



## Pour l'identification qualitative des entérovirus par immunofluorescence dans les cultures cellulaires.

Pour diagnostic *in vitro*.

Un glossaire des symboles peut être consulté sur [quidel.com/glossary](http://quidel.com/glossary).



### UTILISATION PRÉVUE

Diagnostic Hybrids, Inc. D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit est destiné à être utilisé pour l'identification qualitative des entérovirus par immunofluorescence dans les cultures cellulaires.

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Les entérovirus (genre *Enterovirus*, famille des *Picornaviridae*) comptent parmi les virus les plus courants infectant l'homme dans le monde. Les entérovirus sont des virus à ARN monocaténaire de petite taille (environ 30 nm), non enveloppés, avec une capsidie icosaédrique composée de 60 sous-unités comprenant quatre protéines structurelles (VP1 à VP4). Les entérovirus sont associés à divers syndromes cliniques allant d'une maladie fébrile mineure à des affections graves, potentiellement mortelles (par exemple, méningite aseptique, encéphalite, paralysie, myocardite et septicémie entérovirale néonatale) et pourraient être liés au développement de certaines maladies chroniques (par ex. diabète de type 1 et cardiomyopathie dilatée).<sup>1,2</sup> Chaque année, on estime que 10 à 15 millions d'infections symptomatiques à entérovirus se produisent aux États-Unis.<sup>3</sup>

Les entérovirus humains sont généralement classés en échovirus, coxsackievirus des groupes A et B et poliovirus. Cette taxonomie traditionnelle était basée sur la maladie associée chez l'homme et les systèmes de modèles animaux, ce qui entraîne parfois des chevauchements entre les groupes et des difficultés de classification. Par conséquent, à partir des années 1960, les entérovirus nouvellement découverts ont reçu une désignation numérique (par ex. l'entérovirus 71) au lieu d'être assignés à l'un des groupes traditionnels.<sup>1,4</sup>

La taxonomie actuelle<sup>4</sup> tient compte des caractéristiques moléculaires et biologiques et divise les entérovirus humains en quatre espèces (entérovirus humains [EVH] A, B, C et D) mais conserve les noms traditionnels des sérotypes individuels. Les techniques moléculaires de typage des entérovirus étant de plus en plus répandues, de nouveaux entérovirus continuent d'être identifiés, et les entérovirus 79 à 101 ont été récemment décrits (CDC, données non publiées, 2005).

Les échovirus 22 et 23 ont été reclassés dans un nouveau genre (*Parechovirus*) dans les *Picornaviridae* et sont appelés respectivement paréchovirus humains 1 et 2.<sup>4,5</sup> Bien qu'ils appartiennent à des genres génétiquement et biologiquement distincts, les paréchovirus humains et les entérovirus humains partagent de nombreuses caractéristiques épidémiologiques et cliniques.<sup>4</sup>

## PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Le D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit utilise un mélange d'anticorps monoclonaux (AcM) murins spécifiques de l'antigène de l'entérovirus VP1 qui, lorsqu'ils sont associés à un anticorps anti-souris marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine, permettent une identification rapide des antigènes entéroviraux dans les cultures cellulaires.

Les cellules à tester, sur une lame préparée à partir d'une culture cellulaire conventionnelle en tube ou d'une monocouche en flacon shell, sont fixées dans de l'acétone. Le réactif AcM de l'entérovirus est ajouté aux cellules. Après une incubation de 30 minutes à une température comprise entre 35 °C et 37 °C, les cellules colorées sont lavées avec la solution saline tamponnée au phosphate diluée (PBS 1X). Le conjugué anti-souris, qui est marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF), est ajouté aux cellules. Après une incubation de 30 minutes à une température comprise entre 35 °C et 37 °C, les cellules colorées sont à nouveau lavées avec du PBS 1X frais. Pour préparer la lame à l'examen, une goutte du liquide de montage fourni est ajoutée aux cellules colorées et une lamelle est placée sur la lame. Pour préparer les cultures cellulaires centrifugées à l'examen, une goutte de liquide de montage est placée sur une lame de microscope propre. La lamelle est retirée du flacon shell et placée sur une goutte de liquide de montage. Pour les plaques multi-puits, le liquide de montage est ajouté à chaque puits pour couvrir les monocouches. Les lames ou les puits sont examinés à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé de la combinaison de filtres adéquate pour l'ITCF à un grossissement de 200 à 400 fois. Les cellules infectées par le virus seront colorées par une fluorescence vert pomme brillante, tandis que les cellules non infectées ne présenteront pas de fluorescence vert pomme mais une fluorescence rouge terne provenant de la contre-coloration au bleu Evans.<sup>6</sup>

## RÉACTIFS ET MATÉRIELS FOURNIS

Le D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit comprend les éléments suivants :

### **Réactif AcM de l'entérovirus**

**5 ml**

Un flacon compte-gouttes contenant un mélange d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre des antigènes entérovirus. La solution aqueuse tamponnée et stabilisée contient 0,1 % d'azide de sodium comme conservateur.

### **Conjugué anti-souris**

**5 ml**

Un flacon compte-gouttes contenant des anticorps anti-souris marqués à l'ITCF. La solution aqueuse tamponnée et stabilisée contient du bleu Evans en guise de contre-colorant et 0,1 % d'azide de sodium comme conservateur.

### **Lames de contrôle de l'antigène entérovirus**

**5 lames**

Cinq (5) lames de contrôle emballées individuellement contenant des puits avec des cellules de contrôle positives et négatives issues de cultures cellulaires. Chaque puits positif est identifié en fonction du virus infecté présent, c-à-d. échovirus, coxsackie A, etc. Le puits négatif contient des cellules non infectées. Chaque lame est destinée à n'être colorée qu'une seule fois.

### **Concentré PBS 40X**

**25 ml**

Un flacon de concentré PBS 40X comprenant 4 % d'azide de sodium (0,1 % d'azide de sodium après dilution à 1X en utilisant de l'eau déminéralisée).

### **Liquide de montage**

**7 ml**

Un flacon compte-gouttes d'une solution aqueuse, tamponnée et stabilisée de glycérol et 0,1 % d'azide de sodium.

