

PREMIER® ADENOCLONE® Type 40/41

EIA for the detection of Adenovirus Serotypes 40 and 41 in Human Fecal Samples

REF 696006

IVD In vitro diagnostic medical device

INTENDED USE

Premier Adenoclone-Type 40/41 is an enzyme immunoassay (EIA) for the qualitative detection of enteric adenovirus serotypes 40 and 41 in human fecal specimens.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Human adenoviruses consist of 41 known types, classified primarily by serology and DNA electrophoretotyping. The viruses are nonenveloped, DNA-containing icosahedrons composed of 252 capsomers. The virion contains a number of proteins associated with genus and type specificity. Those associated with genus (group) specificity are the alpha portion of the hexon, the penton base, the delta portion of the fiber and polypeptide IIIa. Those associated with species (type) specificity are the epsilon portion of the hexon and the gamma portion of the fiber. Those associated with both genus and type specificity are the major core protein and polypeptide IX.¹¹ The monoclonal antibodies in Premier Adenoclone-Type 40/41 specific EIA are directed against the type-specific portion of the hexon of adenovirus types 40 and 41. The type-specific monoclonal antibodies in the EIA will not react with any of the other adenovirus serotypes.¹

The enteric adenovirus types 40 and 41 are the only adenoviruses which have been consistently associated with gastroenteritis in infants and young children, and may be the second major cause of gastroenteritis after rotaviruses.^{2,4, 8, 13-17} Until recently, these viruses could be detected only by electron microscopy (EM). These adenovirus types can now be detected by cultivation in Graham 293 cells, a human embryonic kidney cell line transformed by adenovirus type 5 DNA, but cannot readily be cultivated in all lines traditionally used for adenovirus isolation, e.g. HEP-2 cells.³ Identification of adenovirus in tissue culture isolation is followed by the appearance of characteristic cytopathic effect (CPE). Generally CPE occurs within 3 to 7 days but may require up to 28 days.⁷⁻¹¹ Once the virus is isolated, it must be further characterized by analysis of restriction endonuclease digests of the virus DNA followed by gel electrophoresis.⁹

The Premier Adenoclone-Type 40/41 test kit for direct stool specimens is a rapid and specific test for adenovirus 40 and 41 that eliminates the need for tissue culture and DNA electrophoretotyping.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

Premier Adenoclone-Type 40/41 utilizes monoclonal antibodies in a solid phase sandwich type assay. Breakaway microwells are coated with a monoclonal antibody directed against the group specific antigen for all known human adenoviruses. An aliquot of fecal suspension is added to the microwell and incubated simultaneously with anti-adenovirus types 40 and 41 monoclonal antibodies, conjugated to horseradish peroxidase, resulting in the adenovirus antigen being sandwiched between the solid phase and enzyme conjugate. After a 60 minute incubation at room temperature, the sample well is washed with distilled or deionized water to remove unbound specimen and enzyme labelled antibodies. Enzyme substrate A (urea peroxide) and substrate B (tetramethylbenzidine) are added to the wells and incubated for 10 minutes at room temperature. Any bound enzyme-conjugate in the wells converts the colorless substrate to a blue color.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

- Microwells** - Coated with Group Specific Anti-Adenovirus Murine Monoclonal Antibody.
- Sample Diluent/Negative Control** - Buffered saline with 0.02% thimerosal as preservative.
- Positive Control** - Inactivated Adenovirus (AD41) in buffer with 0.02% thimerosal as preservative.
- Enzyme Conjugate** - Horseradish Peroxidase conjugated to anti-adenovirus types 40 and 41 murine monoclonal antibodies in a buffered protein solution with gentamicin and 0.02% thimerosal as preservatives.
- Substrate A** - Substrate buffer contains urea peroxide.
- Substrate B** - Substrate buffer contains tetramethylbenzidine.
- Stop Solution** - Contains 1 N sulfuric acid. **Caution:** Avoid contact with skin. If skin contact occurs, flush with water.
- Microwell Holder**
- Sample Transfer Pipettes**

MATERIALS NOT PROVIDED

- 12 x 75 mm test tubes, test tube rack
- Deionized or distilled water
- Absorbent paper
- Precision micropipette tips to deliver 100 µL and 1000 µL (optional)
- Waste container with a 1:10 dilution of household bleach. For autoclaving, use an iodophor disinfectant
- Microwell plate reader capable of reading absorbance at 450 nm (optional)
- Device for dispensing wash solution such as multi-channel pipette, syringe with manifold, wash bottle, etc
- Timer (minimum 1 hour)

PRECAUTIONS

- All reagents are for in vitro diagnostic use only.
- Do not mouth pipette samples or reagents. Avoid contact with broken skin or mucous membranes.
- Do not smoke, eat or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable gloves while handling samples and wash hands after assay is complete. Patient specimens, assay controls and all materials coming into contact with them should be handled at Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories".
- Avoid skin contact with stop solution (1N sulfuric acid). It may cause irritation and burns. Flush with water if contact occurs.
- Dispose of all materials used to perform the test by autoclaving at 121 C for at least one hour. Liquid waste may be disposed by mixing with a 1:10 dilution of household bleach for a minimum of 30 minutes. **CAUTION:** Liquid waste containing stop solution must be neutralized before addition of household bleach. Avoid splashing or generation of aerosols.
- Do not use Premier Adenoclone-Type 40/41 reagents beyond the kit expiration date. Each reagent has been optimized for maximum performance. Dilution or adulteration of these reagents may result in a loss of sensitivity. Incubation time and temperatures other than those specified may give erroneous results.
- Do not interchange or mix different lots of Premier Adenoclone-Type 40/41 reagents.
- Avoid microbial contamination of reagents or incorrect results may occur. Contamination of samples could cause erroneous results.
- Use separate pipettes or pipette tips for each sample, control and reagent.
- DO NOT REUSE MICROWELLS.

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

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

SHelf LIFE AND STORAGE

Store kit reagents at 2-8 C. Bring kit reagents to room temperature (20-30 C) before use and promptly return to 2-8 C after use. Keep microwells in pouch until the pouch reaches room temperature. Return all unused microwells to their original foil pouch. The microwells are stable for the shelf life of the kit after opening.

INDICATION OF INSTABILITY OR DETERIORATION

The following conditions may indicate reagent deterioration:

- Any evidence of microbial contamination or heavy precipitation.
- Any blue color in the substrate solutions before addition to microwells.
- A negative control value greater than 0.150 absorbance units at 450 nm may indicate deterioration of reagents.

- A positive control value of less than 0.3 absorbance units may indicate deterioration of reagents. If any of the above conditions are observed, contact our Technical Services Department at 1-800-343-3858 or your local distributor.

REAGENT PREPARATION

- Bring all reagents to room temperature (20-30 C) before use.
- Return all reagents to 2-8 C immediately after use.
- Do not allow microwells to dry between steps.
- Prepare decontaminating vessel for discarding reagents and materials.
- Reproducibility in any EIA assay is largely dependent upon the consistency with which the microwells are washed. Carefully follow the recommended washing sequence as outlined in the EIA test procedure.

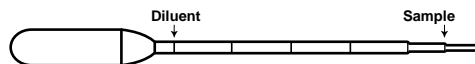
SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Add 1 mL of Sample Diluent/Negative Control to properly marked tube, using a transfer pipette or precision pipette. Add samples by one of the following:

- Stool specimens or rectal swabs should be collected in containers that do not contain media, preservatives, animal serum or detergent as any of these additives may interfere with the Premier Adenoclone-Type 40/41 assay. Caution should be taken when using rectal swabs to insure that sufficient fecal sample (30 to 50 mg of raw stool) is obtained.
- Solid stool — press sample into transfer pipette to first mark.
- Liquid stool — aspirate sample into transfer pipette to first mark.
- Rectal swab — swirl swab in 1 mL of sample diluent to release fecal material. Firmly press swab against side of tube to remove liquid. Mix thoroughly. *Do not dilute further.*
- Diluted samples may be stored at 2-8 C for three days without interfering with the assay performance. For long term storage of undiluted specimens, -20 C or colder is recommended. Repeated freezing and thawing of samples is not recommended and may cause erroneous results. Do not store in self-defrosting freezers.

Use the sample transfer pipette to add two drops (100 µL) of diluted stool specimen to each well.

Sample Transfer Pipette



TEST PROCEDURE

- Snap off a sufficient number of wells for samples and the controls and insert into the microwell holder. Record sample position.
- Add 2 drops (100 µL) of diluted fecal sample, negative control (sample diluent) or positive control to the bottom of separate microwells.
- Add 2 drops (100 µL) of enzyme conjugate to each microwell. Mix by gently swirling on table top.
- Incubate at room temperature for 60 ± 5 minutes.
- Pour the liquid out of the wells into a discard vessel. Tap the microwell holder upside down vigorously against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells.
- Fill all the wells to overflowing with deionized water and pour the liquid out as in Step 5.
- Repeat the washing procedure (Steps 5 & 6) four more times for a total of 5 washes.
- Add 2 drops (100 µL) of Substrate A (urea peroxide) solution, to each microwell.
- Add 2 drops (100 µL) of Substrate B (TMB) solution to each microwell.
- Incubate at room temperature for 10 minutes.
- Discard the used wells and absorbent paper into biohazardous waste after reading and recording results. Visual determinations can be made after incubating for 10 minutes in Step 10, and should be read within 10 minutes. Samples with blue color greater than the negative control are positive. Samples showing equal or less color than negative control are negative.

Optional - Spectrophotometric Procedure

Spectrophotometric determinations can be made by adding 2 drops (100 µL) of stop solution (1 N sulfuric acid) to each microwell after the incubation in step 10. Read the absorbance of each microwell at 450 nm using a >600 nm reference filter (optional) against an air blank within 60 minutes.

INTERPRETATION OF RESULTS

- Visual Determination:
Any sample with blue color more intense than that of the negative control is considered positive. Any sample with color equal to or less intense than the negative control is considered negative.
- Spectrophotometric Determination:
Specimens with absorbance units (A_{450}) equal to or greater than 0.150 are considered positive. Specimens with absorbance less than 0.150 are considered negative. Occasionally, a discrepant result may occur between visual and spectrophotometric determinations with samples containing low amounts of antigen. Spectrophotometric determination, being an objective method, is slightly more accurate.

NOTE: A precipitate may form in high positive samples. This will not affect the results.

QUALITY CONTROL

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

Premier Adenoclone-Type 40/41 is supplied with a positive and negative (sample diluent) control which are to be used every time an assay is performed. These reagents are used to insure that the kit reagents are working properly. The positive control well should be clearly blue with an absorbance at 450 nm of greater than 0.30. The negative control must have no visible color, and an absorbance at 450 nm of less than 0.150.

If the positive and negative controls do not perform properly, 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.

EXPECTED VALUES

Rate of positivity may vary depending on geographic location, method of specimen collection, handling and transportation, test employed and general health environment of patient population under study.

The frequency of adenovirus infection will vary with the clinical syndrome and the age of the individual. It has been reported that approximately 5 to 10% of viral gastroenteritis in infants and children under two years is caused by adenovirus types 40 and 41.^{2,4, 6, 8, 13}

Performance characteristics have not yet been fully determined for direct testing of neonatal stool samples. Lack of false positive results should be determined in each individual laboratory before neonatal stools are tested directly.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Premier Adenoclone-Type 40/41 is highly specific and sensitive for adenovirus types 40 and 41 antigen. Failure to detect adenovirus 40/41 may be a result of factors such as collection of specimen at an improper time in the disease, improper sampling or handling of the specimen.

A negative result for a stool sample may not preclude the presence of an infection with non-enteric adenovirus in other body fluids. If respiratory or ophthalmic infection is suspected specimens from the site of infection should be cultured and confirmed with Meridian Bioscience's Premier Adenoclone (Catalog #696007).

All positive results must be interpreted with caution since adenovirus is capable of latency and recrudescence.¹² Asymptomatic shedding may occur for months after infection.¹³ Enteric adenoviruses may be found in the stools of asymptomatic children.¹³ Test results should be interpreted in conjunction with information available from epidemiological studies or clinical evaluation of patient or other diagnostic procedures.¹²

While the relationship between adenovirus 40/41 and gastroenteritis is well established, co-infection with other viral and bacterial pathogens (including non-enteric adeno-viruses) is possible. Therefore, bacteriological tests should be performed in parallel with this test to rule out bacteriological etiology. Meridian Bioscience's Premier Rotaclo® rotavirus diagnostic kit (Catalog #696004) may be performed in parallel to rule out rotaviral gastroenteritis. False positives could occur with high levels of *S. aureus* possessing protein A such as Cowan strain. *Staphylococcal enterocolitis* is an uncommon disease generally described in adult patients and is extremely rare in infants and children.^{4, 10}

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Premier Adenoclone-Type 40/41 for enteric adenovirus antigen test was tested in collaboration with institutions in Arizona, Massachusetts, Ontario and Manitoba. The results were compared with initial Electron Microscopy followed by DNA restriction endonuclease analysis of adenovirus positive samples. All of the samples were tested by Premier Adenoclone-Type 40/41 EIA and scored visually then read spectrophotometrically. There was 100% correlation between visual and spectrophotometric determinations.

EM/DNA Restriction Analysis

	+	-
Premier Adenoclone-Type 40/41 EIA	58	3
	1	169
Sensitivity	98%	
Specificity	98%	
Total Agreement	98%	

ANALYTICAL SENSITIVITY

Virus particle counts from known adenovirus 40 and 41 stool samples were determined by electron microscopy. Serial dilutions were tested by Premier Adenoclone-Type 40/41. These results show that adenovirus particle counts as low as 10⁴ per mL can be detected by Premier Adenoclone-Type 40/41.

Virus Particle Count	Ad 40 (A ₄₅₀)	Ad 41 (A ₄₅₀)
2 x 10 ⁵	> 2.0	—
1 x 10 ⁶	> 2.0	> 2.0
5 x 10 ⁵	> 2.0	> 2.0
2.5 x 10 ⁵	> 2.0	> 2.0
1.25 x 10 ⁵	1.510	> 2.0
6.25 x 10 ⁴	1.001	> 2.0
3.1 x 10 ⁴	0.595	1.445
1.6 x 10 ⁴	0.307	0.781
8 x 10 ³	0.167	0.425
4 x 10 ³	0.108	0.219
2 x 10 ³	—	0.142

CROSSREACTIVITY

- Non-enteric Adenovirus Subgroups: Adenoviral 3 + CPE culture supernatants were tested by Premier Adenoclone-Type 40/41. The data shows no cross reactivity with the Premier Adenoclone-Type 40/41.
PLEASE NOTE: CPE culture supernates are not approved samples for use with this product. The information derived from tests with culture filtrates that is cited here is provided for information purposes only. Do not use culture supernates to verify specificity or sensitivity.

