-Monolayer vollständig zu bedecken.
8. Bei 35 bis –37°C in Rolltrommeln oder auf statischen Gestellen inkubieren.
9. Der Monolayer kann 2 bis 3 Mal behutsam mit vorgewärmtem Aufbewahrungsmedium gespült werden, wenn es den Anschein hat, dass sich die Einzelprobe zum Zellmonolayer möglicherweise toxisch verhält.
10. Das Zellkulturmedium alle 3 bis 5 Tage erneuern.

Hinweis: Eine Einzelprobe jeder Menge der für die Zellkultur verwendeten Zelllinien sollte mit repräsentativen RSV- und Influenza A-Stämmen inokuliert werden, um die Anfälligkeit für die Infektion und die darauf folgende Entwicklung von CPE nachzuweisen. Es sollten außerdem nicht inokulierte Zellkulturen angezüchtet und täglich auf kontaminierende Viren oder Mycoplasma untersucht werden. Dies dient als Kontrolle der normalen Zellmorphologie und kann bei der Erkennung von frühzeitigem CPE hilfreich sein. Nur wenn diese Kontrollzellkulturen ein entsprechendes Wachstum aufweisen, können die Ergebnisse der Zellkulturenisolierung als gültig betrachtet werden.

Vorbereitung von Gewebekultur zum Anfärben:

1. Die Gewebekultur-Röhrchen und/oder Shell-Vials täglich auf zytopathischen Effekt überprüfen. Shell-Vials können angefärbt werden, wenn CPE vorhanden ist oder zu anderen optimalen Zeitpunkten, die durch das jeweilige Labor bestimmt werden. Wenn CPE festgestellt wurde, können die Zellen aus dem Röhrchen (bzw. den Shell-Vials) geschabt oder trypsinisiert und ein Objektträger mit mehreren Vertiefungen für das Anfärben vorbereitet werden.
2. Um Objektträger mit mehreren Vertiefungen vorzubereiten, das Medium aus dem Röhrchen (oder Shell-Vial) absaugen. Nicht verwendetes Medium bei 2° bis 8°C lagern, bis alle Tests durchgeführt wurden. Wenn eine

Wiederholung der Tests erforderlich ist, kann die Virusisolierung mithilfe dieses Mediums versucht werden.

3. Die Zellkulturen behutsam drei Mal mit 1 bis 2 ml HBSS spülen. Alle Spülungen in Natriumhypochloritlösung entsorgen.
4. Ein Zehntel des ursprünglichen Kulturvolumens an Trypsin hinzufügen und 30 Sekunden stehen lassen. Leicht an das Kulturgefäß tippen, um die Zellen zu lösen. Die Zellen mit 2 ml HBSS resuspendieren. Die Zellsuspension 10 Minuten lang bei 300 bis 500 x g zentrifugieren. Das Zellpellet in 0,3 ml steriler PBS resuspendieren, um eine leicht trübe Suspension zu erhalten. Die Objektträger müssen bei 250facher Vergrößerung mindestens zwei Zellen pro Feld aufweisen, um einen hinreichenden Nachweis darzustellen.

***Hinweis:** Wahlweise hierzu kann der Zell-Monolayer einfach mithilfe eines Glasstäbchens oder einer sterilen Pipette aus dem Röhrchen geschabt werden. Die Zellen wie oben beschrieben resuspendieren und zentrifugieren.*

5. Die Zellsuspension punktförmig auf einen Azeton-gereinigten Objektträger auftragen und an der Luft trocknen lassen. Den Objektträger in gekühltem Azeton (2° bis 8°C) 10 Minuten lang fixieren und vollständig an der Luft trocknen lassen. Unbenutzte Objektträger mit Trockenmittel bei ≤ -20 °C lagern.

Färbungsverfahren

Reagenzvorbereitung:

PBS/Tween 20-Lösung – Den Inhalt des PBS-Päckchens in 950 ml destilliertem Wasser auflösen. Der PBS den Inhalt des Tween 20/Natriumazid-Fläschchens hinzufügen. Gründlich mischen und deionisiertes oder destilliertes Wasser ad 1 Liter auffüllen. In einen sauberen, etikettierten Lagerbehälter umfüllen, diesen fest verschließen und ihn bei Raumtemperatur lagern. Entsorgen, wenn sich PBS/Tween eintrübt oder sich ein Präzipitat entwickelt.

Alle anderen mitgelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Empfohlenes Verfahren für Direkte 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. Genügend **SimulFluor® RSV/Flu A Reagent** REF 5245 zum Bedecken der Zellen hinzufügen: Für Zellauftrag 1 Tropfen und für Shell-Vials 4–6 Tropfen.
3. Den Objektträger 15 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. Bei Shell-Vials: Das Reagenz vom Vial absaugen und jedes Shell-Vial 3 Mal behutsam mit 1 ml PBS/Tween 20 waschen.
5. Überschüssige Reagenzien vom Objektträger abschütteln und den Bereich um den Zellauftrag sorgfältig trocknen.
6. Das Produkt unter einem Deckglas mit wässrigem Mounting Fluid pH 8,5 REF 5013 oder äquivalentes Produkt) eindecken. Bei 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 ZELLESEITE NACH UNTEN auf einem gläsernen Objektträger mit Mounting Fluid bedecken.
7. 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.*

8. Die Objektträger mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 100–200-facher Vergrößerung auf Zellen untersuchen, die Fluoreszenz aufweisen. Eine

detaillierte Untersuchung kann bei einer 400fachen Vergrößerung ausgeführt werden.

***Hinweis:** Die Leistung des Fluoreszenzmikroskops ist zum Erzielen 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.*

Interpretation der Ergebnisse

Qualitätskontrolle

Kontroll-Objektträger sollten bei jeder Gruppe von Einzelproben mit getestet werden. Die im Kit mitgelieferten Kontroll-Objektträger sollen die ordnungsgemäße Funktion der Kit-Komponenten und des Immunfluoreszenz-Färbungsverfahrens demonstrieren.

Außerdem können Kontroll-Objektträger getestet werden, die aus RSV-infizierten, Influenza A-infizierten und nicht infizierten Zellen vorbereitet wurden, um ordnungsgemäße Färbungsverfahren während der direkten Einzelprobenanalyse zu gewährleisten. Zusätzlich dazu sollten Standardröhrchen oder Shell-Vials, die mit RSV- und Influenza A-Stämmen inokuliert wurden, sowie nicht inokulierte Kulturen aufbewahrt und getestet werden, um ordnungsgemäße Kulturoisolation bzw. Färbungsverfahren zu gewährleisten.

***Hinweis:** Den gesamten Objektträger gründlich auf das Vorhandensein zellassoziierter Fluoreszenz untersuchen.*

Direkte Einzelproben:

Shell-Vials und/oder Kontroll-Objektträger, die aus RSV-infizierten, Influenza A-infizierten und nicht infizierten Zellen vorbereitet wurden, sollten getestet werden, um ordnungsgemäße Färbungsverfahren während der direkten Einzelprobenanalyse zu gewährleisten.

Bei der Ansicht mit einem Fluoreszenzmikroskop wird eine RSV-positive Reaktion durch eine Fluoreszenz im Kern und/oder Zytoplasma der infizierten Zellen in hellem Apfelgrün gekennzeichnet. Eine Influenza A-positive Reaktion ist durch eine goldgelbe Fluoreszenz im Zellkern und/oder Zytoplasma der infizierten Zellen gekennzeichnet.

Eine positive Färbung für RSV oder Influenza A liegt vor, wenn mindestens 2 intakte Zellen die spezifische Fluoreszenz aufweisen. Auf ein voraussichtlich negatives Ergebnis deutet hin, wenn in einer Mindestprobe von 20 Epithelzellen keine Fluoreszenz vorhanden ist. Eine Probe mit weniger als 20 Epithelzellen wird als nicht ausreichend und der Test somit als ungültig betrachtet.

Vorsicht: Eine fluoreszente Färbung von Zellfragmenten, oft dadurch bedingt, dass das Reagenz in solchen Zerfallsprodukten gefangen wird, sollte ignoriert werden. Wenn die positiven und negativen Kontrollen nicht deutlich unterschieden werden können, sollte der Test als ungültig gelten.

Wenn gewünscht, kann ein TRITC-Filtersatz zum Bestätigen der Färbung verwendet werden. Die RSV-infizierten Zellen sind nicht mehr sichtbar, während die Influenza A-infizierten Zellen eine fluoreszente Färbung in hellem Rosa aufweisen.

Isolierung/Bestätigung der Zellkultur:

Standardröhrchen oder Shell-Vials, die mit RSV- und Influenza A-Referenzstämmen inokuliert wurden, sowie nicht inokulierte Kulturen sollten aufbewahrt und getestet werden, um ordnungsgemäße Kulturisolierung bzw. Färbungsverfahren zu gewährleisten.

Bei der Ansicht mit einem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines FITC-Filtersatzes wird eine RSV-positive Reaktion durch eine Fluoreszenz im Kern und/oder Zytoplasma der infizierten Zellen in hellem Apfelgrün gekennzeichnet. Eine Influenza A-positive Reaktion ist durch eine goldgelbe Fluoreszenz im Zellkern und/oder Zytoplasma der infizierten Zellen gekennzeichnet.

Eine positive Färbung für RSV oder Influenza A liegt vor, wenn mindestens 2 intakte Zellen die spezifische Fluoreszenz aufweisen. Eine voraussichtlich negative Reaktion ist durch fehlende Fluoreszenz und eine mattrote Färbung aufgrund der Evans-Blau-Gegenfärbung gekennzeichnet.

Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine RSV- und/oder Influenza A-Infektion vorliegt. Ein negatives Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht worden sein, z. B.: unzulängliche Proben, nicht ordnungsgemäße Sammlung und Behandlung von Einzelproben, falsche Kulturtechniken, Verwendung unzutreffender Zelllinien oder Temperaturen während der Isolierung oder andere Faktoren, die im Abschnitt „Problembehandlung“ erwähnt werden. Alle voraussichtlich negativen Ergebnisse sollten als „Kein Virus beobachtet“ berichtet werden.

Einschränkungen

- Ein negatives Ergebnis bei einer direkten Einzelprobe schließt nicht aus, dass eine RSV- und/oder Influenza A-Infektion vorliegt. Ein negatives Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht worden sein, z. B.: der Zeitpunkt der Sammlung während der Infektion, unzulängliche Proben, die Art der Einzelprobe, nicht ordnungsgemäße Sammlung und Behandlung von Einzelproben oder andere Faktoren, die im Abschnitt „Problembehandlung“ erwähnt werden. Die Einzelprobe sollte in Zellkultur inokuliert und auf Infizierung überwacht werden.
- Ein negatives Ergebnis bei Zellkultur schließt nicht aus, dass eine RSV- und/oder Influenza A-Infektion vorliegt. Ein negatives Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht worden sein, z. B.: der Zeitpunkt der Sammlung während der Infektion, unzulängliche Proben, nicht ordnungsgemäße Sammlung und Behandlung von Einzelproben, falsche Kulturtechniken, Verwendung ungeeigneter Zelllinien oder Temperaturen während der Isolierung oder andere Faktoren, die im Abschnitt „Problembehandlung“ erwähnt werden.
- Die Vergrößerung eines 10x-Objektivs (100fache Vergrößerung) reicht möglicherweise nicht aus, um die Zellmorphologie und das Färbungsmuster zu erkennen, besonders bei Zellen, die mit Influenza A infiziert sind.
- Die in diesem Kit verwendeten monoklonalen Antikörper wurden mit einem Prototyp-Stamm vorbereitet und erkennen möglicherweise nicht alle Antigen-Varianten oder neuen Stämme von RSV oder Influenza A.
- Monoklonale Antikörper können möglicherweise keine Stämme von RSV und Influenza A nachweisen, bei denen geringfügige Änderungen der Aminosäure in der Epitop-Zielregion aufgetreten sind.
- Färbungsverfahren für direkte Einzelproben erkennen RSV- oder Influenza A-Antigene und können nicht zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von RSV- oder Influenza A-Viren verwendet werden.
- Das von bestimmten Bakterien produzierte Protein A wird an den Fc-Teil der monoklonalen Antikörper gebunden, die im **Light Diagnostics™ SimulFluor® RSV/Flu A DFA Kit** verwendet werden. Eine bakterielle Kontaminierung wäre in einem Kulturisolat erkennbar. Solche Proben sollten von der Analyse ausgenommen werden. Die Färbung kann jedoch

nach Größe und Morphologie unterschieden werden. Das Vorhandensein von *Staphylococcus aureus* (erzeugt Protein A) resultiert in einer Fluoreszenz der Zellwand, die hell, klein (0,8 bis 1,0 µm) und kugelförmig ist.

- Die Leistung des Fluoreszenzmikroskops ist zum Erzielen befriedigender Testergebnisse von entscheidender Bedeutung. Da sich Objektive, Lampenstärke, Wattzahlen und Filter auf die Ergebnisse auswirken können, wird durch die entsprechenden Kontrollen die Funktion von Reagenzien, der Kulturmethodologie und des Mikroskops überprüft.
- Die Leistungscharakteristiken für diesen Test wurden nicht für die Therapieüberwachung bestimmt.
- Die Leistungscharakteristiken für diesen Test wurden für Probenotypen wie nasopharyngeale Absaugungen oder Biopsieproben aus dem Respirationstrakt nicht vollständig bestimmt.

Spezifität und Kreuzreaktionen

Die im **SimulFluor® RSV/Flu A**-Reagenz vorhandenen monoklonalen Antikörper wurden mit unterschiedlichen im Respirationstrakt vorhandenen Viren und Bakterien sowie mit häufig zum Isolieren von RSV- und Influenza A-Viren verwendeten Zelllinien getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 1a: Kreuzreaktionen gegen verbreitete Viren

Mikroorganismen	SimulFluor® RSV/Flu A
Viren	
Adenovirus; AD-75 CDC V5-002	-
Coxsackie-Virus A9; ATCC VR-186	-
Coxsackie-Virus B1; NIH	-
Zytomegalie-Virus; Klinisches Isolat	-
Enterovirus 70; ATCC VR-836	-
Enterovirus 71; ATCC VR-784	-
ECHO-Virus 4; ATCC VR-34	-
ECHO-Virus 6; ATCC VR-36	-
ECHO-Virus 9; ATCC VR-39	-
ECHO-Virus 11; ATCC VR-41	-

Mikroorganismen	SimulFluor® RSV/Flu A
ECHO-Virus 30; ATCC VR-322	-
Herpes-simplex-Virus Typ 1, klinisches Isolat	-
Herpes-simplex-Virus Typ 2, klinisches Isolat	
Influenza A: H1N1: 6 Stämme H2N2: 1 Stamm H3N2: 8 Stämme	+
Influenza B; 6 Stämme	-
Mumps;	-
Masern	-
Parainfluenza 1; CDC V6-004	-
Parainfluenza 2; CDC V7-003	-
Parainfluenza 3; CDC V5-003	-
Parainfluenza 4A; VR1378-Stamm M-25	-
Respiratory Syncytial Virus; Klinische Isolate - 6 Stamm Long Stamm „B“	+
<i>Pneumocystis carinii</i> , Rattenlunge	-
Varicella-Zoster-Virus; Klinisches Isolat	-

Tabelle 1b: Kreuzreaktionen gegen verbreitete Bakterien und Zelllinien

Mikroorganismen	SimulFluor® RSV/Flu A
Bakterien	
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ; ATCC 10580	-
<i>Bordetella pertussis</i> ; ATCC 9340	-
<i>Branhamella catarrhalis</i> ; ATCC 25238	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> ; ATCC	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ; ATCC 13812	-
<i>Legionella micdadei</i> ; ATCC 33204	-
<i>Legionella pneumophila</i> ; ATCC 33156	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; ATCC 25177	-
<i>Mycoplasma hominis</i> ; ATCC 23114	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ; ATCC 15531	-
<i>Neisseria meningitidis</i> ; ATCC 13077	-
Zelllinien	
HEp-2	
RMK	-
MRC5	-
A549	-
Vero	-
LLC-MK2	-

Erwartete Werte

Zwei Standorte erhielten zwischen September 1997 und März 1998 527 Einzelproben aus dem Südosten und 274 Einzelproben aus dem Nordosten der Vereinigten Staaten.