## MATÉRIEL REQUIS NON FOURNI

- Microscope à fluorescence avec la bonne combinaison de filtres pour l'ITCF (pic d'excitation = 490 nm, pic d'émission = 520 nm) ; grossissement 200X à 400X.
- Culture cellulaire pour l'isolement des entérovirus. Les lignées cellulaires suggérées<sup>14</sup> comprennent BGMK, A549, les fibroblastes diploïdes humains, les cellules RD, Super E-Mix™ MixedCells™ et les cellules primaires de rein de singe rhésus (toutes sont disponibles auprès de Quidel).
- Virus de contrôle vivants pour les contrôles de culture positive : souches connues d'entérovirus à utiliser pour contrôler les procédures de culture cellulaire et de coloration. De telles souches de virus de contrôle peuvent être obtenues auprès de Quidel.
- Lamelles (22 x 50 mm) pour les lames de contrôle de l'antigène et pour les lames d'échantillons.
- Milieu de transport universel (disponible auprès de Quidel).
- Milieu d'ensemencement E-Mix ou autre milieu d'ensemencement standard (disponible auprès de Quidel).
- Acétone de qualité réactif (> 99 % de pureté) réfrigéré entre 2 °C et 8 °C pour la fixation des lames d'échantillons préparés, des flacons shell et des préparations de cultures cellulaires.

### REMARQUES :

- ▶ Gardez le récipient d'acétone de qualité réactif hermétiquement fermé pour éviter l'absorption hygroscopique de l'eau, qui peut provoquer une fluorescence de fond vague et non spécifique.
- ▶ Un mélange de 80 % d'acétone/20 % d'eau déminéralisée est utilisé pour fixer les cellules dans les plaques multi-puits en plastique. À conserver à température ambiante (20 °C à 25 °C).
- Pipettes graduées stériles : 10 ml, 5 ml et 1 ml.
- Pipettes Pasteur stériles ou autres pipettes de transfert.  
**Attention : il ne faut pas utiliser de solvants tels que l'acétone avec des pipettes de transfert en polyéthylène.**
- Pincettes à pointes fines.
- Flacon de lavage, 200 ml.
- Filtre à seringue stérile de 0,45 µm.
- Seringue stérile de 3 ml.
- Aiguille à dissocier à extrémité courbe (pour le retrait de la lamelle d'un flacon shell) ; façonner l'aiguille à dissocier en courbant l'extrémité d'une aiguille à seringue ou un objet similaire (par ex. une aiguille à dissocier de mycologie) contre une paille ou à l'aide d'une paire de pincettes, en prenant soin de ne pas se blesser.
- Solution d'hypochlorite de sodium (dilution finale d'eau de Javel domestique 1:10).
- Chambre humidifiée (par ex. une boîte de Pétri couverte avec une serviette en papier humide placée au fond).
- Lames de microscope en verre.
- Lames de microscope en verre multi-puits nettoyées à l'acétone.
- Buvards pour les lames de microscope en verre multi-puits : buvards absorbants à deux puits, utilisés pour éponger l'excès de liquide du masque afin d'éviter la propagation du liquide ou des cellules colorées d'un puits à l'autre.
- Écouvillons stériles en nylon floqué ou en polyester, qui ne sont pas inhibiteurs de virus et de culture cellulaire.
- Incubateur, 35 °C à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub> ou non-CO<sub>2</sub>, selon le format de culture cellulaire utilisé).
- Centrifugeuse avec rotor à ailettes à oscillation libre.
- Eau déminéralisée pour la dilution du concentré PBS 40X et pour la dilution de l'acétone de qualité réactif à utiliser dans les plaques multi-puits en polystyrène.
- Installation de l'aspirateur : aspirateur avec piège à désinfectant contenant suffisamment d'eau de Javel (5 %) pour que la concentration ne diminue pas de plus de 10 fois lorsqu'elle est diluée avec les fluides rejetés.
- Récipient de lavage : bocal, 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 optique inversé : utilisé pour examiner les monocouches avant l'inoculation et l'examen de la toxicité, de la confluence et des effets cytopathiques (ECP). Il doit avoir une capacité de grossissement comprise entre 40X et 100X.

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Pour diagnostic *in vitro*.
- Aucune méthode de test ne peut totalement garantir l'absence d'agents infectieux. En conséquence, tous les dérivés sanguins humains, les réactifs et échantillons humains doivent être manipulés comme étant susceptibles de transmettre une infection. Il est recommandé de manipuler les réactifs et échantillons humains selon la norme sur les agents pathogènes transmissibles par le sang OSHA.
  - ▶ L'isolement en culture cellulaire est potentiellement dangereux. Le personnel travaillant avec des cultures cellulaires doit être parfaitement formé aux techniques de manipulation sécurisées<sup>7, 8, 9</sup> et doit être expérimenté en cultures cellulaires avant d'appliquer cette procédure.
  - ▶ Toutes les procédures doivent être réalisées conformément à la 5<sup>e</sup> édition du Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux), 2007, édité par le CDC et aux indications générales approuvées M29- A du CLSI, Protection des techniciens de laboratoire contre les risques biologiques et les maladies infectieuses transmissibles par le sang, les liquides corporels et les tissus.
- Tous les échantillons et les matériels utilisés pour traiter ces derniers doivent être considérés comme potentiellement dangereux et doivent être manipulés de manière à éviter la contamination du personnel du laboratoire.
  - ▶ Des pratiques de biosécurité de niveau 2 ou d'autres mesures appropriées doivent être mises en œuvre lors de la manipulation de ces matériels.
  - ▶ La méthode de décontamination des échantillons et cultures la plus efficace consiste à utiliser une solution d'hypochlorite de sodium (dilution 1:10 de Javel domestique).
  - ▶ Bien que les lames de contrôle d'antigènes ont montré ne pas être infectieuses, la manipulation et l'élimination doivent s'effectuer en suivant les mêmes précautions que pour d'autres produits infectieux.
- L'acétone, un 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 des flammes et des autres sources d'inflammation.
- Ne jamais pipeter les réactifs ou les échantillons cliniques avec la bouche, éviter tout contact des échantillons cliniques avec une lésion cutanée.
- Le contre-colorant bleu Evans est un agent cancérigène potentiel. En cas de contact avec la peau, rincer immédiatement avec de l'eau.
- Le réactif AcM de l'entérovirus et le conjugué anti-souris sont fournis à la concentration active. Toute dilution de ces réactifs diminuera leur sensibilité.
- Les réactifs doivent être utilisés avant leur date de péremption.
- Chaque lame de contrôle de l'antigène entérovirus est à usage unique. Ne pas réutiliser une lame de contrôle.
- Une contamination microbienne des réactifs peut entraîner une diminution de la sensibilité.
- Conserver le PBS 1X dans un récipient propre pour éviter toute contamination.
- Éviter les projections et la production d'aérosols avec les échantillons cliniques.
- Utiliser une technique aseptique ainsi qu'un équipement et des matériels stériles pour toutes les procédures de culture de cellulaire.
- Les articles en verre réutilisables doivent être nettoyés et rincés abondamment sans détergent.
- Ne pas exposer le réactif AcM de l'entérovirus et le conjugué anti-souris à une lumière vive pendant la coloration ou le stockage.

