



Kit d'identification des entérovirus D3 IFA.

UTILISATION POUR LE DIAGNOSTIC *IN VITRO*

R_x ONLY



USAGE PRÉVU

Le Diagnostic Hybrids, Inc. D³ IFA Enterovirus Identification Kit est destiné à être utilisé dans le cadre de l'identification qualitative des entérovirus dans des cultures cellulaires, par immunofluorescence.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Les entérovirus (genre entérovirus, famille des *Picornaviridae*) figurent parmi les virus les plus courants infectant les humains dans le monde. Les entérovirus sont de petits virus (d'environ 30 nm) à ARN simple brin non enveloppés ayant une capsidie icosaédrique composée de 60 sous-unités constituées de quatre protéines structurales (VP1 à VP4). Les entérovirus sont associés à divers syndromes cliniques allant de la maladie fébrile mineure à de graves pathologies potentiellement fatales (par ex. méningite aseptique, encéphalite, paralysie, myocardite et sepsie entérovirale néonatale) ; ils peuvent être liés au développement de certaines pathologies chroniques (par ex. diabète de type 1 et cardiomyopathie dilatée).^{1,2} On estime que chaque année aux États-Unis, 10 à 15 millions d'infections symptomatiques à entérovirus se déclarent.³

Les entérovirus humains sont traditionnellement classés en echovirus, virus Coxsackie de groupe A et B et poliovirus. Cette taxonomie classique se basait sur la maladie associée dans les systèmes modèles humains et animaux, entraînant parfois un chevauchement entre les groupes et des difficultés de classification. Par conséquent, au début des années 1960, les entérovirus nouvellement découverts ont été désignés numériquement (par ex. entérovirus 71) au lieu d'être classés dans l'un des groupes classique.^{1,4}

La taxonomie actuelle⁴ prend en compte les caractéristiques moléculaires et biologiques et divise les entérovirus humains en quatre espèces (entérovirus humains [EVH] A, B, C et D) ; elle conserve toutefois les noms classiques de chaque sérotype. Les techniques moléculaires de typage de l'entérovirus étant de plus en plus pratiquées, de nouveaux entérovirus continuent à être identifiés ; les entérovirus 79 à 101 ont été décrits récemment (CDC, données non publiées, 2005).

Les echovirus 22 et 23 ont été reclassés dans un nouveau genre (*Parechovirus*) dans la famille des *Picornaviridae* et sont respectivement appelés parechovirus humains 1 et 2.^{4,5} Bien qu'ils appartiennent à des genres génétiquement et biologiquement distincts, les parechovirus et entérovirus humains partagent de nombreuses caractéristiques épidémiologiques et cliniques.⁴

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Le Diagnostic Hybrids, Inc. D³ IFA Enterovirus Identification Kit utilise un mélange d'anticorps monoclonaux (Mab) murins spécifiques de l'antigène de l'entérovirus VP1 qui permet d'identifier rapidement les antigènes d'entérovirus dans les cultures cellulaires lorsqu'il est associé à un anticorps anti-souris marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.

Les cellules à tester sur une lame préparée à partir d'une culture cellulaire en tube classique ou une couche monocellulaire en shell-vial sont fixées dans de l'acétone. L'Enterovirus MAb Reagent est ajouté aux cellules. Après une incubation de 30 minutes entre 35 °C et 37 °C, les cellules colorées sont lavées avec la solution diluée 1X du salée tamponnée au phosphate (1XPBS). L'Anti-mouse Conjugate, marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), est ajouté aux cellules. Après une incubation de 30 minutes entre 35 °C et 37 °C, les cellules colorées sont à nouveau lavées avec le 1X PBS frais. Pour préparer la lame en vue de l'examen, une goutte de Mounting Fluid fourni est ajoutée aux cellules colorées et un couvre-objet est placé sur la lame. Pour préparer les cultures cellulaires améliorées par centrifugation en vue de l'examen, une goutte de Mounting Fluid est placée sur une lame de microscope propre. Le couvre-objet est retiré du shell-vial et placé sur une goutte de Mounting Fluid. Pour les plaques multipuits, le Mounting Fluid est ajouté dans chaque puits pour recouvrir les monocouches. Les lames ou les puits sont examinés à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé d'un système de filtre adapté FITC, à un grossissement de 200-400X. Les cellules infectées par le virus sont colorées par une fluorescence de couleur vert-pomme brillante, tandis que les cellules non infectées contiennent pas de fluorescence vert-pomme, mais émettent une fluorescence rouge terne due au contre-colorant de bleu d'Evans.⁶

RÉACTIFS MAIS EMETTENT

Le Diagnostic Hybrids, Inc. D³ IFA Enterovirus Identification Kit contient les éléments suivants :

Enterovirus MAb Reagent

5 ml

Réactif MAb de l'entérovirus) Un flacon compte-gouttes contenant un mélange d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre les antigènes d'entérovirus. La solution aqueuse tamponnée et stabilisée contient de l'azoture de sodium à 0,1 % comme conservateur.

Anti-mouse Conjugate

5 ml

(Conjugué anti-souris) Un flacon compte-gouttes contenant des anticorps anti-souris marqués FITC. La solution tampon, stabilisée et aqueuse, contient du bleu d'Evans, utilisé comme contre-colorant et de l'azoture de sodium à 0,1 %, utilisée comme conservateur.

Enterovirus Antigen Control Slides

5 lames

(Lames de contrôle d'antigènes de l'entérovirus) Cinq (5) lames de contrôle emballées individuellement contenant des puits avec des cellules de contrôle positives et négatives dérivées de la culture cellulaire. Chaque puits positif contient un virus infectieux, à savoir, echovirus, coxsackie A, etc. Le puits négatif contient des cellules non infectées. Chaque lame est conçue pour être colorée une fois uniquement.

40X PBS Concentrate

25 ml

(PBS concentré 40X) Un flacon contenant une solution concentrée 40X de PBS contenant de l'azoture de sodium à 4 % (concentration finale d'azoture de sodium à 0,1 % après dilution avec de l'eau déminéralisée jusqu'à une concentration 1X).

Mounting Fluid

7 ml

(Liquide de montage) Un flacon compte-gouttes contenant une solution tampon, stabilisée et aqueuse de glycérol et de l'azoture de sodium à 0,1 %.

PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- Un microscope à fluorescence avec la combinaison de filtre appropriée pour lecture de fluorescence FITC (pic d'excitation = 490 nm, pic d'émission = 520 nm) ; le grossissement 200X à 400X.
- Culture de cellules pour l'isolement d'entérovirus. Les lignées cellulaires suggérées,⁷ incluent BGMK, A549, fibroblaste diploïde humaine, cellules RD, Super E-Mix™ MixedCells™ et les cellules primaires de reins de singes rhésus. Toutes sont disponibles auprès de Quidel.
- Virus vivants de contrôle pour les contrôles positifs de culture: Souches connues d'entérovirus utilisées pour surveiller la culture de cellules et les procédures de coloration. Ces souches virales de contrôle sont disponibles auprès de Quidel.
- Lamelles couvre-objet (22 x 50 mm) pour les Antigen Control Slides et les lames d'échantillons.
- Universal Transport Medium (disponible chez Quidel).
- E-Mix Refeed Medium ou tout autre milieu d'ensemencement standard. Disponibles chez Quidel.
- Acétone de qualité réactif (pure >99 %) réfrigéré entre 2 °C et 8 °C pour permettre la fixation des lames d'échantillon préparées, shell-vials et les préparations cultivées de cellule.

REMARQUES :

- ▶ Maintenir le récipient d'acétone de qualité réactif hermétiquement fermé afin d'éviter l'absorption hygroscopique d'eau, pouvant causer une fluorescence de fond diffuse, non spécifique.
- ▶ Un mélange de 80 % d'acétone / 20 % d'eau déminéralisée doit être utilisé pour fixer les cellules dans les plaques multipuits en plastique. Conserver à température ambiante (20 °C et 25 °C).
- Pipettes graduées stériles : 10 ml, 5 ml et 1 ml.
- Pipettes Pasteur stériles ou autres pipettes de transfert.
Attention: Ne pas utiliser de solvants tels que l'acétone avec des pipettes de transfert en polyéthylène.
- Pincettes à embout fin.
- Bouteille de lavage 200 ml.
- Filtre pour seringue stérile de 0,45 µm.
- Seringue stérile de 3 ml.
- Aiguille à dissocier à embout plié (pour le retrait de la lamelle couvre-objet d'une shell-vial) ; présenter l'aiguille à dissocier en courbant l'extrémité d'une aiguille à seringue ou un objet similaire (par exemple, une aiguille à dissocier de mycologie) contre une table de travail ou à l'aide d'une paire de pincettes, en prenant soin de ne pas se blesser.
- Solution d'hypochlorite de sodium (dilution finale 1:10 de javel domestique).
- Chambre humidifiée (par exemple, une boîte de Petri avec un essuie-tout humide placé au fond de la boîte).
- Lames de microscope en verre.
- Lames de microscope multipuits en verre nettoyées à l'acétone
- Buvards pour lames de microscope en verre multipuits: Buvards absorbants à 2 puits, utilisés pour absorber l'excès de liquide afin d'éviter la dispersion du liquide ou des cellules colorées d'un puit à un autre.
- Écouvillons stérile en nylon floqué ou en polyester, non inhibiteur à des virus et de culture cellulaire.
- Incubateur, entre 35 °C et 37 °C (5 % de CO₂ ou non-CO₂, en fonction du type de culture cellulaire utilisé).
- Centrifugeuse avec rotor à ailettes à oscillation libre.
- Eau déminéralisée pour la dilution du 40X PBS Concentrate et pour la dilution de l'acétone de qualité réactif fixation des cellules ans les plaques multipuits en polystyrène.
- Configuration de l'aspirateur : Aspirateur avec trappe de désinfectant contenant de l'eau de javel domestique (5 %) en quantité suffisante pour que la concentration ne diminue pas plus de 10 fois, lorsqu'elle est diluée avec les liquides rejetés.
- Récipient de lavage : Bécher, bouteille de lavage ou bocal Coplin pour le lavage des lames.
- Récipient de fixation : Bocal Coplin, cuvette pour lames ou support en polyéthylène pour lames, utilisés pour fixer les cellules sur les lames.

- Microscope léger inversé : Utilisé pour examiner les monocouches préalablement à l'inoculation et à l'examen de la toxicité, la confluence et de l'ECP. Sa capacité de grossissement doit être comprise entre 40X et 100X.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

- Utilisation pour le diagnostic *in vitro*.
- Aucune méthode de test connue ne peut garantir l'absence d'agents infectieux ; par conséquent, tous les dérivés du sang humain, les réactifs et les échantillons humains doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Il est recommandé que les réactifs et les échantillons cliniques soient manipulés conformément à l'OSHA Standard on Bloodborne Pathogens.
 - ▶ Les cultures cellulaires sont potentiellement dangereuses. Le personnel travaillant avec ces cultures doit être convenablement formé aux techniques de manipulation en toute sécurité ;^{7,8,9} il doit également posséder une expérience avec la culture cellulaire avant d'appliquer cette procédure.
 - ▶ Toutes les procédures doivent être suivies conformément au CDC 5th Edition Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 2007, et CLSI Approved Guideline M29-A, Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue.
- Tous les échantillons et les matériels utilisés pour les traiter doivent être considérés comme potentiellement dangereux et doivent être manipulés de manière à éviter l'infection du personnel du laboratoire.
 - ▶ Les pratiques de biosécurité de niveau 2 ou les autres pratiques appropriées de biosécurité doivent être utilisées dans le cadre de la manipulation de ces matériels. pour les autres produits infectieux.
 - ▶ Décontaminer des spécimens et les cultures utilisant une 1:10 dilution finale de javel domestique.
 - ▶ Bien que les Antigen Control Slides ne soient pas censées être infectieuses, la manipulation et l'élimination doivent s'effectuer en suivant les mêmes précautions que celles adoptées pour les autres produits infectieux.
- L'acétone, réactif requis pour le test mais non fourni dans le kit, est un solvant organique volatil et inflammable. Il convient de l'utiliser dans un espace bien ventilé et à l'écart de toute flamme.
- Ne jamais porter les réactifs de la pipette ou les échantillons cliniques à la bouche, éviter le contact des échantillons cliniques avec la peau éraflée.
- Le contre-colorant bleu d'Evans est un agent cancérigène potentiel. En cas de contact avec la peau, rincer immédiatement avec de l'eau.
- L'Enterovirus MAb Reagent et le Anti-mouse Conjugate sont fournis prêts à l'emploi. Toute dilution de ce réactif diminuera sa sensibilité.
- Les réactifs doivent être utilisés avant leur date de péremption.
- Chaque Enterovirus Antigen Control Slide est à usage unique. Ne pas les réutiliser une lames de contrôle.
- Une contamination microbienne des réactifs peut entraîner une diminution de sa sensibilité.
- Stocker le 1X PBS dans un récipient propres pour empêcher de la contamination.
- Éviter d'éclabousser et la production d'aérosols avec les échantillons cliniques.
- Utiliser une technique aseptique ainsi que des équipements et des matériels stérilisés pour toutes les procédures de culture de cellules.
- Les articles de verre réutilisables doivent être nettoyés et rincés abondamment pour supprimer toute trace de détergent.
- Ne pas exposer l'Enterovirus MAb Reagent, ni l'Anti-mouse Conjugate, à une forte lumière pendant la coloration ou le stockage.
- L'azoture de sodium est inclus à 4 % dans la 40X Wash Solution Concentrate et à 0,1 % dans les autres solutions de ce kit.
 - ▶ L'azide de sodium est considéré comme toxique. En cas d'ingestion de PBS concentré 40X, consulter immédiatement un médecin.