Im Südosten wurde RSV in 52 Einzelproben durch direkte Proben und/oder Zellkultur mit einer Prävalenz von 20,6 % identifiziert, während Influenza A in 31 Einzelproben isoliert wurde (Prävalenz 12,3 %). Alle Patienten, bei denen RSV identifiziert wurde, waren jünger als drei Jahre. Dagegen waren 19 von 31 (61,3 %) Influenza A-positiven Patienten älter als zehn Jahre.

Im Nordosten wurde RSV in 111 Einzelproben (Prävalenz 40,5 %) und Influenza A in 23 Einzelproben (Prävalenz 8,4 %) identifiziert. Von 11 Rachenabstrichen von Erwachsenen in einem Pflegeheim abgesehen, handelte es sich bei allen Einzelproben um nasopharyngeale Absaugungen von Kindern. Ein ähnliche Altersverteilung wurde für RSV- und Influenza A-Infektionen beobachtet, die am anderen Standort der Studie festgestellt wurden. Alle Patienten, bei denen RSV identifiziert wurde, waren jünger als drei Jahre, während 3 der 23 Influenza A-Isolate von älteren Patienten stammten.

Tabelle 2: Prävalenz von RSV und Influenza A in den östlichen Bundesstaaten bei Kindern unter drei Jahren

	Südosten der USA			Nordosten der USA		
	Gesamt	positiv	% < 3 Jahre	Gesamt	Prozent	% < 3 Jahre
RSV	52/253	20,6 %	100 %	111/274	40,5 %	100 %
Flu A	31/253	12,3 %	38,7 %	23/274	8,4 %	13,0 %

Beide Standorte erhielten fünf verschiedene Probentypen zum Testen. Die Anzahl der Einzelproben und positiven Ergebnisse für RSV und Influenza A sind unten zusammengefasst. Nasenabstriche und nasopharyngeale Absaugungen erwiesen sich als optimale Probentypen für die Virusisolierung.

Tabelle 3: Für RSV- und Influenza A-Tests erhaltene Einzelproben

	RA	NA	RS	NPA	Sput	Bronch	Andere
Anz. Proben	63	137	17	263	37	2	3
Anz. positiv	15	70	4	134	13	0	0
Anz. positiv	23,8	51,1	23,5	50,9	35,1	0	0

RA = Rachenabstrich; NA = Nasenabstrich; RS = Rachenspülung; Sput = Sputum; Bronch = Bronchienprobe mit endosk. Bürste; A = Andere

Leistungsmerkmale

STANDORT 1

Ein Referenzlabor im Südosten der Vereinigten Staaten erhielt zweihundertdreißig Einzelproben für RSV- und Influenza A Tests. Die Einzelproben, bei denen es sich um Nasenabstriche, Rachenabstriche, Nasenspülungen usw. handelte, stammten sowohl von Kindern als auch von Erwachsenen. Mit jeder Einzelprobe wurden Objektträger angefertigt und mit dem **SimulFluor® RSV/Flu A**-Reagenz angefärbt. Die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen verglichen, die mit einem Fluoreszenz-Assay-Bestimmungsinstrument erzielt wurden. Die Einzelproben wurden außerdem zur Virusisolierung in Kultur inokuliert. Mit den inokulierten Kulturen wurden Objektträger hergestellt und mit dem **SimulFluor® RSV/Flu A**-Reagenz sowie einem Fluoreszenz-Assay-Bestimmungsinstrument angefärbt.

Es wurden sechszwanzig andere Viren als RSV und Influenza A isoliert, darunter Rhinovirus (9), CMV (6), Adenovirus (4), Enterovirus (2) und Parainfluenza 2 (1). Es wurden außerdem vier Doppelinfektionen identifiziert: jeweils eine CMV-/Adenovirus-, Influenza A-/Adenovirus-, CMV-/RSV- und CMV-/Parainfluenza 3-Infektion.

Nachweis von RSV

RSV wurde bei 52 Patientenproben sowohl durch Direktproben tests als auch Kultursolierung nachgewiesen. Von diesen waren nur 13 Proben ausschließlich durch Kultursolierung positiv. Die mit dem **SimulFluor® RSV/Flu A**-Reagenz erzielten Ergebnisse stimmten sowohl beim Direktproben test als auch der Kulturbestätigung vollkommen mit den Ergebnissen überein, die mit dem Bestimmungsinstrument erzielt wurden.

Die relative Sensitivität und Spezifität des **SimulFluor® RSV/Flu A**-Reagenz betrug bei der Kulturbestätigung jeweils 100 %, während die relative Sensitivität und Spezifität beim Direktproben test im Vergleich zur Kulturbestätigung jeweils 100 % bzw. 83,8 % betrug.

Tabelle 4: Nachweis von RSV in direkten Einzelproben und durch Kulturbestätigung

SimulFluor® RSV/Flu A/ Bestimmungsinstrument	Direkt positiv	Direkt negativ	Kultur positiv	Kultur negativ
SimulFluor® RSV/Flu A-positiv	52	0	13	0
SimulFluor® RSV/Flu A-negativ	0	201	0	240
Gesamt	52	201	13	240

Relative Sensitivität direkter Einzelproben versus Zellkultur = 100 % (13/13)
(95 %-Konfidenzintervall 33,5–95,9 %)

Relative Spezifität direkter Einzelproben versus Zellkultur = 83,8 % (201/240)
(95 %-Konfidenzintervall 83,7–91,8 %)

Relative Sensitivität der Kulturbestätigung = = 100 % (13/13)
(95 %-Konfidenzintervall 27,6–86,2 %)

Relative Spezifität der Kulturbestätigung = = 100 % (240/240)
(95 %-Konfidenzintervall 91,4–97,2 %)

Nachweis von Influenza A

Influenza A wurde bei 31 von 253 Einzelproben in Zellkultur isoliert. Die mit **SimulFluor® RSV/Flu A** und dem Bestimmungsinstrument bei der Kulturbestätigung erzielten Ergebnisse waren vollständig korreliert. Von den durch Kulturbestätigung positiven Einzelproben waren nur 16 Proben auch durch Direktprobentest mit **SimulFluor® RSV/Flu A** und 15 durch Direktprobentest mit dem Bestimmungsinstrument positiv.

Tabelle 5: Nachweis von Influenza A in direkten Einzelproben und durch Kulturbestätigung

SimulFluor® RSV/Flu A/ Bestimmungsinstrument	Direkt positiv	Direkt negativ	Kultur positiv	Kultur negativ
SimulFluor® RSV/Flu A-positiv	15	1	31	0
SimulFluor® RSV/Flu A-negativ	0	237	0	222
Gesamt	15	238	31	222

Relative Sensitivität direkter Einzelproben versus Zellkultur = 48,4 % (15/31)
(95 %-Konfidenzintervall 33,5–95,9 %)

Relative Spezifität direkter Einzelproben versus Zellkultur = 100 % (222/222)
(95 %-Konfidenzintervall 89,7–96,3 %)

Relative Sensitivität der Kulturbestätigung = 100 % (31/31)
(95 %-Konfidenzintervall 82,1–163 %)

Relative Spezifität der Kulturbestätigung = 100 % (222/222)
(95 %-Konfidenzintervall 83,7–91,8 %)

STANDORT 2

Ein Krankenhauslabor erhielt zwischen November 1997 und März 1998 zweihundertvoersiebzig Einzelproben. Von 11 Rachenabstrichen von Erwachsenen in einem Pflegeheim abgesehen, handelte es sich bei allen Einzelproben um nasopharyngeale Absaugungen von Kindern. Mit den Einzelproben wurden Objektträger vorbereitet und mit **SimulFluor® RSV/Flu A** auf RSV und Influenza A sowie mit dem Membran-EIA eines kommerziellen Anbieters auf RSV getestet. Die 11 Einzelproben von Erwachsenen wurden mit dem Membran-EIA eines kommerziellen Anbieters auf Influenza A getestet. Jede Einzelprobe wurde außerdem für die Isolierung und den Nachweis von Influenza A und RSV in Zellkultur inokuliert, wobei ein Immunfluoreszenz-Reagenz eines kommerziellen Anbieters verwendet wurde.

In den Proben wurden zweiundzwanzig andere Viren als RSV und Influenza A isoliert. Hierzu zählten 9 CMV (einschließlich 1 Koinfektion mit Influenza A und 4 Koinfektionen mit RSV), 8 Adenovirus (einschließlich 3 Koinfektionen mit RSV), 3 Enterovirus (2 Koinfektionen mit RSV) und 1 HSV.

Nachweis von RSV

Zweiunddreißig Einzelproben waren für den Direktproben test mit dem **SimulFluor® RSV/Flu A**-Assay ungeeignet; 4 Einzelproben waren nacheinander durch Zellkultur positiv für RSV und 1 Einzelprobe für Influenza A. RSV wurde in 106 Einzelproben durch direkte Färbung mit **SimulFluor® RSV/Flu A** nachgewiesen. Von diesen waren 36 Einzelproben durch das Membran-EIA-Bestimmungsinstrument positiv, doch durch Zellkultur negativ.

Tabelle 6: Vergleich von **SimulFluor® RSV/Flu A** und Membran-EIA-Bestimmungsinstrument

SimulFluor® RSV/Flu A/ Bestimmungsinstrument	EIA- positiv	EIA- negativ	Gesamt
SimulFluor® RSV/Flu A-positiv	82 (97)	24 (9)*	106 (108)
SimulFluor® RSV/Flu A-negativ	2	122	124
Gesamt	82(99)	146(131)	230

*15 durch das Membran-EIA als positiv bestimmte Einzelproben wurden durch Zellkultur als negativ bestimmt

() gibt nach Kulturbestätigung korrigierte Werte an

Relative Sensitivität: (97/99) 98,0 % (95 %-Konfidenzintervall: 92,9–99,7 %)

Relative Spezifität: (122/131) 93,1 % (95 %-Konfidenzintervall: 87,4–96,8 %)

Tabelle 7: Vergleich von **SimulFluor® RSV/Flu A** und Bestimmungsinstrument

SimulFluor® RSV/Flu A/ Bestimmungsinstrument	Kultur positiv	Kultur negativ	Gesamt
SimulFluor® RSV/Flu A-positiv	88	2*	90
SimulFluor® RSV/Flu A-negativ	0	183	184
Gesamt	88	185	274

*1 Einzelprobe war auch durch Membran-EIA positiv

Relative Sensitivität: (88/90) 97,8 % (95 %-Konfidenzintervall: 92,2–99,7 %)

Relative Spezifität: (183/185) 98,9 % (95 %-Konfidenzintervall: 96,1–99,9 %)

Vier Einzelproben waren sowohl für RSV als auch Influenza A positiv. Drei Einzelproben wurden durch das **SimulFluor® RSV/Flu A**-Reagenz in direkten

Proben identifiziert, und alle vier RSV wurden durch beide Reagenzien in Zellkultur identifiziert.

Nachweis von Influenza A

Dreiundzwanzig Einzelproben wurden durch das Bestimmungsinstrument als positiv für Influenza A bestimmt. Eine Einzelprobe wurde sowohl beim Direktprobentest als auch in Zellkultur durch das **SimulFluor® RSV/Flu A**-Reagenz als positiv, doch durch das Bestimmungsinstrument in Zellkultur als negativ bestimmt. Drei Einzelproben waren in Zellkultur sowohl für RSV als auch Influenza A positiv, und eine Doppelinfektion mit CMV wurde festgestellt. Von den 32 für den Test mit **SimulFluor® RSV/Flu A** ungeeigneten Einzelproben war in Kultur nur 1 Probe positiv für Influenza A.

Tabelle 8: Nachweis von Influenza A in direkten Einzelproben und durch Kulturbestätigung

SimulFluor® RSV/Flu A/ Bestimmungsinstrument	Direkt positiv	Direkt negativ	Kultur positiv	Kultur negativ
SimulFluor® RSV/Flu A-positiv	20	4	23	1
SimulFluor® RSV/Flu A-negativ	2	216	0	250
Gesamt	22	220	23	251

Relative Sensitivität direkter Einzelproben versus Zellkultur = 83,3 % (20/24)
 (95 %-Konfidenzintervall: 62,6–95,3 %)

Relative Spezifität direkter Einzelproben versus Zellkultur = 98,1 % (216/220)
 (95 %-Konfidenzintervall: 95,4–99,5 %)

Relative Sensitivität der Kulturbestätigung = 95,8 % (23/24)
 (95 %-Konfidenzintervall: 78,9–99,9 %)

Relative Spezifität der Kulturbestätigung = 99,6 % (250/251)
 (95 %-Konfidenzintervall: 97,8–100 %)

Elf Rachenabstriche von Erwachsenen in einem Pflegeheim wurden durch ein Membran-EIA-Bestimmungsinstrument auf Influenza A getestet. Durch das **SimulFluor® RSV/Flu A**-Reagenz wurde in drei Einzelproben Influenza A identifiziert. Dieses Ergebnis stimmte vollständig mit dem Ergebnis durch Zellkultur überein. Das Membran-EIA-Bestimmungsinstrument identifizierte hingegen 1 Einzelprobe mit Influenza A.

Tabelle 9: Vergleich von **SimulFluor® RSV/Flu A** und Membran-EIA-Bestimmungsinstrument

SimulFluor® RSV/Flu A/ Bestimmungsinstrument	Direkt positiv	Direkt negativ	Gesamt
SimulFluor® RSV/Flu A-positiv	1(3)	2*(0)	3
SimulFluor® RSV/Flu A-negativ	0	8	8
Gesamt	1(3)	10	11

* Beide wurden durch Zellkultur als positiv für Influenza A bestätigt

() gibt nach Kulturbestätigung korrigierte Werte an

Relative Sensitivität: (3/3) 100 % (95 %-Konfidenzintervall: 29,2–100 %)

Relative Spezifität: (11/11) 100 % (95 %-Konfidenzintervall: 71,5–100 %)

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, Begliddokumente		Inhalausreichhend für r<n>ansätze
	In-vitro-Diagnostikum		Temperaturbegrenzung
	Gebrauchsanweisung beachten		Biologischen Risiken
	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.

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

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

©2012 EMD Millipore Corporation, eine Sparte der Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland. Alle Rechte vorbehalten. EMD, EMD Millipore, Millipore, der Markierung M, Light Diagnostics, SimuFluor 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™

SimulFluor® RSV/Flu A DFA KIT

Dosaggio di immunofluorescenza diretta

Supplemento Italiano Di Lingua



3129



125



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



Millipore (UK) Ltd.
Fleming Road, Kirkton Campus • Livingston EH54 7BN
United Kingdom
Tel. +44 1506 404000 • Fax +44 1506 404001

Uso previsto

Light Diagnostics™ SimulFluor® RSV/Flu A DFA Kit è concepito per uso su campioni respiratori, quali tamponi faringo-tonsillari, nasali e nasofaringei, lavaggi faringo-tonsillari, aspirati, lavaggi broncoalveolare di pazienti affetti da una malattia respiratoria con stato febbrile e in seguito all'amplificazione virale in coltura cellulare. I campioni che si dimostrano negativi al controllo diretto si devono accertare mediante la coltura cellulare.

IVD

Riassunto e spiegazione

L'RSV (Respiratory Syncytial Virus, virus respiratorio sinciziale) appartiene al genere *Pneumovirus* della famiglia dei *Paramyxoviridae*. È un virus pleiomorfo con diametro variabile da 100 a 300 nm e un RNA lineare, non segmentato, a singolo filamento negativo. L'envelope presenta proiezioni sulla superficie esterna composte da 2 glicoproteine altamente antigeniche, F e G, e un'importante proteina strutturale, N, nel nucleocapside. Le proteine strutturali F, G e N dividono l'RSV in 2 principali gruppi antigenici: i ceppi "prototipo" sono Long (gruppo A) e CH-18537 (gruppo B) (1-4). L'RSV provoca gravi epidemie di malattie respiratorie acute d'inverno e in primavera in tutto il mondo. Essendo debole l'immunità naturale verso l'RSV, queste epidemie tendono a insorgere ogni anno e ad anni alterni.

L'RSV si può isolare da aspirati nasofaringei, da tamponi nasali e faringo-tonsillari o da campioni polmonari prelevati entro i primi giorni di malattia. Il virus cresce in cellule epiteliali umane quali HEp2, RMK (rhesus monkey kidney, rene di scimmia rhesus) primario, A549, MRC-5 e NCI-H292. Test rapidi e diretti su campioni clinici idonei sono diagnostici d'infezioni da RSV a condizione che si usino il reagente standardizzato e adeguati controlli. La conferma mediante isolamento virale è desiderabile dovunque sia possibile.