Adenoviruses		Premier Adenoclone-Type 40/41	Premier Adenoclone-Group specific*
Subgroup	Type	(A ₄₅₀)	(A ₄₅₀)
A	12	0.043	> 3.0
A	18	0.042	> 3.0
A	31	0.037	> 3.0
B	3	0.050	> 3.0
B	7	0.061	> 3.0
B	21	0.027	> 3.0
C	1	0.042	> 3.0
C	2	0.041	> 3.0
C	6	0.039	> 3.0
D	22	0.030	> 3.0
D	37	0.033	> 3.0
D	39	0.035	> 3.0
E	4	0.047	> 3.0
Negative control		0.049	0.060
Positive control		1.071	0.580

* The Adenovirus subgroups were tested by Meridian Bioscience's Premier Adenoclone (Catalog #696007) group specific EIA, which detects all 41 types of human adenovirus to demonstrate the presence of adenovirus.

- Microorganisms and Viruses: Common intestinal pathogens and other organisms occasionally present in feces were tested in Premier Adenoclone-Type 40/41 and showed no cross reactivity in the test.

Microorganisms

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Campylobacter lariidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Salmonella dysenteriae</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mycoplasma orale</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> * (Cowan)
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	

*False positives could occur with high levels of *S. aureus*, possessing protein A such as Cowan strain. *Staphylococcal enterocolitis* is an uncommon disease generally described in adult patients and is extremely rare in infants and children.^{9,10}

Viruses

Astrovirus	Echovirus 22	Reovirus 1
Calicivirus	Human Coronavirus	Reovirus 2
Chlamydia trachomatis (serotype A)	Influenza B	Reovirus 3
Coxsackievirus A-9	Measles	Respiratory Syncytial virus
Coxsackievirus B-3	Myxo/Paramyxoviruses SV-5	Rhinovirus 3
Coxsackievirus B-4	Norwalk virus	Rhinovirus 17
Coxsackievirus B-5	Papovavirus SV-40	Rhinovirus 25
Cytomegalovirus	Parainfluenza-1	Rhinovirus 43
Echovirus 4	Parainfluenza-2	Rhinovirus 62
Echovirus 8	Parainfluenza-3	Rotavirus
Echovirus 11	Poliovirus I	Simian foamyvirus (Types 2 & 8)
Echovirus 16	Poliovirus II	Small Round virus (SRV)
Echovirus 20	Poliovirus III	Varicella zoster virus

A urine sample was tested in the Premier Adenoclone-Type 40/41 and found to be negative.

REPRODUCIBILITY

Inter-assay variation

The inter-assay precision was determined by diluting known adenovirus 40 and adenovirus 41 positive samples to obtain high, medium, and low absorbance values. These diluted samples were tested in 21 different assays on different days by several technicians and the mean and coefficient of variation determined.

Adenovirus Type 40	High	Medium	Low	Negative
Mean	1.456	0.856	0.262	0.042
S.D.	0.174	0.088	0.025	0.017
CV	12.0%	10.3%	9.5%	40.5%

Adenovirus Type 41	High	Medium	Low
Mean	0.892	0.565	0.193
S.D.	0.072	0.068	0.019
CV	8.1%	12.0%	9.8%

Intra-assay variation

The intra-assay precision was determined by diluting known adenovirus 40 and adenovirus 41 positive samples to obtain high, medium, and low absorbance values. These diluted samples were tested 21 times within a single assay and the mean and coefficient of variation determined.

Adenovirus Type 40	High	Medium	Low	Negative
Mean	1.522	0.894	0.193	0.064
S.D.	0.038	0.038	0.011	0.022
CV	3.8%	4.3%	5.7%	34.3%

Adenovirus Type 41	High	Medium	Low
Mean	0.924	0.647	0.156
S.D.	0.086	0.039	0.012
CV	9.3%	6.0%	7.7%

ITALIANO

PREMIER® ADENOCLONE® Type 40/41

Test immunoenzimatico (EIA) per la ricerca di Adenovirus Tipo 40 e 41 in campioni fecali

REF 696006

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

FINALITÀ D'USO

Premier Adenoclone-Type 40/41 è un test immunoenzimatico (EIA) per la ricerca qualitativa di Adenovirus sierotipo 40 e 41 in campioni fecali.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli Adenovirus umani appartengono a 41 sierotipi, classificati in base a test sierologici e a tipizzazione elettroforetica del DNA. Adenovirus non presenta capsula pericapsidica, è un virus a DNA con capsidi icosaedrico costituito da 252 capsomeri. Il virus contiene proteine che ne determinano la specificità di genere e di sierotipo. Le proteine associate con la specificità di genere (gruppo) sono: la porzione alfa dell'essone, la porzione delta della fibra e il polipeptide IIIa. Le proteine associate con la specificità di specie (tipo) sono: la porzione epsilon dell'essone e la porzione gamma della fibra. Quelle associate con entrambe le specificità di genere e di tipo sono: la proteina maggiore del core e il polipeptide IX.¹¹ Gli anticorpi monoclonali utilizzati nei test Premier Adenoclone-Type 40/41 sono diretti contro la porzione dell'essone di Adenovirus tipo 40 e 41, che ne determina la specificità di sierotipo. Gli anticorpi monoclonali specifici per i sierotipi 40 e 41 non reagiscono con nessuno degli altri sierotipi di Adenovirus.¹

Gli Adenovirus enterici di tipo 40 e 41 sono gli unici Adenovirus associati a gastroenterite nei neonati e nei bambini e possono essere considerati il secondo agente causale di gastroenterite nei bambini dopo Rotavirus.^{2-4, 8, 13-17} Fino a tempi recenti questi virus potevano essere identificati solo mediante microscopia elettronica (EM). Ora invece questi sierotipi di Adenovirus possono essere coltivati in cellule di Graham 293 (cellule embrionali di rene umano trasformate da DNA di Adenovirus di tipo 5), ma non possono essere facilmente coltivati utilizzando linee cellulari come Hep-2, comunemente utilizzate per l'isolamento di Adenovirus.⁵ L'identificazione di Adenovirus da cellule in coltura avviene a seguito del verificarsi dell'effetto citopatico (CPE). Generalmente l'effetto citopatico si verifica entro 3-7 giorni di coltura, ma può verificarsi anche dopo 28 giorni.^{7,11} Una volta che il virus è stato isolato, deve essere ulteriormente caratterizzato mediante digestione del DNA virale con endonucleasi di restrizione e analisi mediante elettroforesi su gel.⁶

Il test Premier Adenoclone-Type 40/41 viene eseguito direttamente da campione fecale e non richiede colture cellulari e tipizzazione elettroforetica del DNA.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il test Premier Adenoclone-Ti Type 40/41 utilizza anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene specifico di gruppo comune a tutti gli Adenovirus umani conosciuti e adsorbiti su pozzetti microtiter frazionabili. Un'aliquota della sospensione di campione fecale viene aggiunta al pozzetto e incubata contemporaneamente con un anticorpo monoclonale anti-Adenovirus 40 e 41, coniugato con perossidasi di rafano. Se l'antigene è presente si formerà un complesso anticorpo di cattura-antigene-coniugato enzimatico. Dopo 60 minuti di incubazione a temperatura ambiente i pozzetti vengono lavati con acqua distillata o deionizzata per allontanare l'eccesso di campione e di coniugato. Quindi si aggiungono Substrato A (perossido di urea) e il Substrato B (tetrametilbenzidina) e la piastra viene incubata per 10 minuti a temperatura ambiente. In presenza di coniugato enzimatico legato all'antigene si avrà uno sviluppo di colore blu.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

- Pozzetti microtiter - adsorbenti con anticorpi monoclonali di tipo diretti contro l'antigene specifico di gruppo di Adenovirus
- Diluente del campione/Controllo Negativo - Soluzione tampone contenente conservante (thimerosal 0.02%).
- Controllo Positivo - Adenovirus (AD41) inattivato, in soluzione tampone, contenente conservante (thimerosal 0.02%).
- Coniugato enzimatico - Anticorpi monoclonali di tipo anti-Adenovirus tipo 40 e 41, marcati con perossidasi di rafano, in soluzione proteica contenente conservante (thimerosal 0.02%).
- Substrato A - Soluzione tampone contenente perossido di urea
- Substrato B - Soluzione cromagena contenente tetrametilbenzidina (TMB).
- Soluzione di arresto - Acido solforico 1N. Attenzione: Evitare il contatto con la pelle. Se il contatto avviene, lavare con acqua.
- Supporto per pozzetti microtiter
- Pipette monouso

MATERIALI NON FORNITI

- Provette (12x75 mm) per allestire le diluizioni dei campioni, rack per provette.
- Acqua distillata o deionizzata.
- Carta assorbente.
- Pipette e puntali in grado di erogare da 100 µL a 1000 µL (opzionali).
- Contenitore per il materiale di scarico dei lavaggi contenente una soluzione di candeggina al 10%.
- Lettore EIA per micropiastre dotato di filtri per la lettura a 450 nm (opzionale).
- Spruzzetta per dispensare la soluzione di lavaggio oppure pipetta multicanale, siringa, etc.
- Timer

PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- Non pipettare nessun campione o reagente con la bocca.
- Non fumare, mangiare o bere nelle aree dove i campioni e i reagenti del kit vengono utilizzati.
- Indossare guanti monouso e lavare le mani dopo l'esecuzione del test. I campioni dei pazienti e i controlli possono contenere agenti infettivi e devono pertanto essere maneggiati ed eliminati come materiali potenzialmente pericolosi.
- Evitare che la Soluzione d'arresto (acido solforico 1N) venga a contatto con la pelle. Può causare irritazioni e bruciate. Se il contatto con la pelle avviene, lavare con acqua.

- Autoclavare i materiali utilizzati per il test a 121 C per almeno un'ora, prima di eliminarli. Al liquido di scarico deve essere aggiunta una soluzione di candeggina al 10% per almeno 30 minuti. **ATTENZIONE:** il liquido di scarico contenente la Soluzione di arresto deve essere neutralizzato prima dell'aggiunta di ipoclorito di sodio.
- Evitare fuoriuscite di liquido e formazione di aerosol.
- Non utilizzare reagenti scaduti. Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli indicati possono causare risultati non corretti.
- Non scambiare reagenti appartenenti a lotti differenti.
- Evitare la contaminazione microbica dei reattivi. La contaminazione dei reattivi potrebbe causare risultati errati.
- Usare pipette o puntali diversi per ogni campione, controllo e reagente.
- Non riutilizzare i pozzetti.

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

La data di scadenza è indicata sull'etichetta esterna. Conservare il kit a 2-8 C, portare il kit a temperatura ambiente (20-30 C) prima dell'uso e rimetterlo in frigorifero immediatamente dopo l'utilizzo. Riporre tutti i pozzetti non usati nella loro busta.

INSTABILITÀ E DETERIORAMENTO

- Le seguenti condizioni possono indicare un deterioramento dei reagenti:
- Evidente contaminazione microbica dei reagenti o formazione di precipitato.
 - Substrato di colore blu prima dell'aggiunta ai pozzetti.
 - Un controllo negativo con un valore di assorbanza maggiore di 0,150 a 450 nm può indicare un deterioramento dei reagenti.
 - Un controllo positivo con un valore di assorbanza minore di 0,3 può indicare un deterioramento dei reagenti.

Se le condizioni elencate sopra dovessero verificarsi contattare il Servizio Tecnico o il Distributore Locale, (Italia +390331433636).

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Lasciare che tutti i componenti del kit, busta dei micropozzetti inclusa, raggiungano la temperatura ambiente (20-30 C) prima di iniziare il test.
- Riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8 C dopo l'uso.
- Fare in modo che i pozzetti non si asciugano durante i diversi passaggi della metodica.
- Preparare dei recipienti decontaminati per lo scarico di reagenti e materiali.
- La riproducibilità di ogni test EIA dipende particolarmente dalla tecnica di lavaggio, si raccomanda quindi di eseguire accuratamente tale procedura come indicato nella sezione METODICA.

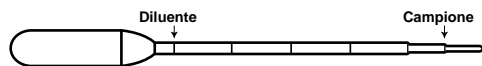
RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Distribuire 1 mL di Diluente del campione nelle provette opportunamente contrassegnate.

Aggiungere i campioni nel seguente modo:

- I campioni fecali o i tamponi rettali dovrebbero essere raccolti in contenitori non contenenti terreni, conservanti, siero animale o detersivi, dal momento che queste sostanze potrebbero interferire con l'esecuzione del test. Quando viene utilizzato per l'esecuzione del test il tampone rettale è necessario assicurarsi che sia stata raccolta una quantità sufficiente di materiale fecale (30-50 mg).
- Feci solide: raccogliere il campione nella pipetta fino alla prima tacca.
- Feci liquide: aspirare il campione nella pipetta fino alla prima tacca.
- Tampone rettale: stemperare il tampone in 1 mL di Diluente del campione, perché rilasci il materiale fecale. Premere il tampone contro la parete della provetta per rimuovere il liquido, quindi mescolare bene. Non diluire ulteriormente.
- I campioni diluiti devono essere esaminati il più velocemente possibile, ma possono anche essere conservati fino a tre giorni in frigorifero (2-8 C). Se la ricerca non può essere effettuata entro questo lasso di tempo, i campioni non diluiti dovrebbero essere congelati in un congelatore senza sbrinatorio ciclico ad una temperatura di -20 C (o inferiore). Ripetuti cicli di congelamento e scongelamento sono sconsigliati perché potrebbero dare risultati scorretti.

Pipette Monouso



PROCEDURA DEL TEST

- Preparare un numero di pozzetti sufficiente per i campioni e per due controlli. Inserire i pozzetti nel supporto e segnare la posizione dei singoli campioni.
- Aggiungere 2 gocce (100 µL) di campione diluito, controllo positivo, controllo negativo (diluente del campione) in pozzetti separati.
- Aggiungere 2 gocce (100 µL) di Coniugato enzimatico ad ogni pozzetto. Mescolare bene, agitando delicatamente la piastra.
- Incubare a temperatura ambiente per 60 ± 5 minuti.
- Scartare il contenuto dei pozzetti in un contenitore con disinfettante. Scuotere la piastra su carta assorbente pulita per rimuovere completamente il liquido dai pozzetti.
- Lavare i pozzetti con acqua distillata e scartare il liquido come al punto 5.
- Ripetere questa operazione di lavaggio (punti 5 e 6) per 4 volte (per un totale di 5 lavaggi).
- Distribuire 2 gocce (100 µL) di Substrato A (perossido di urea) in ciascun pozzetto.
- Distribuire 2 gocce (100 µL) di Substrato B (TMB) in ciascun pozzetto.
- Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
- Dopo lettura e registrazione dei risultati eliminare i pozzetti utilizzati in un contenitore di scarico per materiale biologico.

Al termine dell'incubazione (punto 10) può venire eseguita una lettura visiva: i campioni di colore blu, più intenso rispetto al controllo negativo sono positivi. I campioni che invece hanno un colore uguale o meno intenso rispetto al controllo negativo sono negativi.

Opzionale — Lettura Spettrofotometrica

Al termine dell'ultima incubazione (punto 10) può essere eseguita la lettura spettrofotometrica, dopo aggiunta di 2 gocce (100 µL) di Soluzione d'arresto (acido solforico 1 N).