- ▶ Mélangées à des acides, les solutions aqueuses d'azoture de sodium peuvent dégager des gaz toxiques.
- ▶ Éviter d'éliminer ces solutions par les installations sanitaires ou les canalisations industrielles. L'azoture de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des conduites et former des azotures métalliques hautement explosifs.
- ▶ Éviter de les déverser dans l'environnement.
- L'utilisation d'autres réactifs que ceux spécifiés avec les composants de ce kit peut fausser les résultats.
- Le test doit être effectué dans une zone suffisamment ventilée.
- Éliminer les contenants et les contenus non utilisés conformément aux exigences fédérales, nationales et réglementations réglementaires locales.
- Porter des gants et des lunettes de protection, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire en manipulant cette kit.
- Lavez-vous soigneusement les mains après manipulation.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et l'élimination des composants de ce kit, veuillez vous référer à la Fiche de données de sécurité (FDS) que vous trouverez sur quidel.com.

Préparation de 1X PBS

En cas de stockage à une température comprise entre 2 °C et 8 °C, certains sels du 40X PBS Concentrate peuvent cristalliser. Ramener la solution à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) pour dissoudre les cristaux et mélanger. Mélanger le contenu du 40X PBS Concentrate 25 ml entièrement dissous dans 975 ml d'eau déminéralisée. Marquer le 1X PBS avec une date de péremption à soixante (60)-jours après la reconstitution et stocker à température ambiante.

Instructions de conservation

Tableau 1 : Conditions de conservation du réactif

Enterovirus MAb Reagent	
Anti-mouse Conjugate	Stocker entre 2 °C et 8 °C à l'abri de la lumière
Mounting Fluid	
Enterovirus Antigen Control Slides	Stocker entre 2 °C et 8 °C
40X PBS Concentrate	
REMARQUE : Le Concentré peut cristalliser s'il est stocké entre 2 °C et 8 °C. Les cristaux se dissolvent lorsque le Concentré est réchauffé à température ambiante.	Stocker le liquide entre 2 °C et 8 °C préalablement à la dilution
1X PBS	Stocker à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C)

Stabilité

Les réactifs et des composants conservent leur pleine efficacité jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de chaque flacon, à condition que le stockage s'effectue conformément aux températures recommandées. L'exposition à la lumière d'Enterovirus MAb Reagent et Anti-mouse Conjugate doit être la plus limitée possible.

Éliminer le 1X PBS s'il devient trouble.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Le prélèvement et la manipulation appropriés de l'échantillon du patient sont les facteurs les plus importants pour réussir la détection de l'entérovirus. Le prélèvement de l'échantillon, son traitement et la culture

cellulaire des virus ne doivent être effectués que par un personnel formé à de telles procédures. Veiller à ne pas produire d'aérosols pendant le prélèvement et la manipulation des échantillons.

Se référer à CLSI Approved Viral Culture Guidelines pour le prélèvement de l'échantillon et les recommandations de traitement.¹⁰

Prélèvement de l'échantillon^{11,12}

Les échantillons acceptés en culture d'entérovirus incluent : écouvillons ou lavages pharyngés, liquide céphalo-rachidien, tissu oculaire, lésions vésiculaire ou ulcéreuse, et selles. Les échantillons doivent être reçus dans un milieu de transport viral.

Sinon, ils doivent être transférés dans un tube de milieu de support dès réception.

Transport et stockage de l'échantillon

Tous les agents potentiellement infectieux doivent être transportés conformément à la réglementation de l'International Air Transport Association (IATA), International Civil Aviation Organization, (ICAO), Titles 42 et 49 de l'US Code of Federal Regulations, ou aux autres exigences réglementaires en vigueur.

Les échantillons doivent être transportés vers le laboratoire à des températures comprises entre 2 °C et 8 °C. Ces températures s'obtiennent en utilisant des packs réfrigérants, des bains de glace, un réfrigérant mousse ou d'autres réfrigérants.¹³ L'échantillon doit être traité et testé dès que possible puis conservé entre 2 °C et 8 °C.

Les échantillons doivent être conservés entre 2 °C et 8 °C pendant 2 jours maximum avant d'être testés. Si un temps de stockage plus long est requis, les échantillons doivent être congelés à une température d'au moins -70 °C.

La congélation et la décongélation des échantillons doivent être évitées car cela entraîne une perte de viabilité des virus et une baisse de la sensibilité du test.

PROCÉDURE

Commentaires et précautions préliminaires

- Respecter les volumes et les durées recommandés dans la procédure suivante pour garantir l'exactitude des résultats obtenus.
- Pour les écouvillons d'échantillon reçus dans des milieux de transport viral avec billes de verre, agiter pendant environ 15 secondes pour dissocier les cellules collées. Transférer les écouvillons d'échantillons qui n'ont pas été transmis dans des milieux de transport viral dans un milieu de transport viral contenant des billes de verre et agiter pendant environ 15 secondes pour dissocier les cellules collées.
- Pendant la coloration à l'aide de réactifs fluorescents et l'examen des cellules au microscope pour déterminer la fluorescence, il est très important d'inclure les contrôles, à la fois positifs et négatifs, pour surveiller la procédure et les performances des réactifs. Il est recommandé de réaliser ces contrôles pour chaque série de patient.
- Lieu fermé, chambre humidifiée pour la tenue de lames pendant la coloration de l'incubateur de l'équilibre à 35 °C à 37 °C avant de les colorer. En faisant cela, les lames et de réactifs viendront rapidement à la température, rendant plus rapide, intense coloration.
- Apportez l'Enterovirus MAb Reagent et l'Anti-mouse Conjugate à la température ambiante (20 °C et 25 °C) avant utilisation, et de revenir immédiatement au réfrigérateur après son utilisation pour le stockage de 2 °C et 8 °C.