Lattanti ospedalizzati per infezione da RSV sono stati trattati con successo con la ribavirina somministrata in aerosolterapia. Tuttavia questo trattamento necessita di cure specializzate e non viene somministrato come terapia di routine (4). Anche l'immunoglobulina è disponibile per la terapia. I vaccini contro l'RSV hanno alle spalle una lunga storia di fallimenti ma sono ancora oggetto di ricerca.

Il virus influenzale di tipo A appartiene alla famiglia degli *Orthomyxoviridae*. Si tratta di virus grandi con diametro di circa 110 nm ed envelope, un RNA

segmentato a singolo filamento e proiezioni di HA (hemagglutinin, emoagglutinina) e NA (neuraminidase, neuraminidasi) che sporgono attraverso la membrana glicoproteica (5-7). Il virus influenzale di tipo A ha un'alta frequenza di mutazione e dà luogo a epidemie periodiche d'influenza in tutto il mondo. Le epidemie sono particolarmente gravi quando le mutazioni hanno portato a spostamenti significativi nella struttura HA o NA tali che gli anticorpi presenti in una comunità d'individui non riconoscono i ceppi virali (6-8). La specificità dei virus influenzali è conferita dalle differenze antigeniche presenti in 2 delle principali proteine strutturali, l'NP (nucleoprotein, nucleoproteina) interna e l'M (matrix protein, proteina di matrice) (5-8).

Le infezioni da virus influenzali sono caratterizzate da tracheobronchite, faringite, mialgia, febbre, emicrania e malessere (5,6,9). Una lieve corizza spesso distingue l'influenza dalle altre malattie virali respiratorie. È molto contagiosa fra adulti e si diffonde mediante goccioline aerosolizzate e fomi. Come con l'RSV, un periodo d'incubazione da 1 a 4 giorni contribuisce alla rapida diffusione del virus all'interno delle comunità e nei reparti ospedalieri. La complicazione più significativa dell'influenza è la polmonite, che insorge da sola o associata a una polmonite batterica. La polmonite si manifesta con maggior frequenza negli anziani, in pazienti con un sistema immunitario indebolito o in pazienti affetti da diabete, patologia cardiaca o polmonare implicita o malattia renale cronica. I bambini sono più propensi a soffrire anche di una sintomatologia dolorosa a carico del sistema gastrointestinale, vomito, miosite, otite media, congiuntivite e crup.

Si ritiene che l'aumento della mortalità da polmonite durante la 'stagione delle influenze' sia dovuto al virus influenzale. Tale valore viene usato per rintracciare epidemie influenzali e per controllare l'efficacia dei vaccini antinfluenzali. Complicazioni meno comuni negli adulti comprendono la sindrome di Reye o altre patologie del CNS, sintomi cardiaci, sinusite e otite media.

L'amantadina e il suo analogo, la rimantadina, sono efficaci nel prevenire fino al 90% delle infezioni da virus influenzale di tipo A e fino al 100% delle malattie, se assunti in via profilattica (5,10). Sono anche terapeuticamente efficaci nel ridurre la durata dell'infezione se vengono assunti entro i primi 2 giorni di malattia. Somministrata per aerosolterapia, la ribavirina può essere efficace nel trattamento del virus influenzale di tipo A. I vaccini contro il virus influenzale di tipo A rappresentano un notevole sforzo da parte della sanità pubblica tenendo presente la continua identificazione di nuovi ceppi. I vaccini antinfluenzali attualmente disponibili hanno in genere un tasso d'efficacia del 70-90% (5,7).

I virus influenzali si possono isolare nelle cellule RMK, MDCK (Madin Darby canine kidney, rene canino Madin Darby) e talvolta in altre linee cellulari, a seconda del ceppo virale specifico (11-13). L'aggiunta di tripsina al liquido di coltura a una concentrazione di ~2 µg/ml contribuisce molto all'isolamento del virus influenzale nelle cellule MDCK.

Si possono usare colture standard, shell vial e test diretti, compresi l'FA (fluorescent antibody assay, immunofluorescenza) e l'EIA (enzyme immunoassay, metodica immunoenzimatica) (11,14-17).

I campioni idonei comprendono lavaggi nasali, tamponi faringo-tonsillari e lavaggi broncoalveolari. Ogni test diretto che usa reagenti standardizzati è diagnostico dell'infezione influenzale, in particolare se viene confermato dall'isolamento virale.

Principio del test

Light Diagnostics™ SimulFluor® RSV / Para 3 DFA Kit utilizza un singolo reagente per il rilevamento e l'identificazione contemporanea dell'RSV e del virus influenzale di tipo A. Il componente primario, specifico per l'RSV, si legherà agli antigeni F e G dell'RSV nelle cellule infette da RSV. Il componente secondario, specifico per il virus influenzale di tipo A, si legherà alla nucleoproteina del virus influenzale di tipo A di cellule infette dallo stesso virus. Il reagente che non si è legato viene rimosso mediante il lavaggio con PBS (phosphate buffered saline, soluzione fisiologica tamponata con fosfato). Il complesso antigene anticorpale può essere osservato mediante la microscopia a fluorescenza. Il complesso antigene anticorpale RSV presenterà una fluorescenza verde mela e il complesso antigene anticorpale del virus influenzale di tipo A sarà giallo oro. Le cellule non infette si colorano di un rosso pallido per la presenza del blu di Evans nel reagente.

Componenti del kit

1. SimulFluor® RSV/Flu A Reagent - REF 5245: Una (1) fiala con contagocce da 5 ml contenente un componente primario specifico per l'RSV e un componente secondario specifico per il virus influenzale di tipo A, stabilizzatore proteico, blu di Evans 0,005% e sodio azide 0,1% (conservante).
Importo previsto è sufficiente per 125 tests. Stima si basa su prove di caduta di 40µL; il numero effettivo dei tests possono variare.
2. RSV Control Slides - REF 5012: Due (2) vetrini muniti di un pozzetto con cellule infette da RSV e un pozzetto con cellule non infette.
3. Influenza A/B Control Slides - REF 5010: Due (2) vetrini muniti di un pozzetto contenente cellule infette dal virus influenzale di tipo A, un pozzetto con cellule infette dal virus influenzale di tipo B e due pozzetti con cellule non infette.
4. Phosphate Buffered Saline (PBS) - REF 5087: Una (1) confezione di sali di soluzione salina tampone fosfato da sciogliere in un litro d'acqua distillata. Conservare a temperatura ambiente in un contenitore pulito e chiuso.
5. Tween® 20 / Sodium Azide Solution (100X) - REF 5037: Una (1) fiala da 10 ml contenente Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate, monolaurato di poliossietilene sorbitano) e sodio azide (NaN₃) concentrato per una diluizione 1:100 in PBS.
6. Mounting Fluid - REF 5013: Una (1) fiala con contagocce da 10 ml contenente glicerina in tampone Tris, un intensificatore della fluorescenza e sodio azide 0,1% (conservante). Conservare a temperatura entre 2°C-25°C.

Materiali necessari, ma non forniti

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

- Controlli delle colture virali (ceppi di riferimento dell'RSV e del virus para 3 disponibili presso dalla American Type Tissue Culture Collection ATCC®, Manassas, VA).
- Soluzione d'ipoclorito di sodio 0,05% (diluizione 1:100 di candeggina per uso domestico)
- Linee cellulari sensibili verso l'RSV e i virus influenzali quali HEp-2, MRC-5, PMK (primary monkey kidney, rene di scimmia primario), MDCK (14, 15, 16) o altre linee cellulari sensibili ai virus influenzali (ad es. LLC-MK2 ecc); si possono ottenere linee cellulari idonee dalla American Type Tissue Culture Collection ATCC®, Manassas, VA).
- Terreni di coltura tissutale quali l'RPMI o l'EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, terreno essenziale minimo di Eagle) con FBS (fetal bovine serum, siero fetale bovino) e antibiotici o loro equivalenti
- Un mezzo di trasporto virale, che non inibisce l'RSV o il virus influenzale di tipo A [HBSS (Hanks balanced salt solution, soluzione salina equilibrata di Hank) con antibiotici o loro equivalenti]
- Vetrini di vetro puliti con acetone e non fluorescenti
- N. 1 vetrino coprioggetto
- Aspiratore con pipette Pasteur sterili, monouso
- Centrifuga con capacità 700-950 x g attrezzata con contenitori da biorischio e adattatori per le shell vial
- Microscopio a fluorescenza con lampada a mercurio o alogena da 100 watt, l'idonea combinazione di filtri FITC (picco d'eccitazione = 490 nm, picco d'emissione = 520 nm) e 160-200x e 400x d'ingrandimento (obiettivo asciutto)
- Opzionale: combinazione di filtri TRITC (picco d'eccitazione = 550 nm, picco d'emissione = 570 nm)
- Pinze
- Camera umida
- Incubatore, $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Siringa e ago o altro strumento per rimuovere il vetrino coprioggetto dalla shell vial

- Bagno ad acqua a ultrasuoni
- Vortex o sonicatore

Avvertenze e precauzioni

- La sodio azide usata come conservante nel **SimulFluor®** reagent, nel soluzione PBS/Tween 20 e nel liquido dei supporto è tossica, se ingerita. La sodio azide può formare azidi di metallo potenzialmente esplosivi a contatto con tubature in piombo o rame. Per lo smaltimento di questi materiali, far scorrere abbondante acqua per evitare depositi di azidi nelle tubature.
- Il pooling di un reagente o le sue modifiche possono dare risultati errati.
- Non sostituire con reagenti di altri produttori.
- Tempi o temperature d'incubazione diversi da quelli specificati possono fornire risultati errati. È necessario che l'utilizzatore convalidi ogni modifica di questo tipo.
- Non permettere che le shell vial o i vetrini si asciughino in nessun momento della procedura di colorazione.
- Trattare tutti i campioni e i materiali che ne vengono a contatto come materiale potenzialmente infettivo e usare le adeguate precauzioni per lo smaltimento. Decontaminare con ipoclorito di sodio 0,05%.
- L'acetone è estremamente infiammabile e dannoso, se ingerito o inalato. Tenere lontano dal calore, da scintille o da fiamme. Evitare di respirare i vapori. Ventilare in modo adeguato.
- Non pipettare mai i reagenti con la bocca.
- Evitare il contatto con il blu di Evans (presente nel **SimulFluor®** RSV/Flu A Reagent REF 5245) essendo potenzialmente carcinogeno. In caso di contatto con la pelle, lavare con abbondante acqua.
- Il Mounting Fluid REF 5013 contiene un intensificatore della fluorescenza che può risultare dannoso per le mucose. Evitare il contatto diretto con la pelle e con le mucose. In caso di contatto, lavare con abbondante acqua.

Stabilità e conservazione

Se conservato a 2 - 8°C, **Light Diagnostics™ SimulFluor® RSV/Para 3 DFA Kit** rimane stabile fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del kit stesso. Non congelare né esporre a temperature elevate. Scartare tutti i reagenti rimasti dopo la data di scadenza del kit.

Raccolta di campioni

Raccolta, trasporto, trattamento e conservazione di campioni adeguati sono d'importanza fondamentale nell'isolamento e successivo accertamento d'infezioni da RSV e virus influenzale di tipo A. Gli aspirati dei secreti respiratori sono i campioni preferiti, benché si possano anche usare tamponi nasofaringei o faringo-tonsillari (18).

Lavaggi nasali e aspirati nasofaringei o tracheali sono ideali per l'esame diretto dei campioni dal momento che permettono di ottenere numerose cellule epiteliali. Si raccolgono i campioni di lavaggi nasofaringei immettendo da 3 a 5 ml di soluzione fisiologica nelle narici del paziente, mentre quest'ultimo è in posizione supina. La soluzione fisiologica viene delicatamente aspirata mediante una siringa, una pompetta di gomma o un catetere collegato a un filtro per il muco.

Tamponi nasofaringei, faringo-tonsillari o nasali spesso non contengono un numero adeguato di cellule epiteliali ciliate e a colonna, fondamentali per il rilevamento diretto dell'RSV e del virus influenzale di tipo A.

Trasportare i campioni al laboratorio in ghiaccio umido o in un impacco freddo subito dopo la raccolta. Non si devono congelare i campioni da trattare per un esame diretto in quanto il processo di congelamento/scongelo può spaccare le cellule, rendendo il campione inutile. Il campione per l'RSV si deve trattare e inoculare nella coltura cellulare non appena possibile dopo averlo ricevuto. I campioni da usare per l'isolamento in coltura si devono congelare a -70°C se non verranno trattati entro 72 ore dalla raccolta. Evitare cicli di congelamento/scongelo ripetuti.

Si possono trovare ulteriori informazioni sulle tecniche di raccolta dei campioni in *The Manual of Clinical Microbiology*, Balows, A. *et al.*, eds. 5th ed. (1991). *American Society for Microbiology, Washington, D.C.*, Influenza Viruses, Ch. 81; Respiratory Syncytial Virus, Ch. 83; *Animal and Animal Cell Culture Systems*, Ch. 19 and *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Volume 2, Isenberg, H.D. ed. (1992). *American Society for Microbiology, Washington,*

D.C., Selection, Collection and Transport of Specimens for Viral and Rickettsial Cultures, Section 8.2.

Per il trasporto adeguato dei campioni consultare il 42 CFR (code of federal regulations, codice dei regolamenti federali), sezione 72.

Trattamento dei campioni

Prima di trattare i campioni accertarsi che siano stati raccolti e trasportati in modo adeguato. Il trattamento improprio dei campioni può dare risultati errati.

Trattamento dei campioni per l'esame diretto:

1. Rimuovere il campione dal contenitore originario e porlo in una provetta sterile da centrifuga da 10 a 15 ml.
2. Centrifugare a 300-500 x g per 10 minuti a 2 - 8°C.
3. Raccogliere il sovrnatante per le procedure d'isolamento virale.

Nota: consultare la sezione "Trattamento dei campioni per la coltura e l'isolamento" per istruzioni esaurienti.

4. Lavare il pellet di cellule risospingendolo delicatamente in 4-8 ml di PBS.
5. Centrifugare a 300-500 x g per 10 minuti a 2 - 8°C.
6. Se è presente del muco, formerà uno strato sopra il pellet di cellule. Rimuovere con cura il sovrnatante e il muco con una pipetta pasteur. Se è ancora presente del muco, ripetere le fasi da 4 a 6 finché il muco non sia stato rimosso.
7. Risospingere il pellet di cellule in 0,1-0,2 ml di PBS per ottenere una sospensione leggermente torbida. La qualità del vetrino dipende dalla concentrazione cellulare della sospensione. Le sospensioni concentrate sono di difficile lettura e non danno vetrini d'alta qualità. Le sospensioni cellulari che non contengono un numero sufficiente di cellule portano a una perdita di sensibilità.
8. Porre una goccia di sospensione cellulare nel numero desiderato di pozzetti nei pre-cleaned slides.
9. Lasciar asciugare il vetrino all'aria.
10. Fissare i vetrini con acetone freddo (2 - 8°C) per 10 minuti. Non permettere all'acetone di contaminarsi con acqua e sali. Questo può dare una colorazione indistinta.

11. Lasciar asciugare i vetrini all'aria dopo la fissazione. I vetrini vanno colorati appena possibile. Se è necessaria la conservazione, porre i vetrini in contenitori essiccati a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
12. Passare alla sezione sulla "Procedura d'immunofluorescenza" dopo aver completato quella sulla "Preparazione del reagente".

Trattamento dei campioni per la coltura e l'isolamento:

Aspirato nasofaringeo e tracheale, lavaggio nasale e bronchiale:

1. Rimuovere il campione dal contenitore originario e porlo in una provetta sterile da centrifuga da 10 a 15 ml.
2. Aggiungere la quantità di PBS fredda necessaria a portare il volume da 2,0 – 2,5 ml.
3. Agitare con vortex per miscelare. Il campione è da usarsi solo per l'isolamento virale. Procedere alla fase 4.

