

MERIFLUOR[®]

VZV

REF 500113

IVD For in vitro diagnostic medical device

Rx Only

INTENDED USE

MERIFLUOR VZV is intended for direct detection of varicella-zoster virus (VZV), in vesicle smears and biopsy specimens, by the direct fluorescent antibody technique, in addition, the reagent can be used to confirm the presence of VZV in cell culture.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST^{2,3,5}

VZV is a DNA virus of the *herpesvirus* group which causes chicken pox (varicella) and shingles (zoster). Varicella is the primary infection while zoster is caused by reactivation of latent virus. Although VZV is commonly identified by cell culture isolation, Schmidt, et. al., have demonstrated that cell culture detects only 23% of positive cases. In contrast, a direct fluorescent assay detected all positive cases tested.

BIOLOGICAL PRINCIPLES^{1,3}

MERIFLUOR VZV provides a direct fluorescent antibody stain (FA) for VZV identification. A monoclonal antibody (3B3), specific for VZV glycoprotein and conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), is reacted with cells suspected of VZV infection. This results in a direct fluorescent label of VZV-infected cells which can be visualized using a fluorescence microscope.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.

- 3 mL prediluted FITC-conjugated monoclonal anti-VZV (3B3) antibody in 0.01M phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% sodium azide, 1% carrier protein and Evans blue counterstain.
- 5 mL FA Mounting Medium containing Tris-buffered glycerol with photobleach inhibitor.

MATERIALS NOT PROVIDED

The supplied staining reagent will permit identification of VZV. Additional materials and equipment needed for identification from direct smear specimens, cell culture or from biopsy specimens are as follows:

- Acetone (reagent grade)
 - Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 ± 0.2 (Catalog #500500), calcium and magnesium free
 - Clean wash bottle
 - Microscope slides with 6-8 mm wells
 - Coverslips, No. 1 thickness
 - Humidity chamber
 - Sodium hypochlorite, 0.5% (1:10 dilution of household bleach)
 - Fluorescence microscope equipped with a filter system suitable for fluorescein isothiocyanate (maximum excitation wavelength = 490 nm, mean emission wavelength = 520 nm). Lenses must be of high quality and have a final power of 100X to 400X.
- NOTE:** A well-functioning fluorescence microscope is essential to proper test interpretation. Variations in bulb wattage and alignment, illumination type (epi- or incident) and intensity, and filter type may affect performance. Use the positive control to verify adequate performance of the microscope.
- Timer

PRECAUTIONS

- All reagents are for in vitro diagnostic use only.
- Sodium azide (NaN₃) is used in the reagent as a preservative and may react with lead or copper in drain lines to form explosive metal azides. Upon disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up in drains.
- Use a safety pipetting device for all pipetting. Never pipet by mouth.
- All specimens, pipets and inoculated tissue culture tubes are to be considered potentially infectious and should be disposed of in 0.5% sodium hypochlorite or placed in biohazard bags and autoclaved.
- Avoid microbial contamination of the reagents.

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

Refer to the SDS, available at www.meridianbioscience.com for Hazards and Precautionary Statements.

SHELF LIFE AND STORAGE

Store at 2 to 8 C. Do not freeze or store in strong light. Reagents should not be warmed in a 37 C water bath. Bring to room temperature 18 to 25 C before use.

TEST PROCEDURE^{2,5}

NOTE

- Do not use reagents beyond expiration date.
- Reagents are supplied ready to use. Do not dilute.
- Do not let slides dry during the staining procedure.**
- Do not store the reagent or perform the staining procedure in strong light, such as direct sunlight.

Preparation of Smear Specimens

Incise vesicle peripherally with a sterile scalpel. Lift back the top of the lesion and remove excess fluid by gentle blotting with a swab. This swab can be used as a culture specimen. Scrape the base of the lesion thoroughly with a scalpel blade. Gross bleeding should be avoided. Spread cellular material collected on the edge of the blade *thinly* over the 6-8 mm diameter well area on a clean microscope slide and air dry. Fix in fresh, cold acetone 2 to 8 C for 10 minutes at room temperature 18 to 25 C and air dry, or transport to laboratory for prompt fixation. Stain within two hours or store the fixed slide *desiccated* at 2 to 8 C.

Preparation of Tissue Culture Specimens

For staining tissue culture isolations, remove cells demonstrating typical VZV cytopathic effect (CPE) per routine tissue culture procedures. Drop cells onto a slide, preferably within a well size of 6-8 mm diameter. Air dry. Fix in fresh, cold acetone 2 to 8 C for 10 minutes at room temperature 18 to 25 C and air dry. Stain within two hours or store *desiccated* at 2 to 8 C.

Warning: Isolation of virus by tissue culture should be attempted only by those laboratories experienced in tissue culture procedures.

Preparation of Biopsy Specimens

Collect biopsy specimens using a punch biopsy or standard technique. Biopsy specimens may provide more reliable results than smear specimens.⁵ Biopsy specimens should be frozen, sectioned and air dried. Fix in fresh, cold acetone 2 to 8 C for 10 minutes at room temperature 18 to 25 C and air dry. Stain within two hours or store *desiccated* at 2 to 8 C.

Staining

The reagents are supplied prediluted. Do not dilute. Allow the reagents to warm to room temperature 18 to 25 C before use.

- Add one to three drops of FITZ-conjugated monoclonal anti-VZV to well.
- Incubate in humidity chamber at room temperature 18 to 25 C for 30 minutes.
- Rinse each slide carefully using a squeeze bottle of PBS. **BE SURE NOT TO DISRUPT CELLS WITH BUFFER STREAM.**
- Air dry (a small fan or blow dryer on cool setting can be used).
- Use one drop of FA Mounting Medium. Use a coverslip for mounting slides.
- Evaluate each slide with a fluorescence microscope at 100X to 400X magnification. Read slides immediately for best results. If necessary, slides may be stored in the dark at 2 to 8 C for up to 24 hours without significant fading of the fluorescent stain.

INTERPRETATION OF RESULTS

Direct Smears

Specimens exhibiting typical apple-green fluorescence in two or more cells in the entire smear are considered positive for VZV.

Specimens with fewer than one cell per high power field (400X), and not exhibiting positive fluorescence, should be reported as inadequate for testing.

Specimens with an adequate number of cells, but not exhibiting specific fluorescence in two or more cells are considered negative.

Trapping of conjugate under cells, or by debris and mucus, should not be misinterpreted. It is highly recommended that the user gain experience by extensive comparison of direct FA results with cell culture results (see LIMITATIONS OF THE PROCEDURE #1).

Cell Culture Isolation

Both positive and negative cells should be observed. Positive cells exhibit apple-green cytoplasmic fluorescence. Negative cells stain a faint red due to the counterstain. Culture tubes exhibiting few (less than five) foci of VZV-infected cells may not yield positive results due to inadequate sampling to prepare smear. Only samples with greater than five infected foci which demonstrate no specific staining should be reported negative.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations to accrediting agencies.

As with all direct staining tests, specificity controls cannot be performed on the same smear. However, the reagent should be tested concurrently by staining known positive and negative cell culture monolayers. In addition, when confirming a virus isolate, uninfected cells from the same lot as those used to isolate the virus should be stained in the same manner as the patient sample.

If the expected control reactions are not observed, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- Because cell preparations or cytology smears are not always uniform monolayers, nonspecific reagent trapping can occur.
- Bacterial or fungal contamination may nonspecifically bind the antibody and interfere with interpretation.
- Isolation of varicella-zoster is dependent on the presence of live virus in the specimen. Proper collection, transportation and culture techniques are necessary for successful isolation.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS^{1,3,4,6}

Vesicle smears

Vesicle smear specimens from 26 patients with chicken pox or zoster diagnosed by virus isolation or by serologic studies were stained using the monoclonal 3B3. All samples were positive for varicella-zoster antigen. Vesicle smears from four patients with HSV infections were positive when stained with anti-HSV antisera but negative when stained using 3B3.

