

# PREMIER® ADENOCLONE®

## EIA for the Direct Detection of Adenovirus Antigen in Human Fecal Specimens and for the Confirmation of Adenovirus in Cell Culture

REF 696007

IVD In vitro diagnostic medical device

### INTENDED USE

**Premier Adenoclone** is an Enzyme immunoassay (EIA) for the qualitative detection of human adenoviruses directly from stool specimens and confirms the presence of adenovirus in cell culture isolates from respiratory, ophthalmic or enteric 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. The monoclonal antibody in **Premier Adenoclone** is against the group-reactive hexon antigen shared by human, simian, canine, porcine, marine and bovine adenoviruses. This monoclonal antibody has been shown to react with all 41 human adenovirus types by EIA<sup>1</sup>.

Adenovirus may cause a variety of clinical illnesses in humans, including respiratory (acute febrile pharyngitis, pharyngoconjunctival fever, acute respiratory disease, pneumonia), ocular (epidemic keratoconjunctivitis, water-borne "swimming pool" conjunctivitis), and gastroenteritis<sup>2,4</sup>.

Identification of adenovirus is generally accomplished by cultivation in tissue culture followed by appearance of characteristic cytopathic effect (CPE). Cell lines susceptible to adenovirus are continuous cell lines of epithelial origin such as HeLa, HEK, HEP-2, KB and Graham 293<sup>2,3</sup>. Generally CPE occurs within 2 to 7 days with adenovirus types 1-7. However, other strains, especially subgroup D, can require up to 28 days before recognizable CPE develops<sup>16</sup>. Confirmation of adenovirus isolated in cell culture after CPE has included immunofluorescent assay, radioimmunoassay, DNA hybridization, enzyme immunoassay and DNA electrophoretotyping<sup>17,21</sup>. **Premier Adenoclone** offers a simple, rapid and accurate means of confirming cell culture isolates for the presence of adenovirus.

The second most commonly found virus in stools or rectal swabs from patients with diarrhea is adenovirus<sup>22</sup>. These fastidious adenovirus types 40 and 41 were first discovered by electron microscopic (EM) examination of stool extracts and are most often associated with gastroenteritis<sup>22</sup>. These adenovirus types can be isolated in Graham 293 cells<sup>5</sup>. **Premier Adenoclone** can be used for direct testing of stool specimens, thus reducing the time required by traditional cell culture isolation.

### BIOLOGICAL PRINCIPLES

**Premier Adenoclone** utilizes monoclonal antibodies in a solid phase sandwich type assay. Breakaway microwells are coated with a monoclonal anti-adenovirus antibody. An aliquot of fecal suspension or undiluted cell culture fluid is added to the microwell and incubated simultaneously with an anti-adenovirus monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase, resulting in the adenovirus antigen being sandwiched between the solid phase and enzyme antibodies. After 60 minutes incubation at room temperature, the sample well is washed with purified water to remove unbound specimen and the excess enzyme labeled antibodies. Enzyme substrate (urea peroxide) and chromogen (tetramethyl-benzidine) 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.

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

### MATERIALS NOT PROVIDED

1. Test tubes, 12 x 75 mm
2. Deionized or distilled water
3. Absorbent paper
4. Precision micropipettes and micropipette tips to deliver 100 µL and 1000 µL (optional)
5. Waste container with a 1:10 dilution of household bleach. For autoclaving, use an iodophor disinfectant
6. Microwell EIA plate reader capable of reading absorbance at 450 nm (optional)
7. Device for dispensing wash solution such as multichannel pipette, syringe with manifold wash bottle,
8. Timer (minimum 1 hour)
9. Sterile swabs and viral transport medium (commonly a balanced salt solution containing a viral stabilizing protein and antibiotics). The medium must not be inhibitory to either adenovirus or to cell lines<sup>16</sup>
10. Adenovirus susceptible cell cultures and a light microscope to examine cultures. Susceptible cell cultures for the growth of adenovirus are continuous cell lines of epithelial origin such as HeLa, HEK, HEP-2, KB and Graham 293<sup>2,3</sup>. Only Graham 293 cells should be used for isolation of adenovirus types 40 and 41<sup>5</sup>
11. Adenovirus positive control cultures, i.e. ATCC#VR-2, Adenovirus type 2

### PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Do not mouth pipette samples or reagents. Avoid contact with broken skin or mucous membranes.
3. Do not smoke, eat or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. 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.
5. **CAUTION:** Because of the affinity of adenovirus for the ocular area, hand to eye contact should be carefully avoided during processing of specimens or performing diagnostic tests<sup>16</sup>.
6. Avoid skin contact with stop solution (1N sulfuric acid). It may cause irritation and burns. Flush with water if contact occurs.
7. 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.
8. Avoid splashing or generation of aerosols.
9. Do not use **Premier Adenoclone** reagents beyond the kit expiration date. Each working 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.
10. Do not interchange or mix lots of **Premier Adenoclone** reagents.
11. Avoid microbial contamination of reagents or incorrect results may occur. Contamination of samples could cause false results.

12. Use aseptic technique and sterile equipment and materials for all tissue culture procedures.
13. Use separate pipettes or pipette tips for each sample, control and reagent. Avoid contamination with metal ions.
14. **DO NOT REUSE MICROWELLS.**

### HAZARD AND PRECAUTIONARY STATEMENTS

Refer to the SDS, available at [www.meridianbioscience.com](http://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 once opened.

### INDICATION OF INSTABILITY OR DETERIORATION

The following conditions may indicate reagent deterioration:

1. Any evidence of microbial contamination or heavy precipitation
  2. Any blue color in the substrate solutions before addition to microwells.
  3. A negative control value greater than 0.150 absorbance units at 450 nm may indicate deterioration of reagents.
  4. 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 Support Center at 1-800-343-3858.