- L'azide de sodium est inclus à une concentration de 4 % (m/v) dans le concentré PBS 40X et à une concentration de 0,1 % dans les autres solutions de ce kit.
  - ▶ L'azide de sodium est considéré comme toxique. En cas d'ingestion de concentré PBS 40X, consulter immédiatement un médecin.
  - ▶ Mélangées à des acides, les solutions aqueuses d'azide de sodium peuvent dégager un gaz toxique.
  - ▶ Éviter de jeter ces solutions dans les sanitaires ou dans des systèmes de plomberie industriels. L'azoture de sodium peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques hautement explosifs.
  - ▶ Éviter le rejet dans l'environnement.
- L'utilisation d'autres réactifs que ceux spécifiés avec les composants de ce kit peut fausser les résultats.
- Les tests doivent être réalisés dans une pièce suffisamment ventilée.
- Mettre au rebut les récipients et leur contenu non utilisé conformément aux réglementations locales et nationales.
- Porter des vêtements de protection, des gants et un dispositif de protection des yeux/du visage adéquats lors de la manipulation du contenu de ce kit.
- Se laver soigneusement les mains après manipulation.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et la mise au rebut des composants de ce kit, se reporter à la fiche de données de sécurité (FS) disponible sur le site [quidel.com](http://quidel.com).

## Préparation de la solution de PBS 1X

Après conservation à une température comprise entre 2 °C et 8 °C, certains sels du PBS 40X peuvent cristalliser. Ramener la solution à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C) pour dissoudre les cristaux et mélanger. Ajouter le contenu des 25 ml du PBS 40X entièrement dissous dans 975 ml d'eau déminéralisée. Étiqueter la bouteille contenant le PBS 1X en indiquant une date de péremption à 60 jours après la reconstitution et conserver à température ambiante.

## Stockage

**Tableau 1. Conditions de stockage des réactifs**

<b>Réactif AcM de l'entérovirus</b>	Conserver entre 2 °C et 8 °C dans l'obscurité.
<b>Conjugué anti-souris</b>	
<b>Liquide de montage</b>	
<b>Lames de contrôle de l'antigène entérovirus</b>	Conserver entre 2 °C et 8 °C.
<b>Concentré PBS 40X</b> REMARQUE : le concentré peut cristalliser pendant sa conservation entre 2 °C et 8 °C. Les cristaux se dissolvent lorsque le concentré est ramené à température ambiante.	Conserver le liquide entre 2 °C et 8 °C avant dilution.
<b>PBS 1X</b>	À conserver à température ambiante (20 °C à 25 °C).

## Stabilité

Les réactifs et les composants conservent leur pleine efficacité jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de chaque flacon lorsqu'ils sont conservés conformément aux températures recommandées. L'exposition à la lumière du réactif AcM de l'entérovirus et du conjugué anti-souris doit être la plus limitée possible.

Jeter le PBS 1X 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 des 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.

En ce qui concerne les recommandations relatives à la manipulation des échantillons, se reporter aux directives générales pour les cultures virales approuvées par le CLSI.<sup>10</sup>

### Prélèvement des échantillons<sup>11,12</sup>

Les échantillons acceptés pour la culture des entérovirus sont les suivants : écouillons ou lavages de gorge, liquide céphalo-rachidien (LCR), tissu oculaire, lésion vésiculaire ou ulcérate, et selles. Les spécimens doivent être reçus dans un milieu de transport viral.

Les échantillons qui ne sont pas reçus dans un milieu de transport viral doivent être transférés dans un tube de milieu de transport dès leur réception.

### Transport et stockage des échantillons

Tous les agents potentiellement infectieux doivent être transportés conformément à la réglementation de l'Association du transport aérien international (IATA), de l'Organisation de l'aviation civile internationale, (ICAO), aux Titres 42 et 49 du Code des réglementations fédérales américaines, ou aux autres exigences réglementaires applicables en vigueur.

Les échantillons doivent être transportés au laboratoire entre 2 °C et 8 °C. Cette température peut être atteinte en utilisant des poches réfrigérantes, de la glace humide, de la mousse réfrigérante ou d'autres réfrigérants.<sup>13</sup> Les échantillons doivent être traités et testés dès que possible et ensuite stockés entre 2 °C et 8 °C.

Les échantillons doivent être conservés entre 2 °C et 8 °C pendant une durée de maximum 2 jours avant d'être testés. Si une conservation plus longue est nécessaire, les échantillons doivent être congelés à une température inférieure ou égale à -70 °C.

**Les cycles de congélation-décongélation des échantillons doivent être évités car cela entraîne une perte de viabilité des virus et une diminution de la sensibilité du test.**

## PROCÉDURE

### Commentaires préliminaires et précautions

- Se conformer aux volumes et aux temps indiqués dans la présente procédure pour s'assurer de l'exactitude des résultats.
- Les échantillons d'écouvillonnage reçus en milieu de transport avec billes de verre doivent être vigoureusement mélangés au vortex pendant environ 15 secondes pour permettre de dissocier les cellules adhérentes. Les écouillons non reçus en milieu de transport doivent être transférés dans tube de milieu de transport contenant des billes de verre et être vigoureusement mélangés au vortex pendant environ 15 secondes pour dissocier les cellules adhérentes.
- Lors des étapes de coloration et d'observation de la fluorescence au microscope, il est très important d'inclure des contrôles positifs et négatifs pour contrôler la procédure suivie et les performances des réactifs. Il est recommandé d'intégrer ces contrôles lors de chaque série d'échantillons de patients.