Nota: se il campione dev'essere usato per l'esame diretto e per l'isolamento virale, lo si deve centrifugare a 300-500 x g a 2 - 8°C per 10 minuti. Il sovrantante viene rimosso e usato per l'isolamento virale. Se il pellet di cellule è abbastanza grande, una sua parte può essere aggiunta al sovrantante per aumentare il recupero virale. Consultare la sezione "Trattamento dei campioni per l'esame diretto" per istruzioni esaurienti.

4. Sonicare il campione a 8-12 Kc/sec per 30-60 secondi per disgregare le cellule e liberare le particelle virali.
5. Centrifugare il campione a 300-500 x g a 2 - 8°C per 10 minuti per far sedimentare i detriti cellulari.
6. Rimuovere il sovrantante dai detriti cellulari.
7. Il sovrantante può essere miscelato con una soluzione antibiotica 10X e lasciato riposare a 2 - 8°C per 30-60 minuti prima dell'inoculo per evitare un'eccessiva crescita batterica.

Tampone nasofaringeo, nasale e faringo-tonsillare:

1. Agitare il campione energicamente con il vortex per staccare le cellule dal tampone.

2. Per aumentare il recupero virale, aggiungere poche palline sterili di vetro al campione e agitare col vortex per un minuto o sonicare a 8-12 Kc/sec per 30-60 secondi.
3. Scartare il tampone in una soluzione d'ipoclorito di sodio.
4. Centrifugare il campione a 300-500 x g a 2 - 8°C per 10 minuti.
5. Usare il sovrantante come materiale d'inoculo.

Coltura/isolamento e preparazione per la colorazione:

Inoculo in provette standard o in shell vial:

1. Poco prima d'inoculare i campioni, controllare che le colture cellulari presentino una corretta morfologia.
2. Aspirare il terreno di crescita dalle provette standard o dalle shell vial in attesa d'inoculo.
3. Aggiungere da 0,2 a 0,5 ml dell'inoculo a ciascuna provetta o shell vial.
4. Inoculare i campioni nelle linee cellulari idonee.
5. Centrifugare le shell vial a temperatura ambiente per 30 minuti a 500-700 x g.
6. Far assorbire l'inoculo su monostrati standard in provetta mediante incubazione su griglia inclinata a 35-37°C per 1 ora.
7. Dopo l'assorbimento o la centrifugazione, aspirare l'inoculo e aggiungere una quantità sufficiente di un terreno di mantenimento da coprire completamente il monostrato cellulare.
8. Incubare a 35-37°C roller drum (agitatore a piatto rotante) o su griglie fisse.
9. Si può lavare delicatamente il monostrato 2-3 volte con un terreno di mantenimento preriscaldato se il campione si rivela tossico per il monostrato cellulare.
10. Rinnovare il terreno di coltura cellulare ogni 3-5 giorni.

***Nota:** un campione di ciascun lotto di linee cellulari usate per la coltura cellulare dev'essere inoculato con ceppi rappresentativi dell'RSV e del virus influenzale di tipo A per dimostrarne la sensibilità all'infezione e la conseguente insorgenza del CPE. Anche le colture cellulari non inoculate si devono crescere e controllare ogni giorno per rilevare la presenza di virus contaminanti o*

micoplasm. Questo fungerà da controllo della morfologia cellulare normale e può essere utile nel riconoscimento precoce del CPE. Se queste colture cellulari di controllo non dimostrano un'adeguata crescita, i risultati dell'isolamento di colture cellulari sono da ritenersi non validi.

Preparazione di colture tissutali per la colorazione:

1. Controllare le provette con la coltura tissutale e/o le shell vial ogni giorno per la presenza del CPE (cytopathic effect, effetto citopatico). Le shell vial si possono colorare in presenza del CPE o in tempi ottimali stabiliti dai singoli laboratori. Se si nota la presenza del CPE, le cellule si possono raschiare o tripsinizzare dalla provetta (o dalla shell vial) e da un multi-welled slide allestito per la colorazione.
2. Per preparare i multi-welled slide, aspirare il terreno di coltura dalla provetta (o dalla shell vial). Conservare terreni inutilizzati a 2-8°C finché non si sono concluse le analisi. Se dovessero essere necessarie altre analisi, si potrà tentare l'isolamento virale da questo terreno.
3. Lavare delicatamente la coltura cellulare 3 volte con 1-2 ml di HBSS. Scartare tutti i liquidi di lavaggio in una soluzione d'ipoclorito di sodio.
4. Aggiungere tripsina corrispondente a un decimo del volume originario della coltura e lasciar riposare per 30 secondi. Picchiettare delicatamente il recipiente della coltura per staccare le cellule. Risospendere le cellule in 2 ml di HBSS. Centrifugare la sospensione cellulare a 300-500 x g per 10 minuti. Risospendere il pellet di cellule in 0,3 ml di PBS sterile per ottenere una sospensione leggermente torbida. I vetrini devono presentare almeno 2 cellule per campo a 250x d'ingrandimento per essere ritenuti idonei per il rilevamento.

***Nota:** in alternativa si può raschiare il monostrato cellulare dalla provetta con una bacchetta di vetro o una pipetta sterile. Risospendere e centrifugare le cellule secondo la spiegazione di cui sopra.*

5. Punteggiare la sospensione cellulare su un vetrino pulito con acetone e lasciar asciugare all'aria. Fissare il vetrino con acetone freddo (2 - 8°C) per 10 minuti e asciugare completamente all'aria. Conservare i vetrini inutilizzati con un agente essiccante a $\leq - 20^{\circ}\text{C}$.

Procedura di colorazione

Preparazione del reagente:

PBS/Soluzione di Tween 20 - Sciogliere il contenuto della confezione di PBS in 950 ml d'acqua deionizzata o distillata. Aggiungere il contenuto della fiala di Tween 20/sodio azide al PBS. Miscelare bene e aggiungere acqua deionizzata o distillata quanto basta per raggiungere 1 litro. Spostare su un contenitore per la conservazione pulito e etichettato e chiudere bene. Conservare a temperatura ambiente. Scartare, se la soluzione PBS/Tween diventa torbida o qualora si formasse un precipitato.

Tutti i reagenti sono forniti pronti all'uso.

Procedura d'immunofluorescenza diretta (colorazione) suggerita:

1. Permettere al vetrino di controllo fissato con acetone e/o al vetrino di prova e ai reagenti di raggiungere la temperatura ambiente.

Nota: non permettere che i vetrini si asciughino in nessun momento della procedura di colorazione.

2. Aggiungere **SimulFluor® RSV/F lu A Reagent** REF 5245 in quantità sufficiente da coprire le cellule: 1 goccia per gli spot di cellule e 4-6 gocce per le shell vial.
3. Incubare il vetrino a 37°C per 15 minuti in camera umida.
4. Lavare delicatamente il vetrino con un flacone con spruzzatore di PBS/Tween 20 per 10-15 secondi per rimuovere la soluzione anticorpale monoclonale in eccesso, facendo attenzione a direzionare il getto lontano dal pozzetto. Per le shell vial: aspirare il reagente e lavare delicatamente ciascuna shell vial 3 volte con 1 ml di PBS/Tween 20.
5. Scrollare dal vetrino il reagente in eccesso e asciugare con cura l'area circostante lo spot cellulare.
6. Montare sotto un vetrino coprioggetto usando un Mounting Fluid pH 8,5 REF 5013 o un suo equivalente) liquido. Per le shell vial: aspirare PBS/Tween dalle shell vial. Sollevare ciascun vetrino coprioggetto con un ago piegato fissato a una piccola siringa e rimuoverlo con attenzione con le pinze. Usare il Mounting Fluid per montare ciascun vetrino coprioggetto su un vetrino di vetro con il LATO CELLULARE RIVOLTO IN BASSO.

7. Pulire il liquido in eccesso dai lati del vetrino.

Nota: per ottenere risultati ottimali, leggere i vetrini subito dopo l'allestimento. Se si devono conservare i vetrini dopo la colorazione, mantenerli a 2 - 8°C in un contenitore a tenuta, al buio.

8. Esaminare i vetrini con il microscopio a fluorescenza a 100-200x per rilevare la presenza di cellule fluorescenti. Si può effettuare un controllo dettagliato a 400x d'ingrandimento.

Nota: le prestazioni del microscopio a fluorescenza sono d'importanza fondamentale ai fini di risultati d'analisi soddisfacenti. Mentre gli obiettivi, l'intensità della lampada, la potenza e i filtri possono influenzare i risultati, l'uso di un vetrino di controllo positivo verificherà il funzionamento dei reagenti, la metodologia di coltura e il microscopio.

Interpretazione dei risultati

Controllo di qualità

I vetrini di controllo si devono testare con ciascun batch di campioni. I vetrini di controllo forniti con il kit sono concepiti per dimostrare il corretto funzionamento dei componenti del kit e delle procedure di colorazione a immunofluorescenza.

Anche i vetrini di controllo preparati con cellule infette dall'RSV, dal virus influenzale di tipo A e cellule non infette si possono testare per assicurare corrette procedure di colorazione durante l'analisi diretta dei campioni. Inoltre, le provette standard o le shell vial inoculate con ceppi di riferimento dell'RSV e dei virus influenzali di tipo A e colture non inoculate si devono mantenere e testare per assicurarsi che le procedure d'isolamento e colorazione della coltura siano corrette.

Nota: esaminare l'intero pozzetto del vetrino per riconoscere la presenza di fluorescenza associata alle cellule.

Campione diretto:

Le shell vial e/o i vetrini di controllo allestiti con cellule infette dall'RSV e dal virus influenzale di tipo A e le cellule non infette si possono testare per assicurare corrette procedure di colorazione durante l'analisi dei campioni diretti.

All'osservazione al microscopio fluorescente una reazione positiva all'RSV si manifesta con una fluorescenza brillante verde mela nel nucleo e/o nel

citoplasma delle cellule infette. Una reazione positiva al virus influenzale di tipo A si manifesta con una fluorescenza giallo oro nel nucleo e/o nel citoplasma delle cellule infette. La colorazione positiva per l'RSV o il virus influenzale di tipo A è indicata dalla presenza di 2 o più cellule intatte che evidenziano una fluorescenza specifica. Un risultato diagnostico negativo su base presuntiva è indicato dall'assenza di fluorescenza in un campione di almeno 20 cellule epiteliali. Un campione contenente meno di 20 cellule epiteliali è da ritenersi non idoneo e il test risulta non valido.

Avvertenza: *non si deve tener conto della colorazione fluorescente di frammenti cellulari, dovuta al trapping del reagente in tali detriti. Se i controlli positivi o negativi non si possono distinguere chiaramente, il test è da ritenersi non valido.*

Se lo si desidera, si può usare un set di filtri TRITC per accertare la colorazione. Le cellule infette dall'RSV non saranno più visibili mentre quelle infette dal virus influenzale di tipo A evidenzieranno una colorazione fluorescente rosa brillante.

Isolamento in colture cellulari con successivo accertamento:

Le provette standard o le shell vial inoculate con ceppi di riferimento dell'RSV e del virus influenzale di tipo A e colture non inoculate si devono mantenere e testare per assicurarsi che le procedure d'isolamento e la colorazione della coltura siano corrette.

All'osservazione al microscopio a fluorescenza con un set di filtri FITC, una reazione positiva all'RSV si manifesta con una fluorescenza brillante verde mela nel nucleo e/o nel citoplasma delle cellule infette. Una reazione positiva al virus influenzale di tipo A si manifesta con una fluorescenza giallo oro nel nucleo e/o nel citoplasma delle cellule infette.

La colorazione positiva per l'RSV o il virus influenzale di tipo A è indicata dalla presenza di 2 o più cellule intatte che evidenziano una fluorescenza specifica. Un risultato diagnostico negativo su base presuntiva è indicato dall'assenza di fluorescenza e dalla presenza di un colore rosso pallido dovuto al colorante di contrasto blu di Evans.

Un risultato negativo non esclude la presenza di un'infezione da RSV e/o dal virus influenzale di tipo A. Un risultato negativo può essere dovuto a molteplici fattori, quali: un campione non idoneo, una non corretta raccolta e trattamento dei campioni, una non corretta tecnica colturale, un uso di una linea cellulare o di una temperatura non idonea durante l'isolamento o altri fattori accennati nella

sezione “Problemi”. Tutti i risultati diagnostici negativi su base presuntiva vanno riferiti come “Nessun virus osservato”.

Limitazioni

- Un risultato negativo sul campione diretto non esclude un’infezione da RSV o da virus influenzale di tipo A. Un risultato negativo può essere dovuto a una molteplicità di fattori, quali: il momento della raccolta del campione durante l’infezione, un campione non idoneo, il tipo di campione, una non corretta raccolta e trattamento dei campioni o altri fattori accennati nella sezione “Problemi”. Il campione va inoculato nella coltura cellulare e monitorato per rilevare la presenza di un’infezione.
- Una coltura cellulare negativa non esclude la presenza di un’infezione da RSV e/o da virus influenzale di tipo A. Un risultato negativo può essere dovuto a una molteplicità di fattori, quali: il momento della raccolta del campione durante l’infezione, un campione non idoneo, una non corretta raccolta e trattamento dei campioni, una non corretta tecnica colturale, un uso di una linea cellulare o di una temperatura non idonea durante l’isolamento o altri fattori accennati nella sezione “Problemi”.
- L’uso di un obiettivo 10x (100x d’ingrandimento) può non fornire un ingrandimento sufficiente per poter osservare la morfologia cellulare e il pattern di colorazione, in particolare nelle cellule infette dal virus influenzale di tipo A.
- Gli anticorpi monoclonali usati in questo kit sono stati preparati con un ceppo prototipo e potrebbero non riconoscere tutte le varianti antigeniche o i nuovi ceppi dell’RSV o del virus influenzale di tipo A.
- Gli anticorpi monoclonali potrebbero non riconoscere ceppi dell’RSV e del virus influenzale di tipo A che hanno subito minime variazioni aminoacidiche nella regione target dell’epitopo.
- Le metodiche di colorazione diretta dei campioni rilevano l’antigene dell’RSV o del virus influenzale di tipo A e non si possono usare per determinare la vitalità dell’RSV o del virus influenzale di tipo A.
- La proteina A, prodotta da certi batteri, si legherà alla porzione Fc degli anticorpi monoclonali usati nel **Light Diagnostics™ SimulFluor® RSV / Flu A DFA Kit**. La contaminazione batterica è riconoscibile in un isolato colturale e tali campioni sono da eliminare dall’analisi. Tuttavia la

colorazione si può differenziare per dimensione e morfologia. La presenza dello *Staphylococcus aureus* (che produce la proteina A) darà una fluorescenza luminosa, piccola (0,8 µm) e sferica della parete cellulare.

- Le prestazioni del microscopio a fluorescenza sono d'importanza fondamentale ai fini di risultati d'analisi soddisfacenti. Mentre gli obiettivi, l'intensità della lampada, la potenza e i filtri possono influenzare i risultati, l'uso di un controllo positivo verificherà il funzionamento dei reagenti, la metodologia di coltura e il microscopio.
- Non si sono ancora stabilite le prestazioni di questo test nella terapia di monitoraggio.
- Non tutte le prestazioni di questo test sono state stabilite per campioni, quali aspirati nasofaringei o campioni biotici prelevati dalle vie respiratorie.

Specificità e reattività crociata

Gli anticorpi monoclonali coniugati usati nel **SimulFluor® RSV/Flu A** reagent sono stati testati contro vari virus e batteri reperiti nelle vie respiratorie e nelle linee cellulari più usate per l'isolamento dell'RSV e dei virus influenzali di tipo A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 1a: Reattività crociata contro i virus comuni.

Microrganismi	SimulFluor® RSV/Flu A
Virus	
Adenovirus; AD-75 CDC V5-002	-
Coxsackievirus A9; ATCC VR-186	-
Coxsackievirus B1; NIH	-
Citomegalovirus. Isolato clinico.	-
Enterovirus 70; ATCC VR-836	-
Enterovirus 71; ATCC VR-784	-
Echovirus 4; ATCC VR-34	-
Echovirus 6; ATCC VR-36	-
Echovirus 9; ATCC VR-39	-
Echovirus 11; ATCC VR-41	-

Microrganismi	SimulFluor® RSV/Flu A
Echovirus 30; ATCC VR-322	-
Virus dell'herpes simplex di tipo 1. Isolato clinico.	-
Virus dell'herpes simplex di tipo 2. Isolato clinico.	-
Virus influenzale di tipo A: H1N1: 6 ceppi H2N2: 1 ceppo H3N2: 8 ceppi	+
Virus influenzale di tipo B. 6 ceppi.	-
Virus della parotite;	-
Virus del morbillo	-
Virus parainfluenzale di tipo 1; CDC V6-004	-
Virus parainfluenzale di tipo 2; CDC V7-003	-
Virus parainfluenzale di tipo 3; CDC V5-003	-
Virus parainfluenzale di tipo 4A; VR1378 ceppo M-25	-
Virus respiratorio sinciziale; isolati clinici - 6 ceppo Long ceppo 'B'	+
<i>Pneumocystis carinii</i> . Polmone di ratto.	-
Virus della varicella-zoster. Isolato clinico.	-

Tabella 1b: Reattività crociata contro batteri e linee cellulari comuni.