L'assorbanza di ogni pozzetto deve essere letta entro 60 minuti (azzerando il lettore contro aria) a 450 nm, usando un filtro di riferimento > 600 nm (opzionale).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Letture visiva.** Ogni campione con un colore blu più intenso di quello del Controllo negativo è considerato positivo. Ogni campione con un colore uguale o meno intenso di quello del Controllo negativo è considerato negativo.
- Letture spettrofotometrica.** I campioni con un'assorbanza (A_{450}) maggiore di 0,150 sono considerati positivi. I campioni con un'assorbanza uguale o minore di 0,150 sono considerati negativi. Occasionalmente si può verificare una discrepanza tra i risultati ottenuti con la lettura spettrofotometrica e quella visiva in quei campioni che hanno un basso contenuto di antigene.

Per questo motivo la lettura spettrofotometrica, essendo oggettiva è più accurata.

NOTA: nei campioni molto positivi può formarsi un precipitato, questo fatto non altera i risultati.

CONTROLLO DI QUALITÀ

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

Il Controllo Positivo e quello Negativo (Diluente del campione) devono essere inclusi ogni volta che si esegue il test per controllare il corretto funzionamento dei reagenti.

Se si esegue la lettura visiva il Controllo positivo deve essere blu intenso, se letto allo spettrofotometro (450 nm) deve avere un'assorbanza maggiore di 0,30. Il Controllo negativo letto visivamente deve essere incolore o debolmente blu, se viene letto allo spettrofotometro deve avere un'assorbanza (450 nm) minore di 0,150.

Se si esegue una lettura spettrofotometrica, assicurarsi che non ci siano bolle nei pozzetti e che sulla superficie ottica non ci siano macchie o condensa, se è necessario asciugare delicatamente. Se il Controllo positivo e negativo non danno i sopracitati risultati, contattare il Servizio Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale, (Italia +390331433636).

VALORI ATTESI

Il tasso di positività può variare a seconda della località geografica, del metodo di raccolta dei campioni, dal maneggio e dal metodo di trasporto, dai test utilizzati e dallo stato di salute generale della popolazione di pazienti sottoposti allo studio.

La frequenza delle infezioni adenovirali varierà con la sindrome clinica e con l'età del soggetto. È stato riportato che circa il 5-10% dei casi di gastroenteriti virali riscontrati nei neonati e nei bambini al di sotto dei 2 anni è dovuto agli adenovirus di tipo 40 e 41.^{2, 4, 6, 8, 13}

Le caratteristiche di prestazione non sono state ancora del tutto determinate per le analisi dirette di campioni fecali dei neonati. La mancanza di risultati falsi positivi deve essere determinata presso ciascun laboratorio prima di analizzare direttamente le feci dei neonati.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il test Premier Adenoclone-Type 40/41 è altamente specifico e sensibile per l'antigene di Adenovirus tipo 40 e 41. La mancata diagnosi di infezione da Adenovirus 40 e 41 può essere il risultato di fattori come la raccolta del campione in un tempo non ottimale della malattia, oppure l'erronea conservazione del campione, o non corrette procedure culturali.

Un risultato negativo non preclude la possibile infezione da parte di Adenovirus non enterici localizzati in altre sedi. Se si sospetta un'infezione respiratoria o oculare i campioni dovrebbero essere testati con il kit Premier Adenoclone (Meridian Bioscience, codice 696007) previa coltura.

Tutti i risultati positivi devono essere interpretati con attenzione, dato che Adenovirus può manifestare latenza e recrudescenza.¹² La presenza asintomatica del virus può perdurare per mesi dopo l'infezione.¹³ Adenovirus enterici possono essere ritrovati nelle feci di bambini asintomatici.¹³ I risultati dei test devono essere interpretati in associazione alle informazioni disponibili derivanti da studi epidemiologici o da valutazioni cliniche del paziente.¹²

Mentre la relazione tra Adenovirus 40/41 e gastroenterite è stata ben stabilita, tuttavia è possibile la co-infezione con altri patogeni virali o batterici (incluso gli Adenovirus non enterici). Quindi dovrebbero essere eseguiti in parallelo anche test microbiologici per escludere l'etiologia batterica. Potrebbe venire eseguito in associazione anche il test Premier Rotaclone® (codice 696004) per escludere un'infezione da Rotavirus. Risultati falsi positivi potrebbero verificarsi in presenza di alti livelli di *S. aureus* che presenta la proteina A (Cowan). L'enterocolite da *Staphylococcus* non è un'infezione comune, ed è generalmente descritta in pazienti adulti ed è estremamente rara nei neonati e nei bambini.^{9, 10}

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Premier Adenoclone-Type 40/41 per le analisi degli antigeni di adenovirus enterici, testato in collaborazione con diversi istituti in Arizona, Massachusetts, Ontario e Manitoba. I risultati sono stati confrontati con microscopia elettronica a cui è seguita un'analisi di endonucleasi di restrizioni di DNA di campioni adenovirus positivi. Tutti i campioni sono stati testati con Premier Adenoclone-Type 40/41 EIA dando risultati esaminati visivamente quindi letti spettrofotometricamente. Si è riscontrata una correlazione al 100% tra le determinazioni visive e quelle spettrofotometriche.

Analisi di restrizione EM/DNA			
	+	+	-
Premier Adenoclone-Type 40/41 EIA	58	3	169
Sensibilità	98%		
Specificità	98%		
Concordanza totale	98%		

SENSIBILITÀ ANALITICA

Le conte di particelle virali di campioni fecali noti di adenovirus 40 e 41 sono state determinate mediante microscopia elettronica. Le diluizioni seriate sono state testate con Premier Adenoclone-Type 40/41. Questi risultati dimostrano che le conte di particelle di adenovirus fino a 10^6 per mL possono essere rilevate con Premier Adenoclone-Type 40/41.

Conta particelle virali	Ad 40 (A_{450})	Ad 41 (A_{450})
2×10^6	> 2,0	—
1×10^6	> 2,0	> 2,0
5×10^5	> 2,0	> 2,0
$2,5 \times 10^5$	> 2,0	> 2,0
$1,25 \times 10^5$	1,510	> 2,0
$6,25 \times 10^4$	1,001	> 2,0
$3,1 \times 10^4$	0,595	1,445
$1,6 \times 10^4$	0,307	0,781
8×10^3	0,167	0,425
4×10^3	0,108	0,219
2×10^3	—	0,142

CROSS-REATTIVITÀ

- Sottogruppi adenovirali non enterici: i supernatanti di cultura Adenovirale 3 + CPE sono stati testati con Premier Adenoclone-Type 40/41. I dati non esibiscono alcuna cross reattività con Premier Adenoclone-Type 40/41. **NOTA BENE:** I supernatanti culturali citopatici (CPE) non sono campioni approvati per essere utilizzati con questo prodotto. Le informazioni qui citate, ricavate dai test eseguiti con filtri di coltura, vengono fornite esclusivamente a scopo informativo. Non utilizzare i supernatanti culturali per verificare la specificità o la sensibilità.

Adenovirus		Premier Adenoclone-Type 40/41 (A_{450})	Premier Adenoclone-Specifico di un gruppo* (A_{450})
Sottogruppo	Tipo		
A	12	0,043	> 3,0
A	18	0,042	> 3,0
A	31	0,037	> 3,0
B	3	0,050	> 3,0
B	7	0,061	> 3,0
B	21	0,027	> 3,0
C	1	0,042	> 3,0
C	2	0,041	> 3,0
C	6	0,039	> 3,0
D	22	0,030	> 3,0
D	37	0,033	> 3,0
D	39	0,035	> 3,0
E	4	0,047	> 3,0
Controllo negativo		0,049	0,060
Controllo positivo		1,071	0,580

*I sottogruppi di adenovirus sono stati testati con Premier Adenoclone di Meridian Bioscience (n. di catalogo 696007) del gruppo specifico EIA, che rileva tutti i 41 tipi di adenovirus umani per dimostrare la presenza di adenovirus.

2. Microorganismi e virus: i comuni patogeni intestinali e gli altri organismi talvolta presenti nelle feci sono stati testati nel Premier Adenoclone-Type 40/41 senza esibire alcuna cross reattività.

Microorganismi

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Campylobacter lariidis</i>	<i>Kebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Salmonella dysenteria</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma hominus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mycoplasma orale</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan)
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	

*I falsi positivi potrebbero verificarsi con alti livelli di *S. aureus*, che possiede proteina A come il ceppo di Cowan. La *Staphylococcal enterocolitis* è una malattia poco comune descritta generalmente nei pazienti adulti, mentre è estremamente rara nei neonati e nei bambini.^{9, 10}

Virus

Astrovirus	Echovirus 22	Reovirus 1
Calicivirus	Coronavirus umano	Reovirus 2
Chlamydia trachomatis (serotipo A)	Influenza B	Reovirus 3
Coxsackievirus A-9	Rosolia	Virus della respirazione RSV
Coxsackievirus B-3	Myxovirus-Paramyxovirus SV-5	Rhinovirus 3
Coxsackievirus B-4	Virus Norwalk	Rhinovirus 17
Coxsackievirus B-5	Papovavirus SV-40	Rhinovirus 25
Cytomegalovirus	Parainfluenza-1	Rhinovirus 43
Echovirus 4	Parainfluenza-2	Rhinovirus 62
Echovirus 8	Parainfluenza-3	Rotavirus
Echovirus 11	Poliovirus I	Virus SFV (Tipo 2 e 8)
Echovirus 16	Poliovirus II	Virus "Small Round" (SRV)
Echovirus 20	Poliovirus III	Virus Varicella-Zoster

Un campione di urina è stato testato nel Premier Adenoclone-Type 40/41 ed è risultato negativo.

RIPRODUCIBILITÀ

Variazioni interdosaggio

La precisione interdosaggio è stata determinata diluendo campioni noti di adenovirus 40 e campioni positivi di adenovirus 41 per ottenere valori di assorbanza alti, medi e bassi. Questi campioni diluiti sono stati testati in 21 analisi diverse in giorni diversi da diversi tecnici determinando la media e il coefficiente di variazione.

Adenovirus Tipo 40	Alto	Medio	Basso	Negativo
Media	1,456	0,856	0,262	0,042
S.D.	0,174	0,088	0,025	0,017
CV	12,0%	10,3%	9,5%	40,5%

Adenovirus Tipo 41	Alto	Medio	Basso
Media	0,892	0,565	0,193
S.D.	0,072	0,068	0,019
CV	8,1%	12,0%	9,8%

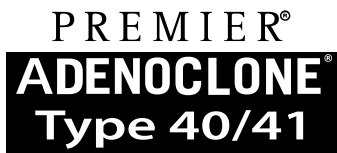
Variazioni intradosaggio

La precisione intradosaggio è stata determinata diluendo noti campioni positivi di adenovirus 40 e adenovirus 41 per ottenere valori di assorbanza alti, medi e bassi. Tali campioni diluiti sono stati testati 21 volte in una singola analisi determinando la media e il coefficiente di variazione.

Adenovirus Tipo 40	Alto	Medio	Basso	Negativo
Media	1,522	0,894	0,193	0,064
S.D.	0,038	0,038	0,011	0,022
CV	3,8%	4,3%	5,7%	34,3%

Adenovirus Tipo 41	Alto	Medio	Basso
Media	0,924	0,647	0,156
S.D.	0,086	0,039	0,012
CV	9,3%	6,0%	7,7%

FRANCAIS



Test ELISA pour la détection des Adenovirus sérotypes 40 et 41 dans les échantillons de selles humaines.

REF 696006

IVD Dispositif médical de diagnostic in vitro

BUT DE LA METHODE

Le Premier Adenoclone-Type 40/41 est un test immuno-enzymatique (ELISA) pour la détection qualitative des adenovirus entériques sérotypes 40 et 41 dans les échantillons de selles humaines.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Les adenovirus comprennent 41 types connus, classifiés à l'origine par la sérologie et par le typage électrophorétique de l'ADN. Ces virus sont sans enveloppe, et leur capsidie icosaédrique contenant l'ADN est formée de 252 capsomères. Les virions contiennent un certain nombre de protéines associées aux spécificités de genre et de type. Les protéines associées à la spécificité de genre sont la portion alpha de l'hexon, la base penton, la portion delta des fibres et le polypeptide iila. Les protéines associées à la spécificité de type sont la portion epsilon de l'hexon, et la portion gamma des fibres. Les protéines associées à la fois à la spécificité de genre et de type sont la protéine core majeure et le polypeptide iIX.¹¹ L'anticorps monoclonal du Premier Adenoclone-Type 40/41 est dirigé contre la portion type-spécifique de l'hexon des adenovirus type 40 et 41. L'anticorps monoclonal type-spécifique du test ELISA ne réagira avec aucun des autres sérotypes d'adenovirus.¹

Les adenovirus entériques types 40 et 41 sont les seuls adenovirus à avoir été constamment associés avec les gastro-entérites chez le nourrisson ou le jeune enfant, et pourraient être la seconde cause de gastro-entérites après les rotavirus.^{2-4, 8, 13-17} Jusqu'à récemment, ces virus pouvaient être détectés uniquement par microscopie électronique (ME). Ces types d'adenovirus peuvent maintenant être détectés par culture dans les cellules Graham 293, une lignée de cellules humaines embryonnaires de rein transformées par l'ADN de l'adenovirus de type 5, mais ne peuvent être cultivés facilement sur toutes les lignées utilisées habituellement pour l'isolation des adenovirus, comme par exemple les cellules HEp-2.⁵ L'identification des adenovirus par isolement en culture tissulaire est suivie par l'apparition d'un effet cytopathique caractéristique (CPE). Le CPE apparaît généralement dans les 3 à 7 jours mais peut nécessiter jusqu'à 28 jours.^{7, 11} Lorsque le virus est isolé, il doit être de plus caractérisé par analyse de l'ADN du virus par digestion par des endonucléases de restriction suivie d'une électrophorèse sur gel.⁶

Le test Premier Adenoclone-Type 40/41 pour test direct sur échantillons de selles, est un test rapide et spécifique pour les adenovirus 40 et 41 qui permet d'éviter la culture tissulaire et le typage électrophorétique de l'ADN.

PRINCIPE DU TEST

Le Premier Adenoclone-Type 40/41 utilise des anticorps monoclonaux fixés sur une phase solide dans un test ELISA de type sandwich. Les micropuits sécables sont recouverts d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène spécifique de groupe pour tous les adenovirus humains connus. Une fraction aliquote de suspension fécale est ajoutée au micropuits et incubée simultanément avec des anticorps monoclonaux anti-adenovirus types 40 et 41, conjugués à la peroxydase de raifort. L'antigène adenovirus sera ainsi pris en sandwich entre la phase solide et le conjugué. Après incubation de 60 minutes à température ambiante, le puits d'échantillon est lavé à l'eau distillée ou désionisée afin d'éliminer le conjugué et les échantillons non liés. Le substrat enzymatique A (peroxyde d'urée) et le substrat B (tétraméthylbenzidine) sont ajoutés aux puits et incubés 10 minutes à température ambiante. Les conjugués enzymatiques liés aux puits vont convertir le substrat incolore pour donner une coloration bleue.