- Placer la chambre humide fermée pour la tenue de lames pendant la coloration dans l'incubateur pour la porter à 35-37 °C avant l'étape de coloration. Ainsi, les lames et les réactifs seront portés plus rapidement à température, avec pour effet d'obtenir plus rapidement une coloration intense.
- Amener le réactif AcM de l'entérovirus et le conjugué anti-souris à température ambiante (20 à 25 °C) avant utilisation, et remettre immédiatement au réfrigérateur après utilisation pour le stockage entre 2 et 8 °C.

#### À propos des tests sur culture cellulaire

- Les bonnes pratiques de laboratoire imposent d'effectuer des contrôles viraux positifs et négatifs avec chaque nouveau lot de cellules pour pouvoir confirmer leur performance dans la culture de virus spécifiques.
- Il est recommandé de conserver le milieu enlevé des monocouches jusqu'après obtention des résultats de coloration. En cas de doute sur les résultats de l'échantillon, le milieu peut être passé à une autre monocouche cellulaire et incubé pendant le temps nécessaire pour répéter le test.
- Lorsque les cultures cellulaires sont réalisées dans des plaques multi-puits en polystyrène, le fixateur acétone doit être dilué à 80 % en ajoutant 20 ml d'eau déminéralisée à 80 ml d'acétone.
- Ne pas laisser les monocouches sécher avant la fixation ; cela peut provoquer une coloration de fond importante et une diminution de la sensibilité.
- Ne pas laisser le réactif AcM de l'entérovirus et le conjugué anti-souris sécher sur les monocouches, car cela peut occasionner un bruit de fond important.

#### À propos de la microscopie d'immunofluorescence

- Examiner les contrôles positifs et négatifs avant l'examen des échantillons. Si un des contrôles ne présente pas les résultats attendus, passer en revue les étapes et les conditions dans lesquelles le test a été effectué afin d'en déterminer la ou les causes. Ne pas communiquer les résultats des échantillons tant que les contrôles ne donnent pas les résultats prévus.
- Trois aspects du microscope à fluorescence doivent impérativement fonctionner de façon optimale pour obtenir une luminosité maximale de la fluorescence :
  - ▶ La source de lumière d'activation a une vie définie. Son rendement décroît avec le temps, aboutissant à une diminution de l'intensité de fluorescence du conjugué anti-souris.
  - ▶ La source de lumière est concentrée par un certain nombre de lentilles et 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.
- Des artéfacts fluorescents peuvent être observés dans les monocouches cellulaires examinées :
  - ▶ D'un point de vue morphologique, les artéfacts de coloration n'ont pas l'apparence d'une cellule complète et, de manière générale, ils n'apparaissent pas sur le même plan que la monocouche. Les débris cellulaires, peluches, etc... peuvent absorber le conjugué anti-souris de manière non spécifique et engendrer une fluorescence extrêmement 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 monocouche cellulaire. Dans les deux cas, la diffusion du conjugué anti-souris piégé est retardée pendant l'étape de lavage, générant une fluorescence non spécifique.
  - ▶ Une fluorescence intense à la périphérie des puits de la lame indique un séchage du conjugué anti-souris pendant l'incubation, suggérant que le temps d'incubation était trop long ou que l'humidité n'a pas été bien contrôlée.
  - ▶ Un lavage insuffisant peut entraîner une fluorescence de faible intensité, liée à la présence de conjugué anti-souris résiduel sur la monocouche cellulaire.
- Protégez les lames colorées et des monocouches de la lumière autant que possible pendant les tests.

- ▶ Une décoloration ou une perte d'intensité de la fluorescence des cellules colorées peut survenir en cas d'exposition à la lumière, en particulier à une lumière de forte intensité.
- ▶ Cette décoloration peut survenir lorsqu'une cellule colorée est observée dans un microscope à fluorescence pendant une durée prolongée.

## Préparation des échantillons

Il n'y a pas d'exigences particulières pour le traitement des échantillons pour la culture des entérovirus.<sup>15</sup> Les échantillons doivent être traités selon la procédure de laboratoire établie.

## Test de culture cellulaire – Culture en tube

1. Examiner les monocouches pour en vérifier la morphologie avant l'inoculation.
2. Aspirer le milieu d'entretien des monocouches et ajouter 0,2 à 0,4 ml de chaque échantillon préparé (voir *Préparation des échantillons*) dans chaque lignée cellulaire utilisée pour la culture des entérovirus.
3. Placer les tubes selon un angle permettant de recouvrir les monocouches avec l'inoculum. Placer les tubes dans un incubateur pendant 1 heure à une température de 35 °C à 37 °C pour permettre l'adsorption du virus.
4. Après adsorption, ajouter 2 ml de milieu d'ensemencement approprié.
5. Incuber les tubes entre 35 °C et 37 °C dans un « agitateur à tambour » à 1 à 3 tr/min. ou dans un portoir stationnaire à un angle suffisant pour que les monocouches soient recouvertes par l'inoculum et le milieu. Examiner quotidiennement les monocouches pour détecter tout signe de toxicité ou d'ECP viral.
6. Quand les monocouches sont prêtes pour la coloration, retirer le milieu par aspiration et rincer doucement deux fois les monocouches avec 1 ml de PBS 1X.
7. Ajouter 0,5 ml de PBS 1X dans le tube, puis préparer une suspension cellulaire en grattant la monocouche à l'aide d'une pipette, puis en rompant les agrégats de cellules par flux et reflux successifs de la pipette.
8. Préparer les dépôts cellulaires en utilisant environ 25 µl de la suspension sur une lame nettoyée à l'acétone. Répéter cette étape pour chaque échantillon.
9. Laisser sécher complètement les puits à l'air libre.
10. Fixer les cellules sur les lames avec de l'acétone pur (100 %), fraîche et réfrigérée. Laisser agir pendant 5 à 10 minutes, entre 20 °C et 25 °C.