Microrganismi	SimulFluor® RSV/Flu A
Batteri	
<i>Bordetella bronchiseptica</i> . ATCC 10580	-
<i>Bordetella pertussis</i> . ATCC 9340	-
<i>Bordetella catarrhalis</i> . ATCC 25238	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> . ATCC	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ; ATCC 13812	-
<i>Legionella micdadei</i> ; ATCC 33204	-
<i>Legionella pneumophila</i> ; ATCC 33156	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; ATCC 25177	-
<i>Mycoplasma hominis</i> ; ATCC 23114	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ; ATCC 15531	-
<i>Neisseria meningitidis</i> ; ATCC 13077	-
Linee cellulari	
HEp-2	-
RMK	-
MRC-5	-
A549	-
Vero	-
LLC-MK2	-

Valori attesi

Cinquecentoventisette campioni sono pervenuti in 2 siti dal settembre 1997 al marzo 1998, 253 provenienti dagli Stati Uniti sud orientali e 274 dal nord est.

Nel sud est l'RSV è stato identificato su campioni diretti e/o mediante coltura cellulare in 52 campioni con una prevalenza del 20,6%, mentre il virus influenzale di tipo A è stato isolato da 31 campioni (prevalenza del 12,3%). Tutti i pazienti da cui si è identificato l'RSV erano sotto i 3 anni d'età. Al contrario, 19 dei 31 pazienti (61,3%) che sono risultati positivi al virus influenzale di tipo A, erano sopra i 10 anni d'età.

Nel nord ovest l'RSV è stato identificato in 111 campioni (prevalenza del 40,5%) e il virus influenzale di tipo A in 23 campioni (prevalenza dell'8,4%). Con l'eccezione di 11 tamponi faringo-tonsillari prelevati da adulti in case di

cura, i campioni erano tutti aspirati nasofaringei prelevati da bambini. La distribuzione della fascia d'età era simile a quella vista negli altri siti di studio per infezioni da RSV e da virus influenzale di tipo A. Tutti i pazienti da cui si è identificato l'RSV erano sotto i 3 anni d'età, mentre 3 dei 23 isolati del virus influenzale di tipo A erano anziani.

Tabella 2: Prevalenza dell'RSV e del virus influenzale di tipo A nei bambini sotto i 3 anni d'età negli Stati Uniti orientali.

	Stati Uniti sud orientali			Stati Uniti nord orientali		
	Totale	Positivi	% < 3 anni	Totale	Percentuale	% < 3 anni
RSV	52/253	20,6%	100%	111/274	40,5%	100%
Influenza A	31/253	12,3%	38,7%	23/274	8,4%	13,0%

Sono pervenuti 5 tipi diversi di campioni da sottoporre a test nei 2 siti di studio. Il numero di campioni e il tasso di positività verso l'RSV o verso il virus influenzale di tipo A sono sintetizzati di seguito. Si è riscontrato che i tamponi nasali e gli aspirati nasofaringei rappresentano la miglior tipologia di campioni per l'isolamento virale.

Tabella 3: Campioni ricevuti da sottoporre a test per l'RSV e il virus influenzale di tipo A.

	TS	NS	TW	NPA	Espettorato	Bronchiali	Altro
N. di campioni	63	137	17	263	37	2	3
N. positivi	15	70	4	134	13	0	0
% Positivi	23,8	51,1	23,5	50,9	35,1	0	0

TS (throat swab, tampone faringo-tonsillare); NS (nasal swab, tampone nasale); TW (throat wash, lavaggio faringo-tonsillare); Sput (sputum, espettorato); Bronch (bronchial brushings, brushing bronchiali); O (other, altro).

Caratteristiche prestazionali

SITO 1

Duecentocinquantatre campioni sono stati ricevuti da sottoporre a test per l'RSV e per il virus influenzale di tipo A in un laboratorio di riferimento nel sud-est degli Stati Uniti. I campioni, compresi i tamponi nasali, faringo-tonsillari e lavaggi nasali ecc. sono stati prelevati sia da bambini sia da adulti. I vetrini sono stati allestiti da ciascun campione e colorati con il **SimulFluor® RSV/Flu A** reagent e i risultati sono stati comparati con quelli del Dispositivo accettato per il test di fluorescenza. I campioni sono anche stati inoculati in colture per l'isolamento virale. I vetrini sono stati allestiti con colture inoculate e colorati con il **SimulFluor® RSV /Flu A** reagent e con un Dispositivo accettato per il test di fluorescenza.

Oltre all'RSV e al virus influenzale di tipo A sono stati isolati altri 26 virus compresi il rhinovirus (9), il CMV (6), l'adenovirus (4), l'enterovirus (2) e 1 virus parainfluenzale di tipo 2. Sono anche state identificate 4 infezioni duplici ciascuna comprendente CMV/adenovirus, virus influenzale di tipo A/adenovirus, CMV/RSV e CMV/virus parainfluenzale di tipo 3.

Riconoscimento dell'RSV

L'RSV è stato rilevato nei campioni prelevati da 52 pazienti mediante l'analisi di campioni diretti e mediante l'isolamento in coltura. Di questi, 13 sono risultati positivi solo in coltura. Il **SimulFluor® RSV/Flu A** reagent ha dimostrato una totale corrispondenza con il Dispositivo accettato sia per l'analisi diretta del campione sia per l'accertamento in coltura.

La sensibilità e specificità relativa del **SimulFluor® RSV/Flu A** reagent sono stati del 100% nell'accertamento in coltura, mentre la sensibilità e specificità relativa dell'analisi del campione diretto erano rispettivamente del 100% e dell'83,8% rispetto alla coltura.

Tabella 4: Rilevamento dell'RSV in campioni diretti e in coltura

SimulFluor® RSV/Flu A Dispositivo accettato	Positivi diretti	Negativi diretti	Positivi in coltura	Negativi in coltura
Positivi con SimulFluor® RSV/Flu A	52	0	13	0
Negativi con SimulFluor® RSV/Flu A	0	201	0	240
Totale	52	201	13	240

Sensibilità relativa di campioni diretti vs coltura = 100% (13/13)
(intervallo di confidenza del 95%, da 33,5 a 95,9%)

Specificità relativa di campioni diretti vs coltura = 83,8% (201/240)
(intervallo di confidenza del 95%, da 83,7 a 91,8%)

Sensibilità relativa dell'accertamento in coltura = 100% (13/13)
(intervallo di confidenza del 95%, da 27,6 a 86,2%)

Specificità relativa dell'accertamento in coltura = 100% (240/240)
(intervallo di confidenza del 95%, da 91,4 a 97,2%)

Rilevamento del virus influenzale di tipo A

Il virus influenzale di tipo A è stato isolato in coltura da 31 dei 253 campioni. Il **SimulFluor® RSV/Flu A** e il Dispositivo accettato hanno dimostrato una totale corrispondenza per quanto riguarda l'accertamento in coltura. Dei campioni positivi in coltura, solo 16 sono risultati anche positivi all'analisi del campione diretto con **SimulFluor® RSV/Flu A** e 15 con il Dispositivo accettato.

Tabella 5: Rilevamento del virus influenzale di tipo A in campioni diretti e in coltura

SimulFluor® RSV/Flu A Dispositivo accettato	Positivi diretti	Negativi diretti	Positivi in coltura	Negativi in coltura
Positivi con SimulFluor® RSV/Flu A	15	1	31	0
Negativi con SimulFluor® RSV/Flu A	0	237	0	222
Totale	15	238	31	222

Sensibilità relativa di campioni diretti vs coltura = 48,4% (15/31)
(intervallo di confidenza del 95%, da 33,5 a 95,9%)

Specificità relativa di campioni diretti vs coltura = 100% (222/222)
(intervallo di confidenza del 95%, da 89,7 a 96,3%)

Accertamento colturale della sensibilità relativa = 100% (31/31)
(intervallo di confidenza del 95%, da 82,1 a 163%)

Accertamento colturale della specificità relativa = 100% (222/222)
(intervallo di confidenza del 95%, da 83,7 a 91,8%)

SITO 2

Duecentosettantaquattro campioni sono pervenuti in un laboratorio ospedaliero dal novembre 1997 al marzo 1998. Con l'eccezione di 11 tamponi faringo-tonsillari prelevati da adulti in case di cura, i campioni erano tutti aspirati nasofaringei prelevati da bambini. I vetrini sono stati allestiti con i campioni e testati per la presenza dell'RSV e del virus influenzale di tipo A con il **SimulFluor® RSV/Flu A** e per l'RSV con un EIA su membrana disponibile in commercio. Gli 11 campioni prelevati da adulti sono stati testati per il virus influenzale di tipo A con un EIA su membrana disponibile in commercio. Ciascun campione è anche stato inoculato in coltura cellulare per l'isolamento e il rilevamento del virus influenzale di tipo A e dell'RSV con un reagente dell'immunofluorescenza disponibile in commercio.

Dai campioni sono stati isolati 22 virus oltre all'RSV e al virus influenzale di tipo A. Questi comprendono 9 CMV (compresa una coinfezione con il virus influenzale di tipo A e 4 con l'RSV), 8 adenovirus (comprese 3 coinfezioni con l'RSV), 3 enterovirus (2 coinfezioni con l'RSV) e 1 HSV.

Rilevamento dell'RSV

Trentadue campioni sono risultati non idonei per l'analisi diretta di campioni con il **SimulFluor® RSV/Flu A assay**; 4 sono poi risultati positivi all'RSV e 1 al virus influenzale di tipo A in coltura. L'RSV è stato identificato mediante la colorazione con **SimulFluor® RSV/Flu A** in 106 campioni. Di questi, 36 sono risultati positivi al test EIA accettato, ma negativi in coltura.

Tabella 6: Comparazione fra **SimulFluor® RSV/Flu A** vs EIA su membrana accettato

SimulFluor® RSV/Flu A Dispositivo accettato	Positivi con l'EIA	Negativi con l'EIA	Totale
Positivi con SimulFluor® RSV/Flu A	82 (97)	24 (9)*	106 (108)
Negativi con SimulFluor® RSV/Flu A	2	122	124
Totale	82(99)	146(131)	230

*15 campioni negativi con l'EIA su membrana sono risultati positivi in coltura.

() riporta i valori adattati in seguito all'accertamento in coltura.

Sensibilità relativa: (97/99) 98,0% (intervallo di confidenza del 95%: 92,9 – 99,7%)

Specificità relativa: (122/131) 93,1% (intervallo di confidenza del 95%: 87,4 – 96,8%)

Tabella 7: Comparazione fra **SimulFluor® RSV/Flu A** vs Dispositivo accettato

SimulFluor® RSV/Flu A Dispositivo accettato	Positivi in coltura	Negativi in coltura	Totale
Positivi con SimulFluor® RSV/Flu A	88	2*	90
Negativi con SimulFluor® RSV/Flu A	0	183	184
Totale	88	185	274

*Un campione è risultato positivo anche con l'EIA su membrana

Sensibilità relativa: (88/90) 97,8% (intervallo di confidenza del 95%: 92,2-99,7%)

Specificità relativa: (183/185) 98,9% (intervallo di confidenza del 95%: 96,1-99,9%)

Quattro campioni sono risultati positivi sia verso l'RSV sia verso il virus influenzale di tipo A. Tre sono stati identificati con il **SimulFluor® RSV/Flu A** reagent nel campione diretto e i 4 positivi verso l'RSV sono stati identificati da entrambi i reagenti in coltura.

Rilevamento del virus influenzale di tipo A

Ventitre campioni sono risultati positivi verso il virus influenzale di tipo A con il Dispositivo, un campione era positivo con il **SimulFluor® RSV** reagent sia nel campione diretto sia in coltura, ma negativo in coltura con il Dispositivo accettato. Tre campioni erano positivi in coltura sia verso l'RSV sia verso il virus influenzale di tipo A. È stata anche riconosciuta un'infezione duplice con il CMV. Dei 32 campioni che sono risultati non idonei per l'analisi con **SimulFluor® RSV/Flu A**, solo 1 è poi risultato positivo verso il virus influenzale di tipo A in coltura.

Tabella 8: Rilevamento del virus influenzale di tipo A in campioni diretti e in coltura

SimulFluor® RSV/Flu A Dispositivo accettato	Positivi diretti	Negativi diretti	Positivi in coltura	Negativi in coltura
Positivi con SimulFluor® RSV/Flu A	20	4	23	1
Negativi con SimulFluor® RSV/Flu A	2	216	0	250
Totale	22	220	23	251

Sensibilità relativa di campioni diretti vs coltura = 83,3% (20/24)
(intervallo di confidenza del 95%: 62,6-95,3%)

Specificità relativa di campioni diretti vs coltura = 98,1% (216/220)
(intervallo di confidenza del 95%: 95,4-99,5%)

Accertamento colturale della sensibilità relativa = 95,8% (23/24)
(intervallo di confidenza del 95%: 78,9-99,9%)

Accertamento colturale della specificità relativa = 99,6% (250/251)
(intervallo di confidenza del 95%: 97,8-100%)

Undici tamponi faringo-tonsillari prelevati da adulti ospedalizzati in case di cura sono stati testati per la presenza del virus influenzale di tipo A con un EIA su membrana accettato. Il **SimulFluor® RSV/Flu A** reagent ha dimostrato una totale corrispondenza con il riconoscimento e la coltura del virus influenzale di tipo A in 3 campioni, mentre l'EIA su membrana accettato ha identificato un campione infetto dal virus influenzale di tipo A.

Tabella 9: Comparazione fra **SimulFluor® RSV/Flu A** vs EIA su membrana accettato

SimulFluor® RSV/Flu A Dispositivo accettato	Positivi diretti	Negativi diretti	Totale
Positivi con SimulFluor® RSV/Flu A	1(3)	2*(0)	3
Negativi con SimulFluor® RSV/Flu A	0	8	8
Totale	1(3)	10	11

*Entrambi risultarono positivi al virus influenzale di tipo A nell'accertamento in coltura.

() riportare i valori adattati in seguito all'accertamento in coltura.

Sensibilità relativa: (3/3) 100% (intervallo di confidenza del 95%: 29,2-100%)

Specificità relativa: (11/11) 100% (intervallo di confidenza 95%: 71,5-100%)

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 dea parte AAAA-MM-GG o AAAA-MM
	Fabbricante		Representante autorizzato della Comunità europea
	Attenzione, consultare la documentazione allegata		Contenuto sufficient per $< n$ $> \text{test}$
	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.

©2012 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, SimulFluor è un marchio registrato di Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



LIGHT DIAGNOSTICS™

SimulFluor® RSV/FLU A TROUSSE DFA

Dosage par méthode d'immunofluorescence

Supplément Français De Langue



3129



125



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

Millipore (UK) Ltd.
Fleming Road, Kirkton Campus • Livingston EH54 7BN
United Kingdom
Tel. +44 1506 404000 • Fax +44 1506 404001

Application

La **Trousse DFA SimulFluor® RSV/Flu A** de **Light Diagnostics™** est destiné à être utilisé dans des échantillons respiratoires tels que les écouvillonnages pharyngés, nasaux et nasopharyngés, les lavages pharyngés, les aspirations et les lavages broncho-alvéolaires de patients présentant une détresse respiratoire fébrile, suite à une amplification du virus dans la culture cellulaire. Les échantillons s'avérant négatifs lors de l'examen direct doivent être confirmés par une mise en culture.