Tests de culture cellulaire :

- Selon les bonnes pratiques de laboratoires, les contrôles de virus positifs et négatifs doivent être effectués avec chaque nouveau lot de cellules afin de confirmer leur performance dans la culture de virus spécifiques.
- Il est d'usage de conserver le milieu de culture retiré des monocouches jusqu'à l'obtention des résultats de coloration. En cas de doute sur les résultats des échantillons, le milieu peut être transféré sur une autre couche monocellulaire et incubées pour la période appropriée afin de recommencer le test.
- Lors de l'utilisation des cultures cellulaires en multi-puits des plaques de polystyrène, diluer le fixateur d'acétone à 80 % en ajoutant 20 ml d'eau déminéralisée à 80 ml.
- Ne pas laisser les monocouches sécher avant la fixation ; cela peut provoquer un bruit de fond et une diminution de la sensibilité.
- Ne pas laisser l'Enterovirus MAb Reagent, ni l'Anti-mouse Conjugate sécher sur les monocouches ce qui peut provoquer un bruit de fond élevé.

L'immunofluorescence :

- Examiner les contrôles positifs et négatifs avant de procéder aux examens des échantillons de test. Si l'un d'entre eux ne permet pas d'obtenir les résultats escomptés, vérifier les étapes et les conditions dans lesquelles le test a été effectué afin d'en déterminer la(les) cause(s) fondamentale(s). Ne pas reporter les résultats pour les échantillons des patients avant que les contrôles n'aient été validés.
- Les trois aspects du microscope à fluorescence, devant obligatoirement fonctionner de manière appropriée et optimale afin d'obtenir une clarté maximale de fluorescence, sont les suivants :
 - ▶ La source de lumière d'activation a une vie définie et, au fil du temps, son rendement décroît, aboutissant à une diminution de l'intensité de fluorescence provenant de l'Anti-mouse Conjugate.
 - ▶ La source de lumière est concentrée par un nombre de lentilles et de miroir(s). Pour obtenir une intensité maximale, ceux-ci doivent être correctement alignés.
 - ▶ Les filtres utilisés dans le trajet de la lumière doivent être appropriés à la fluorescence spécifique, dans ce cas, la fluorescéine.
- On observe de nombreux artéfacts fluorescents dans les couches monocellulaires examinées :
 - ▶ Morphologiquement, les artéfacts de fluorescence n'ont pas l'aspect d'une cellule complète et typiquement n'apparaissent pas sur le plan de la monocouche. Des débris cellulaires peuvent adsorber de façon non spécifique l'Anti-mouse Conjugate en entraînant une fluorescence intense.
 - ▶ Une fluorescence jaune-vert de faible intensité est parfois observée, en particulier dans les zones où les cellules sont empilées ou à proximité de trous dans la couche monocellulaire. Dans les deux cas, la diffusion d'Anti-mouse Conjugate piégés est retardée pendant l'étape de lavage, générant une fluorescence non spécifique.
 - ▶ Une fluorescence intense autour de la périphérie des puits de lame est indicative du séchage du Anti-mouse Conjugate pendant l'incubation, suggérant que le temps d'incubation est trop long ou que l'humidité n'était pas bien contrôlée.
 - ▶ Un lavage inapproprié peut entraîner une fluorescence de faible intensité, à cause d'Anti-mouse Conjugate résiduels restant sur la monocouche de cellules.
- Protégez les lames colorées et des monocouches de la lumière autant que possible pendant les tests.
 - ▶ Blanchiment ou la décoloration de la fluorescence de cellules colorées peut se produire sur l'exposition à la lumière, en particulier à une lumière de forte intensité.
 - ▶ Ce blanchiment peut survenir lorsqu'une cellule colorée est visualisée dans un microscope à fluorescence pour une période de temps prolongée.

Préparation de l'échantillon

Aucune exigence particulière ne s'applique au traitement des échantillons en vue de la culture entérovirale.¹⁵ Les échantillons doivent être traités conformément à la procédure établie par le laboratoire.

Essais de culture de cellules – Culture en tube

1. Examiner les monocouches pour en vérifier la morphologie avant l'inoculation.
2. Aspirer le milieu d'entretien des monocouches, puis ajouter 0,2- à 0,4 ml de chaque échantillon préparé (voir *Préparation des échantillons*) à chacune des lignées cellulaires utilisé pour les cultures d'entérovirus.
3. Placer les tubes selon un angle suffisant pour pouvoir recouvrir les monocouches d'inoculum. Placer les tubes dans un incubateur pendant 1 heure entre 35 °C et 37 °C pour permettre laisser l'adsorption du virus.
4. Après adsorption, ajouter 2 ml du milieu d'ensemencement approprié.
5. Incuber les tubes entre 35 °C et 37 °C dans un bidon à rouleaux entre 1 et 3 tr/min ou sur un plateau fixe suffisamment incliné pour recouvrir les monocouches d'inoculum et de milieu. Examiner quotidiennement les monocouches pour détecter un ECP.
6. Une fois les monocouches prêtes à être colorées, retirer le milieu en aspirant et rincer légèrement les monocouches deux fois avec 1-ml de 1X PBS.
7. Ajouter 0,5-ml de 1X PBS dans le tube, puis préparer une suspension des cellules en grattant la couche monocellulaire à l'aide d'une pipette, puis en rompant les agrégats de cellules en pipetant par allers-retours successifs.
8. Préparer les dépôts cellulaires à l'aide de 25 µL de suspension sur une lame nettoyée à l'acétone. Répéter cette étape pour chaque échantillon. Répéter cette étape pour chaque échantillon.
9. Laisser sécher complètement les puits à l'air.
10. Fixer les cellules sur les lames à l'aide d'acétone à 100%, fraîche et réfrigéré. Laisser agir pendant 5 à 10 minutes, entre 20 °C et 25 °C.

Attention : L'acétone est volatile et inflammable ; éviter des flammes ouvertes.