### REAGENT PREPARATION

1. Bring all reagents to room temperature (20-30 C) before use.
2. Return all reagents to 2-8 C immediately after use.
3. Do not allow microwells to dry between steps.
4. Prepare decontamination vessel for discarding reagents and materials.
5. 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

Proper specimen collection is critical for the isolation of adenovirus in cell culture and should only be attempted by experienced personnel. The optimum time for specimen collection is as soon as possible after onset of symptoms. Adenovirus is most commonly isolated from respiratory, ophthalmic and rectal specimens, but has been recovered from virtually every organ system in man<sup>16</sup>. The site of infection should be thoroughly swabbed to collect epithelial cells. Place the swab directly in approximately 3 mL of viral transport medium and swirl vigorously<sup>16</sup>. The specimen should be sent promptly to the laboratory on ice according to 42 CFR (Code of Federal Regulation) 72.

Alternatively, nasopharyngeal aspirates, secretions or washes can be collected<sup>16</sup>. It is generally more effective and convenient to collect 2-5 mL naso-pharyngeal secretions by aspiration, using a small tube connected to a specimen collection bottle with the tube inserted into the patient's nose. This system is commercially available as the mucous trap. In cases in which nasal secretions are insufficient, nasal washes with 1-2 mL of sterile saline through the nostril may be used. A minimum of 0.2 mL of secretion should be collected.

Rectal swabs or stool specimens collected for culture should be placed in 1 mL of viral transport media. Caution should be taken when using rectal swabs to assure that sufficient fecal sample (30 to 50 mg of raw stool) is obtained.

All specimens should be held at 2-8 C on ice and not frozen unless a delay of more than 72 hours before cell culture inoculation is anticipated. In such cases, rapidly freeze the specimen in a bath of dry ice and acetone or alcohol and store at -20 C or colder for up to one month. Avoid slow freezing (e.g. placing into a -20 C freezer) as this may destroy infectivity of adenovirus in clinical specimens. Do not store specimens in a self-defrosting freezer. Avoid repeated freezing and thawing of specimens. For direct testing of stool specimens: Stool specimens or rectal swabs should be collected in containers that do not contain media, preservatives, animal serum, metal ions, oxidizing agents or detergents as any of these additives may interfere with the **Premier Adenoclone** assay. Caution should be taken when using rectal swabs to assure that sufficient fecal sample (30 to 50 mg) is obtained. Diluted samples may be stored at 2-8 C for 3 days without interference with the assay performance. For long term storage of undiluted stool specimens, store at -20 C or colder. Do not store in self-defrosting freezers. Avoid repeated freezing and thawing of specimens.

### PREPARATION OF SPECIMENS FOR ISOLATION

Susceptible cell cultures for the growth of adenovirus are continuous cell lines of epithelial origin such as HeLa, HEK, HEP-2, KB and Graham 293<sup>2,3</sup>. Only Graham 293 cells should be used for the isolation of adenovirus types 40 and 41<sup>5</sup>. Different cell lines as well as different passages of the same cell lines may vary greatly in viral sensitivity. Each lab should establish their own QC procedures for ensuring the acceptability of tissue culture cells for routine tissue culture isolation.

Swabs arriving in a viral transport medium should be swirled vigorously and excess fluid removed by firmly pressing the swab against the side of the tube. Inoculate into susceptible cell cultures<sup>16</sup>. Do not accept dry swabs for viral isolation.

All aspirates, secretions and washes should be pipetted vigorously to obtain a homogeneous suspension. The suspension should then be treated with antibiotics and inoculated into susceptible cell culture<sup>16, 26, 27</sup>.

Stool specimens can either be used direct (see assay procedure) or prepared for cell culture isolation. For the latter, grind a few grams of fecal material with a mortar, pestle, sterile sand or other abrasive. Add that volume of diluent (e.g. culture medium) with antibiotics that results in a 10% suspension. Clarify by centrifugation and inoculate into Graham 293 cells<sup>16</sup>.

Ideally, specimen cell cultures should be monitored daily for the development of cytopathic effects (CPE) characteristic of adenoviruses. The cells of an adenovirus infected monolayer become enlarged, rounded and retracted, eventually aggregating into irregular grape-like clusters. These changes are generally associated with an increase in the acidity of the culture medium. The time required for the development of CPE depends on the strain of adenovirus and concentration of infectious virus in the specimen. Generally, CPE occurs within 2 to 7 days with adenovirus types 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7. Other adenovirus strains, especially those in subgroup D, can require up to 28 days before recognizable CPE develops or may even require a blind cell culture passage<sup>16</sup>. It is recommended that cultures are ready for confirmation when at least 25% of CPE becomes evident.

### SPECIMEN PREPARATION

#### Assay of Tissue Culture Specimen Fluid

When tissue cultures exhibit at least 25% to 50% CPE, add 2 drops (100 µL) of tissue culture fluid directly into the microwells, using the sample transfer pipette. **DO NOT DILUTE TISSUE CULTURE FLUID.**

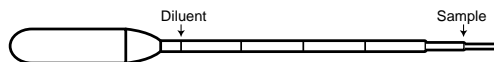
#### Assay of Direct Stool Specimen

Add 1 mL of sample diluent to properly marked tube, using a sample transfer pipette. Add samples by one of the following:

1. Solid stool — press sample into sample transfer pipette to first mark (see figure below).
2. Liquid stool — aspirate sample into sample transfer pipette to first mark (see figure below).
3. Rectal swab — swirl swab in one ml of sample diluent to release fecal material. Firmly press swab against side of tube to remove liquid. Mix thoroughly. *Do not dilute further.*

Resuspend sample in 1 mL of sample diluent with sample transfer pipette by vigorously aspirating and eluting solution until a workable solution is obtained.

#### Sample Transfer Pipette



Using the sample transfer pipette, add 2 drops of either *undiluted* tissue culture fluid or *diluted* stool specimen to wells. See test procedures for details.

## 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 either diluted fecal sample, undiluted tissue culture fluid, 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 (20-30 C) 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 and 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.
- After reading and recording results, discard the used wells and absorbent paper into biohazardous waste.

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 ( $A_{450}$ ) greater than 0.150 are considered positive. Specimens with absorbance equal to or less than 0.150 are considered negative. Occasionally, a discrepancy 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** is supplied with a positive and negative (sample diluent) control which are to be used every time an assay is run. 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.