**Attention : l'acétone est volatile et inflammable ; se tenir à l'écart de toute flamme.**

11. Retirer les lames du fixateur et laisser sécher à l'air libre.
12. Ajouter une goutte de réactif AcM de l'entérovirus pour recouvrir complètement les cellules séchées et fixées sur la lame.
13. Placer les lames entre 35 °C et 37 °C pendant 30 minutes en chambre couverte.
14. Rincer les cellules colorées avec le PBS 1X. Pour seulement un petit nombre de lames, il est possible d'effectuer le rinçage à l'aide d'un bécher de PBS 1X. Pour rincer plusieurs lames, un porte-lame contenant entre 10 et 20 lames peut être placé dans son récipient avec le PBS 1X. Pour effectuer un rinçage efficace, plonger la ou les lames dans un mouvement de va et vient vertical au moins quatre fois.
15. Jeter le PBS utilisé et renouveler l'étape de lavage avec un nouveau PBS 1X.
16. Éponger délicatement le liquide excédentaire.
17. Ajouter une goutte de conjugué anti-souris pour recouvrir complètement les cellules séchées et fixées sur la lame.
18. Placer les lames entre 35 °C et 37 °C pendant 30 minutes en chambre couverte.
19. Rincer les cellules colorées avec le PBS 1X. Pour seulement un petit nombre de lames, il est possible d'effectuer le rinçage à l'aide d'un bécher de PBS 1X. Pour rincer plusieurs lames, un porte-lame contenant entre 10 et 20 lames peut être placé dans son récipient avec le PBS 1X. Pour effectuer un rinçage efficace, plonger la ou les lames dans un mouvement de va et vient vertical au moins quatre fois.
20. Jeter le PBS utilisé et renouveler l'étape de lavage avec un nouveau PBS 1X.
21. Rincer les cellules colorées avec de l'eau déminéralisée. Pour seulement un petit nombre de lames, il est possible d'effectuer le rinçage à l'aide d'un bécher d'eau déminéralisée. Pour rincer plusieurs lames, un



porte-lame contenant entre 10 et 20 lames peut être placé dans son récipient avec l'eau déminéralisée. Pour effectuer un rinçage efficace, plonger la ou les lames dans un mouvement de va et vient vertical au moins quatre fois.

22. Éponger délicatement le liquide excédentaire.
23. Ajouter une petite goutte de liquide de montage dans chaque puits contenant des cellules puis déposer une lamelle sur les puits pour les couvrir.
24. Examiner sous microscope à fluorescence les cellules montées et colorées en utilisant un grossissement compris entre 200X et 400X (voir *À propos de la microscopie en immunofluorescence*).
25. Se reporter à *INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*.

## Culture cellulaire en flacon shell

1. Calculer le nombre de flacons shell nécessaires en fonction du protocole de coloration à utiliser (ce protocole de coloration requiert 2 flacons shell) :
  - ▶ un flacon shell est nécessaire pour chaque jour où la culture sera testée avec le D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit (c.-à-d. que la coloration à 48 à 72 heures, puis à 5 à 7 jours, nécessite 2 flacons shell).
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 flacon shell.
4. Ajouter entre 0,2 et 0,4 ml d'échantillon préparé dans chaque flacon shell.
5. Centrifuger les flacons shell à 700 g pendant 1 heure à une température comprise entre 20 °C et 25 °C.
6. Placer les flacons shell fermés par un capuchon dans un incubateur entre 35 °C et 37 °C.
7. Lorsqu'une monocouche est prête à être colorée avec le réactif AcM de l'entérovirus, retirer le milieu et ajouter 1 ml de PBS 1X.
8. Remuer pour mélanger et puis aspirer.
9. Répéter ce lavage avec un 1 ml supplémentaire de PBS 1X puis aspirer.
10. Ajouter 1 ml d'acétone fraîche et réfrigérée à 100 % et laisser agir pendant 5 à 10 minutes, entre 20 °C et 25 °C.

**Attention : l'acétone est volatile et inflammable ; se tenir à l'écart de toute flamme.**
11. Retirer le fixateur par aspiration.
12. Ajouter 0,5 ml de PBS 1X pour humidifier la monocouche.
13. Remuer puis aspirer la totalité.
14. Ajouter 4 gouttes de réactif AcM de l'entérovirus sur les monocouches fixées des échantillons de patients et les contrôles puis incliner pour **les recouvrir intégralement** de réactif AcM.
15. Placer les flacons shell fermés par un capuchon dans un incubateur entre 35 °C et 37 °C pendant 30 minutes.
16. Aspirer le réactif AcM de l'entérovirus des monocouches.
17. Ajouter 1 ml de PBS 1X.
18. Retirer le PBS 1X par aspiration, répéter l'étape de lavage, et retirer à nouveau par aspiration.
19. Ajouter 4 gouttes de conjugué anti-souris sur les monocouches fixées des échantillons de patients et les contrôles puis incliner pour **recouvrir intégralement** les monocouches de conjugué.
20. Placer les flacons shell fermés par un capuchon dans un incubateur entre 35 °C et 37 °C pendant 30 minutes.
21. Aspirer le conjugué anti-souris des monocouches.
22. Ajouter 1 ml de PBS 1X.
23. Retirer le PBS 1X par aspiration, répéter l'étape de lavage, et retirer à nouveau par aspiration.
24. Ajouter 1 ml d'eau déminéralisée.
25. Aspirer l'eau déminéralisée.
26. Soulever la lamelle du fond du flacon shell à l'aide d'une aiguille à extrémité courbe fixée à un corps de seringue. En la tenant à l'aide de pinces à bouts fins, la transférer, côté monocouche vers le bas, sur une petite goutte de liquide de montage déposée sur une lame de microscope standard.

27. Examiner sous microscope à fluorescence les monocouches colorées en utilisant un grossissement compris entre 200X et 400X (voir À propos de la microscopie d'immunofluorescence).
28. Se reporter à *INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*.