MATERIEL FOURNI

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

1. **Micropuits** - recouverts d'anticorps monoclonaux de souris spécifiques de groupe anti-adenovirus.
2. **Diluant échantillons/contrôle négatif** - solution tamponnée saline avec 0,02% de thimérosal comme conservateur.
3. **Contrôle positif** - adenovirus inactivé (AD41) dans un tampon avec 0,02% de thimérosal comme conservateur.
4. **Conjugué enzymatique** - anticorps monoclonaux de souris anti-adenovirus types 40 et 41 conjugués à la peroxydase de raifort dans une solution protéique tamponnée avec de la gentamicine et 0,02% de thimérosal comme conservateurs.
5. **Substrat A** - solution tampon de substrat contenant du peroxyde d'urée.
6. **Substrat B** - solution tampon de substrat contenant du tétraméthylbenzidine.
7. **Solution d'arrêt** - acide sulfurique 1N. **ATTENTION:** éviter le contact avec la peau. En cas de contact, laver abondamment à l'eau.
8. **Support de microplaque**
9. **Pipettes de transfert pour échantillons**

MATERIEL NON FOURNI

1. Tubes à essais 12 x 75 mm, portoir de tubes
2. Eau distillée ou désionisée
3. Papier absorbant
4. Micropipette de précision pour délivrer des volumes de 100 µL et 1000 µL (en option)
5. Conteneur poubelle contenant de l'eau de Javel à la dilution 1:10. Pour l'autoclavage, utiliser un désinfectant iodophore.
6. Lecteur de microplaques capable de lire des absorbances à 450 nm (en option).
7. Dispositif pour distribuer la solution de lavage, type pipette multi-canaux, seringue avec distributeur automatique, pissette,
8. Minuteur (1 heure minimum)

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Ne pas pipetter à la bouche les échantillons ou les réactifs. Eviter le contact avec des lésions de la peau ou des muqueuses.
3. Ne pas fumer, manger ou boire sur le lieu où sont manipulés les échantillons ou les réactifs du coffret.
4. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons et se laver les mains à la fin du test. Les échantillons de patients, les contrôles et tout matériel entrant en contact avec, doivent être manipulés avec précaution (Biosafety Level 2) comme recommandé dans le manuel CDC/NIH "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories".
5. Eviter le contact cutané avec la solution d'arrêt (acide sulfurique 1N), car cela peut provoquer des irritations et des brûlures. Rincer immédiatement à l'eau en cas de contact.
6. Tout le matériel utilisé pour réaliser le test doit être traité par autoclavage à 121 C pendant au moins 1 heure. Les poubelles liquides doivent être mélangées à une solution au 1:10 d'eau de Javel pendant au moins 30 minutes. **ATTENTION:** la poubelle liquide contenant la solution d'arrêt doit être neutralisée avant le traitement à l'eau de Javel.
7. Eviter les projections et la formation d'aérosols.
8. Ne pas utiliser les réactifs du Premier Adenoclone-Type 40/41 au-delà de la date d'expiration du coffret. Chaque réactif a été optimisé pour une performance maximale. Toute dilution ou dénaturation de ces réactifs peut entraîner une perte de sensibilité. Des temps d'incubation ou des températures autres que ceux spécifiés peuvent entraîner des résultats erronés.
9. Ne pas intervenir ou mélanger des réactifs de différents lots de Premier Adenoclone-Type 40/41.
10. Eviter les contaminations microbiennes des réactifs au des résultats incorrects peuvent avoir lieu.
11. Utiliser des pipettes ou des embouts de pipettes différents pour chaque échantillon, contrôle et réactif.
12. NE PAS REUTILISER LES MICROPUIITS.

DANGER ET MISES EN GARDE

Pour les dangers et les précautions à prendre, se référer à la fiche de 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 du coffret doivent être conservés à 2-8 C. Ramener tous les composants du coffret à température ambiante (20-30 C) avant utilisation et remettre rapidement à 2-8 C après utilisation. Laisser les micropuits dans le sachet jusqu'à ce qu'ils aient atteint la température ambiante. Remettre tous les micropuits non utilisés dans le sachet d'origine. Les micropuits sont stables après ouverture, pour la durée de péremption du coffret.

INDICATION D'INSTABILITE OU DE DETERIORATION

Les conditions suivantes peuvent indiquer une détérioration des réactifs

1. Toute évidence de contamination microbienne ou de précipitation.
2. Toute apparition d'une coloration bleue dans les solutions substrat avant addition dans les micropuits.
3. Une valeur d'absorbance à 450 nm du contrôle négatif supérieure à 0,150 peut indiquer une détérioration des réactifs.
4. Une valeur d'absorbance à 450 nm du contrôle positif inférieure à 0,3 peut indiquer une détérioration des réactifs.

Si une de ces conditions est observée, contacter le support technique de Meridian ou votre distributeur local.

PREPARATION DES REACTIFS

1. Ramener tous les réactifs à température ambiante (20-30 C).
2. Remettre tous les réactifs à 2-8 C après utilisation.
3. Ne pas laisser sécher les micropuits entre deux étapes.
4. Préparer des contenants de décontamination pour l'élimination des réactifs et du matériel.
5. Pour tous les tests ELISA, la reproductibilité dépend largement du soin avec lequel les micropuits sont lavés. Suivre avec attention la séquence de lavage recommandée dans la procédure de test ELISA.

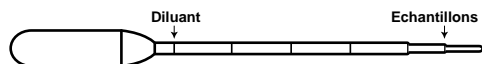
PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

En utilisant une pipette de transfert ou une pipette de précision, ajouter 1 mL de diluant échantillons à un tube marqué de façon adéquate. Ajouter l'échantillon:

1. Les échantillons de selles ou les prélèvements rectaux doivent être collectés dans des contenants ne contenant pas de milieu, conservateur, sérum animal ou de détergent car tous ces additifs peuvent interférer avec le test Premier Adenoclone-Type 40/41. Des précautions doivent être prises lors de l'utilisation de prélèvements rectaux afin de s'assurer que suffisamment d'échantillon fécal a été obtenu (30 à 50 mg de selles brutes).
2. Selles solides: presser l'échantillon dans la pipette de transfert jusqu'à la première marque.
3. Selles liquides: aspirer l'échantillon dans la pipette de transfert jusqu'à la première marque.
4. Prélèvements rectaux: faire tourner le prélèvement dans 1 mL de diluant échantillons afin de relâcher le matériel fécal. Presser fermement le prélèvement sur le bord du tube pour éliminer le liquide. Mélanger. *Ne pas diluer davantage.*
5. Les échantillons dilués peuvent être conservés à 2-8 C pendant trois jours sans que cela interfère avec les performances du test. Pour des temps de conservations plus longs, il est recommandé de conserver les échantillons non dilués à au moins -20 C. Des congélations/décongélations répétées des échantillons ne sont pas recommandées. Ne pas conserver dans des congélateurs auto-dégivrants.

Utiliser la pipette de transfert pour ajouter 2 gouttes (100 µL) d'échantillon de selles dilué à chaque puits.

Pipettes de transfert pour échantillons



PROCEDURE DE TEST

- Détacher un nombre suffisant de puits pour les échantillons et les contrôles et les placer sur le support de micropuits. Noter la position des échantillons.
- Ajouter 2 gouttes (100 µL) d'échantillon fécal dilué, de contrôle négatif (diluant échantillons) ou de contrôle positif dans le fond de micropuits séparés.
- Ajouter 2 gouttes (100 µL) de conjugué enzymatique à chaque micropuits. Mélanger par rotation.
- Incuber 60 ± 5 minutes à température ambiante.
- Éliminer le liquide des puits dans un conteneur poubelle. Taper fermement le support de micropuits sur un papier absorbant afin d'éliminer complètement le liquide des micropuits.
- Remplir entièrement tous les puits d'eau désionisée et éliminer le liquide comme dans l'étape 5.
- Répéter la procédure de lavage (étapes 5 et 6) quatre fois supplémentaires pour un total de 5 lavages.
- Ajouter 2 gouttes (100 µL) de solution Substrat A (peroxyde d'urée) à chaque micropuits.
- Ajouter 2 gouttes (100 µL) de solution Substrat B (TMB) à chaque micropuits.
- Incuber 10 minutes à température ambiante.
- Après la lecture et l'enregistrement des résultats, jeter les puits utilisés et le papier absorbant dans un conteneur pour matériel infectieux.

Une détermination visuelle peut être effectuée après l'incubation de 10 minutes de l'étape 10 et doit être réalisée dans les 10 minutes. Les échantillons avec une couleur bleu plus marquée que le contrôle négatif sont positifs. Les échantillons montrant la même couleur ou une coloration plus pâle que le contrôle négatif sont négatifs.

Procédure spectrophotométrique (optionnelle)

Des déterminations spectrophotométriques peuvent être réalisées en ajoutant 2 gouttes (100 µL) de solution d'arrêt (acide sulfurique 1N) à chaque micropuits après l'incubation de l'étape 10. Lire l'absorbance de chaque micropuits à 450 nm en utilisant un filtre de référence > 600 nm (optionnel). Faire le blanc sur l'air et lire dans les 60 minutes.

INTERPRETATION DES RESULTATS

- Détermination visuelle:
Tout échantillon avec une coloration plus intense que le contrôle négatif est considéré comme positif. Tout échantillon avec une coloration égale ou moins intense que le contrôle négatif est considéré comme négatif.
- Détermination spectrophotométrique:
Les échantillons avec une DO₄₅₀ supérieure ou égale à 0,150 sont considérés comme positifs. Les échantillons avec une absorbance inférieure à 0,150 sont considérés comme négatifs. Occasionnellement, une discordance peut être observée entre la lecture visuelle et spectrophotométrique, avec des échantillons contenant de faible quantité d'antigène. La détermination spectrophotométrique, plus objective, est légèrement plus précise.

Remarque: Un précipité peut se former dans les échantillons fortement positifs. Ceci n'affectera pas les résultats du test.

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.

Le Premier Adenoclone-Type 40/41 est fourni avec un contrôle positif et négatif (diluant échantillons) qui doivent être utilisés lors de chaque test afin de garantir la qualité des réactifs. Le puits du contrôle positif doit être clairement coloré en bleu avec une absorbance à 450 nm supérieure à 0,3. Le contrôle négatif doit être incolore avec une absorbance à 450 nm inférieure à 0,150.

Si les contrôles positif et négatif ne donnent pas les résultats attendus, 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.

VALEURS ATTENDUES

Le taux de positivité peut varier en fonction de la localisation géographique, de la méthode de prélèvement des échantillons, du transport et de la manipulation, du test employé et de l'environnement général sanitaire de la population de patients étudiée.

La fréquence des infections à adénovirus variera avec les syndromes cliniques et l'âge des individus. Il a été décrit que, approximativement 5 à 10% des gastro-entérites virales chez le nourrisson et l'enfant de moins de deux ans sont causées par les adénovirus de types 40 et 41.^{2, 4, 6, 8, 13}

Les performances n'ont pas été pleinement établies pour le test direct des échantillons de selles néonatales. L'absence de résultats faussement positifs doit être établie par chaque laboratoire individuel avant que les selles néonatales soient testées directement.

LIMITES DU TEST

Le Premier Adenoclone-Type 40/41 est hautement spécifique et sensible pour les antigènes des adénovirus type 40 et 41. Un échec lors de la détection des adénovirus 40/41 peut être dû à des facteurs tels que le prélèvement des échantillons à un moment inapproprié de la maladie, une préparation ou une manipulation incorrecte des échantillons.

Un résultat négatif pour un échantillon de selles n'exclut pas la présence d'une infection par un adénovirus non entérique dans d'autres fluides corporels. Si des infections respiratoires ou ophtalmiques sont suspectées, des échantillons provenant du site de l'infection doivent être mis en culture et confirmés avec le test Premier Adenoclone- de Meridian Bioscience (référence 696007).

Les résultats positifs doivent être interprétés avec prudence dans la mesure où les adénovirus sont capables de latence et de recrudescence.¹² Une chute asymptomatique peut avoir lieu des mois après l'infection.¹³ Des adénovirus entériques peuvent être trouvés dans les selles d'enfants asymptomatiques.¹³ Les résultats du test doivent être interprétés en conjonction avec les informations disponibles provenant d'études épidémiologiques ou d'évaluation cliniques de patients ou d'autres procédures de diagnostic.¹²

Bien que la relation entre les adénovirus 40/41 et les gastro-entérites soit bien établie, des co-infections par d'autres pathogènes bactériens (y compris des adénovirus non entériques) est possible. Aussi, des tests bactériologiques doivent être réalisés en parallèle avec ce test afin d'exclure des étiologies bactériennes. Le test Premier Rotaclone®, pour le diagnostic du rotavirus, de Meridian Bioscience (référence 696004) peut être réalisé en parallèle afin d'exclure les gastro-entérites dues au rotavirus. Des résultats faussement positifs peuvent être observés avec des taux élevés de *S. aureus* qui possède une protéine A comme la souche Cowan. *Staphylococcus enterocolitis* est une maladie peu commune généralement décrite chez les patients adultes et qui est extrêmement rare chez les nourrissons et les enfants.^{9, 10}

PERFORMANCES DU TEST

Le Premier Adenoclone-Type 40/41 pour les antigènes des adénovirus entériques a été testé en collaboration avec des institutions de l'Arizona, du Massachusetts, de l'Ontario et du Manitoba. Les résultats ont été comparés avec la microscopie électronique suivie d'analyse par endonucléases de restriction de l'ADN, à partir d'échantillons adénovirus positifs. Tous les échantillons ont été testés par le Premier Adenoclone-Type 40/41 et analysés visuellement puis lus spectrophotométriquement. La corrélation entre la détermination visuelle et spectrophotométrique était de 100%.

Premier Adenoclone -Type 40/41 EIA	ME/analyse de l'ADN	
	+	-
Sensibilité	98%	98%
Spécificité	98%	98%
Corrélation	98%	98%

SENSIBILITE ANALYTIQUE

Le comptage de particules virales à partir d'échantillons de selles adénovirus connues a été réalisé par microscopie électronique. Des dilutions sérielles ont été testées par le Premier Adenoclone-Type 40/41. Ces résultats montrent qu'un nombre de particules d'adénovirus aussi petit que 10⁴ par mL, peut être détecté par le Premier Adenoclone-Type 40/41.

Comptage des particules virales	Ad 40 (A ₄₅₀)	Ad 41 (A ₄₅₀)
2 x 10 ⁶	> 2,0	—
1 x 10 ⁶	> 2,0	> 2,0
5 x 10 ⁵	> 2,0	> 2,0
2,5 x 10 ⁵	> 2,0	> 2,0
1,25 x 10 ⁵	1,510	> 2,0
6,25 x 10 ⁴	1,001	> 2,0
3,1 x 10 ⁴	0,595	1,445
1,6 x 10 ⁴	0,307	0,781
8 x 10 ³	0,167	0,425
4 x 10 ³	0,108	0,219
2 x 10 ³	—	0,142

REACTIONS CROISEES

- Sous-groupe des adénovirus non entériques: des surnageants de cultures adénovirales 3+ en CPE ont été testés par le Premier Adenoclone-Type 40/41. Les résultats ne montrent pas de réactions croisées avec le Premier Adenoclone-Type 40/41.