In addition to the positive and negative controls supplied, when performing tissue culture confirmation, two other types of controls may be used at the discretion of the laboratory. These controls insure that the tissue culture system employed is functioning properly:

- Uninfected cell supernatant from the same lot as those used to isolate the virus can be utilized as a negative control.
- Infected cell supernatant from a known adenovirus positive specimen (25% CPE or greater) can be utilized as a positive control.

The uninfected cell supernatant well should be colorless with an absorbance at 450 nm of less than 0.150. The infected cell supernatant from a known positive should be blue. The absorbance at 450 nm will depend on the degree of infection, but should be greater than 0.150.

If the positive and negative controls supplied with the kit do not perform properly, contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor. If the positive and negative controls supplied work properly but the tissue culture controls do not perform properly, an evaluation of the cell lines and procedures involved is required.

## EXPECTED VALUES

Rate of positivity may vary depending on geographic location, method of specimen collection, handling and transportation, cell culture system used or 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. In children under 5 years, approximately 5% of acute respiratory disease is due to adenovirus<sup>5</sup>.

Approximately 10% of childhood pneumonia may be of adenovirus etiology<sup>7</sup>. Acute hemorrhagic cystitis in children may be caused by adenoviruses in 20 to 70% of cases<sup>8, 9</sup>. Enteric adenoviruses (types 40 and 41) have been implicated in approximately 10% of pediatric patients with gastroenteritis and appears most frequently in children under 2 years of age<sup>10</sup>. 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.

In adults, adenoviruses have been implicated at times in cervicitis<sup>4</sup>, and in acute respiratory disease, especially in military recruits<sup>11</sup>. Ocular infections such as epidemic keratoconjunctivitis and so called "swimming pool conjunctivitis" due to adenoviruses may occur in any age group<sup>12, 13</sup> and those in any group who are immunosuppressed may become infected with adenoviruses<sup>14, 15</sup>.

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

**Premier Adenoclone** assay is highly specific and sensitive for adenovirus antigen. The monoclonal antibody in this test reacts with the group specific hexon antigen. It will detect all 41 known serotypes, but cannot be used to differentiate types.

A negative result does not exclude the possibility of adenovirus infection in the patient. Failure to detect adenovirus may be a result of factors such as collection of specimen at an improper time in the disease when too few virions are present, improper sampling or handling of the specimen, failure of cell culture, etc. 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.

All positive results must be interpreted with caution since adenovirus is capable of latency and recrudescence. Asymptomatic shedding may occur up to 18 months after infection<sup>16</sup>. Enteric adenoviruses may be found in the stools of asymptomatic children<sup>25</sup>. Test results should be interpreted in conjunction with information available from epidemiological studies or clinical evaluations of patient or other diagnostic procedures<sup>24</sup>.

Co-infection with bacterial pathogens is possible. Therefore, bacteriological tests should be performed in parallel with this test to rule out bacteriological etiology. The use of **Premier Adenoclone** for direct specimen testing other than stool specimens is not recommended as insufficient antigen, inadequate or improper specimen collection may cause negative results. This test is intended for use for culture confirmation or direct stool specimens. A positive result in feces, in association with diarrhea is highly suggestive of adenoviral gastroenteritis<sup>10</sup>. Adenovirus types 40 and 41 have been most often associated with viral 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<sup>25, 26</sup>.

## SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Premier Adenoclone** was tested in four laboratories in New York, California and Massachusetts for tissue culture confirmation or direct testing of stool samples. Results of **Premier Adenoclone** were compared to cytopathic effect (CPE) formation in tissue culture and Electron Microscopy (EM) for stool. **Premier Adenoclone** assay showed excellent correlation with both methods.

Method of Determination*	Site I		Site II		Site III		Site IV	
	S		S, V		V		S, V	
	Tissue Culture		Stool Suspension		Tissue Culture		Tissue Culture	
	+	-	+	-	+	-	+	-
<b>Premier Adenoclone®</b>	75	0	70	0	22	0	23	0
	0	115	1	160	0	51	1	49
Sensitivity	100%		99%		100%		96%	
Specificity	100%		100%		100%		100%	
Total Agreement	100%		99%		100%		99%	

\*S: Spectrophotometric determination; V: Visual determination

NOTE: There was 100% correlation between spectrophotometric and visual determination.

## LIMITS OF DETECTION

### STOOL SUSPENSION

Four adenovirus positive stool samples with known EM particle counts per ml were serially diluted and tested in **Premier Adenoclone** to show the limits of detection. These results show that adenovirus particle counts as low as  $10^7$  per mL can be detected by **Premier Adenoclone**.

Particles/mL	Non-enteric		Non-enteric		Ad 41		Ad 40	
	Stool 1	Stool 2	Stool 1	Stool 2	Stool 3	Stool 4	Stool 3	Stool 4
$10^8$	$A_{450}$	$A_{450}$	$A_{450}$	$A_{450}$	$A_{450}$	$A_{450}$	$A_{450}$	$A_{450}$
	1.78	-	-	-	-	-	-	-
$10^7$	.26*	>2.00	>2.00	>2.00	>2.00	>2.00	>2.00	>2.00
$10^6$	.04	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06
$10^5$	.03	.17*	.17*	.17*	.17*	.17*	.17*	.17*
$10^4$	-	.04	.04	.04	.04	.04	.04	.04

## CELL CULTURE

Serial dilutions of different adenovirus supernatants, from 3+ CPE cultures, as tested by **Premier Adenoclone** Adenovirus diagnostic kit are shown in the following table. Asterisks indicate the relative sensitivity of **Premier Adenoclone** for the adenovirus serotype tested. The monoclonal antibody used in **Premier Adenoclone** has been shown to react with all human subgroups as well as with isolates that infect monkeys, dogs, cattle and swine<sup>2</sup>.