11. Retirer les lames du fixateur et laisser sécher à l'air.
12. Ajouter une goutte d'Enterovirus MAb Reagent pour recouvrir intégralement les cellules séchées, fixées sur la lame.
13. Placer les lames dans un incubateur humidifié entre 35 °C et 37 °C pendant 30 minutes.
14. Rincer les cellules colorées à l'aide de 1XPBS. Il est possible d'effectuer le rinçage à l'aide d'un bécher de 1X PBS (pour un petit nombre de lames uniquement). Pour rincer plusieurs lames, placer un porte-lame contenant entre 10 et 20 lames dans son récipient de 1X PBS. Pour effectuer un rinçage efficace, immerger la ou les lames avec un mouvement de va et vient vertical, répéter l'action au moins quatre fois.
15. Jeter le 1X PBS usagé et recommencer l'étape de lavage avec un nouveau 1X PBS.
16. Absorber doucement l'excès de liquide.
17. Ajouter une goutte d'Anti-mouse Conjugate pour recouvrir intégralement les cellules séchées fixées sur les lames.
18. Placer les lames dans un incubateur humidifié entre 35 °C et 37 °C pendant 30 minutes.
19. Rincer les cellules colorées à l'aide de 1X PBS. Il est possible d'effectuer le rinçage à l'aide d'un bécher de 1X PBS (pour un petit nombre de lames uniquement). Pour rincer plusieurs lames, placer un porte-lame contenant entre 10 et 20 lames dans son récipient de 1X PBS. Pour effectuer un rinçage efficace, immerger la ou les lames avec un mouvement de va et vient vertical, répéter l'action au moins quatre fois.
20. Jeter le 1X PBS usagé et recommencer l'étape de lavage avec un nouveau 1X PBS.
21. Rincer les cellules colorées avec de l'eau déminéralisée. Il est possible d'effectuer le rinçage à l'aide d'un bécher d'eau déminéralisée (pour quelques lames uniquement). Pour rincer plusieurs lames, placer un porte-lame contenant entre 10 et 20 lames dans son récipient avec de l'eau déminéralisée. Pour effectuer un rinçage efficace, immerger la ou les lames avec un mouvement de va et vient vertical, répéter l'action au moins quatre fois.
22. Absorber doucement l'excès de liquide.
23. Ajouter une petite goutte de Mounting Fluid dans chaque puits contenant les cellules et couvrir les puits avec un couvre-objet.

24. Examiner les cellules colorées montées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec grossissement de 200X à 400X (l'immunofluoromicroscopie).
25. Consulter la Interprétation des Résultats.

Test sur culture cellulaire – Shell-vial

1. Calculer le nombre de shell-vials nécessaires en fonction du protocole de coloration à utiliser (ce protocole de coloration requiert 2 shell-vials) :
 - ▶ Un shell-vial est nécessaire pour chaque jour de culture ; le dépistage sera réalisé avec le D³ IFA Enterovirus Identification Kit (c'est-à-dire coloration après 48- à 72-heures, puis entre 5- et 7-jours ; 2 shell-vials sont nécessaires).
2. Examiner les monocouches pour en vérifier la morphologie avant l'inoculation.
3. Aspirer le milieu d'entretien des monocouches et ajouter 1 ml de milieu d'ensemencement approprié dans chaque shell-vial.
4. Ajouter entre 0,2 et 0,4 ml d'échantillon préparé dans chaque shell-vial.
5. Centrifuger les shell-vials à 700 xg pendant 1 heure entre 20 °C et 25 °C.
6. Placer les shell-vials fermés par un capuchon dans une étuve entre 35 °C et 37 °C.
7. Lorsqu'une couche monocellulaire est prête à être colorée à l'aide d'Enterovirus MAb Reagent, retirer le milieu et ajouter 1 ml de 1X PBS.
8. Agiter par rotation pour mélanger, puis aspirer.
9. Répéter ce lavage avec un 1 ml supplémentaire de 1X PBS puis aspirer.
10. Ajouter 1 ml d'acétone à 100 %, fraîche et réfrigéré, et laisser agir pendant 5 à 10 minutes, entre 20 °C et 25 °C.
Attention : L'acétone est volatile et inflammable ; éviter des flammes ouvertes.
11. Retirer de fixatif d'acétone par aspiration.
12. Ajouter 0,5 ml du 1X PBS pour humidifier la monocouche.
13. Agiter par rotation puis aspirer complètement.
14. Ajouter 4 gouttes d'Enterovirus MAb Reagent sur les monocouches fixées des échantillons du patient et de contrôle et imprimer un mouvement de balancier **afin de garantir un recouvrement complet** de la monocouche par le Reagent.
15. Placer les shell-vials fermées par un capuchon dans un incubateur entre 35 °C et 37 °C pendant 30 minutes.
16. Aspirer l'Enterovirus Mab Reagent des monocouches.
17. Ajouter 1 ml du 1X PBS.
18. Retirer le 1X PBS par aspiration, répéter l'étape de lavage, et retirer encore par l'aspiration.
19. Ajouter 4 gouttes d'Anti-mouse Conjugate sur les monocouches inactivées des échantillons du patient et de contrôle et imprimer un mouvement de balancier **afin de garantir un recouvrement complet** de la monocouche par le Conjugate.
20. Placer les shell-vials fermés par un capuchon dans un incubateur entre 35 °C et 37 °C pendant 30 minutes.
21. Aspirer l'Anti-mouse Conjugate des monocouches.
22. Ajouter 1 ml du 1X PBS.
23. Retirer le 1X PBS par aspiration, répéter l'étape de lavage, et retirer encore par l'aspiration.
24. Ajouter 1 ml d'eau déminéralisée.
25. Retirer l'eau déminéralisée par aspiration.
26. Soulever le couvre-objet au fond du shell-vial à l'aide d'une aiguille à l'extrémité courbée sur un corps de seringue et, en le tenant à l'aide de pincettes à extrémité fine, le transférer, côté couche monocellulaire orientée vers le bas, dans une petite goutte de Mounting Fluid, sur une lame de microscope standard.
27. Examiner les monocouches colorées en utilisant un microscope à fluorescence avec des agrandissements compris entre 200X et 400X (l'immunofluoromicroscopie).
28. Consulter *INTERPRETATION DES RESULTATS*.