Tissue Sections

Vesicle biopsy specimens were obtained from a patient with zoster four days after onset. Sections were frozen, sectioned and stained using 3B3 monoclonal antibody. Specific staining was observed in the basal and malpighian layers of the epidermis. No varicella-zoster antigens were detected in the outer keratin layer or in the underlying dermis.

Lung sections from a patient with interstitial pneumonitis caused by CMV were stained using the VZV monoclonal. No staining was seen. The same technique was positive when antibody to CMV was utilized.

Cell Culture

Human fibroblast cells infected with VZV-32, VZV-OKa, or five different clinical isolates, were stained using 3B3 in an indirect fluorescent antibody procedure. All strains of VZV exhibited positive results. Monolayers infected with HSV 1 (McIntyre), HSV 2 (MS) or CMV (AD-169) were stained with 3B3 and exhibited negative results. The following cell lines demonstrated no cross reactivity:

Human embryonic lung fibroblast	Transformed guinea pig (ATCC 104C1)
Human melanoma cells (Mewo strain)	VERO

ITALIANO

MERIFLUOR[®]

VZV

REF 500113

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

Rx Only

FINALITÀ D'USO

MERIFLUOR VZV deve essere utilizzato per il rilevamento diretto del virus varicella-zoster (VZV) negli strisci di vescicole e nei campioni di biopsie tramite la tecnica di anticorpi a fluorescenza diretta. È inoltre possibile utilizzare il reagente per confermare la presenza di VZV nella coltura cellulare.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST^{2,3,5}

Il VZV è un virus del DNA del gruppo *herpesvirus* che causa varicella e herpes zoster. La varicella è l'infezione principale, mentre l'herpes zoster è causato dalla riattivazione del virus latente. Benché il VZV venga in genere identificato con l'isolamento della coltura cellulare, Schmidt et al. hanno dimostrato che la coltura cellulare rileva solo il 23% di casi positivi. Al contrario, una valutazione a fluorescenza diretta ha rilevato tutti i casi positivi testati.

PRINCIPII BIOLOGICI^{1,3}

MERIFLUOR VZV fornisce una colorazione di anticorpi a fluorescenza diretta (FA) per l'identificazione del VZV. Un anticorpo monoclonale (3B3), specifico della glicoproteina VZV e coniugato all'isotiocianato con fluoresceina (FITC), viene fatto reagire con le cellule che si presume siano state infettate dal VZV. Come conseguenza, le cellule infettate vengono contrassegnate da una fluorescenza diretta e possono essere visualizzate con un microscopio a fluorescenza.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

- 3 mL di anticorpi monoclonali anti-VZV (3B3) coniugati con fluoresceina (FITC) prediluiti in una soluzione tampone di 0,01 M PBS (pH 7,6 ± 0,2) contenente azotiduro di sodio 0,1%, proteina vettore 1% e colorazione di contrasto blu Evans.
- 5 mL di mezzo di montaggio FA contenente glicerolo tampone tris con inibitore della fotodecolorazione.

MATERIALI NON FORNITI

Il reagente colorante fornito consente l'identificazione del VZV. Di seguito sono elencati gli ulteriori materiali e dispositivi necessari per l'identificazione tramite campioni colorati direttamente, campioni di coltura cellulare o prelevati con biopsia:

- Acetone (grado reagente)
- Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), pH 7,4 ± 0,2 (n. catalogo 500500), priva di calcio e magnesio
- Spruzzetta di plastica pulita
- Vetrini da microscopio con scanalature da 6 a 8 mm
- Vetrini coprioggetto, spessore n. 1
- Camera umida
- Ipoclorito di sodio, 0,5% (diluizione 1:10 di candeggina per uso domestico)

8. Microscopio a fluorescenza dotato di un sistema di filtraggio adatto all'isocianato di fluorescina (lunghezza d'onda di eccitazione massima = 490 nm, lunghezza d'onda di emissione media = 520 nm). Gli obiettivi devono essere di alta qualità e di potenza finale compresa fra 100X e 400X.
- NOTA:** Un microscopio a fluorescenza ben funzionante è fondamentale per la corretta interpretazione dei test. Le variazioni di potenza nell'allineamento della lampadina, il tipo e l'intensità dell'illuminazione (epi o incidente) e il tipo di filtro potrebbero incidere sulle prestazioni. Utilizzare il controllo positivo per verificare l'adeguatezza delle prestazioni del microscopio.
9. Timer

PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- L'azotidato di sodio (NaN₃) viene utilizzato nei reagenti come conservante e può reagire a contatto con il piombo o il rame nelle tubature degli scarichi formando azotidati di metallo esplosivi. Nelle operazioni di smaltimento, sciocquare accuratamente con molta acqua per evitare l'accumulo di azotidati negli scarichi.
- Usare sistemi di pipettaggio meccanico. Non pipettare mai con la bocca.
- Tutti i campioni, le pipette e le provette di coltura di tessuti inoculati devono essere considerati potenzialmente infettivi e smaltiti in ipoclorito di sodio 0,5% o posti in appositi contenitori per sostanze a rischio biologico e sterilizzati in autoclave.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Fare riferimento alla SDS, disponibile sul sito www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version) per i rischi e i consigli di prudenza.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

È necessario conservare i materiali a una temperatura compresa fra 2 e 8°C. Non congelare o conservare in ambienti molto luminosi. I reagenti non devono essere riscaldati con acqua a 37°C. Portare a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso.

PROCEDURA DEL TEST^{2,5}

NOTA

- Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza.
- I reagenti forniti sono pronti per l'uso. Non diluire.
- Non lasciare asciugare i vetrini durante la procedura di fondazione.**
- Non riporre il reagente o eseguire la procedura di colorazione in ambienti molto illuminati o sotto la luce diretta del sole.

Preparazione dei campioni di striscio

Incidere la vescicola a livello periferico con un bisturi sterile.

Sollevare la parte superiore della lesione e rimuovere delicatamente il fluido in eccesso con un batuffolo di cotone, che potrà essere utilizzato come campione di coltura. Raschiare la base della lesione con la lama del bisturi. Evitare un forte sanguinamento. Spandere in uno strato sottile la materia cellulare raccolta sul bordo della lama nell'area del contenitore di 6-8 mm di diametro su un vetrino da microscopio pulito e lasciare asciugare all'aria. Fissare con acetone freddo 2-8°C per 10 minuti a temperatura ambiente 18-25°C e lasciare asciugare all'aria o trasportarlo al laboratorio per un rapido fissaggio. Colorare entro due ore o conservare il vetrino fissato essiccato a 2-8°C.

Preparazione dei campioni di coltura tissutale

Per la colorazione di isolamenti di colture tissutali, rimuovere le cellule che rivelano il tipico effetto citopatico VZV (CPE) per le normali procedure di coltura cellulare. Trasferire le cellule su un vetrino, se possibile con un diametro del contenitore di 6-8 mm. Lasciare asciugare all'aria. Fissare in acetone freddo 2-8°C per 10 minuti a temperatura ambiente 18-25°C e lasciare asciugare all'aria. Colorare entro due ore o conservare essiccato a 2-8°C.

Avvertenza: l'isolamento di virus con coltura tissutale deve essere eseguito solo da laboratori con esperienza in questo tipo di procedura.

Preparazione di campioni da biopsia

Raccogliere i campioni con una biopsia endoscopica o con una tecnica standard. I campioni possono fornire risultati più affidabili di quelli dello striscio.⁵ I campioni da biopsia devono essere congelati, sezionati e lasciati asciugare all'aria. Fissare in acetone freddo 2-8°C per 10 minuti a temperatura ambiente 18-25°C e lasciare asciugare all'aria. Colorare entro due ore o conservare essiccato a 2-8°C.

COLORAZIONE

Il reagente anti-RSV monoclonale è pre-diluito e pronto per l'uso. Non è necessario diluirlo ulteriormente. Prima dell'uso, lasciare scaldare i reagenti e i vetrini a temperatura ambiente 18-25°C.