	TYPE A			TYPE B			TYPE C			
	AD12	AD18	AD31	AD3	AD7	AD21	AD1	AD2	AD5	AD6
1:10	>3.0	>3.0	>3.0	1.78	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0
1:100	2.13	0.64*	2.09	0.49*	>3.0	2.36	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0
1:1000	0.21**	0.05	0.15*	0.09	1.56	0.24	>3.0	1.67	0.57	2.52
1:2000	0.08	0.02	0.06	0.05	0.71*	0.08	1.66	0.70	0.23*	1.26
1:4000	0.04	0.01	0.03	0.04	0.15	0.04	0.65	0.19*	0.12	0.60
1:8000	0.02	0.02	0.02	0.03	0.07	0.02	0.22*	0.11	0.06	0.35
1:16000	0.02	0.02	0.02	0.02	0.07	0.02	0.11	0.07	0.03	0.19*

	TYPE D				TYPE E		ENTERIC	
	AD9	AD22	AD37	AD39	AD4	AD40	AD41	
1:10	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	
1:100	2.75	2.44	2.62	2.28	>3.0	2.40	>3.0	
1:1000	0.24*	0.22*	0.25*	0.15*	1.60	0.26*	0.73	
1:2000	0.11	0.09	0.09	0.07	0.94	0.15	0.27*	
1:4000	0.05	0.04	0.06	0.03	0.46	0.08 -	0.12	
1:8000	0.05	0.03	0.02	0.02	0.25	0.06	0.06	
1:16000	0.02	0.02	0.02	0.02	0.15*	0.05	0.04	*limits of detection

## REPRODUCIBILITY

### Intra-assay

Each specimen\* was tested in a single assay twenty-one times and the mean and coefficient of variation determined.

	Neg Stool		Stool 1		Stool 2		Stool 3	
	N	21	21	21	21	21	21	21
$\bar{X}$	0.012	0.232	0.744	1.713				
CV	56%	10%	14%	8%				
	Neg Cult.		Cult.1		Cult.2		Cult.3	
	N	21	21	21	21	21	21	
$\bar{X}$	0.017	0.181	0.418	1.318				
CV	35%	6%	7%	7%				

\*A positive sample was diluted in a 5% stool suspension and in tissue culture fluid to represent a low (near the cut-off), medium and high sample.

### Inter-assay

Each specimen was run individually in twenty-one different assays performed by three technicians and the mean and coefficient of variation determined.

	Neg Stool		Stool 1		Stool 2		Stool 3	
	N	21	21	21	21	21	21	21
$\bar{X}$	0.026	0.129	0.474	0.990				
CV	48%	9%	12%	10%				
	Neg Cult.		Cult.1		Cult.2		Cult.3	
	N	21	21	21	21	21	21	
$\bar{X}$	0.017	0.198	0.508	1.547				
CV	59%	10%	10%	9%				

\*A positive sample was diluted in a 5% stool suspension and in tissue culture fluid to represent a low (near the cut-off), medium and high sample.

## CROSSREACTIVITY

The following microorganisms and viruses were tested in **Premier Adenoclone** and showed no cross reactivity in the test. All cross-reactivity tests utilized stock cultures containing an estimated  $10^7$ - $10^9$  infectious organisms per mL with the following exceptions: calicivirus, SRV, rotavirus, norwalk virus and astrovirus were tested as EM positive stools; *Clostridium difficile* was tested as a toxin positive. Stool and urine was tested and found to be negative.

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

## Viruses

Coxsackievirus A-9	Rhinovirus 3	Echovirus 6
Coxsackievirus B-3	Rhinovirus 17	Echovirus 7
Coxsackievirus B-4	Rhinovirus 43	Echovirus 9
Coxsackievirus B-5	Varicella zoster	Echovirus 11
Poliovirus I	Chlamydia trachomatis	Echovirus 17
Poliovirus II	Simian foamyvirus 2	Echovirus 18
Poliovirus III	Simian foamyvirus 8	Echovirus 22
Human Coronavirus	Measles	Herpes simplex 1
Reovirus 1	Respiratory Syncytial virus	Herpes simplex 2
Reovirus 2	Cytomegalovirus	Small round virus (SRV)
Reovirus 3	Influenza A	Rotavirus
Parainfluenza-1	Influenza B	Nonwalk virus
Parainfluenza-2	Calicivirus	Astrovirus
Parainfluenza-3	Papovavirus SV-40	Myxoviruses-Paramyxoviruses SV-5

\*False positive results 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<sup>25, 26</sup>.

## ITALIANO

# PREMIER® ADENOCLONE®

### Test immunoenzimatico (EIA) per la ricerca dell'antigene di Adenovirus in campioni fecali umani e per la conferma di Adenovirus in colture cellulari

REF 696007

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

#### FINALITÀ D'USO

Premier Adenoclone è un test immunoenzimatico (EIA) qualitativo per la ricerca dell'antigene di Adenovirus in campioni fecali e per confermare la presenza di Adenovirus in colture cellulari di campioni respiratori, ottalmici ed enterici.

#### SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli Adenovirus umani sono suddivisi in 41 tipi, classificati mediante sierologia ed elettroforesi del DNA. A una famiglia di virus a DNA, privi di capsule e con capsidi icosaedrico composto da 252 capsomeri. I virioni contengono proteine associate al genere che sono tipo-specifiche. Le proteine associate alla specificità (gruppo-specifiche) sono le porzioni alfa dell'esone, la base-pentamerica, la porzione delta della fibra ed il polipeptide IIIa. L'anticorpo monoclonale utilizzato nel kit Premier Adenoclone è diretto contro l'antigene (esone) gruppo-reattivo condiviso da Adenovirus umani, di scimmia, canini, suini, di topo e bovini. Questo anticorpo monoclonale reagisce con tutti e 41 i tipi di Adenovirus umani<sup>1</sup>.

Gli Adenovirus possono causare varie patologie nell'uomo, patologie respiratorie (faringiti acute, febbri faringoconjuntivali, sindromi respiratorie acute, polmoniti), patologie oculari (cheratoconjuntiviti epidemiche, congiuntiviti contratte in piscina) e gastroenteriti<sup>2,4</sup>.

L'identificazione di Adenovirus è generalmente accompagnata dalla proliferazione in colture cellulari del virus, seguita dalla comparsa del caratteristico effetto citopatico (CPE). Le linee cellulari suscettibili ad Adenovirus sono linee cellulari continue di origine epiteliale come cellule HeLa, Hep-2, KB e Graham 293<sup>2, 3</sup>. Generalmente l'effetto citopatico con i tipi 1-7 compare in un periodo compreso tra 2-7 giorni. Tuttavia altri ceppi, soprattutto il sottogruppo D, possono richiedere più di 28 giorni prima che possa essere evidente l'effetto citopatico<sup>16</sup>. La conferma dell'isolamento di Adenovirus in colture cellulari dopo CPE può essere ottenuta con un saggio in immunofluorescenza, un metodo RIA, ibridazione del DNA, un saggio EIA o elettroforesi del DNA<sup>17-21</sup>. Premier Adenoclone è un metodo rapido, semplice ed accurato per confermare la presenza di Adenovirus in colture cellulari.