## Test de culture cellulaire sur plaque multi-puits

1. Calculer le nombre de puits nécessaires en fonction du protocole de coloration à utiliser (ce protocole de coloration requiert 2 puits) :
  - ▶ un puits est nécessaire pour chaque jour où la culture sera testée avec le D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit (c.-à-d. que la coloration à 48 à 72 heures, puis à 5 à 7 jours, nécessite 2 puits).
  - ▶ Il est recommandé de placer chaque réplicat sur des lames multi-puits différentes. Cela permettra de tester indépendamment chaque lame le jour voulu.
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 d'une plaque multi-puits de 24 puits ; ajouter 0,8 ml à chaque monocouche d'une plaque de 48 puits.
4. Ajouter 0,2 à 0,4 ml d'échantillon préparé dans les puits appropriés d'une plaque multi-puits.
5. Centrifuger les plaques multi-puits à 700 g pendant 1 heure entre 20 °C et 25 °C.
6. Incuber les plaques multi-puits couvertes entre 35 °C et 37 °C en atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub>.
7. Lorsqu'une monocouche est prête à être colorée avec le réactif AcM de l'entérovirus, retirer le milieu par aspiration et ajouter 1 ml de PBS 1X.
8. Remuer pour mélanger et puis aspirer.
9. Répéter ce lavage avec un 1 ml supplémentaire de PBS 1X puis aspirer.
10. Ajouter 1 ml d'acétone aqueuse à 80 % et laisser agir pendant 5 à 10 minutes, entre 20 °C et 25 °C.  
**REMARQUE** : Ne pas laisser le fixateur acétone à 80 % dans les puits de polystyrène pendant plus de 10 minutes car il peut fendiller et obscurcir le plastique et rendre difficile l'examen des monocouches.  
**Attention** : **l'acétone est volatile et inflammable ; se tenir à l'écart de toute flamme.**
11. Retirer le fixateur par aspiration.
12. Ajouter 0,5 ml du PBS 1X pour humidifier la monocouche.
13. Remuer puis aspirer la totalité.
14. Ajouter 4 gouttes de réactif AcM de l'entérovirus sur chaque monocouche fixée des échantillons de patients et des contrôles dans chaque puits d'une plaque à 24 puits ; ajouter 3 gouttes de réactif AcM de l'entérovirus sur chaque monocouche fixées des échantillons de patients et des contrôles dans chaque puits d'une plaque à 48 puits. Incliner pour **recouvrir complètement** la monocouche avec le réactif AcM de l'entérovirus.
15. Incuber la plaque multi-puits couverte entre 35 °C et 37 °C en atmosphère humide pendant 30 minutes.
16. Aspirer le réactif AcM de l'entérovirus des monocouches.
17. Ajouter 1 ml du PBS 1X et mélanger pour laver.
18. Retirer le PBS 1X par aspiration, répéter l'étape de lavage, et retirer à nouveau par aspiration.
19. Ajouter 4 gouttes de conjugué anti-souris sur chaque monocouche fixée des échantillons de patients et des contrôles dans chaque puits des plaques à 24 puits ; ajouter 3 gouttes de conjugué anti-souris sur chaque monocouche fixées des échantillons de patients et des contrôles dans chaque puits des plaques à 48 puits. Incliner pour **recouvrir complètement** la monocouche avec le conjugué.
20. Incuber la plaque multi-puits couverte entre 35 °C et 37 °C en atmosphère humide pendant 30 minutes.
21. Aspirer le conjugué anti-souris des monocouches.
22. Ajouter 1 ml du PBS 1X et mélanger pour laver.
23. Retirer le PBS 1X par aspiration, répéter l'étape de lavage, et retirer à nouveau par aspiration.
24. Ajouter 1 ml d'eau déminéralisée.
25. Aspirer l'eau déminéralisée.
26. Ajouter 2 à 3 gouttes de liquide de montage sur chaque monocouche, puis couvrir la plaque.

27. Examiner sous microscope à fluorescence les monocouches colorées en utilisant un grossissement compris entre 200X et 400X (voir À propos de la microscopie d'immunofluorescence).
28. Se reporter à *INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*.

## Contrôle qualité

### Réactifs

- Une nouvelle lame de contrôle de l'antigène entérovirus doit être colorée chaque fois que la procédure de coloration est exécutée afin de garantir la bonne performance du test.
- Les puits positifs présenteront de nombreuses cellules infectées avec une fluorescence brillante vert-pomme, alors que les cellules négatives apparaîtront rouge-sombre en raison de la contre-coloration au bleu Evans.
- Le puits négatif ne présentera que des cellules négatives en rouge sombre.
- Les contrôles positifs et négatifs doivent présenter la fluorescence attendue pour que les résultats des échantillons soient validés. Les lames de contrôle d'antigène peuvent également faciliter l'interprétation des échantillons du patient.

### Culture cellulaire

- Des contrôles d'entérovirus positifs et négatifs doivent être effectués avec chaque nouveau lot de cellules pour pouvoir confirmer leur performance dans la culture d'entérovirus.
- Pour garantir la sensibilité virale, il faut inclure des monocouches témoins inoculées par un entérovirus chaque fois qu'un nouveau lot de culture cellulaire est utilisé.
- Une monocouche non inoculée de chaque lot devrait être colorée pour servir de contrôle négatif. Des conditions de stockage ou des procédures de manipulation défavorables seront également reflétées dans le contrôle négatif.
- Les résultats doivent être jugés non valides si les contrôles de culture ne se déroulent pas correctement.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

### Examen des échantillons et contrôles

- Il est recommandé d'examiner les contrôles avant les échantillons afin de s'assurer de la performance correcte du test.
- Une réaction positive aux entérovirus apparaît sous forme de fluorescence brillante vert-pomme dans les cellules infectées.
- Les cellules non infectées présenteront une coloration rouge sombre due à la contre-coloration au bleu Evans inclus dans le conjugué anti-souris.
- Examiner la totalité du dépôt cellulaire ou de la monocouche avant de fournir un compte rendu définitif de résultats négatifs. Ne communiquer les résultats des échantillons que lorsque les contrôles fonctionnent comme prévu.

### Artéfacts de coloration

- Les bordures séchées de la monocouche ou des amas cellulaires peuvent générer une fluorescence non spécifique due au piégeage de l'anticorps.
- En raison de la toxicité de l'échantillon ou d'un mauvais stockage des cellules, des cellules mortes arrondies peuvent présenter une coloration vert olive.
- Une humidité correctement contrôlée pendant la coloration et un lavage adéquat entre les étapes permettent d'éliminer les colorations non spécifiques.