- Aggiungere una-tre gocce di anti-VZV monoclonale coniugato con FITC nel pozzetto.
- Incubare nella camera umida a temperatura ambiente 18-25°C per 30 minuti.
- Sciocquare delicatamente i vetrini con un flacone morbido di PBS. ASSICURARSI DI NON DANNEGGIARE LE CELLULE CON IL LIQUIDO TAMPONE.
- Lasciare asciugare all'aria (è possibile utilizzare un piccolo ventilatore o un termoventilatore impostato sul flusso d'aria freddo).
- Utilizzare una goccia del mezzo di montaggio FA. Per il montaggio dei vetrini, utilizzare un vetrino coprioggetti.
- Esaminare i vetrini con un microscopio a fluorescenza con ingrandimento 100X-400X. Per ottenere risultati migliori, leggere immediatamente i vetrini. Se necessario, è possibile riporre i vetrini al buio a 2-8°C per un tempo massimo di 24 ore senza sbiadimento significativo della colorazione fluorescente.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Colorazioni dirette

I campioni che mostrano la tipica fluorescenza di colore verde mela in due o più cellule dell'intero striscio sono considerati positivi al VZV.

I campioni con meno di una cellula per campo ad alta potenza (400X) e che non mostrano fluorescenza positiva non risultano idonei al test.

I campioni con un numero adeguato di cellule, ma senza una fluorescenza specifica in due o più cellule, sono considerati negativi.

La presenza di sostanza coniugata sotto le cellule, anche a causa di residui e muco, non va interpretata in modo errato. Si consiglia vivamente che l'utente acquisisca esperienza confrontando in maniera estesa i risultati FA diretti con quelli delle colture cellulari (vedere LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA N. 1).

Isolamento delle colture cellulari

È necessario osservare sia le cellule positive sia quelle negative. Le cellule positive mostrano fluorescenza citoplasmatica di colore verde mela. Le cellule negative mostrano una colorazione rossa dovuta alla colorazione di contrasto. Le provette che rivelano poche (meno di cinque) cellule infettate da VZV potrebbero non dare risultati positivi a causa dell'adeguatezza del campione per la preparazione dello striscio. Solo i campioni con più di cinque cellule infette che non dimostrano alcuna colorazione specifica vanno riferiti come negativi.

CONTROLLO QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

Analogamente ai test di colorazione diretta, non è possibile eseguire il controllo di specificità sullo stesso striscio. Tuttavia, è necessario verificare i reagenti simultaneamente colorando i monostrati di cellule culturali positivi e negativi noti. Inoltre, durante la conferma dell'isolamento di un virus, le cellule non infette dello stesso lotto di quelle utilizzate per isolare il virus devono essere colorate allo stesso modo del campione del paziente.

Se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale, (Italia +390331433636).

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Poiché le preparazioni cellulari o gli strisci citologici non sono sempre monostrati uniformi, potrebbe verificarsi il bloccaggio di reagenti non specifici.
- La contaminazione batterica o fungina potrebbe legare in modo non specifico l'anticorpo e interferire con l'interpretazione.
- L'isolamento del virus varicella zoster dipende dalla presenza di virus vivo nel campione. Pertanto, per un corretto isolamento è necessario mettere in atto le procedure idonee di raccolta, trasporto e coltura.

PRESTAZIONE SPECIFICHE^{1,3,4,5}

Strisci vescicolari

Con il 3B3 monoclonale, sono stati colorati i campioni di strisci di vescicole di 26 pazienti affetti da varicella o herpes zoster diagnosticati tramite isolamento del virus o studi sierologici. Tutti i campioni risultavano positivi all'antigene varicella-zoster. Gli strisci di vescicole di quattro pazienti con infezioni HSV risultavano positivi se colorati con gli antisieri anti-HSV, ma negativi se si utilizzava il 3B3.

Sezioni tissutali

I campioni di biopsia vescicolare sono stati ottenuti da un paziente nel quale l'herpes zoster era insorto da quattro giorni. Le sezioni sono state congelate, sezionate e colorate con l'anticorpo monoclonale 3B3. Nello strato basale e in quello malpighiano dell'epidermide si è osservata una colorazione specifica. Non sono stati rilevati antigeni varicella-zoster nello strato cheratinico esterno o nel derma sottostante.

Con il VZV monoclonale, sono state colorate le sezioni polmonari di un paziente con polmonite interstiziale causata da CMV. Non è stata rilevata alcuna colorazione. La stessa tecnica è risultata positiva quando si è utilizzato l'anticorpo del CMV.

Coltura cellulare

Alcuni fibroblasti umani infettati da VSV-32, VSV-Oka o da cinque isolati clinici diversi sono stati colorati con 3B3, utilizzando una procedura di anticorpi a fluorescenza indiretta. Tutti i ceppi di VZV hanno mostrato risultati positivi. I monostrati infettati da HSV 1 (McIntyre), HSV 2 (MS) o CMV (AD-169) sono stati colorati con 3B3 e hanno mostrato risultati negativi. Le seguenti linee cellulari non hanno mostrato alcuna reattività incrociata:

Fibroblasti polmonari embrionali umani
Cellule del melanoma umano (ceppo Mewo) VERO
Cavia trasformata (ATCC 104C1)

FRANÇAIS

MERIFLUOR[®]
VZV

REF 500113

IVD

Dispositif médical de diagnostic in vitro

Rx Only

BUT DE LA METHODE

MERIFLUOR VZV est destiné à la détection directe de l'herpesvirus varicellae (VZV) dans les échantillons de frottis et de biopsies de la vésicule par la méthode d'anticorps fluorescents directe. Le réactif peut également être utilisé pour confirmer la présence du VZV dans une culture cellulaire.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST^{2,3,5}

Le VZV est un virus à ADN de la famille des virus herpétiques, responsable de la varicelle et du zona. La varicelle représente la primo-infection, tandis que le zona est causé par la réactivation du virus à l'état latent. Le VZV est couramment identifié au moyen de la méthode d'isolement par culture cellulaire, bien que Schmidt, et al. aient démontré que cette méthode ne détectait que 23% des cas positifs. En revanche, l'essai par fluorescence direct a détecté tous les cas positifs testés.

PRINCIPE DU TEST^{1,3}

MERIFLUOR VZV permet d'identifier le VZV par coloration directe d'anticorps fluorescents (FA). Un anticorps monoclonal (3B3) spécifique à la glycoprotéine du VZV et conjugué à l'isothiocyanate de fluoresceïne (FITC) réagit avec des cellules coupçonnées d'infection par le VZV; ce qui a pour conséquence le marquage direct des cellules infectées par VZV qui sont visibles sous un microscope à fluorescence.

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

- 3 mL d'isothiocyanate de fluoresceïne (FITC) – anticorps conjugué monoclonal anti-VZV (3B3) pré-dilué dans une solution saline tampon phosphate (PBS) de 0,01M contenant 0,1% d'azide de sodium, 1% de protéine porteuse et le contre-colorant bleu Evans.
- 5 mL de milieu de montage permanent FA contenant du glycérol avec tampon tris et inhibiteur photocolant.