Adenovirus è il secondo virus più comunemente ritrovato in campioni fecali o in tamponi rettali di pazienti con diarrea. I tipi 40 e 41 di Adenovirus sono stati evidenziati per la prima volta esaminando estratti di campioni fecali in microscopia elettronica e sono spesso associati con gastroenteriti<sup>22</sup>. Questi tipi di Adenovirus possono essere isolati in cellule Graham 293<sup>3</sup>. Premier Adenoclone può essere utilizzato per l'identificazione diretta da campione fecale riducendo così il tempo richiesto per la coltura cellulare.

#### PRINCIPI BIOLOGICI DEL TEST

Premier Adenoclone è un test EIA che utilizza anticorpi monoclonali adsorbiti ad una fase solida. I micropozzetti separabili sono coattati con un anticorpo monoclonale anti-Adenovirus. Un'aliquota della sospensione di campione fecale o di brodo di coltura cellulare non diluito viene aggiunta al pozzetto e incubata contemporaneamente con un anticorpo monoclonale anti-Adenovirus, coniugato con perossidasi di ratano. Se l'antigene è presente si formerà un complesso a sandwich tra anticorpo legato ally fase solida, antigene e anticorpo legato all'enzima. Dopo 60 minuti di incubazione a temperatura ambiente i pozzetti vengono lavati con acqua deionizzata per allontanare il campione non legato e l'eccesso di coniugato enzimatico. Quindi si aggiungono il substrato (urea perossido) ed il cromogeno (tetrametilbenzidina), lasciando in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente. In presenza di coniugato enzimatico legato all'antigene si avrà uno sviluppo di colore blu. L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla concentrazione di antigene nel campione.

#### REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

- Pozzetti microtiter** - coattati con anticorpi monoclonali (da topo) gruppo-specifici anti-Adenovirus
- Diluente campione/Controllo Negativo**- Soluzione tampone con thimerosal 0.02% come conservante.
- Coniugato enzimatico** - Anticorpi monoclonali (da topo) specifici anti-Adenovirus, marcati con perossidasi di rafano, in soluzione proteica con gentamicina e con thimerosal 0.02% come conservante.
- Controllo Positivo** - Adenovirus (AD41) inattivato in soluzione tampone, con thimerosal 0.02% come conservante.
- Substrato A** - Soluzione tampone contenente urea perossido.
- Substrato B** - Soluzione cromogena contenente tetrametilbenzidina (TMB).
- Soluzione di arresto** - Contenente acido solforico 1N. **Attenzione:** evitare il contatto con la pelle. Se la soluzione viene a contatto con la pelle lavare con abbondante acqua.
- Pipette monouso**
- Supporto per pozzetti microtiter**

#### MATERIALI NON FORNITI

- Provette (12x75 mm) per allestire le diluizioni dei campioni.
- Acqua distillata o deionizzata
- Carta assorbente
- Pipettatrici 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 filtro per la lettura a 450 nm (opzionale).
- Spruzzetta per dispensare la soluzione di lavaggio oppure apparecchio automatico per il lavaggio della piastre EIA.
- Timer (minimo un'ora).

- Tamponi sterili e medium di trasporto per virus (solitamente una soluzione saline tamponata contenente uno stabilizzante proteico del virus e antibiotici) Il medium non deve essere inibitorio nei confronti di Adenovirus o di altre linee cellulari<sup>16</sup>.
- Linee cellulari suscettibili ad Adenovirus ed un microscopio per esaminare le colture cellulari. Le linee suscettibili ad Adenovirus sono linee cellulari continue di origine epiteliale come cellule HeLa, HEK, Hep-2, KB e Graham 293<sup>2, 3</sup>. Questa ultima linea cellulare dovrebbe essere utilizzata per l'isolamento di Adenovirus 40-41<sup>5</sup>.
- Culture cellulari infettate da Adenovirus, per esempio ATCC VR-2, Adenovirus tipo-2.

#### PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- Non pipettare nessun campione o reagente con la bocca. Evitare il contatto con tagli o mucose.
- 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, i controlli ed il materiale che viene con essi a contatto, devono essere manipolati con cautela (Biosafety 2) come raccomandato nel Manuale CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories".
- ATTENZIONE: Vista l'affinità dell'adenovirus per l'area oculare, evitare accuratamente il contatto mani-occhi durante la preparazione dei campioni nonche durante l'esecuzione del test
- 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. 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. Oeni reattivo e' stato ottimizzato per ottenere la massima performance— la diluizione o alterazione dei reattivi può provocare perdita di sensibilità: I tempi di incubazione e le temperature diverse da quelle indicate possono dare risultati errati.
- Non scambiare reagenti appartenenti a lotti differenti.
- Evitare contaminazione microbica dei reattivi. La contaminazione dei reattivi potrebbe causare risultati errati. La contaminazione dei campioni potrebbe causare falsi risultati.
- Utilizzare tecniche asettiche e materiale sterile per le procedure di coltura tissutale.
- Usare pipette o puntali diversi per ogni campione, controllo e reagente. Evitare la contaminazione con ioni metallici.
- NON RIUTILIZZARE I POZZETTI.

#### DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Fare riferimento alla SDS, disponibile sul sito [www.meridianbioscience.com](http://www.meridianbioscience.com) (US version) / [www.meridianbioscience.eu](http://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. I pozzetti sono stabili per la durata beletta una volta aperto. Tenere i pozzetti nella busta sigillata finché quest'ultimi raggionge temperatura ambiente. 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.

#### PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Lasciare che tutti i componenti del kit, busta dei micropozzetti inclusa, raggiungano temperatura ambiente (20-30 C) prima di iniziare il test.
- Riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-3 C dopo l'uso.
- Fare in modo che i pozzetti non si asciughino durante i diversi passaggi del test.
- 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 DEI CAMPIONI

Un metodo corretto di raccolta del campione è critico per l'isolamento di Adenovirus in colture cellulari e dovrebbe essere eseguito da personale con esperienza. Il momento ottimale per la raccolta del campione è immediatamente dopo la comparsa dei sintomi. Adenovirus è comunemente isolato da campioni respiratori, oftalmici e da tamponi rettali, ma nell'uomo è possibile isolarlo anche da altri organi<sup>16</sup>. Le cellule epiteliali nel punto dell'infezione devono essere raccolte con un tampone. Il tampone deve quindi essere posto in circa 3 mL di medium di trasporto e stemperato nel liquido accuratamente<sup>16</sup>. Il campione deve essere inviato immediatamente al laboratorio in un contenitore con ghiaccio, in accordo alle indicazioni 42CFR (Codice delle Regolamentazioni Federali) 72.

In alternative si possono prelevare aspirati o lavaggi naso-faringei e secrezioni nasali<sup>16</sup>. Generalmente si consiglia di raccogliere 2-5 mL di secrezioni naso-faringee mediante aspirazione, usando un piccolo tubo, inserito nella cavità nasale del paziente e collegato ad un flacone di raccolta. Tale sistema di prelievo è anche disponibile commercialmente. Nel caso in cui le secrezioni nasali siano insufficienti può essere eseguito un lavaggio nasale con 1-2 mL di soluzione fisiologica. Dovrebbero essere raccolti almeno 0.2 mL di secrezioni.

I tamponi rettali o i campioni fecali utilizzati per l'esecuzione di colture cellulari devono essere posti in 1 mL di medium di trasporto. Quando deve essere utilizzato un tampone rettale, prestare attenzione affinché venga raccolto un quantitativo sufficiente di campione fecale (30-50 mg di feci).

Tutti i campioni devono essere conservati a 2-8 C in un contenitore con ghiaccio ma non devono essere congelati, a meno che non sia previsto un ritardo di più di 72 ore prima dell'inoculo in cellule in coltura, in tal caso congelare rapidamente il campione in ghiaccio secco e acetone o alcool e conservare a -20 C o a temperature inferiori, fino anche ad un mese. Si deve evitare però che il congelamento del campione avvenga lentamente (per esempio ponendolo in un congelatore a -20 C) dato che questa operazione potrebbe far perdere le proprietà infettanti di Adenovirus. Non si consiglia di conservare i campioni in un congelatore a sbrinamento ciclico, ripetuti cicli di congelamento e scongelamento del campione sono sconsigliati. Esame diretto del campione fecale: i campioni fecali o i tamponi rettali dovrebbero essere raccolti in contenitori non contenenti terreni, conservanti, siero animale ioni metallici, agenti ossidanti o detergenti, 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). I campioni diluiti devono essere esaminati il più velocemente possibile, ma possono anche essere conservati fino a 3 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 sbrinamento ciclico) ad una temperatura di -20 C (o inferiore). Ripetuti cicli di congelamento e scongelamento sono sconsigliati perchè potrebbero dare risultati scorretti.

#### PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER L'ISOLAMENTO VIRALE

Le colture cellulari utilizzate per la crescita e l'isolamento di Adenovirus consistono in linee cellulari continue di origine epiteliale come cellule HeLa, HEK, HEp-2, KB e Graham 293<sup>2, 3</sup>. Per l'isolamento di Adenovirus 40 e 41 si dovrebbero invece utilizzare solo cellule Graham 293<sup>3</sup>. Linee cellulari diverse così come cambiamenti delle metodiche culturali potrebbero causare variazioni di sensibilità. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire della procedure di controllo di qualità al fine di garantire l'accettabilità delle linee cellulari utilizzate per l'isolamento culturale.

I tamponi rettali posti in un medium di trasporto virale devono essere stemperati accuratamente e l'eccesso di liquido deve essere rimosso premendo il tampone contro le pareti della provetta. Il liquido deve quindi essere inoculato in cellule in coltura<sup>16</sup>. Per l'isolamento virale non devono essere accettati tamponi disidratati, non contenuti in un medium di trasporto virale.

Gli aspirati, le secrezioni e i lavaggi nasali devono essere pipettati ripetutamente per rendere la sospensione omogenea. La sospensione deve essere quindi trattata con antibiotici e inoculate in cellule in coltura<sup>16, 26, 27</sup>.

I campioni fecali possono essere esaminati direttamente (vedi metodica) o utilizzati per il test previo isolamento colturale. In questo caso il materiale fecale deve essere sminuzzato con un mortaio, un pestello o del materiale abrasivo. Aggiungere quindi un volume di diluente (per esempio brodo di coltura) tale da ottenere una sospensione al 10%. Centrifugare e inoculare in cellule Graham 293<sup>16</sup>.

Teoricamente le cellule in coltura dovrebbero essere esaminate quotidianamente per valutare il caratteristico effetto citopatico (CPE) causato da Adenovirus. Le cellule in coltura infettate da Adenovirus diventano allargate, rotondeggianti e rifrangenti talvolta si aggregano in gruppi di forma irregolare. Questi cambiamenti sono generalmente associati ad un aumento di acidità del brodo di coltura. Il tempo necessario per lo sviluppo dell'effetto citopatico (CPE) dipende dal tipo di Adenovirus e della concentrazione di particelle virali nel campione. Solitamente l'effetto citopatico si verifica entro 2-7 giorni in presenza di Adenovirus tipo 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Altri tipi di Adenovirus, specialmente quelli del sottogruppo D, possono richiedere anche 28 giorni per causare effetto citopatico<sup>16</sup>. Quando l'effetto citopatico è evidente in almeno il 25% delle cellule in coltura, si raccomanda di eseguire un test di conferma.

## PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

### Esame del brodo colturale

Quando almeno il 25-50% delle cellule in coltura mostra effetto citopatico, aggiungere 2 gocce (100 µL) di brodo colturale direttamente nei pozzetti, utilizzando le pipette per il trasferimento del campione. NON DILUIRE IL BRODO COLTURALE.