Test de culture sur cellules – Plaque multipuits

1. Calculer le nombre de puits nécessaires pour le protocole de coloration à utiliser (ce protocole de coloration requiert 2 puits) :
 - ▶ Un puits est nécessaire pour chaque jour de culture ; le dépistage sera réalisé avec le D³ IFA Enterovirus Identification Kit (c'est-à-dire coloration après 48- à 72-heures, puis entre 5- et 7-jours ; 2 puits sont nécessaires).
 - ▶ Il est recommandé de placer chaque dupliqué sur une lame multipuits différente. Cela permet de traiter chacune d'elles le jour déterminé.
2. Examiner les monocouches pour en vérifier la morphologie avant l'inoculation.
3. Aspirer le milieu d'entretien des monocouches et ajouter 1 ml de milieu d'ensemencement approprié à chaque monocouche de plaque à multipuits de 24 puits ; Dans le cas d'utilisation de plaque à 48 puits, ajouter 0,8 ml à chaque monocouche.
4. Ajouter 0,2- à 0,4 ml de l'échantillon préparé au puits approprié d'une plaque multipuits.
5. Centrifuger les plaques multipuits à 700 xg pendant 1 heure entre 20 °C et 25 °C.
6. Placer les plaques multipuits couvertes dans un incubateur entre 35 °C et 37 °C en atmosphère humide à 5 % de CO₂.
7. Lorsqu'une couche monocellulaire est prête à être colorée à l'aide de l'Enterovirus MAb Reagent, retirer le milieu par aspiration et ajouter 1 ml de 1X PBS.
8. Agiter par rotation pour mélanger, puis aspirer.
9. Répéter ce lavage avec un 1 ml supplémentaire de 1X PBS puis aspirer.
10. Ajouter 1 ml d'acétone aqueuse à 80 %. Laisser agir 5 à 10 minutes, entre 20 °C et 25 °C.
REMARQUE : Ne pas laisser le fixatif d'acétone à 80 % dans le puits de polystyrène pendant plus de 10 minutes dans la mesure où il peut précipiter et obscurcir le plastique, rendant ainsi difficile l'examen des monocouches.
Attention : L'acétone est volatile et inflammable ; éviter des flammes ouvertes.
11. Retirer le fixateur par aspiration.
12. Ajouter 0,5 ml de 1X PBS pour humidifier la monocouche.
13. Agiter par rotation puis aspirer complètement.
14. Pour chaque puits d'une plaque 24 à puits, ajouter 4 gouttes d'Enterovirus MAb Reagent aux monocouches fixées des échantillons du patient et des échantillons de contrôle ; pour chaque puits d'une plaque 48 à puits, ajouter 3 gouttes d'Enterovirus MAb Reagent aux monocouches fixées des échantillons du patient et des échantillons de contrôle. Imprimer un mouvement de balancier **afin de garantir un recouvrement complet** de la monocouche par le *Mab Reagent*. Imprimer un mouvement de balancier **afin de garantir un recouvrement complet** de la monocouche par d'Enterovirus MAb Reagent.
15. Placer la plaque multipuits couverte dans un incubateur humidifié entre 35 °C et 37 °C pendant 30 minutes.
16. Aspirer l'Enterovirus MAb Reagent des monocouches.
17. Ajouter 1 ml du 1X PBS.
18. Retirer le 1X PBS par aspiration, répéter l'étape de lavage, et retirer encore par l'aspiration.
19. Pour chaque puits d'une plaque 24 à puits, ajouter 4 gouttes d'Anti-mouse Conjugate aux monocouches fixées des échantillons du patient et des échantillons de contrôle ; pour chaque puits d'une plaque 48 à puits, ajouter 3 gouttes d'Anti-mouse Conjugate aux monocouches fixées des échantillons du patient et des échantillons de contrôle. Imprimer un mouvement de balancier **afin de garantir un recouvrement complet** de la monocouche par le Conjugate.
20. Placer la plaque multipuits couverte dans un incubateur humidifié entre 35 °C et 37 °C pendant 30 minutes.
21. Aspirer l'Anti-mouse Conjugate des monocouches.
22. Ajouter 1 ml du 1X PBS.
23. Retirer le 1X PBS par aspiration, répéter l'étape de nettoyage de nouveau et aspirer à nouveau.
24. Ajouter 1 ml d'eau déminéralisée.

25. Retirer l'eau déminéralisée par aspiration.
26. Ajouter 2-à 3 gouttes du Mounting Fluid à chaque couche monocellulaire, puis couvrir la plaque.
27. Examiner les monocouches colorées en utilisant un microscope à fluorescence avec grossissements entre 200X et 400X (Voir *l'immunofluoromicroscopie*).
28. Consulter *INTERPRETATION DES RESULTATS*.

CONTROLE DE QUALITE

Réactifs

- Une Enterovirus Antigen Control Slide frais doit être colorée chaque fois la procédure de coloration est exécuté afin de s'assurer de la performance correcte du test.
- Le puits positif présentera de nombreuses zones infectées de fluorescence et vert-pomme brillante, les cellules négatives présentant une fluorescence rouge terne en raison de la contre-coloration au bleu d'Evans.
- Le puits négatif ne présentera que les cellules négatives en rouge terne.
- Les contrôles positifs et négatifs doivent présenter la fluorescence appropriée pour que les résultats soient considérés valides. Les Antigen Control Slides peuvent également aider dans l'interprétation du résultat patient.

Culture cellulaire

- Les contrôles positifs et négatifs d'entérovirus doivent être effectués avec chaque nouveau lot de cellules afin de confirmer leur performance dans la culture d'entérovirus.
- Afin de garantir la sensibilité virale, une monocouche de contrôle inoculée par d'enterovirus doit être incluse chaque fois qu'un nouveau lot de culture cellulaire est utilisé.
- Pour chaque lot, une couche monocellulaire non inoculée doit être colorés pour fournir un contrôle négatif. Les conditions défavorables de stockage ou les procédures de manipulation seront aussi reflétés dans le contrôle négatif.
- Si des cultures de contrôle n'ont pas la performance attendue, les résultats sont considérés invalides.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'examen des échantillons et des contrôles

- Il est recommandé de commencer par examiner les contrôles afin de s'assurer d'une performance correcte du test préalablement à l'examen des échantillons.
- Une réaction positive de l'entérovirus dans les cellules infectées apparaît sous forme d'une fluorescence vert-pomme brillante .
- Les cellules non infectées Les cellules non-infectées en fluorescence rouge terne due au contre-colorant bleu d'Evans inclus dans l'Anti-mouse Conjugate.
- Examiner la totalité le dépôt de cellules ou la monocouche de cellules avant de rapporter les résultats finaux.
- Ne pas rapporter de résultat d'échantillons négatifs si les contrôles ne présentent pas les valeurs attendues.