MATERIEL NON FOURNI

Le réactif fourni permet d'identifier le virus VZV. Les autres équipements et solutions nécessaires à l'identification d'échantillons prélevés directement, d'échantillons de culture cellulaire ou d'échantillons biopsiques sont énumérés ci-dessous:

- Acétone (pure pour analyse)
 - Solution saline tamponnée à phosphate (PBS), pH 7,4 ± 0,2 (catalogue n 500500), sans calcium ni magnésium
 - Flacon laveur propre
 - Lames pour microscopie avec puits de 6 à 8 mm
 - Lamelles couvre-objet (épaisseur 1)
 - Chambre humide
 - Hypochlorite de sodium à 0,5% (eau de javel domestique diluée à 1:10)
 - Microscopie à fluorescence équipé d'un système de filtre adapté à l'isothiocyanate de fluoresceïne (longueur d'onde d'excitation maximale = 490 nm, longueur d'onde d'émission moyenne = 520 nm). Les lentilles doivent être de haute qualité avec une puissance d'agrandissement final de 100X à 400X.
- REMARQUE:** L'interprétation correcte des tests est étroitement liée au bon fonctionnement du microscope à fluorescence. La puissance de l'ampoule et son alignement, le type de luminosité (rayon incident ou epi), l'intensité lumineuse, ainsi que le type de filtre ont une incidence sur les performances. Effectuer des comparaisons avec le contrôle positif pour vérifier les performances du microscope.
9. Minuteur

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
- Les réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN₃) (conservateur), qui peut former des azides métalliques explosifs lorsqu'il est mis en contact avec le cuivre ou le plomb présent dans les tuyauteries. Pour éviter l'accumulation de l'azide dans les canalisations, faire couler de large volume d'eau en cas d'élimination dans un évier.
- Tout prélèvement par pipette doit impérativement être effectué avec une pipette conforme. Ne jamais pipetter avec la bouche.
- Tous les échantillons, pipettes et tubes de culture de tissus inoculés présentent un risque biologique. Ils doivent être décontaminés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5%, ou placés dans des sacs étanches de déchets biologiques à risque, puis placés en autoclave.
- Eviter toute contamination microbienne des réactifs.

DANGER ET MISES EN GARDE

Pour les dangers et les précautions à prendre, se référer à la fiche de sécurité, disponible sur le site web de Meridian Bioscience. (www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version)).

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

Les réactifs doivent être conservés à une température de 2 à 8°C, à l'abri de toute lumière forte. Ne pas congeler. Ne pas réchauffer les réactifs au bain-marie à 37°C. Amener à la température ambiante 18 à 25°C avant utilisation.

PROCEDURE DE TEST^{2,5}

REMARQUE

- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration.
- Les réactifs sont prêts à l'emploi. Ne pas les diluer.
- Ne pas laisser sécher les lames pendant la procédure de coloration.**
- Ne pas conserver les réactifs et ne pas effectuer la procédure de coloration dans un environnement à forte luminosité (lumière du soleil, par exemple).

Préparations des échantillons de frottis

Procéder à l'incision superficielle de la vésicule à l'aide d'un scalpel stérile. Soulever la partie supérieure de la lésion et appliquer soigneusement un tampon d'ouate pour absorber l'excès de fluide. Ce tampon pourra servir d'échantillon de culture. Racler entièrement la base de la lésion avec une lame de scalpel, en veillant à éviter tout saignement excessif. Etaler le matériel cellulaire recueilli en couche mince sur les parois du puits de 6 à 8 mm d'une lame de microscope stérile. Laisser sécher à l'air. Fixer 10 minutes avec de l'acétone froide 2 à 8°C à la température ambiante 18 à 25°C et sécher à l'air, ou acheminer dans les plus brefs délais au laboratoire qui procédera à la fixation. Conserver la préparation fixée et séchée à une température de 2 à 8°C si la procédure de coloration doit être différée au-delà de deux heures.

Préparation des échantillons de cultures tissulaires

Commencer par supprimer les cellules pour lesquelles les procédures de culture de tissus courantes ont démontré un effet cytopathique (ECP) spécifique au VZV. Déposer les cellules dans le puits (6 à 8 mm de diamètre) d'une lame, et laisser sécher à l'air. Fixer 10 minutes avec de l'acétone froide 2 à 8°C à la température ambiante 18 à 25°C et sécher à l'air. Conserver la préparation fixée et séchée à une température de 2 à 8°C si la procédure de coloration doit être différée au-delà de deux heures.

Avertissement: Seuls les laboratoires très expérimentés sur les procédures d'isolement viral par culture tissulaire peut procéder à l'isolement du virus par cette méthode.

Préparations des échantillons de biopsie

Recueillir les échantillons biopsiques à l'aide d'une biopsie à l'emporte-pièce ou d'une technique standard. Les biopsies sont susceptibles d'apporter des résultats plus fiables que les frottis.³ Les échantillons biopsiques doivent être congelés, subdivisés et séchés à l'air. Fixer 10 minutes avec de l'acétone froide 2 à 8°C à la température ambiante 18 à 25°C et sécher à l'air. Conserver la préparation fixée et séchée à une température de 2 à 8°C si la procédure de coloration doit être différée au-delà de deux heures.

Coloration

Les réactifs sont pré-dilués et prêts à l'emploi; ils ne doivent pas être dilués plus avant. Réchauffer les réactifs à température ambiante 18 à 25°C avant utilisation.

1. Déposer une à trois gouttes de FIT-anti-VZV conjugué monoclonal dans le puits.
2. Incuber 30 minutes dans une chambre humide à température ambiante 18 à 25°C.
3. Rincer délicatement chaque lame à l'aide d'un flacon de PBS en plastique déformable. VEILLER A CE QUE LE JET DE TAMPON NE DETERIORE PAS LES CELLULES.
4. Sécher à l'air ou, au besoin, avec un petit ventilateur ou séchoir à main réglé au plus bas.
5. Monter la préparation avec une goutte de milieu de montage, puis recouvrir d'une lamelle.
6. Examiner chaque lame sous un microscope à fluorescence avec agrandissement de 100X à 400X. La lecture immédiate des lames fournit les meilleurs résultats. Au besoin, les lames peuvent être conservées 24 heures dans le noir à une température de 2 à 8°C sans modifier la coloration de la fluorescence.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Frottis directs

Les échantillons présentant une fluorescence caractéristique vert pomme dans au moins deux cellules de l'ensemble du frottis sont considérés comme positifs pour VZV.

Les échantillons ne présentant aucune cellule dans un champ agrandi (400X), ni fluorescence positive ne répondent pas aux exigences du test.

On considère que les échantillons comportant un nombre suffisant de cellules parmi lesquelles on n'observe aucune fluorescence spécifique sont considérés comme négatifs.

La capture des conjugués sous les cellules, des résidus ou du mucus est susceptible d'entraîner une interprétation erronée. Il est fortement recommandé à l'utilisateur de comparer et de se familiariser avec les résultats obtenus par FA directe et les résultats de culture cellulaire (voir LIMITES DU TEST No1).

Isolement par culture cellulaire

Il convient d'observer les cellules positives et négatives. Les cellules positives présentent une fluorescence cytoplasmique vert pomme, tandis que les cellules négatives rouissent sous l'effet du contre colorant. Il est possible qu'un résultat négatif obtenu à partir d'un tube de cultures présentant peu (moins de cinq) de foyers de cellules infectées par le VZV découle d'un prélèvement de frottis inadéquat. Seuls les échantillons comportant au moins cinq foyers infectieux et ne démontrant aucune coloration spécifique devraient être déclarés négatifs.

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

Les tests de coloration directe ne permettent pas de contrôler la spécificité sur un même frottis. Les réactifs doivent cependant être testés en même temps par coloration des monocouches de cultures cellulaires positives et négatives connues. De plus, lorsque le test est effectué pour confirmer l'isolement d'un virus, les cellules non infectées du lot de cellules ayant servi à isoler le virus doivent être utilisées comme contrôle de cellule positif.

Si les réactions attendues ne sont pas observées, la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.

LIMITES DU TEST

1. Les préparations cellulaires et les frottis cytologiques ne forment pas toujours des monocouches uniformes, il existe un risque de capture de réactifs non spécifique.
2. L'interprétation peut être entravé par une contamination bactérienne ou fongique liant l'anticorps de manière aspécifique.
3. L'isolement du VZV par culture cellulaire est subordonné à la présence d'un virus vivant dans l'échantillon. Le succès de l'isolement dépend directement de la qualité des techniques de recueil, de transport et de culture mises en oeuvre.

PERFORMANCES DU TEST^{1, 3, 4, 6}

Frottis vésiculaires

Les échantillons de frottis vésiculaires de 26 patients, pour lesquels un diagnostic de varicelle ou zona a été établi par isolement du virus ou par des études sérologiques, ont été testés par la méthode de coloration avec l'anticorps monoclonal 3B3. Tous les échantillons ont présenté une réaction positive à l'antigène de l'herpesvirus varicellae. Les frottis vésiculaires de quatre patients infectés par le HSV étaient positifs après coloration avec antisérum anti-HSV, et négatifs après coloration avec l'anticorps 3B3.