IVD

Résumé et explication

Le virus respiratoire syncytial (RSV) appartient au genre *Pneumovirus* dans la famille des *Paramyxoviridae*. Il s'agit d'un virus pléomorphe d'un diamètre de 100 à 300 nm, qui contient un ARN à simple brin linéaire non segmenté de polarité négative. La surface externe de son enveloppe contient des projections de glycoprotéines F et G, aux propriétés extrêmement antigéniques, et une protéine structurale principale, N, dans la nucléocapside. Les protéines structurales F, G et N divisent le RSV en deux groupes antigéniques principaux ; les souches « prototypes » sont les Long (groupe A) et CH-18537 (groupe B) (1-4). Le RSV provoque d'importantes épidémies d'infections respiratoires graves en hiver et au printemps dans le monde. Comme l'immunité naturelle contre le RSV est faible, ces épidémies ont tendance à se produire chaque année ou tous les deux ans.

Le RSV peut être isolé à partir d'aspirations nasopharyngées, d'écouvillonnages nasaux ou PHARYNG2S, ou d'échantillons pulmonaires prélevés durant les premiers jours de la maladie. Le virus se développe dans les cellules épithéliales humaines telles que les HEp2, les RMK (primary rhesus monkey kidney), les A549, MRC-5 et les NCI-H292. Des tests rapides et directs sur des échantillons cliniques adéquats permettent de diagnostiquer les infections par le RSV à condition que le réactif normalisé et les contrôles adéquats soient utilisés. Une confirmation par isolement viral est souhaitable dans la mesure du possible.

Le traitement à la ribavirine, administrée sous forme d'aérosol, de nourrissons infectés par le RSV et hospitalisés, a réussi. Il s'agit toutefois d'un traitement inhabituel qui nécessite des soins spéciaux (4). L'immunoglobuline est également disponible pour ce traitement. Les vaccins contre le RSV sont légendaires pour leurs échecs, mais ils sont toujours en phase de développement intense.

Le virus Influenza A est membre de la famille des *Orthomyxoviridae*. C'est un virus de grande taille, d'environ 110 nm de diamètre, protégé par une enveloppe, dont les projections d'hémagglutinine (HA) et de neuraminidase (NA) traversent la membrane de glycoprotéines, et qui contient un ARN simple brin segmenté (5-7). L'Influenza A subit une mutation très fréquente et est la cause d'épidémies d'influenza périodiques dans le monde. Les épidémies sont particulièrement graves lorsque les mutations ont entraîné des changements de structure de l'HA ou de la NA si radicaux que les anticorps circulant au sein d'une collectivité ne reconnaissent pas les souches du virus (6-8). Les virus influenza tiennent leur spécificité de différences antigéniques dans deux des protéines structurales principales : la nucléoprotéine interne (NP) et la protéine de matrice (M) (5-8).

Les infections par l'influenza se caractérisent par des trachéo-bronchites, des pharyngites, des myalgies, de la fièvre, des maux de tête et des malaises (5,6,9). Un léger coryza distingue souvent l'influenza des autres maladies respiratoires virales. Il est extrêmement contagieux parmi les adultes car il se propage par des gouttelettes d'aérosols et des fomites. Comme dans le cas du RSV, une période d'incubation de 1 à 4 jours permet au virus de se propager rapidement au sein des collectivités et des salles d'hôpitaux. La complication la plus significative de l'influenza est la pneumonie, qui se produit d'elle-même ou peut être confondue avec une pneumonie bactérienne. La pneumonie se produit le plus souvent chez les personnes âgées, les patients dont le système immunitaire est affaibli ou chez les patients présentant un diabète sous-jacent, une maladie pulmonaire ou cardiaque ou une maladie rénale chronique. Les enfants sont plus susceptibles d'être sujets à des symptômes supplémentaires tels que des douleurs gastro-intestinales, des vomissements, des myosites, des otites moyennes, des conjonctivites et des croups.

L'augmentation des décès dus à la pneumonie pendant la « saison de la grippe », dont la cause présumée est le virus de l'influenza, permet de suivre les épidémies d'influenza et de vérifier l'efficacité des vaccins contre l'influenza. Des complications moins courantes chez les adultes incluent le syndrome de Reye ou les lésions du SNC, les symptômes cardiaques, les sinusites et otites moyennes.

L'amantadine et son analogue, la rimantadine, sont efficaces pour la prévention d'un maximum de 90 % des infections par l'influenza A et de 100 % des maladies lorsque ces dernières sont prises à titre prophylactique (5,10). Elles exercent également une efficacité thérapeutique en réduisant la durée de la maladie lorsqu'elles sont prises dans les 2 premiers jours de la maladie. La ribavirine peut être efficace pour le traitement de l'influenza A lorsqu'elle administrée en aérosol. Les vaccins contre l'influenza A constituent un effort de

santé publique important au fur et à mesure que les nouvelles souches sont identifiées. Les vaccins contre l'influenza qui existent actuellement présentent généralement d'un taux d'efficacité de 70 à 90 % (5,7).

Les virus Influenza peuvent être cultivés dans des cellules RMK, MDCK (Madin Darby canine kidney) et, à l'occasion, dans d'autres lignées cellulaires, en fonction de la souche du virus en question (11-13). L'ajout de trypsine au liquide de culture à une concentration avoisinant 2 µg/ml facilite énormément l'isolement du virus de l'influenza dans les cellules MDCK.

Des flacons de culture standard et des flacons à échantillons cylindriques peuvent être utilisés. Des tests directs, y compris par immunofluorescence, (FA) et des dosages immuno-enzymatiques (EIA) (11,14-17).

Les échantillons adéquats incluent les lavages nasaux, les écouvillonnages pharyngés et les lavages broncho-alvéolaires. Tout test direct utilisant des réactifs normalisés permet de diagnostiquer l'infection par l'influenza, en particulier s'il est confirmé par isolement viral.

Principe du test

La **Trousse DFA SimulFluor® RSV/Flu A** de **Light Diagnostics™** utilise un seul réactif pour la détection et l'identification simultanées du RSV et de l'influenza A. Le composant primaire, spécial RSV, se lie aux antigènes F et G du RSV dans les cellules infectées par le RSV. Le composant secondaire, spécial influenza A, se lie aux nucléoprotéines de l'influenza A dans les cellules infectées par l'influenza A. Le réactif non lié est éliminé par rinçage avec du sérum physiologique tamponné avec du phosphate (PBS). Le complexe antigènes-anticorps peut être visualisé par microscopie à fluorescence. Le complexe antigènes-anticorps du RSV arbore une fluorescence vert pomme et le complexe antigènes-anticorps de l'influenza A est jaune or. La coloration des cellules non infectées est d'un rouge terne en raison de la présence de bleu Evans dans le réactif.

Composants de la trousse

1. SimulFluor® RSV/Flu A Reagent - **REF** 5245: Un (1) flacon compte-gouttes de 5 ml comportant un composant primaire spécial RSV et un composant secondaire spécial influenza A, un stabilisateur protéinique, 0,005% du Bleu Evans et 0,1 % d'azide de sodium (conservateur).

Montant prévu est suffisant pour 125 tests. Estimation est basée sur les tests de goutte de 40µL; nombre réel de tests peut varier.

2. RSV Control Slides - **REF** 5012: Deux (2) lames comportant un puits de cellules infectées par le RSV et un puits de cellules non infectées.
3. Influenza A/B Control Slides - **REF** 5010: Deux (2) lames comportant un puits de cellules infectées par l'influenza A, un puits de cellules infectées par l'influenza B et deux puits de cellules non infectées.
4. Phosphate-Buffered Saline (PBS) - **REF** 5087: Un (1) sachet de sels pour sérum physiologique tamponné au phosphate produit 1 litre après dissolution dans de l'eau distillée. Conserver dans un récipient propre et fermé, à température ambiante.
5. Tween® 20/Sodium Azide Solution (100X) - **REF** 5037: Un (1) flacon de 10 mL contenant une solution concentrée de polysorbate 20 (Tween 20) et d'azide de sodium (NaN_3) qui doit être diluée au 1/100 dans du PBS.
6. Mounting Fluid - **REF** 5013: Un flacon compte-gouttes de 10 ml contenant de la glycérine tamponnée au trométamol, un amplificateur de fluorescence et 0,1 % d'azide de sodium (conservateur). Conserver à une température comprise entre 2°C - 25 °C.

Matériel requis mais non fourni

- Acétone, de qualité réactif ou mieux ; conservée dans un flacon de verre
- Eau déionisée ou eau distillée
- Contrôles de culture virale (souches références de RSV et d'influenza A disponibles auprès de l'American Type Tissue Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA).

- Solution d'hypochlorite de sodium 0,05 % (dilution au 1:100 d'eau de Javel du commerce)
- Lignées cellulaires sensibles au RSV et à l'influenza telles que les lignées HEp-2, MRC-5, PMK (primary monkey kidney), MDCK (14,15,16) ou d'autres lignées cellulaires sensibles à l'influenza (par ex. les LLC-MK2, etc.). Des lignées cellulaires appropriées peuvent être obtenues auprès de l'American Type Tissue Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA).
- Milieu de culture tissulaire comme le RPMI ou le milieu essentiel minimum d'Eagle (EMEM) avec sérum foetal bovin (FBS) et antibiotiques ou équivalent
- Milieu de transport viral non inhibitoire du RSV ou de l'influenza A (HBSS [soluté de base de Hanks] conjugué à des antibiotiques ou l'équivalent)
- Lames de verre nettoyées à l'acétone, non fluorescentes
- Lammelles couvre-objet n° 1
- 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 doté d'une lampe au mercure ou halogène de 100 W, combinaison de filtres appropriée pour FITC (pic d'excitation = 490 nm, pic d'émission = 520 nm) avec un grossissement de 160 à 200 x et de 400 x (objectif sec)
- Facultatif : Combinaison de filtres appropriée pour le TRITC (pic d'excitation = 550 nm, pic d'émission = 570 nm)
- Forceps
- Chambre humide
- Incubateur, $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Seringue et aiguille ou autre instrument permettant d'enlever la lamelle couvre-objet du flacon à échantillons cylindrique
- Bain à ultrasons
- Vortex ou agitateur à ultrasons

Avertissements et précautions

- L'azide de sodium utilisé comme conservateur dans le réactif **SimulFluor®**, le solution PBS/Tween 20 et le liquide de montage, est toxique si ingéré. L'azide de sodium peut réagir avec les conduites en plomb et en cuivre pour former des azides métalliques très explosifs. Lors de la mise au rebut, rincer à grande eau pour éviter une accumulation dans les conduites.
- Le regroupement ou l'altération de tout réactif peut causer des résultats erronés.
- Ne pas remplacer par des réactifs d'autres fabricants.
- Des températures ou des durées d'incubation autres que les valeurs spécifiées sont susceptibles de conduire à des résultats erronés. L'utilisateur doit valider tout changement de cette nature.
- Ne jamais laisser sécher les flacons à échantillons cylindriques ou les lames au cours de la procédure de coloration.
- Manipuler tous les spécimens et les matériaux ayant été en contact avec eux comme s'il s'agissait de matières potentiellement infectieuses et les mettre au rebut en prenant les précautions appropriées. Procéder à une décontamination avec de l'hypochlorite de sodium à 0,05 %.
- L'acétone est extrêmement inflammable et nocive en cas d'ingestion ou d'inhalation. À conserver à l'écart des étincelles, des flammes ou de toute source de chaleur. Éviter de respirer les vapeurs. Utiliser une ventilation appropriée.
- Ne jamais pipeter à la bouche.
- Éviter le contact avec le Bleu Evans (présent dans le **SimulFluor®** RSV/Flu A REF 5245) étant donné qu'il s'agit d'un carcinogène potentiel. En cas de contact avec la peau, rincer à grande eau.
- Le liquide de montage REF 5013 contient un amplificateur de fluorescence qui peut détruire les muqueuses. Éviter tout contact direct avec la peau ou les muqueuses. En cas de contact, rincer à grande eau.

Stabilité et conservation

Lorsqu'il est conservé à une température comprise entre 2° et 8°C, la **Trousse DFA SimulFluor® RSV/Flu A** de **Light Diagnostics™** est stable jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette du trousseau. Ne pas congeler ou exposer à des températures élevées. Jeter tout reste de réactif après la date de péremption du trousseau.

Prélèvement des échantillons

Le prélèvement, le transport, le traitement et la conservation corrects des échantillons sont des éléments d'une importance fondamentale pour l'isolement et la confirmation de l'infection par le RSV et l'influenza A. Les aspirations de sécrétions respiratoires sont des échantillons de premier ordre bien que les écouvillonnages nasopharyngés ou pharyngés puissent également être utilisés (18).

Les lavages nasaux et les aspirations trachéales ou nasopharyngées sont idéaux pour un examen direct des échantillons étant donné qu'ils permettent d'obtenir une vaste quantité de cellules épithéliales. Les échantillons de lavages nasopharyngiens sont prélevés en plaçant 3 à 5 ml de sérum physiologique dans la narine du patient pendant que ce dernier est en position couchée. Le sérum physiologique est délicatement aspiré à l'aide d'une seringue, d'un bulbe en caoutchouc ou d'une sonde attachée à un piège à mucus.

Souvent les écouvillonnages nasopharyngés, pharyngés ou nasaux ne contiennent pas le nombre adéquat de cellules épithéliales ciliées et cylindriques, lesquelles sont indispensables à la détection directe du RSV et de l'influenza A.

Transporter l'échantillon au laboratoire sur de la glace légèrement fondue ou dans une compresse froide tout de suite après le prélèvement. Les échantillons à traiter en vue d'un examen direct ne doivent pas être congelés puisque le processus de congélation-décongélation brise les cellules en les ouvrant, ce qui rend les échantillons inutilisables. Les échantillons pour le RSV doivent être traités et inoculés dans la culture cellulaire dès que possible à réception. Les échantillons à utiliser pour l'isolement en culture doivent être congelés à -70 °C si le traitement n'est pas effectué dans un délai de 72 heures suivant le prélèvement. Éviter les cycles de congélation-décongélation répétés.

Pour des informations supplémentaires concernant les techniques de prélèvement des échantillons, consulter Manual of Clinical Microbiology, Balows, A. *et al.*, eds. 5^{ème} édition (1991). American Society for Microbiology, Washington, D.C., Influenza Viruses, Ch. 81; Respiratory Syncytial Virus, Ch. 83; Animal and Animal Cell Culture Systems, Ch. 19 and Clinical Microbiology Procedures Handbook, Volume 2, Isenberg, H.D. ed. (1992). American Society for Microbiology, Washington, D.C., Selection, Collection and Transport of Specimens for Viral and Rickettsial Cultures, section 8.2.

Pour un transport approprié des échantillons, se référer au 42 CFR (Code of Federal Regulations), article 72.

Traitement des échantillons

Avant le traitement des échantillons, s'assurer qu'ils ont été prélevés et transportés correctement. Une mauvaise manipulation des échantillons peut causer des résultats erronés.

Traitement des échantillons en vue d'un examen direct :

1. Retirer l'échantillon du récipient d'origine et le placer dans un tube stérile pour centrifugeuse de 10 à 15 ml.
2. Centrifuger entre 300 et 500 x g pendant 10 minutes à une température comprise entre 2° et 8°C.
3. Prélever le surnageant pour les procédures d'isolement du virus.

Remarque: *Se référer à la rubrique « Traitement des échantillons en vue de la mise en culture / l'isolement » pour des instructions complètes.*

4. Laver l'agrégat de cellules en effectuant à nouveau une suspension délicate dans 4 à 8 ml de PBS.
5. Centrifuger entre 300 et 500 x g pendant 10 minutes à une température comprise entre 2° et 8°C.
6. La présence de mucus formera une couche au-dessus de l'agrégat de cellules. Enlever soigneusement le surnageant et le mucus à l'aide d'une pipette pasteur. S'il reste encore du mucus, répéter les étapes 4 à 6 jusqu'à la suppression de ce dernier.

7. Suspendre à nouveau l'agrégat de cellules dans 0,1 à 0,2 ml de PBS pour réaliser une suspension légèrement trouble. La qualité de la lame dépend de la concentration cellulaire inhérente à la suspension. Les suspensions lourdes sont difficiles à lire et ne permettent pas de réaliser des lames de qualité. Les suspensions cellulaires qui ne contiennent pas suffisamment de cellules conduisent à une perte de sensibilité.
8. Placer une goutte de suspension cellulaire sur le nombre désiré de puits sur les lames préalablement nettoyées.
9. Laisser la lame sécher à l'air.
10. Fixer les lames dans de l'acétone réfrigérée (entre 2° et 8°C) pendant 10 minutes. Veiller à ce que l'acétone ne soit pas contaminée avec l'eau et les sels. Ceci peut donner une apparence voilée à la coloration.
11. Laisser les lames sécher à l'air après la fixation. Les lames doivent être colorées aussitôt que possible. Si le stockage s'avère nécessaire, placer les lames dans un récipient comportant un dessicatif à $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
12. Passer à la section « Procédure d'immunofluorescence » après avoir terminé la section « Préparation du réactif ».