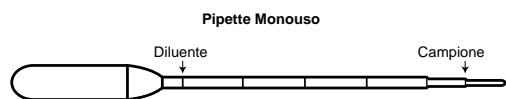
### Esame diretto del campione fecale

Distribuire 1 mL di Diluente del campione nella provette opportunamente contrassegnate. Utilizzando una pipetta monouso.

Aggiungere i campioni nel seguente modo:

1. Feci solide: raccogliere il campione nella pipetta fino alla prima tacca.
2. Feci liquide: aspirare il campione nella pipetta fino alla prima lacca.
3. Tamponi rettali: stempere il tamponi in 1 mL di Diluente del campione, perchè rilasci il materiale fecale. Premere il tamponi contro la parete della provetta per rimuovere il liquido, quindi mescolare bene. Non diluire ulteriormente.

Risospendere il campione, in 1mL di diluente dei campioni, con la pipetta monouso aspirando e rilasciando la soluzione finché si ottiene un adeguato dissolvimento.



Utilizzando la pipetta monouso, aggiungere 2 gocce di brodo di coltura nondiluito o di campione fecale diluito nei pozzetti—vedi "metodica" per dettagli.

## PROCEDURA DEL TEST

1. 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.
2. Aggiungere 2 gocce (100 µL) di campione diluito, brodo colturale non diluito, controllo positivo, controllo negativo (diluente del campione) in pozzetti separati.
3. Aggiungere 2 gocce (100 µL) di Conjugato enzimatico ad ogni pozzetto. Mescolare bene, agitando delicatamente la piastra.
4. Incubare a temperatura ambiente (20-30 C) per 60 ±5 minuti.
5. Scartare il contenuto dei pozzetti in un contenitore contenente disinfettante. Scuotere la piastra su carta assorbente pulita per rimuovere completamente il liquido dai pozzetti.
6. Lavare i pozzetti con acqua distillata e scartare il liquido come al punto 5.
7. Ripetere questa operazione di lavaggio (punti 5 e 6) per 4 volte (per un totale di 5 lavaggi).
8. Distribuire 2 gocce (100 µL) di Substrato A (perossido di urea) in ciascun pozzetto.
9. Distribuire 2 gocce (100 µL) di Substrato B (TMB) in ciascun pozzetto.
10. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
11. Dopo lettura e registrazione dei risultati eliminare i pozzetti utilizzati in un contenitore di scarico per materiale biologico Al termine dell'incubazione (punto 10) ed entro 10 minuti 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). Ad ogni pozzetto. L'assorbanza di ogni pozzetto deve essere letta entro 60 minuti (azzerando il lettore contro aria) a 450nm, usando un filtro di riferimento >600nm (opzionale).

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. Lettura 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 a quello del Controllo negativo è considerato negativo.
2. Lettura spettrofotometrica. I campioni con un'assorbanza (A<sub>450</sub>) maggiore di 0.150 sono considerati positivi. I campioni con un'assorbanza uguale o minore di 0.150 sono considerati negativi. Occasionalmente, si può avere discrepanza tra lettura visiva e spettrofotometrica con campioni aventi basse quantità di antigene. La lettura spettrofotometrica, essendo un metodo oggettivo è più accurato.  
NOTA: nei campioni molto positivi può formarsi un precipitato, questo fatto non altera i risultati.

## CONTROLLO 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, se letto allo spettrofotometro (450nm) deve avere un'assorbanza maggiore di 0.30. Il Controllo negativo letto visivamente deve essere incolore, se viene letto allo spettrofotometro deve avere un'assorbanza (450nm) minore di 0.150.

Quando si esegue il test di conferma da coltura cellulare, oltre al controllo positivo e negativo forniti con il kit, dovrebbero essere utilizzati due altri controlli a discrezione del laboratorio. Questi controlli assicurano che i sistemi culturali impiegati funzionino correttamente:

- Come controllo negativo può essere utilizzato il surnatante di cellule in coltura, non infette, dello stesso lotto di quelle utilizzate per l'isolamento del virus.
- Come controllo positivo può essere utilizzato il surnatante di cellule in coltura infettate con un campione positivo (CPE 25% o maggiore).

Il pozzetto contenente il surnatante delle cellule non infette deve risultare incolore, con un'assorbanza a 450 nm minore di 0.150. Il pozzetto contenente il surnatante delle cellule infette deve risultare di colore blu. L'assorbanza a 450 nm, proporzionale al grado di infezione, deve essere maggiore di 0.150.

Se il Controllo positivo e negativo forniti con il kit non danno i sopracitati risultati, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale, (Italia +390331433636). Se i controlli forniti con il kit funzionano correttamente ma i controlli della coltura cellulare non danno i risultati attesi, le linee cellulari utilizzate e le procedure culturali eseguite devono essere controllate.

## VALORI ATTESI

La percentuale dei risultati positivi può variare in relazione all'area geografica, ai metodi di raccolta del campione, alle condizioni di trasporto, al test utilizzato e alle generali condizioni di salute della popolazione studiata.

La frequenza dell'infezione varia in relazione al tipo di manifestazione clinica e all'età del paziente. In bambini al di sotto dei 5 anni circa il 5% delle patologie respiratorie acute è causata da Adenovirus<sup>5</sup>.

Circa il 10% delle polmoniti nei bambini può essere causato da Adenovirus<sup>7</sup>. Nei bambini il 20-70% dei casi di cistite acuta emorragica può essere causato da Adenovirus<sup>8, 9</sup>. Adenovirus enterici (tipo 40 e 41) sono responsabili di circa il 10% delle gastroenteriti nei pazienti in età pediatrica e sono frequentemente responsabili di infezione nei bambini sotto i due anni di età<sup>14, 15</sup>.

Le caratteristiche del test non sono state ancora completamente determinate per quanto riguarda il test diretto da campioni fecali di neonati.