Coupes tissulaires

Une biopsie de la vésicule d'un patient atteint de zona a été réalisée quatre jours après l'apparition de l'infection. Les sections ont été congelées, fractionnées et colorées avec l'anticorps monoclonal 3B3. Une coloration spécifique a été observée dans les couches basales et profondes de l'épiderme. Aucun antigène du virus de la varicelle n'a été détecté dans la couche de kératine externe ou dans le derme sous-jacent.

Les sections pulmonaires d'un patient atteint de pneumonie interstitielle causée par le cytomégalovirus ont été testées par la méthode de coloration avec l'anticorps monoclonal VZV. Aucune coloration n'a été observée. Par contre, la même technique était positive avec l'anticorps du cytomégalovirus.

Culture cellulaire

Les cellules de fibroblastes humains infectées par VZV-32, VZV-OKa ou cinq autres isolats cliniques ont été colorées avec 3B3 au cours d'une procédure d'anticorps fluorescents directe. Toutes les couches de VZV étaient positives. Des monocouches infectées par HSV 1 (McIntyre), HSV 2 (MS) ou CMV (AD-169) ont été colorées avec 3B3. Les résultats étaient négatifs. Aucune réactivité croisée n'a été démontrée dans les lignes cellulaires suivantes:

Fibroblaste pulmonaire embryonnaire humain	Cobaye transformé (ATCC 104C1)
Cellules de mélanine humaines (souche Mewo)	VERO

ESPAÑOL

MERIFLUOR[®]

VZV

IVD 500113

REF Dispositivo medico para diagnostic in vitro

Rx Only

USO INDICADO

El reactivo MERIFLUOR VZV ("Varicella Zoster Virus") ha sido preparado para la detección del virus de varicela-zóster (VZV) en frotis del líquido de vesículas y biopsias mediante la técnica de tinción directa con anticuerpo fluorescente (inmunofluorescencia directa, FA). Además, el reactivo puede utilizarse para confirmar la presencia de VZV en cultivos celulares.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El VZV es un virus ADN del grupo *herpesvirus* agente causal de la varicela y del herpes zóster (culebrilla). La varicela es la infección primaria, mientras que herpes zóster es el resultado de la reactivación del virus latente. A pesar de que comúnmente el VZV es identificado aislando el virus en cultivos celulares, Schmidt y col. han demostrado que dichos cultivos sólo detectan el 23% de los casos positivos. Contrariamente, los test por tinción directa con anticuerpo fluorescente detectaron todos los casos positivos analizados.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS^{1, 3}

El reactivo MERIFLUOR VZV proporciona la tinción directa con anticuerpo fluorescente (FA) para identificar al VZV. Un anticuerpo monoclonal (3B3), específico para la glicoproteína VZV y conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), reacciona con células potencialmente infectadas con VZV. Estas células quedan marcadas directamente con el anticuerpo fluorescente y la reacción puede observarse directamente utilizando un microscopio de fluorescencia.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

1. 3 mL de anticuerpo monoclonal pre-diluido: anti-VZV (3B) conjugado con FITC en solución tamponada de fosfatos (PBS) 0,01 M que contiene 0,1% azida de sodio, 1% proteína portadora y azul Evans como colorante de contraste.
2. 5 mL de medio de montaje que contiene glicerol tamponado con buffer Tris con agente inhibidor de decoloración por exposición a la luz.

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

El reactivo de tinción suministrado permite la identificación de VZV. Los materiales y el equipo adicionales necesarios para identificar el virus en frotis de muestras directas, cultivos celulares o biopsias son los siguientes:

1. Acetona (Grado reactivo)
 2. Solución salina tamponada de fosfatos (PBS), pH 7,4 ± 0,2 (No. de Catálogo 500500), sin calcio o magnesio
 3. Frasco de lavado limpio
 4. Láminas (portaobjeto) con orificios de 6 a 8 mm para microscopio
 5. Laminillas (cubreobjeto) de grosor No. 1
 6. Cámara de húmeda
 7. Hipoclorito de sodio al 0,5% (blanqueador de uso doméstico diluido a 1:10)
 8. Microscopio de fluorescencia con sistema de filtros adecuado para isotiocianato de fluoresceína (longitud de onda de excitación máxima = 490 nm; longitud de onda de emisión media = 520 nm). Las lentes deben ser de alta calidad con potencia final de 100X a 400X.
- NOTA:** Un microscopio en buen estado de funcionamiento es indispensable para interpretar los resultados del test correctamente. Las variaciones en el voltaje y la alineación de las lámparas, el tipo de iluminación (epi-o incidente) y la intensidad, al igual que el tipo de filtros pueden afectar el funcionamiento. Use el control positivo para verificar el funcionamiento correcto del microscopio.
9. Cronómetro

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. La azida de sodio (NaN₃) del reactivo es un preservante; puede reaccionar con el cobre y plomo de los tubos de desague y formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Para evitar la acumulación de azidas, use agua abundante al desechar las soluciones.
3. Use dispositivos de pipeteo seguros. No pipetee las muestras o los reactivos con la boca.
4. Todas las muestras, pipetas y tubos para cultivo tisular inoculados deben desinfectarse potencialmente infecciosos. Para desechar estos materiales, desinfectelos con hipoclorito de sodio al 0,5% o colóquelos en bolsas para materiales de peligro biológico en un autoclave.
5. Evite la contaminación microbiana de los reactivos.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

Se debe referir a los SDS, disponibles en www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version) para las Frases de Peligro y Precaución

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

Almacene el reactivo entre 2 y 8°C. No lo congele o almacene donde haya luz intensa. Los reactivos no deben ser calentados en un baño de agua a 37°C. Antes de usarlos, deje que se aclimaten a temperatura ambiente 18-25°C.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA^{2, 5}

NOTA

1. No use el reactivo después de la fecha de caducidad.
2. Los reactivos se suministran listos para usar. No se deben diluir.
3. **No deje que los frotis se sequen durante el procedimiento de tinción.**
4. No almacene el reactivo o realice el procedimiento de tinción bajo luz intensa, por ejemplo, la luz solar.

Preparación de las muestras para frotis

Haga una incisión en la periferia de la vesícula con un bisturí estéril. Levante hacia atrás la parte superior de la lesión y elimine el exceso de líquido absorbiéndolo suavemente con un hisopo. Este hisopo puede utilizarse como muestra para el cultivo. Raspe el lecho de la lesión minuciosamente con la hoja de un bisturí. Debe evitarse el sangrado excesivo. En una laminita limpia y dentro del orificio de 6 a 8 mm de diámetro, extienda una capa fina del material celular recolectado con el borde de la hoja. Deje secar al aire. La muestra debe fijarse con acetona fresca y fría 2 a 8°C durante 10 minutos a temperatura ambiente 18 a 25°C. De nuevo, deje secar al aire o transporte el frotis al laboratorio para fijar la muestra rápidamente. Realice la tinción dentro de las dos horas siguientes, o almacene el frotis fijado y *desechado* entre 2 y 8°C.

Preparación de las muestras para cultivos de tejido

Para hacer tinciones de virus aislados en cultivo tisular, recolecte las células que presenten un efecto citopático (CPE) típico para VZV, siguiendo los procedimientos de rutina para cultivos de tejidos. Coloque las células sobre una laminita portaobjetos, preferentemente dentro del orificio 6 a 8 mm de diámetro. Deje secar al aire. La muestra debe fijarse con acetona fresca fría 2 a 8°C durante 10 minutos a temperatura ambiente 18 a 25°C. De nuevo deje secar al aire. Realice la tinción dentro de las dos horas, o almacene la muestra *desechada* entre 2 y 8°C.

Precaución: el aislamiento del virus mediante cultivos de tejido sólo debe ser realizado en laboratorios con bastante experiencia en procedimientos de cultivo de tejidos.