Traitement des échantillons en vue de la mise en culture/l'isolement:

Aspirations nasopharyngées, aspirations trachéales, lavages nasaux, lavages bronchiques :

1. Retirer l'échantillon du récipient d'origine et le placer dans un tube stérile pour centrifugeuse de 10 à 15 ml.
2. Ajouter suffisamment de PBS froid de manière à faire monter le volume à 2 à 2,5 ml.
3. Vortexer pour mélanger. Si l'échantillon peut être utilisé pour l'isolement viral uniquement, passer à l'étape 4.

***Remarque:** Si l'échantillon est destiné à un examen direct de même qu'à un isolement viral, il doit être centrifugé à 300 à 500 x g à une température comprise entre 2° et 8°C pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et utilisé pour l'isolement viral. Si l'agrégat de cellules est suffisamment important, une partie de ce dernier peut être ajoutée au surnageant pour optimiser la récupération du virus. Prière de se référer à la rubrique*

« Traitement des échantillons en vue d'un examen direct » pour des instructions complètes.

4. Agiter l'échantillon par ultrason à 8 à 12 Kc/sec pendant 30 à 60 secondes pour perturber les cellules et libérer les particules virales.
5. Centrifuger l'échantillon entre 300 et 500 x g à une température comprise entre 2° et 8°C pendant 10 minutes pour sédimenter les débris cellulaires.
6. Retirer le surnageant des débris cellulaires.
7. Le surnageant peut être mélangé à 10X de solution antibiotique et laissé agir à une température comprise entre 2° et 8°C pendant 30 à 60 minutes avant l'inoculation pour éviter une croissance bactérienne excessive.

Écouvillonnage rhinopharyngé, écouvillonnage pharyngé, écouvillonnage nasal:

1. Vortexer ou agiter l'échantillon énergiquement pour déloger les cellules de l'écouvillon.
2. Pour améliorer la récupération du virus, ajouter quelques perles de verre stériles à l'échantillon et vortexer pendant une minute, ou agiter par ultrasons entre 8 et 12 kc/sec pendant 30 à 60 secondes.
3. Jeter l'écouvillon dans la solution d'hypochlorite de sodium.
4. Centrifuger l'échantillon entre 300 et 500 x g à une température comprise entre 2° et 8°C pendant 10 minutes.
5. Utiliser le surnageant comme inoculum.

Mise en culture/isolement et préparation en vue de la coloration

Inoculation de tubes standard ou de flacons à échantillons cylindriques :

1. Juste avant l'inoculation des échantillons, vérifier que la morphologie des cultures cellulaires est correcte.
2. Aspirer le milieu de culture des tubes standard ou des flacons à échantillons cylindriques à inoculer.
3. Ajouter 0,2 à 0,5 ml de l'inoculum à chaque tube ou flacon à échantillons cylindrique.

4. Inoculer les échantillons dans des lignées cellulaires appropriées.
5. Centrifuger les flacons à échantillons cylindriques à température ambiante pendant 30 minutes entre 500 et 700 x g.
6. Adsorber l'inoculum sur des couches uniques en tube standard en incubant sur un portoir incliné à une température comprise entre 35 et 37 °C pendant 1 heure.
7. Après l'adsorption ou la centrifugation, aspirer l'inoculum et ajouter suffisamment de milieu de maintenance pour recouvrir complètement l'unique couche de cellules.
8. Incuber à une température comprise entre 35 et 37 °C dans des cylindres à rouleaux ou des portoirs stationnaires.
9. La couche unique peut être rincée délicatement 2 à 3 fois avec un milieu de maintenance préalablement chauffé si l'échantillon présente un risque de toxicité pour la couche unique de cellules.
10. Renouveler le milieu de culture cellulaire tous les 3 à 5 jours.

***Remarque:** Un échantillon de chaque lot de lignées cellulaires utilisé pour la culture cellulaire doit être inoculé avec des souches de RSV et d'influenza 3 représentatives pour établir la sensibilité à une infection et le développement ultérieur de l'ECP. Les cultures cellulaires non inoculées doivent être cultivées et examinées quotidiennement à la recherche de virus contaminateur ou de mycoplasme. Ceci servira à contrôler la normalité de la morphologie cellulaire et peut être utile à la détection d'un ECP précoce. À moins que ces cultures cellulaires témoins ne fassent preuve d'une croissance adéquate, les résultats de l'isolement de la culture cellulaire doivent être considérés non valides.*

Préparation de culture cellulaire pour la coloration :

1. Examiner les tubes et/ou les flacons à échantillons cylindriques de cultures tissulaires quotidiennement à la recherche d'un effet cytopathique. En présence d'un ECP ou à des moments déterminés comme étant les plus propices par chaque laboratoire, les flacons à échantillons cylindriques peuvent être colorés. Si un ECP se manifeste, les cellules peuvent être raclées ou trypsiniées du tube (ou des flacons à échantillons cylindriques) et d'une lame multipuits et préparées pour la coloration.

2. Pour préparer des lames multipuits, aspirer le milieu du tube (ou du flacon à échantillons cylindrique). Conserver le milieu inutilisé à une température comprise entre 2 et 8 °C jusqu'à la fin du test. S'il est nécessaire de répéter le test, un isolement viral peut être tenté à partir de ce milieu.
3. Rincer la culture cellulaire délicatement trois fois avec 1 à 2 ml d'HBSS. Jeter tous les rinçages dans la solution d'hypochlorite de sodium.
4. Ajouter un dixième du volume de culture initial de trypsine et laisser agir pendant 30 secondes. Tapoter délicatement le récipient de culture pour délier les cellules. Suspendre les cellules à nouveau dans 2 ml d'HBSS. Centrifuger la suspension cellulaire entre 300 et 500 x g pendant 10 minutes. Suspendre à nouveau l'agrégat de cellules dans 0,3 ml de PBS stérile pour obtenir une suspension légèrement trouble. Les lames doivent comporter au moins deux cellules par champ grossi 250 fois pour être considérées adéquates pour la détection.

***Remarque:** Il est également possible de séparer la couche unique de cellules du tube en utilisant une tige de verre ou une pipette stérile. Suspendre à nouveau et centrifuger les cellules selon la procédure décrite ci-dessus.*

5. Déposer la suspension de cellules sur une lame nettoyée à l'acétone et laisser sécher à l'air. Fixer la lame dans de l'acétone réfrigérée (entre 2 et 8 °C) pendant 10 minutes et laisser sécher à l'air complètement. Conserver les lames inutilisées avec un dessiccatif à ≤ -20 °C.

Procédure de coloration

Préparation du réactif :

Solution PBS/Tween 20 - Dissoudre le contenu du paquet de PBS dans 950 ml d'eau déionisée ou distillée. Ajouter le contenu du flacon de Tween 20/d'azide de sodium au PBS. Bien mélanger ; Q. S. d'un litre avec de l'eau déionisée ou distillée. Transférer dans un récipient propre et étiqueté destiné à la conservation et bien le reboucher ; conserver à température ambiante. Jeter si le PBS/Tween se trouble ou qu'un précipité se développe.

Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.

Procédure d'immunofluorescence directe suggérée (coloration) :

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

Remarque: Ne laisser les lames sécher à aucun moment lors de la procédure de coloration.

2. Ajouter suffisamment de **SimulFluor** RSV/Flu A Reagent REF 5245 de façon à recouvrir les cellules ; 1 goutte pour les tâches de cellules et 4 à 6 gouttes pour les flacons à échantillons cylindriques.
3. Incuber la lame à 37°C pendant 15 minutes dans une chambre humide.
4. Rincer la lame délicatement à l'aide d'un flacon pulvérisateur rempli de solution PBS/Tween 20 pendant 10 à 15 secondes pour éliminer l'excès de solution d'anticorps monoclonaux, en prenant soin de détourner le jet du puits. Pour les flacons à échantillons cylindriques : aspirer le réactif du flacon et laver délicatement chaque flacon à échantillons cylindrique à 3 reprises avec 1 ml de solution PBS/Tween 20.

5. Agiter pour enlever tout excès de réactif de la lame et faire sécher avec soin la zone entourant la tâche de cellule.

6. Monter sous une lamelle couvre-objet à l'aide d'un milieu de montage aqueux au pH de 8,5 REF 5013 ou équivalent. Pour les flacons à échantillons cylindriques : aspirer le PBS/Tween des flacons à échantillons cylindriques. Soulever chaque lamelle couvre-objet à l'aide d'une aiguille tordue fixée à une petite seringue et la retirer avec précaution en utilisant les forceps. Monter chaque lamelle couvre-objet CÔTÉ CELLULE TOURNÉ VERS LE BAS sur une lame de verre avec du liquide de montage.

7. Essuyer l'excès de liquide des bords de la lame.

Remarque: Pour de meilleurs résultats, lire les lames tout de suite après la préparation. Si les lames doivent être conservées après la coloration, les conserver à une température comprise entre 2° et 8°C, dans un récipient sûr et dans l'obscurité.

8. Examiner les lames à l'aide d'un microscope à fluorescence à un grossissement de 100 à 200 x à la recherche des cellules fluorescentes. Un examen détaillé peut être effectué à un grossissement par 400 x.

Remarque: La performance du microscope à fluorescence est d'une importance critique pour l'obtention de résultats de test satisfaisants. L'utilisation d'un contrôle positif permet de vérifier le fonctionnement des réactifs, de la méthode de culture et du microscope alors que les objectifs, l'intensité de l'ampoule, la puissance et les filtres peuvent affecter les résultats.

Interprétation des résultats

Contrôle de la qualité

Les lames de contrôle doivent être testées à chaque lot d'échantillons. Les lames de contrôle fournies dans ce trousseau sont conçues pour démontrer comment utiliser correctement les composants du trousseau et la procédure de coloration par immunofluorescence.

Les lames de contrôle préparées à partir de cellules infectées par le RSV et l'influenza A et de cellules non infectées peuvent également être testées pour garantir des procédures de coloration correctes lors de l'analyse des échantillons directs. En outre, des tubes standard ou des flacons à échantillons cylindriques inoculés avec des souches référence de RSV et d'influenza A et de cultures non inoculées doivent être maintenus et testés pour garantir un isolement en culture et des procédures de coloration correctes.

Remarque: *Bien lire la lame entièrement à la recherche de fluorescence liée aux cellules.*

Échantillon direct:

Les flacons à échantillons cylindriques et/ou les lames de contrôle préparés à partir de cellules infectées par le RSV et l'influenza A et de cellules non infectées doivent être testés pour garantir des procédures de coloration correctes lors de l'analyse des échantillons directs.

Lorsqu'elle est visualisée à l'aide d'un microscope à fluorescence, une réaction positive au RSV est indiquée par une fluorescence vert pomme vif du noyau et/ou du cytoplasme des cellules infectées. Une réaction positive à l'influenza A est indiquée par une fluorescence jaune or du noyau et/ou du cytoplasme des cellules infectées.

Une coloration positive pour le RSV ou l'influenza A est indiquée par la présence d'au moins 2 cellules intactes présentant une fluorescence spécifique. Un résultat présumé négatif est indiqué par l'absence de fluorescence dans un échantillon comportant un minimum de 20 cellules épithéliales. Un échantillon comportant moins de 20 cellules épithéliales est considéré inadéquat et le test, de ce fait, non valide.

Attention: *La coloration fluorescente de fragments de cellules, relevant de l'emprisonnement du réactif dans de tels débris, doit être ignorée. Si les*

contrôles positifs et négatifs ne peuvent être clairement distingués, le test doit être considéré non valide.

S'il y a lieu, un jeu de filtres TRITC peut être utilisé pour confirmer la coloration. Les cellules infectées par le RSV ne seront plus visibles lorsque les cellules infectées par l'influenza A présenteront une coloration fluorescente rose vif.

Isolement de culture cellulaire/confirmation :

Des tubes standard ou des flacons à échantillons cylindriques inoculés avec des souches référence de RSV et d'influenza A et de cultures non inoculées doivent être maintenus et testés pour garantir un isolement en culture et des procédures de coloration correctes.

Lorsqu'elle est visualisée par microscope à fluorescence à l'aide d'un jeu de filtres FITC, une réaction positive au RSV est indiquée par une fluorescence vert pomme vif du noyau et/ou du cytoplasme des cellules infectées. Une réaction positive à l'influenza A est indiquée par une fluorescence jaune or du noyau et/ou du cytoplasme des cellules infectées.

Une coloration positive pour le RSV ou l'influenza A est indiquée par la présence d'au moins 2 cellules intactes présentant une fluorescence spécifique. Une réaction présumée négative est indiquée par l'absence de fluorescence et par la présence d'une coloration rouge terne due au colorant de contraste, le bleu Evans.

Un résultat négatif ne permet pas d'exclure une infection par le RSV et/ou l'influenza 3. Un résultat négatif peut être dû à divers facteurs tels que : un échantillon inadéquat, un prélèvement et une manipulation incorrects de l'échantillon, une technique de mise en culture mal effectuée, l'utilisation d'une lignée cellulaire ou d'une température inappropriée au cours de l'isolement, ou d'autres facteurs mentionnés sous la rubrique « Résolution des problèmes ». Tous les résultats présumés négatifs doivent être rapportés avec la mention « Aucun virus observé ».

Limites

- Un résultat négatif directement sur l'échantillon n'exclut pas une infection par le RSV et/ou l'influenza A. Un résultat négatif peut être dû à divers facteurs tels que : le moment du prélèvement pendant l'infection, un échantillon inadéquat, le type d'échantillon, un prélèvement et une

manipulation incorrects de l'échantillon, ou d'autres facteurs mentionnés sous la rubrique « Résolution des problèmes ». L'échantillon doit être inoculé dans une culture cellulaire et le risque d'infection surveillé.

- Un résultat négatif dans la culture cellulaire ne permet pas d'exclure une infection par le RSV et/ou l'influenza A. Un résultat négatif peut être dû à divers facteurs tels que : le moment du prélèvement pendant l'infection, un échantillon inadéquat, un prélèvement et une manipulation incorrects de l'échantillon, une technique de mise en culture mal effectuée, l'utilisation d'une lignée cellulaire ou d'une température inappropriée au cours de l'isolement, ou d'autres facteurs mentionnés sous la rubrique « Résolution des problèmes ».
- Il est possible que l'utilisation d'un objectif 10x (grossissement par 100) ne fournisse pas un grossissement suffisant pour permettre de voir la morphologie et le modèle de coloration, en particulier pour les cellules infectées par l'influenza A.
- Les anticorps monoclonaux utilisés dans ce trousseau ont été préparés à l'aide d'une souche prototype et il est possible qu'ils ne détectent pas toutes les variants antigéniques ou les nouvelles souches de RSV ou d'influenza A.
- Il est possible que les anticorps monoclonaux ne réussissent pas à détecter les souches de RSV et d'influenza A ayant subi des changements mineurs au niveau des acides aminés de la région de l'épitope cible.
- Les procédures de coloration d'échantillons directs permettent de détecter l'antigène du RSV ou de l'influenza A et elles ne peuvent pas être utilisées pour déterminer la viabilité du RSV ou de l'influenza A.
- La protéine A, produite par certaines bactéries, lie la partie Fc des anticorps monoclonaux utilisés dans la **Trousse DFA SimulFluor® RSV/Flu A de Light Diagnostics™**. La contamination bactérienne est identifiable dans un isolat de culture et de tels échantillons doivent être éliminés de l'analyse. La coloration peut toutefois être différenciée par la taille et la morphologie. La présence de *Staphylococcus aureus* (producteur de protéine A) est à l'origine d'une fluorescence de la paroi cellulaire, laquelle est de couleur vive, de petite taille (0,8 µm) et sphérique.
- La performance du microscope à fluorescence est d'une importance critique pour l'obtention de résultats de test satisfaisants. Comme les objectifs, l'intensité et la puissance des lampes ainsi que les filtres sont susceptibles d'influencer les résultats, l'utilisation de contrôles appropriés permet de

vérifier le bon fonctionnement des réactifs, de la méthodologie de culture et du microscope.