Des artefacts de coloration

- Les bordures desséchées de la monocouche ou des amas cellulaires peuvent présenter une fluorescence non-spécifique due au piégeage de l'anticorps.
- Des cellules mortes, arrondies, peuvent émettre une fluorescence non spécifique de couleur vert-olive terne en raison de la toxicité d'un échantillon ou d'un mode inapproprié de conservation des cellules.
- Un taux d'humidité correctement contrôlé pendant l'étape de révélation et des étapes de lavage adéquates contribuent à éliminer la fluorescence non-spécifique.

Résultats de la Culture Isolation/Confirmation

- La fluorescence vert-pomme brillant est **cytoplasmique**.
- Rechercher dans la totalité du dépôt cellulaire, ou de la monocouche cellulaire, des cellules émettant une fluorescence spécifique d'entérovirus. Si aucune cellule fluorescente n'est observée, mentionner « Aucun entérovirus isolé par culture cellulaire ».
- Si une fluorescence spécifique d'entérovirus est observée, mentionner « Entérovirus isolé par culture cellulaire ».

LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Un prélèvement, un stockage et un transport incorrects des échantillons peuvent entraîner des résultats de culture faussement négatifs.¹⁶
- Les durées ou les températures d'incubation autres que celles citées dans les instructions de test peuvent conduire à des résultats erronés.
- La détection de virus varie considérablement selon la qualité de l'échantillon et la manipulation auquel il est soumis. Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'infection virale. Les résultats du test doivent être interprétés conjointement avec les informations disponibles d'études épidémiologiques, l'évaluation clinique du patient et d'autres procédures de diagnostic.
- Dans la mesure où les anticorps monoclonaux ont été préparés en utilisant des souches définies, ils ne pourront peut-être pas identifier tous les variant antigéniques ou les nouvelles souches d'entérovirus. Les anticorps monoclonaux ne détecteront peut-être pas les souches de virus qui ont connu des changements mineurs d'acides aminés dans la région d'épitope cible.
- Un résultat négatif sur un l'échantillon direct ou cultivé n'exclut pas la présence de virus.
- La performance du kit ne peut être garantie que si les composants utilisés dans le test sont ceux fournis par Quidel.
- Un stockage prolongé de l'Anti-mouse Conjugate sous une lumière forte va diminuer l'intensité de la coloration.
- Une réactivité croisée limitée a été observée avec les adénovirus de types 11 et 16.
- Un léger bruit de fond peut apparaître avec des échantillons contaminés avec des souches de *Staphylococcus aureus* qui contiennent des quantités importantes de protéine A. La protéine A va fixer les portions Fc des anticorps conjugués. Une telle fixation peut se distinguer de la fixation à l'antigène viral sur la base de la morphologie, c'est à dire que la fluorescence liée au *S. aureus* a l'aspect de petits points brillants (~1-micron de diamètre). Les résultats des cultures cellulaires présentant une contamination bactérienne doivent donc être interprétés avec prudence.
- Toute fluorescence **nucléaire** non spécifique présente dans les cellules mises en culture ou sur des lames de contrôle doit être interprétée comme négatif à l'entérovirus.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES SPÉCIFIQUES

Réactivité de l'entérovirus

Un total de 224 isolats cliniques d'entérovirus a été remis en culture et testé à l'aide du D³ IFA Enterovirus Identification Kit sur deux sites (site 1 : 168, site 2 : 56). L'identité de chaque isolat a été déterminée par neutralisation. Le D³ IFA Enterovirus Identification Kit a correctement identifié tous les isolats d'entérovirus par rapport aux résultats de neutralisation. Les données sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Isolats d'entérovirus correctement identifiés par le D³ IFA Enterovirus Identification Kit comparés à des résultats de neutralisation.

Type d'entérovirus	Nombre d'isolats	Type d'entérovirus	Nombre d'isolats
Coxsackie A9	20	Echovirus 9	17
Coxsackie A16	5	Echovirus 11	20
Coxsackie A24	1	Echovirus 13	1
Coxsackie B1	6	Echovirus 14	4
Coxsackie B2	20	Echovirus 15	1
Coxsackie B3	11	Echovirus 18	5
Coxsackie B4	9	Echovirus 21	1
Coxsackie B5	16	Echovirus 24	2
Coxsackie B6	1	Echovirus 25	2
Echovirus 3	3	Echovirus 30	18
Echovirus 4	8	Enterovirus 70	2
Echovirus 5	8	Enterovirus 71	5
Echovirus 6	10	Poliovirus type 1	4
Echovirus 7	12	Poliovirus type 2	5
		Poliovirus type 3	6

Spécificité de l'entérovirus

Le Diagnostic Hybrids, Inc. D³ IFA Enterovirus Identification Kit a été testé en termes de réactivité croisée contre une grande variété de cellules et microorganismes. Aucune réactivité croisée n'a été observée pour 59 souches virales (mises en culture et colorées), ni pour 17 types de cellules de cultures hôtes. Trente deux (32) cultures bactériennes ont été colorées et examinées en termes de réactivité croisée, y compris *Staphylococcus aureus*, une bactérie qui produit de la protéine A. La coloration de *S. aureus* est apparue sous l'aspect de petits points de fluorescence (voir *LIMITATIONS DE LA PROCEDURE*) alors que toutes les autres cultures bactériennes étaient négatives. [Voir les tableaux 3, 4 et 5 ci-dessous pour la liste des organismes qui ont été testés pour la réactivité croisée avec l'Enterovirus MAb Reagent.]

Quarante et une (41) souches de virus ont été testées en termes de réactivité croisée. Aucune réactivité croisée n'a été observée pour les virus listés ci-dessous:

Tableau 3 : Souches de virus testées pour la réactivité croisée

Adénovirus	Type 1	RSV	Long	
	Type 3		Laver	
	Type 5		9320	
	Type 6		Parainfluenza 1	C-35
	Type 7		Parainfluenza 2	Greer
	Type 14		Parainfluenza 3	C 243
	Type 18		HSV-1	1F
	Aichi			CWOH 0026
Mal	CWOH 0015			
Influenza A	Hong-Kong	HSV-2	MacIntyre	
	Denver		MS	
	Port Chalmers	Souche G		
	Victoria	CMV	Towne	
	New Jersey		Davis	

	PR
Influenza B	Hong-Kong
	Maryland
	Mass
	Taiwan
	GL
	Russie

	AD169
Varicelle	Webster
	Ellen
Oreillons	Bion, (CDC V5-004)
Rubéole	Bion
Epstein-Barr	Bion

Dix-huit (18) cellules de culture hôtes ont été testées en termes de réactivité croisée ; aucune réactivité croisée n'a été observée pour les lignées suivantes :

Tableau 4 : Lignées cellulaires testées pour la de réactivité croisée

A549	NCI-H292
BGMK	pCMK
HEp-2	pRhMK
LLC-MK2	pRK
MDCK	RD
MRC-5	RhMK II
MRHF	R-Mix
Mv1Lu	Vero
Super E-Mix	WI-38

Trente deux (32) cultures bactériennes ont été colorées et examinées en termes de réactivité croisée, y compris *Staphylococcus aureus*, une bactérie qui produit de la protéine A (Section VIII.9, Limitations de la Procédure). La coloration de *S. aureus* est apparue avec l'aspect de petits points de fluorescence alors que toutes les autres cultures étaient négatives.