Preparación de las muestras de biopsias

Recoja las muestras utilizando la técnica de biopsia por preparación o biopsia estándar. Las biopsias pueden proporcionar resultados más confiables que los frotis.⁵ Las biopsias se deben congelar, cortar, secar al aire y deben fijarse con acetona fresca fría 2 a 8°C durante 10 minutos a temperatura ambiente 18 a 25°C. Deje secar al aire. Realice la tinción dentro de dos horas o almacene la muestra *desechada* entre 2 y 8°C.

Tinción

Los reactivos suministrados están prediluidos. No vuelva a diluirlos. Deje que los reactivos se aclimaten a la temperatura ambiente 18 a 25 °C antes de usarlos.

1. Dispense en un orificio de una a tres gotas de anticuerpo monoclonal anti-VZV conjugado con FITC.
2. Incube en una cámara húmeda a temperatura ambiente 18 a 25 °C durante 30 minutos.
3. Lave cada frotis cuidadosamente usando el frasco con solución de lavado PBS. **CERCIÓRESE DE QUE EL CHORRO DE SOLUCIÓN NO DESPRENDA LAS CÉLULAS.**
4. Deje secar al aire (puede usar un ventilador pequeño o un secador utilizando aire frío).
5. Use una gota de medio de montaje para FA. Cubra el frotis con una laminilla cubreobjetos.
6. Estudie cada frotis bajo el microscopio de fluorescencia a una magnificación de 100-400X. Para mejores resultados, haga la lectura inmediatamente. Si es necesario, los frotis pueden ser almacenados en un lugar oscuro a una temperatura entre 2 y 8 °C hasta 24 horas sin que ocurra decoloración del colorante fluorescente.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Frotis directos

Las muestras que demuestran fluorescencia de color verde manzana en dos o más células del total del frotis son consideradas positivas para VVZ.

Las muestras con menos de una célula por campo de alta magnificación (400X) que no demuestran fluorescencia positiva deben reportarse como muestras no adecuadas para el test.

Las muestras con un número adecuado de células infectadas que no exhiben fluorescencia específica en dos o más células son consideradas negativas para VVZ.

No debe interpretarse erróneamente el conjugado atrapado debajo de las células o por detritos o moco. Es muy recomendable que el técnico adquiera experiencia en la interpretación de los resultados del test, haciendo extensas comparaciones de los resultados obtenidos por tinción directa con anticuerpo fluorescente (FA) y los obtenidos por cultivos celulares (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO, Punto. 1).

Aislamiento por cultivo celular

Se deben observar células positivas y negativas. Las células positivas expresan fluorescencia citoplásmica color verde manzana. Las células negativas expresan color rojo pálido debido al colorante de contraste. Los tubos de cultivo que exhiben pocos (menos de cinco) focos de células infectadas con VVZ pueden no dar resultados positivos debido a una toma inadecuada de la muestra para preparar el frotis. Sólo se deben reportar negativas las muestras con más de cinco focos de células infectadas que no exhiben tinción específica.

CONTROL DE CALIDAD

Este Ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales. Como es el caso con todas las pruebas de tinción directa, el test de control de especificidad no puede realizarse con el mismo frotis. No obstante, el reactivo debe ser analizado simultáneamente aplicando el colorante a capas simples de células con resultados conocidos positivos y negativos para VVZ. Además, cuando el virus aislado es confirmado, las células no infectadas provenientes del mismo lote utilizado para aislar el virus deben teñirse usando el mismo procedimiento que para la muestra del paciente.

Si los resultados esperados para el control no son observados, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Debido a que las preparaciones de células o frotis celulares no siempre se agrupan en capas uniformes de una sola célula, puede ocurrir que el reactivo sea atrapado de manera no específica.
2. La contaminación bacteriana o micótica puede ligar el anticuerpo de manera no específica e interferir con la interpretación de los resultados.
3. El aislamiento del virus de varicela-zóster depende de la presencia del virus activo en la muestra. Para un aislamiento satisfactorio deben emplearse técnicas apropiadas de recolección, transporte y cultivo de muestras.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO^{1, 3, 4, 5}

Frotis de vesículas

Utilizando el anticuerpo monoclonal 3B3, se teñieron frotis de muestras provenientes de vesículas de 26 pacientes diagnosticados con varicela o zóster mediante aislamiento del virus o provenientes serológicos. Todas las muestras dieron positivas para el antígeno de varicela-zóster. Los frotis de vesículas de cuatro pacientes con infecciones por el virus herpes simplex (VHS) dieron resultados positivos después de la tinción con antiseros anti-VHS, pero negativos por tinción con 3B3.

Secciones de tejidos

Se obtuvieron muestras de biopsias de vesículas obtenidas de un paciente con zóster cuatro días después del comienzo de la enfermedad. Las biopsias fueron congeladas, seccionadas y teñidas con el anticuerpo monoclonal 3B3. Se observó tinción específica en las capas basal y malpighiana de la epidermis. No se detectaron antígenos de varicela-zóster en la capa exterior de queratina o en la dermis subyacente.

Se obtuvieron secciones de tejido pulmonar de un paciente con neumonitis intersticial causada por el citomegalovirus (CMV) y se teñieron con el anticuerpo monoclonal VVZ. No se observó tinción específica. La misma técnica rindió resultados positivos con el anticuerpo CMV.

Cultivos celulares

En un procedimiento por tinción indirecta con anticuerpo fluorescente, fueron teñidos con 3B3, fibroblastos humanos infectados con VVZ-32, VVZ-OK_α o cinco tipos diferentes de VVZ aislados de material clínico. Todas las capas de VVZ exhibieron resultados positivos. Capas de una sola célula infectadas con VHS-1 (McIntyre), VHS-2 (MS) o CMV (AD-169) fueron teñidas con 3B3 y exhibieron resultados negativos. Las siguientes líneas de células demostraron la ausencia de reactividad cruzada:

Fibroblasto pulmonar de embrión humano
Células de melano ma humano (cepa MeWo)

Células transformadas de cobayo (ATCC 104C1)
Células Vero (células de riñón de mono verde africano o de mono Cercopithecus aethiops)

DEUTSCH

MERIFLUOR[®]

VZV

REF 500113

IVD In-vitro-Diagnostikum

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

MERIFLUOR VZV ist zum direkten Nachweis des Varicella zoster-Virus (VZV) in Bläschenabstrichen und Biopsieproben durch direkte Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Darüber hinaus kann das Reagens zur Bestätigung vorhandener VZV in der Zellkultur verwendet werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS^{2, 3, 5}

VZV ist ein DNS-Virus der Herpesvirus-Gruppe, der Windpocken (Varicella) und Gürtelrose (Zoster) hervorruft. Varicella ist die Hauptinfektion, wohingegen Zoster durch die Reaktivierung des latenten Virus verursacht wird. Obwohl VZV gewöhnlich durch Zellkulturisolation nachgewiesen wird, haben Schmidt et al. aufgezeigt, dass die Zellkultur nur 23% der positiven Fälle nachweist. Im Gegensatz dazu wies ein direkter Fluoreszenzassay alle getesteten positiven Fälle nach.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN^{1, 3}

MERIFLUOR VZV bietet eine direkte fluoreszente Antikörperfärbung (FA) zum Nachweis von VZV. Ein monoklonaler Antikörper (3B3), der spezifisch für das VZV-Glykoprotein und mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert ist, reagiert mit Zellen, bei den ein Verdacht auf VZV-Infektion besteht. Dies ergibt eine direkte fluoreszente Markierung von VZV-infizierten Zellen, die mittels eines Fluoreszenzmikroskops visualisiert werden kann.

REAGENZEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Außenseite der Packung angegeben.

1. 3 mL vorverdünnte Fluorescein-(FITC-) konjugierte, monoklonale Anti-VZV-(3B3) Antikörper in 0,01 Mol phosphatpufferte Kochsalzlösung (PBS), die 0,1% Natriumazid, 1% Trägerprotein und Evans Blue Glycerinfärbestoff beinhaltet.
2. 5 mL FA-Einbettungsmedium, bestehend aus Tris-Puffer-Glycerol mit Verzögerungsmittel gegen lichtinduziertes Ausbleichen.