NB: les surnageants de la culture cytopathique ne sont pas approuvés pour être utilisés avec ce produit. Les données obtenues à partir des tests faits sur les filtrats mis en culture et qui sont fournies ici ne sont données qu'à titre d'information. Ne pas utiliser les surnageants mis en culture pour vérifier la spécificité ou la sensibilité.

Adénovirus	Premier Adenoclone-Type 40/41	Premier Adenoclone Groupe Spécifique*
Sous-groupes	Type	(A₄₅₀)
A	12	0,043
A	18	0,042
A	31	0,037
B	3	0,050
B	7	0,061
B	21	0,027
C	1	0,042
C	2	0,041
C	6	0,039
D	22	0,030
D	37	0,033
D	39	0,035
E	4	0,047
Contrôle négatif		0,049
Contrôle positif		0,071

*Les sous-groupes d'adénovirus ont été testés avec le Premier Adenoclone groupe spécifique ELISA de Meridian Bioscience (référence 696007), qui détecte tous les 41 types d'adénovirus humains afin de démontrer la présence de l'adénovirus.

- Micro-organismes et virus: les pathogènes intestinaux communs et d'autres organismes occasionnellement présents dans les selles ont été testés avec le Premier Adenoclone-Type 40/41 et ne montrent pas de réactivité avec le test.

Micro-organismes

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Campylobacter lariidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Salmonella dysenteria</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mycoplasma orale</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> * (Cowan)
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	

* Des résultats faussement positifs peuvent être observés avec des taux élevés de *S. aureus* qui possède une protéine A comme la souche Cowan.

Staphylococcus enterocolitis est une maladie peu commune généralement décrite chez les patients adultes et qui est extrêmement rare chez les nourrissons et les enfants.^{9, 10}

Virus

Astrovirus	Echovirus 22	Reovirus 1
Calicivirus	Coronavirus humain	Reovirus 2
Chlamydia trachomatis (sérotype A)	Influenza B	Reovirus 3
Coxsackievirus A-9	Rougeole	Virus respiratoire syncytial
Coxsackievirus B-3	Myxo/Paramyxovirus SV-5	Rhinovirus 3
Coxsackievirus B-4	Norwalk virus	Rhinovirus 17
Coxsackievirus B-5	Papovavirus SV-40	Rhinovirus 25
Cytomégalovirus	Parainfluenza-1	Rhinovirus 43
Echovirus 4	Parainfluenza-2	Rhinovirus 62
Echovirus 8	Parainfluenza-3	Rotavirus
Echovirus 11	Poliovirus I	Virus simian (Type 2 & 8)
Echovirus 16	Poliovirus II	Small Round virus (SRV)
Echovirus 20	Poliovirus III	Virus varicelle zona

Un échantillon d'urine a été testé par le Premier Adenoclone-Type 40/41 et a été trouvé négatif.

REPRODUCTIBILITE DE TEST

Variation inter-essais

La précision inter-essais a été déterminée en diluant des échantillons adénovirus 40 et adénovirus 41 positifs connus, de façon à obtenir des valeurs d'absorbance haute, moyenne et faible. Ces échantillons dilués ont été testés au cours de 21 tests différents, effectués lors de différents jours par plusieurs techniciens. La moyenne et le coefficient de variation ont ainsi été déterminés.

Adénovirus Type 40	Haut	Moyen	Faible	Négatif
Moyenne	1,456	0,856	0,262	0,042
DS	0,174	0,088	0,025	0,017
CV	12,0%	10,3%	9,5%	40,5%

Adénovirus Type 41	Haut	Moyen	Faible	Négatif
Moyenne	0,892	0,565	0,193	0,042
DS	0,072	0,068	0,019	0,017
CV	8,1%	12,0%	9,8%	40,5%

Variation intra-essai

La précision intra-essai a été déterminée en diluant des échantillons adénovirus 40 et adénovirus 41 positifs connus de façon à obtenir des valeurs d'absorbance haute, moyenne et faible. Ces échantillons dilués ont été testés 21 fois au cours d'un seul test et la moyenne et le coefficient de variation ont été déterminés.

Adenovirus Type 40	Haut	Moyen	Faible	Négatif
Moyenne	1,522	0,894	0,193	0,064
DS	0,038	0,038	0,011	0,022
CV	3,8%	4,3%	5,7%	34,3%

Adenovirus Type 41	Haut	Moyen	Faible
Moyenne	0,924	0,647	0,156
DS	0,086	0,039	0,012
CV	9,3%	6,0%	7,7%

ESPAÑOL

PREMIER® ADENOCLONE® Type 40/41

Immunoensayo enzimático (EIA) para la detección de los serotipos 40 y 41 de Adenovirus en muestras de materia fecal humana

REF 696006

IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

USO INDICADO

El test Premier Adenoclone-Type 40/41 es un immunoensayo enzimático (EIA) para la detección cualitativa de los serotipos 40 y 41 de adenovirus entéricos en muestras de materia fecal humana.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Se han identificado 41 tipos de adenovirus humanos. En la mayoría de los casos los adenovirus han sido clasificados en tipos por técnicas de serología y electroforesis de ADN. Los virus tienen simetría icosaédrica, carecen de envoltura, contienen ADN y están compuestos por 252 capsómeros. El virión contiene un número de proteínas específicas al género y al tipo. Las proteínas específicas al género (grupo) son: la porción alfa de la hexona, la base de pentona, la porción delta de la fibra y el polipéptido ulla. Las relacionadas con la especificidad de la especie (tipo) son: la porción epsilon de la hexona y la porción gamma de la fibra. Las relacionadas con ambos, género y tipo, son la proteína principal del núcleo y el polipéptido IX.¹¹ Los anticuerpos monoclonales específicos del test EIA Premier Adenoclone-Type 40/41 se dirigen contra la porción de la hexona específica a los adenovirus tipos 40 y 41. En el test EIA, los anticuerpos monoclonales específicas al tipo no reaccionan con ningún otro serotipo de adenovirus.¹

Los adenovirus entéricos de tipos 40 y 41 son los únicos que han sido asociados repetidamente con la gastroenteritis en infantes y niños pequeños, y es posible que representen el segundo factor causal de esta enfermedad después del rotavirus.^{2,4,8,13-17} Hasta hace muy poco, estos tipos de adenovirus sólo podían ser detectados por microscopía electrónica (ME). En la actualidad, pueden detectarse en cultivos de células 293 de Graham, una línea de células renales humanas embrionarias transformadas por ADN tipo 5 de adenovirus. No obstante, no pueden ser cultivados fácilmente en todas las líneas de células usadas tradicionalmente para aislar adenovirus, por ejemplo, las células Hep-2.⁵ La identificación de los adenovirus aislados en cultivo tisular es seguida por la expresión del efecto citopático característico. Generalmente, el efecto citopático ocurre dentro de los 3 a 7 días, pero puede tardar hasta 28 días.^{7,11} Una vez aislado, el virus debe ser caracterizado por análisis del ADN viral mediante técnicas con restricción de endonucleasa, seguidas por electroforesis en gel.⁸

El Kit del test Premier Adenoclone-Type 40/41 para el análisis directo de materia fecal es un método rápido y específico para la detección de adenovirus tipos 40 y 41 que elimina la necesidad de los cultivos de tejidos y la tipificación de ADN por electroforesis.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El test Premier Adenoclone-Type 40/41 utiliza anticuerpos monoclonales en un immunoensayo de fase sólida tipo "sandwich". Los micropocillos desprendibles están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno específico de grupo para todos los adenovirus humanos conocidos. A cada pocillo se añade una alícuota de la suspensión de materia fecal y se incuba simultáneamente con los anticuerpos monoclonales anti-adenovirus tipos 40 y 41 conjugados con peroxidasa de rábano. Esto trae como resultado que el antígeno del adenovirus quede en "sandwich" entre la fase sólida y el conjugado enzimático. Después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lavan los micropocillos de muestras con agua destilada o desionizada para eliminar la muestra remanente y los anticuerpos marcados con enzimas no ligados. A continuación, se añade sustrato enzimático (peróxido de urea) y cromógeno (tetrametilbenzidina) a los micropocillos y se incuban 10 minutos a temperatura ambiente. Todos los conjugados de enzima ligados que se encuentran en los micropocillos cambian el color del sustrato de incoloro a azul.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El test Premier Adenoclone-Type 40/41 contiene material para 48 determinaciones.

- Micropocillos** - recubiertos con anticuerpo monoclonal (merino) contra adenovirus específico de grupo.
- Diluyente de muestras / Control Negativo** - solución salina tamponada con 0,02% de timerosal como agente preservante.
- Control Positivo** - adenovirus inactivado (AD41) en tampón con 0,02% de timerosal como agente preservante.
- Conjugado enzimático** - peroxidasa de rábano conjugada a anticuerpos monoclonales (murino) contra adenovirus de tipos 41 y 41 en solución proteica tamponada con gentamicina y 0,02% de timerosal como agentes preservantes.
- Sustrato, Parte A** - tampón de sustrato que contiene peróxido de urea.
- Sustrato, Parte B** - tampón de sustrato que contiene tetrametilbenzidina.
- Solución de Parada (STOP)** - contiene ácido sulfúrico 1N. **PRECAUCIÓN:** evitar el contacto con la piel. Si ocurre contacto, lavar con un chorro de agua.
- SopORTE para tiras de micropocillos
- Pipetas de transferencia de muestras

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm; gradilla para tubos.
- Agua desionizada o destilada.
- Papel absorbente.
- Puntas de pipetas graduadas para dispensar 100 µL y 1000 µL (opcionales).
- Recipiente para desechos con blanqueador de uso doméstico diluido 1:10. Para esterilizar en el autoclave, use un desinfectante con yodoformo.
- Lector para plato de micropocillos: capacidad de lectura a 450 nm (opcional).
- Dispositivo para dispensar la solución de lavado; ej. pipeta multicanal, jeringa con distribuidor, frasco de lavado, etc.
- Cronómetro (1 hora mínimo).

PRECAUCIONES

- Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
- No pipete las muestras o los reactivos con la boca. Evite el contacto de los reactivos con la piel lesionada o las membranas mucosas.
- No fume, coma o beba en el área donde se manejan las muestras o los kit de reactivos.
- Use guantes desechables para manejar las muestras; lávese las manos después de terminar el ensayo. Las muestras de pacientes, los controles del ensayo y todos los materiales que tengan contacto con éstos elementos deben manipularse siguiendo las pautas de Bioseguridad Nivel 2 recomendadas en el manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories" (Bioseguridad en laboratorios de Microbiología y Biomédica). Evite el contacto de la piel con la Solución de Parada (STOP) (ácido sulfúrico 1N). Puede causar irritación y quemaduras. Si ocurre contacto, lave con abundante agua.

- Coloque todos los materiales de la prueba en un autoclave a 121 C durante una hora como mínimo. Los desechos líquidos pueden mezclarse con una dilución 1:10 de blanqueador de uso doméstico, dejando reposar un mínimo de 30 minutos. **PRECAUCIÓN:** los desechos líquidos que contengan Solución de Parada, deben ser neutralizados antes de añadir el blanqueador de uso doméstico.
- Evite salpicar o generar aerosoles.
- No use los reactivos Premier Adenoclone-Type 40/41 después de su fecha de caducidad. Cada reactivo ha sido optimizado para proporcionar el máximo desempeño. Si los reactivos son diluidos o adulterados pueden perder sensibilidad. Tiempos de incubación y temperaturas diferentes a las especificadas pueden resultar en resultados erróneos.
- No intercambie o mezcle lotes diferentes de reactivos Premier Adenoclone-Type 40/41.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos. De lo contrario, se obtendrán resultados erróneos. La contaminación de las muestras puede producir resultados erróneos.
- Para cada muestra, control o reactivo, use diferentes pipetas o puntas de pipeta.
- NO VUELVA A USAR LOS MICROPOCILLOS.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

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

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

Almacene el kit de reactivos entre 2 y 8 C. Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (entre 20 y 30 C) antes de usarlos y regrese el kit al refrigerador (2 a 8 C) inmediatamente después de cada uso. Vuelva a colocar todos los micropocillos no usados en la bolsa original de papel de aluminio. Los micropocillos permanecen estables durante la vida útil del kit, después de abierto.

SIGNOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO

Las siguientes condiciones pueden indicar que los reactivos se han deteriorado:

- Cualquier evidencia de contaminación microbiana o demasiada precipitación.
- Color azul de las soluciones del sustrato antes de añadirlos a los micropocillos.
- Un valor del control negativo mayor de 0,150 unidades de absorbancia a 450 nm puede indicar deterioro de los reactivos.
- Un valor del control positivo menor de 0,3 unidades de absorbancia puede indicar que los reactivos se han deteriorado.

Si observa cualquiera de las condiciones descritas, contacte el Departamento de Servicios Técnicos al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

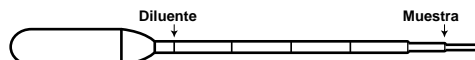
- Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20 C a 30 C) antes de usarlos.
- Regrese los reactivos al refrigerador (2 C a 8 C) inmediatamente después de cada uso.
- No permita que los micropocillos se sequen entre cada paso del test.
- Prepare un recipiente de descontaminación para desechar los reactivos y otros materiales.
- La reproducibilidad de cualquier test EIA depende, en gran parte, de la minuciosidad del lavado de los micropocillos. Siga con cuidado los pasos del procedimiento de lavado recomendado para test de EIA.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Con una pipeta de transferencia o graduada, añada 1 mL de diluyente de muestras a un tubo etiquetado correctamente. Añada las muestras a los tubos en la forma siguiente:

- Las muestras o hisopos rectales de materia fecal deben recogerse en recipientes que no contengan medio, agentes preservantes, suero animal o detergentes, ya que cualquiera de estas sustancias puede interferir con el test Premier Adenoclone-Type 40/41. Cuando se usan hisopos rectales debe tenerse cuidado de obtener suficiente materia fecal (30 a 50 mg de materia fecal no procesada) para el test.
- Materia fecal sólida: empaque la muestra hasta la primera marca en una pipeta de transferencia.
- Materia fecal líquida: aspire la muestra hasta la primera marca en la pipeta de transferencia.
- Hisopo rectal: Sumerja el hisopo en un ml de diluyente de muestra y mezcle con un movimiento circular para liberar la materia fecal del hisopo. Presione firmemente el hisopo contra los costados del tubo para escurrir el líquido. Mezcle completamente. *No diluya mas esta muestra.*
- Las muestras diluidas pueden almacenarse hasta 3 días entre 2 C y 8 C sin afectar el desempeño del test. Si es necesario almacenar las muestras no diluidas durante más tiempo, se recomienda guardarlas a -20 C o menos. No se recomienda congelar y descongelar las muestras más de una vez. De lo contrario, pueden obtenerse resultados erróneos. No usar un congelador con descongelación automática. Use la pipeta de transferencia de muestras para añadir dos gotas (100 µL) de materia fecal diluida a cada pocillo.