Tableau 5 : Bactéries testées pour la réactivité croisée

Acholeplasma laidlawii	Mycoplasma hominis
Acinetobacter calcoaceticus	Mycoplasma orale
Bordetella bronchiseptica	Mycoplasma pneumoniae
Bordetella pertussis	Mycoplasma salivarium
Candida glabrata	Neisseria gonorrhoeae
Chlamydia psittaci	Peptostreptococcus anaerobius
Chlamydia trachomatis	Proteus mirabilis
Clostridium diphtheriae	Pseudomonas aeruginosa
Escherichia coli	Salmonella enteritidis
Gardnerella vaginalis	Salmonella typhimurium
Haemophilus influenzae type A	Staphylococcus aureus
Klebsiella pneumoniae	Streptococcus agalactiae
Legionella pneumophila	Streptococcus pneumoniae
Moraxella cartarrhalis	Streptococcus pyogenes
Mycobacterium avium	Trichomonas vaginalis
Mycobacterium intracellulare	Ureaplasma urealyticum

Des conditions strictes de test de réactivité croisée ont été obtenues en utilisant une forte concentration de réactifs MAb primaires et des titres élevés de microorganismes. L'Enterovirus MAb Reagent primaire a été préparé à 1,5X de la concentration fournie dans le kit. Le réactif secondaire anti-souris de chèvre marqué à la fluorescéine (*Anti-mouse Conjugate*) a été utilisé tel que fourni dans le kit. Chaque virus testé a été préparé

sous forme de couches monocellulaires infectées (250 cellules infectées inoculées en culture en shell-vial et incubées pendant 24- à 48-heures, afin de présenter une infection 3+ à 4+), puis traitées et colorées avec l'Enterovirus MAb Reagent 1,5X selon la procédure détaillée dans la notice du produit. Les souches bactériennes ont été mises en culture, traitées sous forme de suspensions, puis appliquées sur des lames de microscopes (Rendement > 150 bactéries par champ de microscope à 400X), avant d'être colorées avec l'Enterovirus MAb Reagent 1,5X, conformément à la procédure de la notice du produit. Les cultures cellulaires ont été colorées à confluence.

ASSISTANCE

Pour passer une commande ou obtenir une assistance technique, veuillez contacter un représentant Quidel au 800.874.1517 (aux États-Unis) ou au 858.552.1100 (en dehors des États-Unis), du lundi au vendredi, de 8h00 à 17h00, heure de l'Est. Les commandes peuvent également être passées par fax au 740.592.9820. Pour obtenir de l'aide par e-mail, veuillez écrire à customerservice@quidel.com ou technicalsupport@quidel.com.

Pour des services en dehors des États-Unis, veuillez contacter votre distributeur local. De plus amples informations sur Quidel, nos produits et nos distributeurs sont disponibles sur notre site Internet quidel.com.

BIBLIOGRAPHIE

1. Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knippe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001:723-775.
2. Khetsuriani N, Parashar UD. Enteric viral infections. In: Dale DC, Federman DD, eds. *Scientific American medicine*. New York, NY: WebMD, Inc.; 2003:1758-1766.
3. Strikas RA, Anderson L, Parker RA. Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enteroviruses in the United States, 1970-1983. *J Infect Dis* 1986;153:346-351
4. Stanway G, Brown F, Christian P, et al. *Picornaviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus taxonomy---classification and nomenclature of viruses*. 8th report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Academic Press; 2005:757-778.
5. Stanway G, Joki-Korpela P, Hyypia T. Human parechoviruses---biology and clinical significance. *Rev Med Virol* 2000;10:57-69.
6. Specter, S., Hodinka, R. L., and Young, S.A. 2000, *Clinical Virology Manual*, Washington D.C., ASM Press, 420-424.
7. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, 5th edition, 2007, CDC-NIH manual. [<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/bmbl5toc.htm>]
8. *Biosafety Manual*, 3rd edition, 2004. World Health Organization [Manual may be available in additional languages; refer to WHO web page http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/]
9. *Laboratory Biosafety Guidelines*, 3rd edition, 2004. Published by authority of the Minister of Health, Population and Public Health Branch, Centre for Emergency Preparedness and Response [Guideline is available in French or English; refer to web page [<http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/lbg-ldmbl-04/index.html>]]
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Viral Culture; Approved Guidelines*. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006.
11. Eisenberg, Henry D. 1992. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, published by American Society for Microbiology, Washington DC, p 8.2.3.

12. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Viral Culture: Proposed Guideline*. CLSI document M41-P. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006. pp. 15 - 17
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Viral Culture; Approved Guidelines*. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006, Section 7.4.
14. IBID, pg. 28
15. IBID, pp. 22 – 25
16. Leland, Diane S. (1996). *Clinical Virology*, published by W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

REF

01-050000 – D³ IFA Enterovirus Identification Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Diagnostic Hybrids, Inc. – a subsidiary of Quidel Corporation

2005 East State Street, Suite 100

Athens, OH 45701 USA

quidel.com

PI1780001EN00 (04/19)

GLOSSAIRE

REF

Référence catalogue



Conformité Européenne

EC REP

Représentant autorisé dans
la Communauté Européenne

LOT

Référence du lot



Date d'expiration



Fabricant



Conditions de stockage



Utilisation prévue

Rx ONLY

Sur prescription médicale uniquement



Consulter les instructions
électroniques



Ne pas réutiliser

IVD

Utilisation pour diagnostic *in vitro*



25 to 40

Contient une quantité suffisante pour
25 à 40 déterminations

CONT NaN₃

Contient de l'azoture de sodium

NaN₃ 4%

Contient 4% l'azoture de
sodium sans dilution