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

Das mitgelieferte Färbungsreagens gestattet die Identifizierung von VZV. Die zusätzlichen Materialien und Ausrüstungen, die zur Identifizierung auf der Grundlage von direkten Abstrichproben oder Zellkulturproben notwendig sind, werden im folgenden aufgelistet:

1. Azeton (Reagenzgrad)
 2. Phosphat-pufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4 ± 0,2 (Katalognr. 500500), kalzium- und magnesiumfrei.
 3. Saubere Plastikspritzflasche
 4. Mikroskop-Objektträger mit 6 bis 8 mm Vertiefungen
 5. Deckgläser, Stärke Nr. 1
 6. Feuchte Kammer
 7. Natriumhypochlorid, endgültige Konzentration 0,5% (Verdünnung 1:10 von Haushaltsbleichmittel)
 8. Fluoreszenzmikroskop, das mit einem für Fluoresceinisothiocyanat passenden Filtersystem ausgestattet ist (Maximale Erregungswellenlänge = 490 nm, Mittlere Emissionswellenlänge = 520 nm). Die Linsen müssen von hoher Qualität sein und eine Endleistung von 100X bis 400X haben.
- HINWEIS:** Ein gut funktionierendes Fluoreszenzmikroskop ist zur korrekten Testauswertung von essenzieller Bedeutung. Variationen hinsichtlich der Wattzahl und der Ausrichtung der Birne, der Beleuchtungsart (Epi-Illumination oder einfallend) und Stärke und dem Filtertyp kann die Leistung beeinflussen. Verwenden Sie die positive Kontrolle, um die adäquate Leistung des Mikroskops zu verifizieren.
9. Stoppuhr

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Natriumazid (NaNa) wird als Konservierungsmittel in den Reagenzien verwendet. Es kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und explosive Metallazide bilden. Zur Beseitigung sollte es mit sehr viel Wasser weggespült werden, damit eine Azidablagerung in den Abflussrohren verhindert wird.
3. Verwenden Sie eine Sicherheitspipette zum Pipettieren. Nie mit dem Mund pipettieren.
4. Alle Proben, Pipetten und inokulierte Gewebekulturreagenzgläser sind als potenziell infektiös zu betrachten und sollte in 0,5% Natriumhypochlorid entsorgt oder in Tüten für biologisches Gefahrengut autoklaviert werden.
5. Vermeiden Sie die mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien.

GEFAHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

Für weitere Informationen zu den Gefahren- und Sicherheitshinweisen, beziehen Sie sich auf die SDS, die uner folgendem Link verfügbar sind www.meridianbioscience.com (US Version) / www.meridianbioscience.eu (EU Version).

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Die Reagenzien sollte bei 2 bis 8 °C gelagert werden. Frieren Sie sie nicht ein und lagern Sie sie nicht bei heller Beleuchtung. Die Reagenzien sollten nicht in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt werden. Bringen Sie sie vor Gebrauch auf Raumtemperatur 18 bis 25 °C.

TESTDURCHFÜHRUNG^{2, 5}

HINWEIS

1. Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach Ablauf der Haltbarkeitsfrist.
2. Die Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert. Verdünnen Sie sich nicht.
3. **Lassen Sie die Objektträger während des Färbeverfahrens nicht austrocknen.**
4. Lagerung der Reagenzien unter hellem Licht und Durchführung des Färbeverfahrens bei heller Beleuchtung, z.B. bei direkter Sonnenbestrahlung, sind zu vermeiden.

Vorbereitung der Ausstrichproben

Schneiden Sie das Vesikel peripher mit einem sterilen Skalpell ein.

Heben Sie die Oberseite der Läsion an und entfernen Sie die Flüssigkeit durch vorsichtiges Abtupfen mit einem Wattetupfer. Dieser Wattetupfer kann als Kulturprobe verwendet werden. Schaben Sie die Basis der Läsion gründlich mit einer Skalpellklinge ab. Starke Blutungen sollte dabei vermieden werden. Streichen Sie das zelluläre Material an der Kante der Klinge *dünn* über die 6 bis 8 mm große Vertiefung auf einem sauberen Objektträger und lassen Sie diesen lufttrocknen. Fixieren Sie die Probe 10 Minuten bei Raumtemperatur 18 bis 25 °C mit frischem, kaltem Azeton 2 bis 8 °C und lassen Sie sie dann lufttrocknen oder transportieren Sie sie zum Labor zur sofortigen Fixierung. Färben Sie die Probe innerhalb von zwei Stunden oder lagern Sie den fixierten Objektträger *getrocknet* bei 2 bis 8 °C.

Vorbereitung der Gewebekulturproben

Zur Färbung von Zellkulturisolationen entfernen Sie mittels Routinegewebekulturverfahren Zellen, die den typischen VZV-zytopathischen Effekt (CPE) aufweisen. Geben Sie die Zellen auf einen Objektträger, vorzugsweise auf eine Vertiefung von 6 bis 8 mm Durchmesser. Lassen Sie das Präparat lufttrocknen. Fixieren Sie die Probe zehn Minuten bei Raumtemperatur 18 bis 25 °C mit frischem, kaltem Azeton 2 bis 8 °C und lassen Sie sie dann lufttrocknen. Färben Sie die Probe innerhalb von zwei Stunden oder lagern Sie den fixierten Objektträger *getrocknet* bei 2 bis 8 °C.

Warnhinweis: Der Versuch einer Isolierung von Viren durch Gewebekultur sollte nur von Labors unternommen werden, die Erfahrung in Gewebekulturverfahren haben.

Vorbereitung der Biopsieproben

Entnehmen Sie Biopsieproben mit einer Biopsiestanze oder mittels einer anderen Standardtechnik. Biopsieproben können u.U. zu zuverlässigeren Ergebnissen als Ausstrichproben führen.⁵ Biopsieproben sollte eingebröckelt werden, dann sollten Schnitte angefertigt werden, die anschließend luftgetrocknet werden. Fixieren Sie die Probe 10 Minuten bei Raumtemperatur 18 bis 25 °C mit frischem, kaltem Azeton 2 bis 8 °C und lassen Sie sie dann lufttrocknen. Färben Sie die Probe innerhalb von zwei Stunden oder lagern Sie den fixierten Objektträger *getrocknet* bei 2 bis 8 °C.

Färbung

Die Reagenzien sind bereits vorverdünnt und gebrauchsfertig. Eine weitere Verdünnung ist nicht notwendig. Lassen Sie die Reagenzien und Objektträger vor Gebrauch Raumtemperatur 18 bis 25 °C annehmen.

1. Geben Sie eine bis drei Tropfen FITZ-konjugiertes, monoklonales Anti-VZV in die Vertiefung des Objektträgers.
2. Inkubieren Sie den Objektträger in einer feuchten Kammer 30 Minuten lang bei Raumtemperatur 18 bis 25 °C.
3. Spülen Sie jeden Objektträger vorsichtig mit PBS in einer Spritzflasche ab. **ZERSETZEN SIE DIE ZELLEN DABEI NICHT MIT DEM PUFFERSTRAHL!**
4. Lufttrocknen Sie die Objektträger (ein kleiner Ventilator oder auf "kühl" gestellter Fön kann verwendet werden).
5. Verwenden Sie ein Tropfen des FA-Einbettungsmediums und legen Sie ein Deckglas zum Einbetten auf.
6. Werten Sie jeden Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer 100X bis 400X Vergrößerung aus. Für die optimalste Auswertung lesen Sie die Objektträger sofort ab. Wenn notwendig können die Objektträger im Dunkeln bei 2 bis 8 °C bis zu 24 Stunden lang aufbewahrt werden, ohne dass die Fluoreszenzfärbung signifikant ausbleicht.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Direkte Abstriche

Proben, die typische apfelgrüne zytoplasmatische Einschlüsse in zwei oder mehr Zellen im gesamten Abstrich aufweisen, werden als VZV-positiv betrachtet.