Pipetas de transferencia de muestras



PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Desprenda un número de micropocillos de la tira, suficiente para las muestras y los controles. Coloque los micropocillos en el soporte para el plato. Registre la posición de las muestras.
- Añada 2 gotas (100 µL) de muestra de materia fecal diluida, control negativo (diluyente de muestra) a control positivo al fondo de micropocillos individuales diferentes.
- Añada 2 gotas (100 µL) de conjugado enzimático a cada micropocillo. Mezcle suavemente con movimiento circular sobre la mesa de trabajo.
- Incube durante 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente.
- Vierta el líquido de los micropocillos en un recipiente apropiado para descartarlo. Invierta el soporte con los micropocillos y sacúdalo firmemente sobre una toalla de papel absorbente para eliminar completamente el líquido de los micropocillos.
- llene todos los micropocillos hasta inundarlos con agua desionizada y vierta el líquido, como hizo en el Paso 5.
- Repita el procedimiento de lavado (Pasos 5 y 6) cuatro veces, hasta completar 5 lavados.
- Añada 2 gotas (100 µL) de solución de Sustrato A (peróxido de urea) a cada pocillo.
- Añada 2 gotas (100 µL) de solución de Sustrato B (tetrametilbenzidina) a cada pocillo.
- Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Después de hacer una lectura y registrar los resultados, deseche los micropocillos usados y la toalla absorbente en un recipiente adecuado para material de riesgo biológico.

Después de incubar la muestra 10 minutos (Paso 10) puede hacerse una determinación visual. La lectura debe realizarse dentro de los 10 minutos. Las muestras que adquieren un color azul más intenso que el del control negativo son positivas. Las muestras que adquieren un color azul de la misma intensidad o más claro que el control negativo son negativas.

Opcional — Procedimiento espectrofotométrico

Pueden hacerse determinaciones espectrofotométricas añadiendo 2 gotas (100 µL) de solución de parada (ácido sulfúrico 1N) a cada micropocillo después de incubar durante 10 minutos (Paso 10). Dentro de los 60 minutos siguientes, lea la absorbancia en cada micropocillo a 450 nm contra un blanco en aire usando un filtro de referencia (opcional) de > 600 nm.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Determinación visual:
Todas las muestras con color azul más intenso que el del control negativo se consideran positivas. Todas las muestras con color azul de la misma intensidad o más claro que el control negativo se consideran negativas.
- Determinación por espectrofotometría:
Las muestras con una absorbancia (A_{450}) igual o mayor de 0,150 se consideran positivas. Las muestras con una absorbancia (A_{450}) menor de 0,150 se consideran negativas. A veces, puede producirse un resultado discrepante entre la determinación visual y la espectrofotométrica para muestras que tienen un nivel de antígeno bajo. La determinación espectrofotométrica es más objetiva y por lo tanto, algo más exacta.

NOTA: en muestras altamente positivas puede formarse un precipitado. Este no afectará el resultado.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

El test Premier Adenoclone-Type 40/41 se suministra con un control positivo y un control negativo (diluyente de muestras) que deben usarse en cada ensayo. Estos reactivos se utilizan para garantizar el desempeño correcto de los reactivos del kit. El control positivo debe tener un color definitivamente azul, con una absorbancia a 450 nm mayor de 0,30. El pocillo de control negativo debe ser visualmente incoloro y tener una absorbancia a 450 nm menor de 0,150.

Si los controles positivo y negativo no se desempeñan correctamente, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la faya. Si se repite la faya luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.

VALORES ESPERADOS

La frecuencia de resultados positivos puede variar según la zona geográfica, el método de recolección, manejo y transporte de la muestra, el test utilizado y la salud de la población general estudiada.

La frecuencia de infecciones por adenovirus puede variar con el síndrome clínico y la edad del individuo. Se ha informado que aproximadamente el 5 al 10% de los casos de gastroenteritis viral en infantes y niños menores de 2 años es causada por los adenovirus tipos 40 y 41.^{2,3,6,8,13}

Aún no se han establecido las características de funcionamiento con muestras directas de materia fecal provenientes de neonatos. Cada laboratorio debe determinar la ausencia de resultados positivos falsos antes de hacer un test directo de la materia fecal de neonatos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El test Premier Adenoclone-Type 40/41 es un test muy específico y sensible para los antígenos de adenovirus tipos 40 y 41. La ausencia de adenovirus 40 y 41 puede atribuirse a varios factores; por ejemplo, la muestra fue recogida en un momento en que el adenovirus no se manifiesta en el curso de la enfermedad, o al muestreo o manejo indebidos de la muestra.

El resultado negativo de una muestra de materia fecal no es indicativo de la ausencia de infección por adenovirus no entérico en otros fluidos corporales. Si se sospecha una infección respiratoria u oftálmica, se deben hacer cultivos de muestras provenientes del sitio de la infección. Estos cultivos deben confirmarse usando el test Premier Adenoclone de Meridian Bioscience (Número de Catálogo 696007).

Todos los resultados positivos deben ser interpretados con precaución dado que el adenovirus puede estar latente y recrudescer.¹² Puede ocurrir eliminación asintomática varios meses después de la infección.¹³ Los adenovirus entéricos pueden detectarse en la materia fecal de niños que no manifiestan síntomas.¹³ Los resultados del test deben ser interpretados conjuntamente con la información disponible de estudios epidemiológicos, de la evaluación clínica del paciente, u otros procedimientos de diagnóstico.¹²

Si bien la relación de los adenovirus 40 y 41 con la gastroenteritis está claramente establecida, también son posibles infecciones concomitantes con otros patógenos virales y bacterianos (incluyendo adenovirus no entéricos). Por lo tanto, también deben hacerse pruebas bacteriológicas para descartar etiologías de origen bacteriano. El kit para el diagnóstico de rotavirus Premier Rotaclone® de Meridian Bioscience (Número de Catálogo 696004) puede realizarse al mismo tiempo para eliminar la posibilidad de gastroenteritis rotaviral. Es posible obtener resultados positivos falsos con niveles elevados de *S. Aureus* que contiene proteína A, tal como la cepa Cowan. La *enterocolitis estafilocócica* es una enfermedad poco común diagnosticada generalmente en pacientes adultos; y es muy rara en infantes y niños.^{9,10}

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El test Premier Adenoclone-Type 40/41 para el antígeno contra el adenovirus entérico fue evaluado en colaboración con centros de salud en los estados de Arizona y Massachusetts de los EE.UU., y Ontario y Manitoba en Canadá. Los resultados fueron comparados con los datos obtenidos por microscopía electrónica y luego per técnicas de análisis de ADN con endonucleasa de restricción en muestras positivas para adenovirus. Todas las muestras fueron analizadas con el inmunoensayo enzimático (EIA) Premier Adenoclone-Type 40/41, evaluadas visualmente y luego por espectrofotometría. Se estableció una correlación del 100% entre las determinaciones visuales y las espectrofotométricas.

Análisis de restricción de AND y ME

	+	-
Premier Adenoclone-Type 40/41 EIA	58	3
Sensibilidad	98%	169
Especificidad	98%	
Concordancia total	98%	

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

El conteo de partículas de virus en muestras de materia fecal positivas para los adenovirus 40 y 41 fue determinado por microscopía electrónica. Se analizaron diluciones seriadas con el test Premier Adenoclone-Type 40/41. Estos resultados demuestran que el test Premier Adenoclone-Type 40/41 es suficientemente sensible para detectar conteos de partículas de adenovirus tan bajos como 10⁴ por mL.

Conteo de partículas del virus	Adenovirus 40 (A ₄₅₀)	Adenovirus 41 (A ₄₅₀)
2 x 10 ⁶	> 2,0	—
1 x 10 ⁶	> 2,0	> 2,0
5 x 10 ⁵	> 2,0	> 2,0
2,5 x 10 ⁵	> 2,0	> 2,0
1,25 x 10 ⁵	1,510	> 2,0
6,25 x 10 ⁴	1,001	> 2,0
3,1 x 10 ⁴	0,595	1,445
1,6 x 10 ⁴	0,307	0,781
8 x 10 ³	0,167	0,425
4 x 10 ³	0,108	0,219
2 x 10 ³	—	0,142

REACTIVIDAD CRUZADA

1. Subgrupos de adenovirus no entérico: se analizó el sobrenadante de un cultivo de Adenovirus con resultado citopático equivalente a tres cruces (3+) con el test Premier Adenoclone-Type 40/41. Los datos no revelan reactividad cruzada con este test.

FAVOR DE OBSERVAR: Los sobrenadantes de cultivos CPE no son muestras aprobadas para usar con este producto. La información que se obtenga de las pruebas con filtrados de cultivos que se cita aquí se ofrece solamente con fines informativos. No utilice los sobrenadantes de cultivos para verificar especificidad o sensibilidad.

Adenovirus		Premier Adenoclone-Type 40/41 (A ₄₅₀)	Premier Adenoclone Específico al grupo* (A ₄₅₀)
Subgroup	Tipo		
A	12	0,043	> 3,0
A	18	0,042	> 3,0
A	31	0,037	> 3,0
B	3	0,050	> 3,0
B	7	0,061	> 3,0
B	21	0,027	> 3,0
C	1	0,042	> 3,0
C	2	0,041	> 3,0
C	6	0,039	> 3,0
D	22	0,030	> 3,0
D	37	0,033	> 3,0
D	39	0,035	> 3,0
E	4	0,047	> 3,0
Control negativo		0,049	0,060
Control positivo		1,071	0,580

*Los subgrupos de adenovirus fueron analizados con el test específico de grupo EIA Premier Adenoclone de Meridian Bioscience (Número de Catálogo 696007) que detecta todos los 41 tipos de adenovirus humanos para demostrar la presencia de adenovirus.

2. Microorganismos y virus: patógenos intestinales comunes y otros organismos que pueden estar presentes en la materia fecal, se analizaron con el test Premier Adenoclone-Type 40/41 sin evidencia de reactividad cruzada

Microorganismos

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Campylobacter lariidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Salmonella dysenteria</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mycoplasma orale</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> * (Cowan)
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	

*Es posible obtener resultados positivos falsos con niveles elevados de *S. Aureus* que contiene proteína A, tal como la cepa Cowan. La *enterocolitis estafilocócica* es una enfermedad poco común diagnosticada generalmente en pacientes adultos; es muy poco frecuente en infantes y niños.^{9,10}

Virus

Astrovirus	Echovirus 22	Reovirus 1
Calicivirus	Human Coronavirus	Reovirus 2
Chlamydia trachomatis (serotype A)	Influenza B	Reovirus 3
Coxsackievirus A-9	Del Sarampión	Sincitial respiratorio
Coxsackievirus B-3	Myxo/Paramyxoviruses SV-5	Rhinovirus 3
Coxsackievirus B-4	Norwalk virus	Rhinovirus 17
Coxsackievirus B-5	Papovavirus SV-40	Rhinovirus 25
Cytomegalovirus	Parainfluenza-1	Rhinovirus 43
Echovirus 4	Parainfluenza-2	Rhinovirus 62
Echovirus 8	Parainfluenza-3	Rotavirus
Echovirus 11	Poliovirus I	"Foamy" del simio (tipos 2 y 8)
Echovirus 16	Poliovirus II	Small Round virus (SRV)
Echovirus 20	Poliovirus III	De la varicela zoster

Se analizó una muestra de orina con el test Premier Adenoclone-Type 40/41 y se obtuvo un resultado negativo.

REPRODUCIBILIDAD

Variabilidad entre prueba y prueba

La precisión entre prueba y prueba fue determinada diluyendo muestras positivas con cantidades conocidas de los adenovirus 40 y 41 hasta obtener valores de absorbancia altos, medios y bajos. Estas muestras diluidas se analizaron en 21 ensayos diferentes y por más de un operador en diferentes días, y se determinaron la media y el coeficiente de variación.

Adenovirus Tipo 40	Media	Alto	Medio	Bajo	Negativo
	D.E.	1,456	0,856	0,262	0,042
	C.V.	0,174	0,088	0,025	0,017
		12,0%	10,3%	9,5%	40,5%

Adenovirus Tipo 41	Media	Alto	Medio	Bajo
	D.E.	0,892	0,565	0,193
	C.V.	0,072	0,068	0,019
		8,1%	12,0%	9,8%

Variabilidad dentro de la misma prueba

La precisión dentro de la misma prueba fue determinada diluyendo muestras positivas para los adenovirus 40 y 41 y con cantidades conocidas de virus hasta obtener valores de absorbancia altos, medios y bajos. Estas muestras diluidas se analizaron 21 veces dentro del mismo ensayo y se determinaron la media y el coeficiente de variación.

Adenovirus Tipo 40	Media	Alto	Medio	Bajo	Negativo
	D.E.	1,522	0,894	0,193	0,064
	C.V.	0,038	0,038	0,011	0,022
		3,8%	4,3%	5,7%	34,3%

Adenovirus Tipo 41	Media	Alto	Medio	Bajo
	D.E.	0,924	0,647	0,156
	C.V.	0,086	0,039	0,012
		9,3%	6,0%	7,7%

DEUTSCH

PREMIER®
ADENOCLONE®
Type 40/41

ELISA zum Nachweis der Adenovirus Serotypen 40 und 41 in humanen Stuhlproben

REF 696006

IVD in-vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Premier Adenoclone-Type 40/41 ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) zum qualitativen Nachweis der im Darm befindlichen Adenovirus Serotypen 40 und 41 in humanen Stuhlproben.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Es gibt 41 bekannte Typen von humanpathogenen Adenoviren, die vorrangig serologisch oder durch DNA-Elektrophorese klassifiziert sind. Die Viren sind unbehüllt, DNA-haltige Ikoosaeder, die sich aus 252 Kapsomeren zusammensetzen. Das Virion enthält eine Anzahl von Gattungs- und Typ-spezifischen Proteinen; zu den Gattungs-(Gruppen-) spezifischen Proteinen gehören der alpha-Teil des Hexon, die Penton-Basis, der Delta-Teil des Gerüsts und Polytypid IIIa. Jene, die mit der Spezies (Typ) Spezifität verknüpft sind, sind der Epsilon Teil des Hexons und der Gamma Teil des Gerüsts. Solche, die sowohl Genus- als auch Typ-spezifisch assoziiert sind, sind das Haupt Core Protein und das Polytypid IX.¹¹ Die monoklonalen Antikörper im Premier Adenoclone-Type 40/41 spezifischen ELISA sind gegen den typ-spezifischen Teil des Hexon der Adenoviren Typ 40 und 41 gerichtet. Die typ-spezifischen monoklonalen Antikörper reagieren nicht mit anderen Adenovirus Serotypen.¹