### Résultats de l'isolement par culture / confirmation

- La coloration brillante par fluorescence vert pomme est **cytoplasmique**.

- Examiner la totalité du dépôt cellulaire ou de la monocouche cellulaire pour rechercher la présence de cellules fluorescentes spécifiques aux entérovirus. Si aucune cellule fluorescente n'est détectée, les résultats doivent être rendus comme suit : « Aucun entérovirus isolé par culture cellulaire ».
- Si une fluorescence spécifique aux entérovirus est observée, indiquer « Entérovirus isolé par culture cellulaire ».

## LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Un prélèvement, stockage et transport inadéquat des échantillons peut entraîner des résultats de culture faux négatifs.<sup>16</sup>
- Des incubations pendant des durées ou à des températures autres que celles citées dans les instructions de test peuvent produire des résultats erronés.
- La détection de virus varie considérablement selon la qualité de l'échantillon et les manipulations auxquelles il est ultérieurement soumis. Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection virale. Les résultats du test doivent être interprétés conjointement avec les informations disponibles provenant des études épidémiologiques, de l'évaluation clinique du patient et d'autres méthodes de diagnostic.
- Dans la mesure où les AcM ont été préparés en utilisant des souches définies de virus, ils peuvent ne pas identifier tous les variants antigéniques ou de nouvelles souches d'entérovirus. Les AcM peuvent ne pas détecter des souches virales ayant subi des changements mineurs d'acides aminés dans la région de l'épitope cible.
- Un résultat négatif en immunofluorescence directe ou après culture n'exclut pas la présence de virus.
- La performance du kit ne peut être garantie qu'avec l'utilisation des composants fournis par QUIDEL.
- Une conservation prolongée du conjugué anti-souris sous une lumière forte va diminuer l'intensité de la coloration.
- Une réactivité croisée limitée a été observée avec les adénovirus de type 11 et 16.
- Une légère coloration de fond peut apparaître avec les échantillons contaminés par des souches de *Staphylococcus aureus* qui contiennent des quantités importantes de protéine A. La protéine A va se fixer aux segments Fc des anticorps conjugués. Cette fixation peut être distinguée de la fixation à l'antigène viral à partir de leur morphologie, la fluorescence liée au *S. aureus* apparaissant sous la forme de petits points brillants ( $\pm 1$  micron de diamètre). Les résultats de cultures cellulaires présentant une contamination bactérienne doivent donc être interprétés avec prudence.
- Toute fluorescence **nucléaire** non spécifique présente dans les cellules cultivées ou sur les lames de contrôle de l'antigène doit être interprétée comme un résultat négatif pour les entérovirus.

## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES SPÉCIFIQUES

### Réactivité des entérovirus

Au total, 224 isolats cliniques d'entérovirus ont été remis en culture et testés avec le D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit sur deux sites (site 1 : 168, site 2 : 56). L'identité de chaque isolat a été déterminée par neutralisation. Le D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit a correctement identifié tous les isolats d'entérovirus comparativement aux résultats de la neutralisation. Les données sont résumées dans le Tableau 2.

**Tableau 2. Isolats d'entérovirus correctement identifiés par le D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit comparativement aux résultats de la neutralisation**

Type d'entérovirus	Nbre d'isolats	Type d'entérovirus	Nbre d'isolats
Coxsackie A9	20	Échovirus 9	17
Coxsackie A16	5	Échovirus 11	20
Coxsackie A24	1	Échovirus 13	1
Coxsackie B1	6	Échovirus 14	4
Coxsackie B2	20	Échovirus 15	1

Type d'entérovirus	Nbre d'isolats	Type d'entérovirus	Nbre d'isolats
Coxsackie B3	11	Échovirus 18	5
Coxsackie B4	9	Échovirus 21	1
Coxsackie B5	16	Échovirus 24	2
Coxsackie B6	1	Échovirus 25	2
Échovirus 3	3	Échovirus 30	18
Échovirus 4	8	Entérovirus 70	2
Échovirus 5	8	Entérovirus 71	5
Échovirus 6	10	Poliovirus type 1	4
Échovirus 7	12	Poliovirus type 2	5
		Poliovirus type 3	6

Au total, six isolats cliniques de l'entérovirus 68 ont été remis en culture et testés avec le D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit. Tous les isolats de l'entérovirus 68 ont été identifiés positivement par le D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit, alors que les mêmes cellules infectées par le virus et colorées avec les IgG de chèvre anti-souris marquées à la fluorescéine n'ont donné que des résultats négatifs. Les données sont résumées dans le Tableau 3.

**Tableau 3. Détection de six isolats cliniques d'EV68 avec le D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit**

Isolat d'EV68	D3 IFA Enterovirus Identification Kit	Conjugué IgG de chèvre anti-souris uniquement
US/MO/14-18947	Positif	Négatif
US/MO/14-18949	Positif	Négatif
US/IL/14-18952	Positif	Négatif
US/KY/14-18953	Positif	Négatif
US/IL/14-18956	Positif	Négatif
Souche de Fermon	Positif	Négatif

### Spécificité des entérovirus

Le D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit a été testé en termes de réactivité croisée contre une grande variété de cellules et de micro-organismes. Aucune réactivité croisée n'a été observée pour 47 souches virales (mises en culture et traitées pour la coloration) ou pour 17 types de cellules de culture hôtes. Trente (30) cultures bactériennes ont été colorées et examinées en termes de réactivité croisée, y compris *Staphylococcus aureus*, une bactérie qui produit la protéine A. La coloration de *S. aureus* est apparue sous la forme de petits points de fluorescence (voir *LIMITES DE LA PROCÉDURE*) alors que toutes les autres cultures bactériennes étaient négatives. (Les Tableaux 4, 5 et 6 ci-dessous énumèrent les organismes dont la réactivité croisée avec le réactif AcM de l'entérovirus a été testée).

Quarante-sept (47) souches virales ont été testées en termes de réactivité croisée. Aucune réactivité croisée n'a été observée pour les virus énumérés ci-dessous (Tableau 4).