Proben die pro HPF (400X) weniger als eine Epithelzelle aufweisen und keine positive Fluoreszenz beobachten lassen, sollten als zur Testung unangemessen berichtet werden.

Proben, die eine zureichende Zellzahl, aber keine spezifische Fluoreszenz in zwei oder mehr Zellen aufweisen, sind als negativ zu betrachten.

Der Einschluss von Kinjugat unter den Zellen oder von Verschmutzung und Schleim sollte nicht zu einer fehlerhaften Auswertung führen. Es wird sehr empfohlen, dass der Testbetreiber sich ausreichend Erfahrung durch intensive Vergleiche zwischen direkten Fluoreszenz-Antikörper-Ergebnissen und Zellkulturergebnissen aneignet (siehe EINSCHRÄNKUNGEN, Punkt 1).

Zellkulturisolation

Sowohl negative als auch positive Zellen sollten beobachtet werden. Positive Zellen weisen eine apfelgrüne zytoplasmatische Fluoreszenz auf. Negative Zellen färben sich aufgrund des Gegenfarbstoffs blassrot. Kulturen in Reagenzgläsern, die wenige (d.h. weniger als fünf) Herde VZV-infizierter Zellen aufweisen, ergeben u.U. keine positiven Ergebnisse aufgrund unzureichender Stichproben bei der Präparation des Abstrichs. Lediglich Proben mit mehr als fünf infizierten Herden, die keine spezifische Färbung aufweisen, sollten als negativ berichtet werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. Zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

Wie bei allen direkten Färbungstests können Spezifitätskontrollen nicht mit dem selben Abstrich unternommen werden. Allerdings sollte das Reagens simultan durch die Färbung von bekanntermaßen positiven und negativen Kulturmonolayers getestet werden. Darüber hinaus sollten bei der Bestätigung eines Virusisolats uninifizierte Zellen von der gleichen Charge wie die, die zur Isolation des Virus verwendet wurde, in der gleichen Art wie die Patientenproben gefärbt werden.

Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Distributor.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Da Zellpräparate oder zytologische Abstriche nicht immer einheitliche Monolayers darstellen, kann ein nichtspezifischer Einschluss von Reagenzien auftreten.
- Eine bakterielle oder mykotische Kontaminierung kann den Antikörper nichtspezifisch binden und mit der Auswertung interferieren.
- Die Isolation von VZV durch Zellkultur hängt von vorhandenen lebenden Viren ab. Unsachgerechte Handhabung der Proben kann zu einer Inaktivierung von VZV und folglich zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

LEISTUNGSMERKMALE^{1, 3, 4, 6}

Bläschenabstriche

Von 26 Patienten mit Windpocken oder Gürtelrose, die mit Virusisolation oder durch serologische Studien diagnostiziert wurden, wurden Bläschenabstriche mittels dem monoklonalen Antikörper 3B3 gefärbt. Alle Proben waren positiv hinsichtlich des Varicella-Zoster-Antigens. Die Bläschenabstriche von vier Patienten mit HSV-Infektionen waren positiv, wenn sie mit Anti-HSV-Antisern gefärbt wurden, zeigten jedoch ein negatives Ergebnis, wenn sie mit 3B3 gefärbt wurden.

Gewebeschnitte

Von einem Patienten mit Gürtelrose wurden vier Tage nach dem Ausbruch Bläschenbiopsieproben entnommen. Die Schnitte wurden gefroren, eingeteilt und mit dem 3B3 monoklonalen Antikörper gefärbt. Ein spezifische Färbung wurde in den Basal- und Regenerationsschichten der Epidermis festgestellt. Es in der äußeren Keratinschicht oder in der darunter liegenden Dermis wurden keine Varicella-Zoster-Antigene nachgewiesen. Bei einem Patienten mit Interstitieller Pneumonitis, die durch CMV verursacht wurde, wurden Längsschnitte mit dem VZV monoklonalen Antikörper gefärbt. Eine Färbung wurde nicht beobachtet. Die gleiche Technik ergab positive Resultate, wenn ein CMV-spezifischer Antikörper verwendet wurde.

Zellkultur

Humane Fibroblasten, die mit VZV-32, VZV-Oka oder fünf verschiedenen klinischen Isolaten infiziert wurden, wurden in einem indirekten Fluoreszenz-Antikörperverfahren mit 3B3 gefärbt. Alle VZV-Stämme zeigten positive Ergebnisse. Monolayers, die mit HSV 1 (McIntyre), HSV 2 (MS) oder CMV (AD-169) infiziert waren, wurden mit 3B3 gefärbt und zeigten negative Ergebnisse. Die folgenden Zelllinien zeigten keine Kreuzreaktivität:

Humane Embryonen-Lungenfibroblast (Mewo-Stamm) (ATCC 104C1) Transformierte Meerschweinchenzelllinien Humane Melanomzellen (VERO-Zelllinien)

REFERENCES

- Grose C, Edwards DP, Friedrichs WE, Weigle KA and McGuire WL. Monoclonal antibodies against three major glycoproteins of varicella-zoster virus. Infect Immun 1983 40:381-388.
- Schmidt NJ, Gallo D, Devlin V, Woodie JD and Emmons RW. Direct immunofluorescence staining for detection of herpes simplex and varicella-zoster virus antigens in vesicular lesions and certain tissue specimens. J Clin Microbiol 1980 12 (5):651-655.
- Weigle KA and Grose C. Common expression of varicella-zoster viral glycoprotein antigens in vitro and in chickenpox and zoster vesicles. J Infect Dis 1983 148(4):630-638.
- Weigle KA and Grose C. Varicella pneumoniae: immunodiagnosis with a monoclonal antibody. J Pediatrics 1984 August 105(2):265-9. 1979
- Weller TH. 1979. Varicella and Herpes Zoster, in *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*, Chapter 12, Lennette EH and Schmidt NJ. (eds.), p. 375-398. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Unpublished study. Data on file, Meridian Bioscience, Inc.



SN11068

REV. 04/16



Manufactured By

Meridian Bioscience Europe S.r.l.
Via dell'Industria, 7
20200 Villa Cortese, Milano
ITALY
Tel: +39 0331 43 36 36
Fax: +39 0331 43 36 16
Email: info@meridianbioscience.eu
WEB: www.meridianbioscience.eu



Authorized Representative

Meridian Bioscience Europe S. r. l.
Via dell'Industria, 7
20200 Villa Cortese, Milano
ITALY
Tel: +39 0331 43 36 36
Fax: +39 0331 43 36 16
Email: info@meridianbioscience.eu
WEB: www.meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe s.a.n.v.
2 Avenue du Japon - 1420 Braine l'Alleud
BELGIUM
Tel: +32 (0) 67 89 59 59
Fax: +32 (0) 67 89 59 58
Email: info.bn@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe France
34 rue de Ponthieu - 75008 Paris
FRANCE
Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40
Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10
Email: info.fr@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe b.v.
Postbus 301 - 5460 AH Veghel
NETHERLANDS
Tel: +31 (0) 411 62 11 66
Fax: +31 (0) 411 62 48 41
Email: info.bn@meridianbioscience.eu

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostika 98/79/EG.	SMP PREP DIL SPE	Simple Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenzubereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Numero de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulta las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabbriante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Solitario per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Solo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para "n" ensayos / Inhalt ausreichend für "n" Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limites de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numero de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontroltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactif / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date of fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
R. Only	Caution: US Federal law restricts this device to sale by or on the order of a licensed healthcare practitioner. / La legge Federale negli Stati Uniti prevede che questo test sia venduto solo a un operatore autorizzato ad operare nella salute. / Attention: La vente ou la prescription de ce dispositif par un médecin agréé est soumise à des restrictions par la loi fédérale des US. / Cuidado: Los productos de los EU limitan la venta de dispositivos por o por la orden de licenciados en la práctica del cuidado de la salud. / Vorsicht: Der Verkauf oder die Verschreibung dieses Geräts durch einen zugelassenen Arzt unterliegt den Beschränkungen des US Bundesgesetzes.	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Détection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz

For technical assistance, call Technical Support Services at (800) 343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at (800) 543-1980.