Die Adenoviren Typ 40 und 41 im Darm sind die einzigen Adenoviren, die beständig mit Gastroenteritiden bei Kleinkindern und Kindern assoziiert werden, und stellen damit die zweit häufigste Ursache von Gastroenteritiden nach den Rotaviren dar.^{2,4, 6, 13-17} Bis vor kurzem konnten diese Viren nur im Elektronenmikroskop (EM) nachgewiesen werden. Jetzt können die Typen des Adenovirus durch Kultivierung auf Graham 293 Zellen, einer humanen embryonalen Nieren Zelllinie, die durch Adenovirus Typ 5 DNA transformiert wurde, nachgewiesen werden, eine vollständige Kultivierung kann jedoch nicht auf Zeller erzielt werden, die traditionell für die Isolierung von Adenoviren verwendet werden, wie z.B. Hep-2 Zellen.⁵ Die Identifizierung von Adenovirus in der Zellkultur erfolgt durch das Erscheinen des charakteristischen Zytotoxischen Effekts (CPE). Im Allgemeinen zeigt sich der CPE innerhalb von 3-7 Tagen, es kann jedoch auch bis zu 28 Tagen dauern.^{7, 11} Wenn das Virus isoliert ist, muß eine weitere Charakterisierung der Virus DNA durch Verdauung mit Restriktionsenzymen und anschließender Gelelektrophorese erfolgen.⁶

Der Premier Adenoclone-Type 40/41 Testkit für den Direktnachweis in Stuhlproben ist ein schneller und spezifischer Test für den Nachweis von Adenovirus Typ 40 und 41 und eliminiert die Notwendigkeit von Zellkultur und Typisierung durch DNA Elektrophorese.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Premier Adenoclone-Type 40/41 verwendet monoklonale Antikörper und ist ein Festphasen-Sandwich-ELISA. Mikrotiter-Kavitäten zum Auseinanderbrechen sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen die Gruppen spezifischen Antigene von allen bekannten Human Adenoviren gerichtet ist. Ein Aliquot der fäkalen Suspension oder her unverdünnten Zellkultur-Flüssigkeit wird in eine Kavität gegeben und gleichzeitig mit monoklonalen anti-Adenovirus Typ 40 und 41-Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, inkubiert. So entsteht ein „Sandwich“, bei dem das Adenovirus-Antigen zwischen dem Festphasen-Antikörper und dem Enzym-gebundenen Antikörper eingeschlossen ist. Nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, werden die Kavitäten mit gereinigtem Wasser gewaschen, um ungebundenes Probenmaterial und überschüssige Enzym-markierte Antikörper zu entfernen. Enzym-Substrat A (Harnstoffperoxid) und Substrat B (Tetramethylbenzidin) werden in die Kavitäten gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Gebundenes Enzym-Konjugat in den Kavitäten verwandelt das farblose Substrat in ein blaues Produkt.

REAGENZIENTHALTENE MATERIALIEN

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

1. Mikrotiter-Kavitäten beschichtet mit einem monoklonalen Gruppen-spezifischen anti-Adenovirus Antikörper aus Mäusen.
2. Proben-Verdünnungspuffer / Negativ-Kontrolle: Phosphat-gepufferte isotone Kochsalzlösung mit 0,02% Thiomersal als Konservierungsmittel.
3. Positiv-Kontrolle: inaktiviertes Adenovirus (AD41) in Puffer mit 0,02% Thiomersal als Konservierungsmittel.
4. Enzym-Konjugat: mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte monoklonale anti-Adenovirus Typ 40 und 41 Antikörper aus Mäusen in einer gepufferten Proteinlösung mit Gentamicin und 0,02% Thiomersal als Konservierungsmittel.
5. Substrat A: Substrat-Puffer, enthält Harnstoffperoxid
6. Substrat B: Lösung mit Chromogen, enthält Tetramethylbenzidin (TMB)
7. Stopp-Lösung: enthält 1 N Schwefelsäure, Vorsicht: Hautkontakt vermeiden, bei Hautkontakt mit Wasser spülen.
8. Halter für Mikrotiter-Kavitäten
9. Transferpipetten für Proben

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Reagenzröhrchen (12 x 75 mm)
2. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
3. Papiertücher
4. Präzisions-Mikropipettenspitzen für 100 µl oder 1000 µL (wahlweise)
5. Abfallbehälter mit einer 1:10 Verdünnung von Haushaltsbleichmittel, zum Autoklavieren ein Jod-haltiges Desinfektionsmittel verwenden.
6. ELISA-Plattenphotometer für Extinktionsmessungen bei 450 nm (wahlweise)
7. Multikanal-Pipette, Mehrfach-Spritze, Waschflasche oder andere Hilfsmittel zum Einfüllen der Waschlösung
8. Stoppuhr (mindestens für 1 Stunde)

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Es gibt keine bekannten Gefahren die mit diesem Produkt verbunden sind.
2. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
3. In den Bereichen, in denen mit den Proben oder den Test-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
4. Einmal-Handschuhe während des Umgangs mit Proben tragen und die Hände nach Abschluß des Tests waschen. Patienten-Proben, Test-Kontrollen und alle Materialien, die mit ihnen in Berührung kommen, sollten nach den Biosafety Level 2 -Empfehlungen des CDC/NIH Handbuchs „Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories“ gehandhabt werden.
5. Hautkontakt mit der Stopp-Lösung vermeiden (1N Schwefelsäure). Sie könnte Irritationen und Verätzungen verursachen. Falls es zu einem Kontakt kommt, mit Wasser spülen.
6. Vor der Entsorgung alle Materialien, die während des Tests benutzt wurden, mindestens eine Stunde bei 121 C autoklavieren. Flüssig-Abfall kann entsorgt werden, nachdem er mindestens 30 Minuten mit einer 1:10 Verdünnung von Haushaltsbleichmittel gemischt wurde. **VORSICHT:** Flüssigabfall, der Stopp-Lösung enthält, muß neutralisiert werden, bevor er in Haushaltsbleichmittel gegeben wird.
7. Vermeiden Sie jedes Verspritzen oder Zerstäuben.
8. Premier Adenoclone-Type 40/41 Reagenzien nach Ablauf des Haltbarkeitsdatum nicht mehr verwenden. Jedes Reagenz ist in seiner Konzentration und Zusammensetzung optimiert worden. Verdünnung oder Verformung dieser Reagenzien kann zu einem Verlust der Sensitivität führen. Von den Angaben abweichende Inkubationszeiten und Temperaturen können falsche Ergebnisse zur Folge haben.
9. Reagenzien von Premier Adenoclone-Type 40/41 mit unterschiedlicher Chargennummern sollten nicht ausgetauscht oder gemischt werden.
10. Mikrobiellen Befall der Reagenzien vermeiden, er könnte die Ergebnisse verfälschen. Die Kontamination der Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
11. Für jede Probe, Kontrolle oder jedes Reagenz sollten gesonderte Pipetten oder Pipetten-Spitzen verwendet werden.
12. Mikrotiterkavitäten nicht wiederverwenden.

GEFÄHRDUNGEN UND SICHERHEITSHINWEISE

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

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Lagern Sie die Test-Reagenzien bei 2-8 C. Vor dem Gebrauch die Test-Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und nach Gebrauch sofort wieder auf 2-8 C abkühlen. Mikrotiterplatten im Beutel belassen bis er Raumtemperatur erreicht hat. Alle unbenutzten Mikrotiter-Kavitäten in den Originalbeutel zurücklegen. Nach dem Öffnen sind die Mikrotiter-Kavitäten stabil während der gesamten Haltbarkeitsdauer des Test-Kits.

ANZEICHEN FÜR INSTABILITÄT ODER VERDERB

Die folgenden Gegebenheiten können Reagentienverfall andeuten:

1. Jeder Hinweis mikrobieller Kontamination oder erheblicher Ausfällung.
2. Eine Blaufärbung der Substratlösung vor der Zugabe in die Mikrotitergefäße der Mikrotiterplatte.
3. Ein negativer Kontrollwert größer als 0,150 optischer Dichte-/Absorptionseinheiten bei 450 nm kann einen Verfall von Reagenzien andeuten.

4. Ein positiver Kontrollwert von weniger als 0,3 optischer Dichte-/Absorptionseinheiten kann einen Verfall von Reagenzien andeuten.

Wenn irgendeine der oben erwähnten Gegebenheiten beobachtet wird, kontaktieren Sie bitte unseren Technischen Service unter 1-800-343-3858.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

1. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen (20-30 C).
2. Sofort nach Gebrauch alle Reagenzien wieder auf 2-8 C abkühlen.
3. Zwischen den Arbeitsschritten die Kavitäten nicht austrocknen lassen.
4. Ein Desinfektionsgefäß zur Entsorgung von Reagenzien und Materialien bereitstellen.
5. Die Reproduzierbarkeit eines jeden ELISA ist stark von der Gleichförmigkeit des Waschens der Mikrotiter-Kavitäten abhängig. Beachten Sie die in der Anleitung empfohlenen Waschschritte genau.

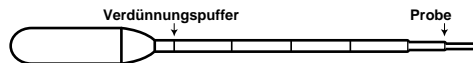
PROBENNAHME UND VORBEREITUNG

1 mL Proben-Verdünnungspuffer mit einer Transfer-Pipette in ein sorgfältig beschriftetes Röhrchen geben. Die Probe wie folgt dazugeben:

1. Stuhlproben oder Rektalabstriche sollten in Gefäßen gesammelt werden, die kein Nährmedium, Konservierungsmittel, Tierserum oder Detergenzien enthalten, da diese Zusätze mit dem Premier Adenoclone-Type 40/41 Test beeinträchtigen können. Bei rektalen Abstrichen sollte darauf geachtet werden, daß genügend fäkales Material (30-50 mg reiner Stuhl) abgenommen wird.
2. Fester Stuhl: Probe bis zur ersten Markierung in die Transfer-Pipette drücken (siehe Abbildung unten).
3. Flüssiger Stuhl: Probe mit her Transfer-Pipette bis zur ersten Markierung hochziehen (siehe Abbildung unten).
4. Rektaler Abstrichtupfer. Tupfer in 1 mL Proben-Verdünnungspuffer quirlen, so daß das fäkale Material gelöst wird. Flüssigkeit aus dem Tupfer durch festes Drücken an die Wand des Röhrchens auspressen. Sorgfältig mischen. *Nicht weiter verdünnen.*
5. Verdünnte Proben können bis zu 3 Tagen bei 2-8 C gelagert werden, ohne den Test zu beeinflussen. Für die Dauerlagerung wird empfohlen, die Proben unverdünnt bei -20 C and kälter zu lagern. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben, da dies zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann. Proben nicht in einem selbstabtauwenden Gefriergerät lagern.

Probe in 1 mL Probenverdünnungspuffer durch heftiges Aufziehen und wieder Ausdrücken der Lösung aufzuspendieren, bis eine weiter zu verarbeitende Lösung entsteht.

Transferpipetten für Proben



TESTDURCHFÜHRUNG

1. Eine ausreichende Zahl von Kavitäten für Proben und Kontrollen abbrechen und in den Halter für die Kavitäten einsetzen. Die Plättze der Proben notieren.
2. Je 2 Tropfen (100 µL) von der verdünnten fäkalen Probe, der Positiv- und der Negativ-Kontrolle (Proben-Verdünnungspuffer) auf den Boden der Kavitäten geben.
3. In jede Kavität 2 Tropfen (100 µL) Enzym-Konjugat geben. Durch vorsichtiges Bewegen auf der Tisch-Oberfläche mischen.
4. Bei Raumtemperatur 60 ± 5 Minuten inkubieren.
5. Die Flüssigkeit aus den Kavitäten in einen Abfallbehälter auskippen. Den Kavitäten-Halter umgedreht auf Papiertüchern kräftig ausklopfen, um sicher zugehen, daß die Flüssigkeit vollständig aus den Kavitäten entfernt wurde.
6. Alle Kavitäten bis zum Überfließen mit deionisiertem Wasser füllen und die Flüssigkeit wie in Schritt 5 ausgießen.
7. Den Waschvorgang (Schritt 5 und 6) vier weitere Male durchführen (insgesamt also 5 Waschvorgänge).
8. 2 Tropfen (100 µL) Substrat A in jede Kavität geben.
9. 2 Tropfen (100 µL) Substrat B (TMB) in jede Kavität geben.
10. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Nach dem Ablesen und Notieren der Ergebnisse die benutzten Kavitäten und das benutzte Papier als potentiell pathogen entsorgen.

Das Ablesen des Ergebnisses mit bloßem Auge ist nach den 10 Minuten Inkubation in Schritt 10 innerhalb von 10 Minuten möglich. Proben mit einer Blaufärbung, die dunkler als die der Negativ-Kontrolle ist, sind positiv. Proben, die die gleiche oder eine schwächere Blaufärbung als die Negativ-Kontrolle aufweisen, sind negativ.

Wahlweise: Spektrophotometrische Auswertung

Spektrophotometrische Auswertungen können durchgeführt werden, indem 2 Tropfen (100 µL) Stopp-Lösung (Schwefelsäure) in jede Kavität nach der Inkubation von Schritt 10 gegeben werden. Die Extinktion jeder Kavität wird bei 450 nm (gegebenenfalls mit einem Referenzfilter > 600 nm) nach einem Abgleich gegen Luft innerhalb von 60 Minuten abgelesen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

1. Auswertung mit dem bloßen Auge:

Jede Probe mit einer blauen oder im Vergleich zur Negativ-Kontrolle intensiveren Farbe wird als positiv betrachtet. Jede Probe mit einer Farbe, die im Vergleich zur Negativ-Kontrolle gleich oder weniger intensiv gefärbt ist, wird als negativ betrachtet.

2. Spektrophotometrische Bestimmung:

Proben mit einem Extinktionswert (A_{450}) > 0,150 werden als positiv betrachtet. Proben mit einer Extinktion < 0,150 werden als negativ betrachtet. Bei Proben mit geringen Antigen-Mengen können die Ergebnisse aus der spektrophotometrischen Bestimmung gelegentlich von den Auswertungen mit bloßem Auge abweichen. Die spektrophotometrische Bestimmung ist die objektivere und daher die etwas genauere Methode.

ACHTUNG: in stark positiven Proben können sich Niederschläge bilden. Dies beeinflusst die Ergebnisse nicht.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

Premier Adenoclone-Type 40/41 wird mit einer Positiv-Kontrolle und einer Negativ-Kontrolle (Proben-Verdünnungspuffer) geliefert, die bei jedem Testlauf mitgeführt werden müssen. Diese Reagenzien werden eingesetzt, um die Funktionsfähigkeit der Test-Reagenzien sicherzustellen. Die Kavität der Positiv-Kontrolle sollte deutlich blau sein mit einer Extinktion > 0,30 bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Negativ-Kontrolle darf keine sichtbare Farbe haben, die Extinktion muß < 0,150 bei einer Wellenlänge von 450 nm sein.

Wenn die Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrolle des Test-Kits nicht wie erwartet ausfallen, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer.

ERWARTETE WERTE

Die Häufigkeit von positiven Ergebnissen kann unterschiedlich ausfallen, und zwar in Abhängigkeit von geographischem Standort, Probennahmehmethode, Handhabung und Transport, angewandtem Test und den allgemeinen gesundheitsspezifischen Bedingungen des untersuchten Patientenkollektivs.