**Tableau 4. Souches virales utilisées dans l'étude de réactivité croisée**

Adénovirus	Type 1	Parainfluenza 1	C-35
	Type 3	Parainfluenza 2	Greer
	Type 5	Parainfluenza 3	C 243
	Type 6	VHS-1	1F
	Type 7		CWOH 0026
	Type 11		MacIntyre

**Tableau 4. Souches virales utilisées dans l'étude de réactivité croisée**

	Type 14	VHS-2	MS
	Type 16		Souche G
	Type 18		Towne
Influenza A	Aichi	CMV	Davis
	Mal		AD169
	Hong Kong		Webster
	Denver	Varicella	Ellen
	Port Chalmers		Type 7
	Victoria	Rhinovirus humain	Type 16
	New Jersey		Type 26
	PR		Type B37
Influenza B	Hong Kong		Type A40
	Maryland		Type A78
	Mass	Oreillons	Lame EMD Millipore
	Taiwan	Rougeole	Lame EMD Millipore
	GL	Epstein-Barr	Lame Cell Marque
	Russia		
VRS	Long		
	Wash		

Dix-sept (17) cellules de culture hôte ont été testées en termes de réactivité croisée ; aucune réactivité croisée n'a été observée pour les lignées cellulaires énumérées ci-dessous (Tableau 5)

**Tableau 5. Lignées cellulaires utilisées dans l'étude de réactivité croisée**

A549	NCL-H292
BGMK	pRhMK
HEp-2	pRK
LLC-MK2	RD
MDCK	RhMKII
MRC-5	R-Mix
MRHF	Vero
Mv1Lu	Wi-38
Super E-Mix	

Trente (30) cultures bactériennes ont été colorées et examinées en termes de réactivité croisée, y compris *Staphylococcus aureus*, une bactérie qui produit la protéine A (voir *LIMITES DE LA PROCÉDURE*). La coloration de *S. aureus* est apparue sous la forme de petits points de fluorescence alors qu'aucune réactivité croisée n'a été observée pour toutes les autres cultures énumérées dans le Tableau 6.

**Tableau 6. Bactéries utilisées dans l'étude de réactivité croisée**

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Mycoplasma orale</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>

**Tableau 6. Bactéries utilisées dans l'étude de réactivité croisé**

<i>Clostridium diphtheriae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Haemophilus influenzae de type A</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>

Des conditions rigoureuses pour les tests de réactivité croisée ont été obtenues en utilisant une concentration élevée d'anticorps monoclonal primaire et des titres élevés de micro-organismes. Le réactif primaire AcM de l'entérovirus a été préparé à 1,5X la concentration fournie dans le kit. Le réactif secondaire de chèvre anti-souris marqué à la fluorescéine (conjugué anti-souris) a été utilisé tel que fourni dans le kit. Chacun des virus testés a été préparé sous forme de monocouches de cellules infectées (250 cellules infectées inoculées dans une culture en flacons shell et incubées pendant 24 à 48 heures, pour obtenir une infection de 3+ à 4+), puis traité et coloré avec le réactif AcM de l'entérovirus 1,5X selon la procédure détaillée dans cette notice. Les souches bactériennes ont été cultivées, traitées sous forme de suspensions, puis déposées sur des lames de microscope (donnant > 150 bactéries par champ microscopique X400), puis colorées avec le réactif AcM de l'entérovirus 1,5X selon la procédure décrite dans cette notice. Les cultures cellulaires ont été colorées sous forme de monocouches confluentes.

## ASSISTANCE

Pour commander ou obtenir une assistance technique, veuillez contacter un représentant Quidel au 800-874-1517 (aux États-Unis) ou au +1-858-552-1100 (en dehors des États-Unis), du lundi au vendredi, de 8 h à 17 h, heure de la côte est de l'Amérique du Nord. Les commandes peuvent également être passées par fax au (740) 592-9820. Pour obtenir de l'aide par e-mail, veuillez écrire à l'adresse [customerservice@quidel.com](mailto:customerservice@quidel.com) ou [technicalsupport@quidel.com](mailto: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](http://quidel.com).

## REFERENCES

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, Hyyppia 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)*, 5<sup>th</sup> edition, 2007, CDC-NIH manual. [<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/bmbl5toc.htm>]
8. *Biosafety Manual*, 3<sup>rd</sup> edition, 2004. Organisation mondiale de la santé [Le manuel peut être disponible dans d'autres langues ; voir la page Internet de l'OMS [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/)]
9. *Laboratory Biosafety Guidelines*, 3<sup>rd</sup> edition, 2004. Publié sous l'autorité du Ministre de la santé, de la population et de la santé publique, Centre de mesures et d'interventions d'urgence [directive disponible en français ou en anglais ; se référer à la page Internet [<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*, publié par l'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, p. 28
15. IBID, pp. 22 - 25
16. Leland, Diane S. (1996). *Clinical Virology*, publié par W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

**REF**

01-050000 – D<sup>3</sup> IFA Enterovirus Identification Kit

**IVD**



**EC REP**

MDSS GmbH  
 Schiffgraben 41  
 30175 Hannover,  
 Allemagne



**Diagnostic Hybrids, Inc. – une filiale de Quidel Corporation**  
 2005 East State Street, Suite 100  
 Athens, OH 45701 USA  
**quidel.com**

**PI1780002FR00 (03/21)**



**Historique des révisions :**

- Ajout d'un glossaire
- Mise à jour des résultats des tests actuels

## GLOSSAIRE

---

**REF**

Numéro de catalogue



Marque de conformité CE

---

**EC REP**

Représentant autorisé dans  
la Communauté européenne

**LOT**

Code du lot

---



Date de péremption



Fabricant

---



Limite de température



Utilisation prévue

---

**Rx ONLY**

Utilisation sur ordonnance exclusivement



Consulter le mode d'emploi de l'étiquetage  
électronique.

---



Ne pas réutiliser

**IVD**

Pour diagnostic *in vitro*

---



25 jusqu'à 40

Quantité suffisante pour 25 à 40 tests

**CONT NaN<sub>3</sub>**

Compositions/Contient

---

**NaN<sub>3</sub> 4%**

Compositions/Contient

---