- Les caractéristiques de performance de ce test n'ont pas été établies pour la surveillance du traitement.
- Les caractéristiques de performance de ce test n'ont pas été complètement établies pour les échantillons tels que les aspirations nasopharyngées ou les échantillons de biopsie prélevés sur l'appareil respiratoire.

Spécificité et réactivité croisée

Les anticorps monoclonaux utilisés dans le réactif **SimulFluor® RSV/Flu A** ont été testés contre une série de virus et de bactéries trouvés dans l'appareil respiratoire, et de lignées cellulaires couramment utilisées pour isoler les virus RSV et influenza A. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Tableau n° 1a : Réactivité croisée avec les virus courants

Micro-organismes	SimulFluor® RSV/Flu A
Virus	
Adénovirus ; AD-75 CDC V5-002	-
Coxsackievirus A9 ; ATCC VR-186	-
Coxsackievirus B1 ; NIH	-
Cytomégalovirus ; isolat clinique	-
Entérovirus 70 ; ATCC VR-836	-
Entérovirus 71 ; ATCC VR-784	-
Échovirus 4 ; ATCC VR-34	-
Échovirus 6 ; ATCC VR-36	-
Échovirus 9 ; ATCC VR-39	-
Échovirus 11 ; ATCC VR-41	-
Échovirus 30 ; ATCC VR-322	-
Virus de l'herpès simple type 1 ; isolat clinique	-
Virus de l'herpès simple type 2 ; isolat clinique	
Influenza A :	+

Micro-organismes	SimulFluor® RSV/Flu A
H1N1 : 6 souches H2N2 : 1 souche H2N2 : 8 souches	
Influenza B ; 6 souches	-
Oreillons	-
Rougeole	-
Parainfluenza 1 ; CDC V6-004	-
Parainfluenza 2 ; CDC V7-003	-
Parainfluenza 3 ; CDC V5-003	-
Parainfluenza 4A ; souche M-25 VR1378	-
Virus respiratoire syncytial ; isolats cliniques : 6 Souche : type Long Souche « B »	+
<i>Pneumocystis carinii</i> , poumon de rat	-
VirusVaricella-Zoster ; isolat clinique	-

Tableau 1b : Réactivité croisée avec des bactéries et lignées cellulaires courantes

Micro-organismes	SimulFluor® RSV/Flu A
Bactérie	
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ; ATCC 10580	-
<i>Bordetella pertussis</i> ; ATCC 9340	-
<i>Branhamella catarrhalis</i> ; ATCC 25238	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> ; ATCC	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ; ATCC 13812	-
<i>Legionella micdadei</i> ; ATCC 33204	-
<i>Legionella pneumophila</i> ; ATCC 33156	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; ATCC 25177	-
<i>Mycoplasma hominis</i> ; ATCC 23114	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ; ATCC 15531	-
<i>Neisseria meningitidis</i> ; ATCC 13077	-
Lignées cellulaires	
HEp-2	-
RMK	-
MRC5	-
A549	-
Vero	-
LLC-MK2	-

Valeurs escomptées

Cinq cent vingt-sept échantillons ont été reçus sur 2 sites entre septembre 1997 et mars 1998 ; 253 provenaient de la région sud-est des États-Unis et 274 du nord-est. Dans le sud-est, le RSV a été identifié au moyen d'échantillons directs et/ou de culture dans le cas de 52 échantillons, indiquant une prévalence de 20,6 %, alors que l'influenza A a été isolé à partir de 31 échantillons (prévalence de 12,3 %). Tous les patients chez lesquels le RSV a été identifié étaient âgés de moins de 3 ans. En revanche, 19 des 31 patients (61,3 %) ayant été testés positifs pour l'influenza A avaient plus de 10 ans.

Dans le nord-est, le RSV a été identifié dans 111 échantillons (prévalence de 40,5 %) et l'influenza A dans 23 échantillons (prévalence de 8,4 %). À

l'exception de 11 écouvillonnages pharyngés prélevés sur des adultes dans une maison de soins, tous les échantillons étaient des aspirations nasopharyngées prélevées sur des enfants. Selon l'autre site d'étude, une distribution d'âge similaire a été observée pour les infections par le RSV et l'influenza A. Tous les patients chez lesquels le RSV a été identifié étaient âgés de moins de 3 ans alors que 3 isolats d'influenza A sur 23 provenaient de personnes âgées.

Tableau no 2 : Prévalence de RSV et d'Influenza A dans la région est des États-Unis chez les enfants âgés de moins de 3 ans

	Sud-est des États-Unis			Nord-est des États-Unis		
	Total	Positif	% < 3 ans	Total	Pourcentage	% < 3 ans
RSV	52/253	20,6 %	100 %	111/274	40,5 %	100 %
Flu A	31/253	12,3 %	38,7 %	23/274	8,4 %	13 %

Cinq types d'échantillons différents ont été reçus pour des tests sur les deux sites d'étude. Le nombre d'échantillons et le taux de positivité pour le RSV ou l'influenza A sont récapitulés ci-dessous. Les écouvillonnages nasaux et les aspirations nasopharyngées se sont avérés être les meilleurs types d'échantillon pour l'isolement du virus.

Tableau no 3 : Échantillons reçus pour les tests de RSV et d'Influenza A

	TS	NS	TW	NPA	Sput	Bronch	Autres
Nombre d'échantillons	63	137	17	263	37	2	3
Nombre de positifs	15	70	4	134	13	0	0
% de positifs	23,8	51,1	23,5	50,9	35,1	0	0

TS = écouvillonnages pharyngés ; NS = écouvillonnages nasaux ; TW = lavage pharyngé ; Sput = sputum ; Bronch= lavages bronchiques ; P = Autres

Caractéristiques de performance

SITE No 1

Deux cent cinquante-trois échantillons ont été reçus pour des tests de RSV et d'influenza A dans un laboratoire de référence du sud-est des États-Unis. Les échantillons, y compris les écouvillonnages nasaux, les écouvillonnages pharyngés et les lavages nasaux, etc., ont été prélevés sur des enfants et des adultes. Les lames ont été réalisées à partir de chaque échantillon et ont été colorées à l'aide du réactif **SimulFluor® RSV/Flu A**, et les résultats ont été comparés à ceux d'un dispositif de prédiction pour dosage par fluorescence. Les échantillons ont également été inoculés dans la culture pour l'isolement du virus. Les lames ont été réalisées à partir de cultures inoculées et ont été colorées à l'aide du réactif **SimulFluor® RSV/Flu A** et d'un dispositif de prédiction pour dosage par fluorescence.

Vingt-six virus autres que le RSV et l'influenza A ont été isolés, y compris le rhinovirus (9), le CMV (6), l'adénovirus (4), l'entérovirus (2) et 1 parainfluenza 2. Quatre doubles infections ont également été identifiées, y compris une de chacune des combinaisons suivantes : CMV/adéno, influenza A/adéno, CMV/RSV et CMV/parainfluenza 3.

Détection du RSV

Le RSV a été dépisté dans 52 échantillons de patients par tests sur échantillons directs et isolement en culture. 13 de ces échantillons uniquement se sont révélés positifs par culture. Le réactif **SimulFluor® RSV/Flu A** concordait avec le dispositif de prédiction pour les tests sur échantillons directs et la confirmation bactériologique.

La sensibilité et la spécificité relatives du réactif **SimulFluor® RSV/Flu A** étaient respectivement de 100 % pour la confirmation bactériologique alors que la sensibilité et la spécificité relatives des tests sur échantillons directs étaient respectivement de 100 % et de 83,8 % en comparaison avec la culture.

Tableau no 4: Détection du RSV dans des échantillons directs et la culture

Dispositif de prédiction	Direct positif	Direct négatif	Culture positive	Culture négative
SimulFluor® RSV/Flu A positif	52	0	13	0
SimulFluor® RSV/Flu A négatif	0	201	0	240
Total	52	201	13	240

Sensibilité relative de l'échantillon direct *versus* culture = 100 % (13/13)
(Intervalle de confiance à 95 % : 33,5 à 95,9 %)

Spécificité relative de l'échantillon direct *versus* culture = 83,8 % (201/240)
(Intervalle de confiance à 95 % : 83,7 à 91,8 %)

Confirmation bactériologique de sensibilité relative = 100 % (13/13)
(Intervalle de confiance à 95 % : 27,6 à 86,2 %)

Confirmation bactériologique de spécificité relative = 100 % (240/240)
(Intervalle de confiance à 95 % : 91,4 à 97,2 %)

Détection de l'Influenza A

L'Influenza A a été isolé en culture à partir de 31 échantillons sur 253. Le **SimulFluor® RSV/Flu A** et le dispositif de prédiction corrélaient parfaitement pour la confirmation bactériologique. Sur les échantillons positifs par culture, 16 uniquement étaient également positifs par tests sur échantillons directs avec le **SimulFluor® RSV/Flu A**, et 15 avec le dispositif de prédiction.

Tableau no 5 : Détection de l'Influenza A dans des échantillons directs et la culture

Dispositif de prédiction	Direct positif	Direct négatif	Culture positive	Culture négative
SimulFluor® RSV/Flu A positif	15	1	31	0
SimulFluor® RSV/Flu A négatif	0	237	0	222
Total	15	238	31	222

Sensibilité relative de l'échantillon direct *versus* culture = 48,4 % (15/31)
(Intervalle de confiance à 95 % : 33,5 à 95,9 %)

Spécificité relative de l'échantillon direct *versus* culture = 100 % (222/222)
(Intervalle de confiance à 95 % : 89,7 à 96,3 %)

Confirmation bactériologique de sensibilité relative = 100 % (31/31)
(Intervalle de confiance à 95 % : 82,1 à 163 %)

Confirmation bactériologique de spécificité relative = 100 % (222/222)
(Intervalle de confiance à 95 % : 83,7 à 91,8 %)

SITE No 2

Deux cent soixante-quatorze échantillons ont été reçus dans un laboratoire hospitalier entre novembre 1997 et mars 1998. À l'exception de 11 écouvillonnages pharyngés prélevés sur des adultes dans une maison de soins, tous les échantillons étaient des aspirations nasopharyngées prélevées sur des enfants. Les lames ont été réalisées à partir d'échantillons et la présence de RSV et d'influenza A a été testée à l'aide du **SimulFluor® RSV/Flu A** et d'un dosage immuno-enzymatique de recherche du RSV sur la membrane en vente dans le commerce. Les 11 échantillons d'adultes ont été testés pour l'influenza A à l'aide d'un dosage immuno-enzymatique de la membrane en vente dans le commerce. Chaque échantillon a également été inoculé dans la culture cellulaire pour l'isolement et la détection de l'influenza A et du RSV à l'aide d'un réactif d'immunofluorescence en vente dans le commerce.

Vingt-deux virus autres que le RSV et l'influenza A ont été isolés à partir des échantillons. Ces virus comprenaient 9 CMV (y compris 1 co-infection avec l'influenza A et 4 avec le RSV), 8 adénovirus (y compris 3 co-infections avec le RSV), 3 entérovirus (2 co-infections avec le RSV) et 1 HSV.

Détection du RSV

Trente-deux échantillons étaient inappropriés pour les tests sur échantillons directs à l'aide du dosage **SimulFluor® RSV/Flu A** ; 4 se sont avérés par la suite positifs pour le RSV par culture et 1 pour l'influenza A. Le RSV a été identifié par coloration directe à l'aide du **SimulFluor® RSV/Flu A** dans 106 échantillons. 36 de ces échantillons se sont révélés positifs par dosage de prédiction immuno-enzymatique de la membrane, mais négatifs en culture.

Tableau no 6: Comparaison du **SimulFluor® RSV/Flu A** versus l'EIA de prédiction de la membrane

Dispositif de prédiction	EIA positif	EIA négatif	Total
SimulFluor® RSV/Flu A positif	82 (97)	24 (9)*	106 (108)
SimulFluor® RSV/Flu A négatif	2	122	124
Total	82 (99)	146 (131)	230

*15 échantillons négatifs par EIA de la membrane ont donné des résultats positifs en culture

() indique les valeurs ajustées suite à la confirmation par culture

Sensibilité relative : (97/99) 98 % (intervalle de confiance à 95 % : 92,9 à 99,7 %)

Spécificité relative : (122/131) 93,1% (intervalle de confiance à 95 % : 87,4 à 96,8 %)

Tableau no 7: Comparaison du **SimulFluor® RSV/Flu A** versus le dispositif de prédiction

Dispositif de prédiction pour SimulFluor®RSV/Flu A	Culture positive	Culture négative	Total
SimulFluor® RSV/Flu A positif	88	2*	90
SimulFluor® RSV/Flu A négatif	0	183	184
Total	88	185	274

*1 échantillon s'est également révélé positif par EIA de la membrane

Sensibilité relative : (88/90) 97,8% (intervalle de confiance à 95 % : 92,2 à 99,7 %)

Spécificité relative : (183/185) 98,9 % (intervalle de confiance à 95 % : 96,1 à 99,9 %)

Quatre spécimens étaient positifs pour le RSV et l'influenza A. Trois ont été identifiés par le réactif **SimulFluor® RSV/Flu A** dans des échantillons directs et tous les quatre RSV ont été identifiés par les deux réactifs en culture.

Détection de l'Influenza A

Vingt-trois échantillons se sont révélés positifs pour l'influenza A avec le dispositif de prédiction en culture ; un échantillon s'est révélé positif avec le réactif **SimulFluor® RSV/Flu A** lors de tests sur échantillons directs et en culture, mais il était négatif en culture avec le dispositif de prédiction. Trois échantillons étaient positifs pour le RSV et l'influenza A en culture et 1 double infection par le CMV a été identifiée. Sur les 32 échantillons qui étaient inappropriés pour les tests avec le **SimulFluor® RSV/Flu A**, 1 seul s'est avéré positif pour l'influenza A en culture.

Tableau no 8: Détection de l'Influenza A dans des échantillons directs et la culture

Dispositif de prédiction	Direct positif	Direct négatif	Culture positive	Culture négative
SimulFluor® RSV/Flu A positif	20	4	23	1
SimulFluor® RSV/Flu A négatif	2	216	0	250
Total	22	220	23	251

Sensibilité relative de l'échantillon direct *versus* culture = 83,3 % (20/24)
 (Intervalle de confiance à 95 % : 62,6 à 95,3 %)

Spécificité relative de l'échantillon direct *versus* culture = 98,1 % (216/220)
 (Intervalle de confiance à 95 % : 95,4 à 99,5 %)

Confirmation bactériologique de sensibilité relative = 95,8 % (23/24)
 (Intervalle de confiance à 95 % : 78,9 à 99,9 %)

Confirmation bactériologique de spécificité relative = 99,6 % (250/251)
 (Intervalle de confiance à 95 % : 97,8 à 100 %)

Un dosage immuno-enzymatique de prédiction de la membrane a été utilisé pour tester la présence d'influenza A dans onze écouvillonnages pharyngés prélevés sur des adultes pensionnaires d'une maison de soins. Le réactif **SimulFluor® RSV/Flu A** était unanime avec la culture et a permis d'identifier l'influenza A dans 3 échantillons alors que le dosage immuno-enzymatique de prédiction de la membrane a permis d'identifier 1 échantillon infecté par l'influenza A.

Tableau no 9: Comparaison du **SimulFluor® RSV/Flu A** versus l'EIA de prédiction de la membrane

Dispositif de prédiction	Direct positif	Direct négatif	Total
SimulFluor® RSV/Flu A positif	1 (3)	2* (0)	3
SimulFluor® RSV/Flu A négatif	0	8	8
Total	1(3)	10	11

*Tous les deux ont été confirmés positifs pour l'influenza A par culture

() indique les valeurs ajustées suite à la confirmation par culture

Sensibilité relative : (3/3) 100 % (intervalle de confiance à 95 % : 29,2 à 100 %)

Spécificité relative : (11/11) 100 % (intervalle de confiance à 95 % : 71,5 à 100 %)

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.

©2012 EMD Millipore Corporation, une division de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne. Tous droits réservés. EMD, EMD Millipore, Millipore, la marque M, Light Diagnostics, SimulFluor 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.



3129

August 2012
Revision A; 3129CESUPPMAN