Die Häufigkeit des Vorliegens von Adenovirus-Infektionen schwankt je nach klinischem Syndrom und Alter der betreffenden Person. Berichten zufolge werden ca. 5 bis 10% aller Fälle von Viren-Gastroenteritis bei Kleinkindern und Kindern unter zwei Jahren von Adenoviren der Typen 40 und 41 verursacht.^{2, 4, 6, 8, 13}

Die Leistungsmerkmale für Direkttests an Neonatal-Stuhlproben sind noch nicht vollständig ermittelt. Vor Direkttests an Neonatal-Stuhlproben ist die Abwesenheit fälschlicherweise positiver Ergebnisse von jedem einzelnen Labor zu ermitteln.

EINSCHRÄNKUNGEN

Premier Adenoclone-Type 40/41 ist hochspezifisch und –sensitiv für Adenovirus-Typ 40 und 41 Antigen. Ein Mißlingen des Nachweises kann bedingt sein durch Faktoren wie einem ungünstigen Zeitpunkt der Probennahme oder einer falschen Probennahme oder -Handhabung.

Durch ein negatives Ergebnis bei Stuhlproben kann eine Infektion anderer Körperflüssigkeiten mit nicht-intestinalen Adenoviren nicht ausgeschlossen werden. Bei Verdacht auf Infektion des Atmungstraktes oder der Augen sollten Proben vom Infektionsort in Kultur genommen und mit Premier Adenoclone- (Katalog Nummer 696007) bestätigt werden.

Alle positiven Ergebnisse müssen vorsichtig interpretiert werden, da Adenoviren zur Latenz und zu Rezidiven fähig sind.¹² Asymptomatisches Shedding kann bis zu Monaten nach der Infektion andauern.¹³ Intestinale Adenoviren können im Stuhl von Beschwerde-freien Kindern gefunden werden.¹³ Die Testergebnisse sollten in Zusammenhang mit den Informationen aus epidemiologischen Studien, klinischen Erhebungen oder anderen diagnostischen Verfahren interpretiert werden.¹²

Während der Zusammenhang zwischen Adenovirus 40/41 und Gastroenteritiden allgemein bekannt ist, sind Begleitinfektionen mit anderen viralen und bakteriellen Keimen (die nicht-intestinalen Adenoviren eingeschlossen) möglich. Daher sollten bakteriologische Tests parallel zu diesem Test durchgeführt werden, um eine bakteriologische Ätiologie auszuschließen. Der Einsatz von Premier Rotaclo® kann parallel durchgeführt werden, um eine Rotavirale Gastroenteritis auszuschließen. Falsch positive Ergebnisse könnten bei einer hohen Konzentration eines *S. aureus* mit Protein A (z.B. des Cowan Stammes) auftreten. Die *Staphylokokken-Enterokolitis* ist eine ungewöhnliche Erkrankung, die hauptsächlich bei Erwachsenen und nur extrem selten bei Säuglingen und Kindern^{9,10} beobachtet wurde.

LEISTUNGSMERKMALE

Premier Adenoclone- Type 40/41 für Antigen-Tests auf enterische Adenoviren wurde in Zusammenarbeit mit Einrichtungen in Arizona (USA), Massachusetts (USA), Ontario (Kanada) und Manitoba (Kanada) getestet. Die Ergebnisse wurden mit den anfänglichen Elektronenmikroskop-Ergebnissen und der anschließenden DNS-Endonuklease-Restriktionsanalyse von Adenovirus-positiven Proben verglichen. Sämtliche Proben wurden mit dem EIA Premier Adenoclone- Typ 40/41 getestet und visuell beurteilt und anschließend spektralphotometrisch bestimmt. Es gab eine 100-%ige Korrelation zwischen den visuellen und spektralphotometrischen Bestimmungen.

EM/DNS-Restriktionsanalyse			
		+	-
Premier Adenoclone- Type 40/41 EIA		58	3
Empfindlichkeit	98%	1	169
Spezifität	98%		
Gesamt-Übereinstimmung	98%		

TESTEMPFLINDLICHKEIT

Per Elektronenmikroskop wurden die Virus-Partikelzahlen von Stuhlproben, die bekanntermaßen Adenovirus 40 und 41 enthielten, ermittelt. Serielle Verdünnungen wurden mit dem Premier Adenoclone-Type 40/41 getestet. Diese Ergebnisse zeigten, daß selbst geringe Adenovirus-Partikelzahlen von 10⁴ pro mL mit dem Premier Adenoclone-Type 40/41 nachweisbar sind.

Virus-Partikelzahl	Ad 40 (A ₄₅₀)	Ad 41 (A ₄₅₀)
2 x 10 ⁶	> 2,0	—
1 x 10 ⁶	> 2,0	> 2,0
5 x 10 ⁵	> 2,0	> 2,0
2,5 x 10 ⁵	> 2,0	> 2,0
1,25 x 10 ⁵	1,510	> 2,0
6,25 x 10 ⁴	1,001	> 2,0
3,1 x 10 ⁴	0,595	1,445
1,6 x 10 ⁴	0,307	0,781
8 x 10 ³	0,167	0,425
4 x 10 ³	0,108	0,219
2 x 10 ³	—	0,142

KREUZREAKTIVITÄT

1. Nicht-enterische Adenovirus-Subgruppen: Adenovirus 3 + CPE-Kulturüberstände wurden mit dem Premier Adenoclone-Type 40/41 getestet. Die Daten zeigten keine Kreuzreaktivität mit dem Premier Adenoclone-Type 40/41.

BITTE BEACHTEN: Die Untersuchung von CPE-Kulturüberständen mit diesem Produkt ist nicht zugelassen. Die hier angegebenen Daten über Untersuchungen von Kulturfiltraten dienen ausschließlich zur Information. Kulturüberstände dürfen nicht zur Überprüfung der Spezifität und Sensitivität verwendet werden.

Adenovirus		Premier Adenoclone- Type 40/41	Premier Adenoclone- Gruppenspezifisch*
Subgruppe	Typ	(A ₄₅₀)	(A ₄₅₀)
A	12	0,043	> 3,0
A	18	0,042	> 3,0
A	31	0,037	> 3,0
B	3	0,050	> 3,0
B	7	0,061	> 3,0
B	21	0,027	> 3,0
C	1	0,042	> 3,0
C	2	0,041	> 3,0
C	6	0,039	> 3,0
D	22	0,030	> 3,0
D	37	0,033	> 3,0
D	39	0,035	> 3,0
E	4	0,047	> 3,0
Negativ-Kontrolle		0,049	0,060
Positiv-Kontrolle		1,071	0,580

*Die Adenovirus-Subgruppen wurden mit dem gruppenspezifischen EIA Premier Adenoclone (Best.-Nr. 696007) von Meridian Bioscience getestet, mit dem alle 41 Typen der Human-Adenoviren nachweisbar sind, um das Vorliegen von Adenoviren zu belegen.

2. Mikroorganismen und Viren: Übliche Darm-Pathogene und sonstige, gelegentlich im Stuhl vorliegende Organismen wurden mit dem Premier Adenoclone-Type 40/41 getestet; die Tests zeigten keine Kreuzreaktivität.

Mikroorganismen

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Campylobacter lariidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Salmonella dysenteriae</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma hominus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mycoplasma orale</i>	<i>Staphylococcus aureus*</i> (Cowan)
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	

*Fälschlicherweise positive Ergebnisse können bei hohen Konzentrationen an *S. aureus* mit Protein A (wie bspw. dem Cowan-Stamm) auftreten. *Staphylokokken-Enterokolitis* ist eine seltene Erkrankung, die normalerweise bei erwachsenen Patienten anzutreffen und bei Kleinkindern und Kindern extrem selten ist.^{9,10}

Viren

Astrovirus	Echovirus 22	Reovirus 1
Calicivirus	Human Coronavirus	Reovirus 2
Chlamydia trachomatis (serotype A)	Influenza B	Reovirus 3
Coxsackievirus A-9	Masern	RS-Virus
Coxsackievirus B-3	Myxovirien-Paramyxoviren SV-5	Rhinovirus 3
Coxsackievirus B-4	Norwalk-Virus	Rhinovirus 17
Coxsackievirus B-5	Papovavirus SV-40	Rhinovirus 25
Cytomegalovirus	Parainfluenza-1	Rhinovirus 43
Echovirus 4	Parainfluenza-2	Rhinovirus 62
Echovirus 8	Parainfluenza-3	Rotavirus
Echovirus 11	Poliovirus I	Simian Foamy Virus (Typen 2 und 8)
Echovirus 16	Poliovirus II	Small Round Virus (SRV)
Echovirus 20	Poliovirus III	Varicella-Zoster Virus

Eine Urinprobe wurde mit dem Premier Adenoclone-Type 40/41 getestet und als negativ befunden.

REPRODUZIERBARKEIT

Inter-Assay-Abweichung

Die Inter-Assay-Präzision wurde durch Verdünnung von Proben, die bekanntermaßen für Adenovirus 40 und Adenovirus 41 positiv waren, und Bestimmung der hohen, mittleren und niedrigen Extinktionswerte ermittelt. Diese verdünnten Proben wurden an verschiedenen Tagen von mehreren Labortechnikern in 21 verschiedenen Assays getestet, und es wurde der Mittelwert und der Variationskoeffizient bestimmt.

Adenovirus Typ 40	Hoch	Mittel	Niedrig	Negativ
Mittelwert	1.456	0.856	0.262	0.042
S	0.174	0.088	0.025	0.017
VK	12.0%	10.3%	9.5%	40.5%

Adenovirus Typ 41	Hoch	Mittel	Niedrig
Mittelwert	0.892	0.565	0.193
S	0.072	0.068	0.019
VK	8.1%	12.0%	9.8%

Intra-Assay-Abweichung

Die Intra-Assay-Präzision wurde durch Verdünnung von Proben, die bekanntermaßen für Adenovirus 40 und Adenovirus 41 positiv waren, und Bestimmung der hohen, mittleren und niedrigen Extinktionswerte ermittelt. Diese verdünnten Proben wurden im Rahmen eines einzigen Assays 21 Mal getestet, und es wurde der Mittelwert und der Variationskoeffizient bestimmt.

Adenovirus Typ 40	Hoch	Mittel	Niedrig	Negativ
Mittelwert	1.522	0.894	0.193	0.064
S	0.038	0.038	0.011	0.022
VK	3.8%	4.3%	5.7%	34.3%

Adenovirus Typ 41	Hoch	Mittel	Niedrig
Mittelwert	0.924	0.647	0.156
S	0.086	0.039	0.012
VK	9.3%	6.0%	7.7%

REFERENCES

- Herrmann, JE, Perron-Henry, DM, Stobbs-Walro, D, and Blacklow, NR. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to enteric adenovirus types 40 and 41. Arch. Virol. 1987;94:259-265.
- Uhnnoo, L, Wadell, G., Svensson, L., and Johansson, M. Two new serotypes of adenovirus from human infantile diarrhea. Dev. Biol. Stand. 1983;55:311-318.
- Brandt, CD, Kim, HW, Yolken, RH, Kapikian, AZ, Arrobio, JO, Rodriguez, WJ, Wyatt, RG, Chanock, RM, and Parrott, RH Comparative epidemiology of two rotavirus serotypes and other viral agents associated with pediatric gastroenteritis. Amer. J. Epidemiol. 1979;110: 243-254.
- Uhnnoo, L, Wadell, G, Svensson, L, Johansson, ME. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. J. Clin. Microbiol. 1984;20:365-372.
- Takiff, HF, Straus SE, and Garon, CF. Propagation and *in vitro* studies of previously non-cultivable enteric adenoviruses in 293 cells. Lancet ii: 1981:832-834.
- Wadell, G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. In: Doerfler W., ed. The molecular biology of adenoviruses 2. 30 years of adenovirus research 1953-1983. Current topics in microbiology and immunology. Berlin: Springer-Verlag, 1984;110:191-220.
- Herrmann, JE, Personal communication, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, 1987.
- Brandt, CD, Kim, HW, Rodriguez, WJ, Arrobio, JO, Jeffries, BC, Stallings, EP, Lewis, C, Miles, AJ, Chanock, RM, Kapikian, AK, Parrott, RH. Pediatric viral gastroenteritis during eight years of study. J. Clin. Microbiol. 1983;18:71-78.
- Gutman, LT, Idriss, ZH, Gehlbach, S, Blackman, L. Neonatal staphylococcal enterocolitis: association with indwelling feeding catheters and *S. aureus* colonization. J. Pediatr. 1976;88:836-839.
- Hay, P, and McKenzie, P. Side effects of oxytetracycline therapy. Lancet i: 1954:945-950.
- Horwitz, MS, Adenoviruses and Their Replication. In B.N. Fields ed. Virology, Ravew Press, New York, pp. 433-438.
- Horwitz, MS, Adenoviruses and Their Replication. In B.N. Fields ed. Virology, Ravew Press, New York, pp. 480.
- Cukor, G, and Blacklow, NR, Human viral gastroenteritis. Microbiological Reviews. 1984;48:157-179.
- Chiba, S, Wakamura, I, Urasawa, S, Nakata, S, Taniguchi, K, Fujinaga, K, Nakao, T. Outbreak of infantile gastroenteritis due to type 40 adenovirus. Lancet ii: 1983:954-957.
- Johansson, ME, Uhnnoo, I, Kidd, AH, Madeley, CR, Wadell, G. Direct identification of enteric adenovirus, a candidate new serotype, associated with infantile gastroenteritis. J. Clin. Micro., 1980;12:95-100.
- Wigand, R, Baumeister, HG, Maass, G, Kuhn, J, Nammer, HJ. Isolation and identification of enteric adenoviruses. J. Med. Virol. 1983;11:233-240.
- de Jong, JC, Wigand, R, Kidd, AH, Wadell, G, Kapsenberg, JG, Muzerie, CJ, Wermenbol, AG, Firtzloff, RG. Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. J. Med. Virol. 1983;11:215-231.



SN11244

REV. 12/14



 Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
 USA/Corporate Office
 3471 River Hills Drive
 Cincinnati, Ohio 45244
 Telephone: 513.271.3700
 Orders/Customer Service:
 800.543.1980
 Technical Support Center:
 800.343.3858
 Information Fax: 513.272.5432
 Ordering Fax: 513.271.0124

Meridian Bioscience Europe S. r. l.
 Via dell'Industria, 7
 20020 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.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


















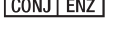





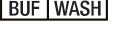



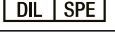


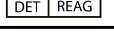
Meridian Bioscience Europe France
 34 rue de Ponthieu - 75008 Paris
 FRANCE
 Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40
 Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10
 Email: info.fr@meridianbioscience.eu

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, Erläuterung der graphischen symbole)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis		Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung		Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
	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		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 Diagnostica 98/79/EG.		Sample 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 Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
	Catalogue number / Numero de catalogo / Référence du catalogue / Número 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 / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten		Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo 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		Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung		Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugé enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
	Serial number / Numero de serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer		Assay Control / Controllo dei test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät		Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum		Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
	Buffer / Solution tamponne / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat		Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillon / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat		Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
			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.