In ciascun laboratorio dovrebbe essere determinata l'assenza di risultati falsi positivi per tale tipologia di campione, prima di esaminare direttamente campioni fecali di neonati. Negli adulti Adenovirus può causare infezioni cervicali<sup>4</sup> e respiratorie acute, specialmente in ambienti come caserme militari<sup>11</sup>. Le infezioni oculari da Adenovirus come le cheratoconjuntiviti epidemiche e le cosiddette congiuntiviti acquisite in piscina possono essere contratte da individui di qualunque età<sup>12, 13</sup>, inoltre Adenovirus anche nei pazienti immunodepressi può causare infezione in tutte le fasce di età<sup>14, 15</sup>.

## LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il test **PREMIER Adenoclone**, è altamente specifico e sensibile per l'antigene di Adenovirus. L'anticorpo monoclonale di questo test reagisce con l'antigene gruppo specifico (esone). Può riconoscere tutti e 41 i sierotipi ma non può essere utilizzato per differenziarli. Un risultato negativo non esclude la possibile infezione da parte di Adenovirus nel paziente. La mancata diagnosi di infezione da Adenovirus può essere il risultato di molti fattori come la raccolta del campione in un tempo non ottimale della malattia, quando cioè sono presenti pochi virioni, oppure l'erronea conservazione del campione, o non corrette procedure culturali. Un risultato negativo per un campione fecale non esclude la presenza del virus in altri fluidi corporei. Se si sospetta un'infezione respiratoria o oftalmica si dovrebbe effettuare una coltura del campione che si sospetta infettato. Tutti i risultati positivi devono essere interpretati con attenzione, dato che Adenovirus può manifestare latenza e recrudescenza.

L'infezione asintomatica può perdurare fino mesi dopo l'infezione<sup>24</sup>. Adenovirus enterici possono essere ritrovati nelle feci di bambini asintomatici<sup>23</sup> I risultati del test devono essere interpretati in associazione alle informazioni disponibili di studi epidemiologici e valutazioni cliniche del paziente<sup>24</sup>.

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.

Per l'esame diretto con il test **Premier Adenoclone** non si raccomanda l'utilizzo di campioni diversi da quello fecale dato che una quantità insufficiente di antigene o un inadeguato metodo di prelievo del campione possono causare risultati negativi. Il test può essere utilizzato per conferma da coltura cellulare o per l'esame diretto del campione fecale.

Un risultato positivo da campione fecale, in associazione a diarrea, è altamente indicativo di gastroenterite causata da Adenovirus<sup>10</sup>. Adenovirus di tipo 40 e 41 sono più frequentemente associati a gastroenterite virale. 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<sup>25, 26</sup>.

## PRESTAZIONI SPECIFICHE

Il test **PREMIER Adenoclone**, è stato valutato presso 4 laboratori ospedalieri in Massachusetts, New York, California come test di conferma da coltura e come test diretto. I risultati sono stati confrontati con la comparsa dell'effetto citopatico in colture cellulari (CPE) e con la microscopia elettronica (EM).

**PREMIER Adenoclone**, ha dimostrato un'eccellente correlazione con entrambi i metodi.

Metodo di Determinazione*	Site I		Site II		Site III		Site IV	
	S	S, V	S, V	S, V	V	V	S, V	S, V
	Cultura tissutale		Sospensione fecale		Cultura tissutale		Cultura tissutale	
<b>Premier Adenoclone®</b>	+	75	-	0	+	70	-	0
	-	0	115	1	160	22	0	23
						51		49
Sensibilità	100%		99%		100%		96%	
Specificità	100%		100%		100%		100%	
Concordanza	100%		99%		100%		99%	

Legenda: \*S=determinazione spettrofotometrica V=determinazione visiva

NOTA: è stata ottenuta una correlazione del 100% tra lettura spettrofotometrica e visiva.

## LIMITI DI RILEVABILITÀ

### SOSPENSIONE FECALE

Su quattro campioni fecali positivi, con un valore noto (ottenuto mediante microscopia elettronica) di particelle virali/mL, sono state eseguite diluizioni seriali e ciascuna diluizione è stata testata con il kit **PREMIER Adenoclone**, per verificare il limite di rilevabilità del test. I risultati mostrano che il test è in grado di identificare fino a 10<sup>7</sup> particelle di Adenovirus per ml.

	Adenovirus non enterici Campione fecale 1	Adenovirus non enterici Campione fecale 2	Adenovirus 41 Campione fecale 3	Adenovirus 40 Campione fecale 4
Particelle/mL	A <sub>450</sub>	A <sub>450</sub>	A <sub>450</sub>	A <sub>450</sub>
10 <sup>8</sup>	1.78	-	-	-
10 <sup>7</sup>	0.26*	>2.00	>2.00	-
10 <sup>6</sup>	0.04	1.06	>2.00	>2.00
10 <sup>5</sup>	0.03	0.17*	1.73	>2.00
10 <sup>4</sup>	-	0.04	0.21*	0.58*

## COLTURA CELLULARE

Diluzioni seriali di alcuni campioni di surnatante da colture cellulari positive per Adenovirus (Effetto Citopatico 3+) sono state testate con il kit **PREMIER Adenoclone**. Gli asterischi indicano la sensibilità del test **PREMIER Adenoclone** per ogni sierotipo testato. Gli anticorpi monoclonali utilizzati nel test reagiscono con tutti i sierogruppi di Adenovirus umani, così come con Adenovirus che infettano scimmie, cani il bestiame e i maiali<sup>12</sup>.

	TIPO A			TIPO B			TIPO C			AD6
	AD12	AD18	AD31	AD3	AD7	AD21	AD1	AD2	AD5	
1:10	>3.0	>3.0	>3.0	1.78	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0
1:100	2.13	0.64*	2.09	0.49*	>3.0	2.36	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0
1:1000	0.21**	0.05	0.15*	0.09	1.56	0.24	>3.0	1.67	0.57	2.52
1:2000	0.08	0.02	0.06	0.05	0.71*	0.08	1.66	0.70	0.23*	1.26
1:4000	0.04	0.01	0.03	0.04	0.15	0.04	0.65	0.19*	0.12	0.60
1:8000	0.02	0.02	0.02	0.03	0.07	0.02	0.22*	0.11	0.06	0.35
1:16000	0.02	0.02	0.02	0.02	0.07	0.02	0.11	0.07	0.03	0.19*

	TIPO D				TIPO E		ENTERIC		
	AD9	AD22	AD37	AD39	AD4	AD40	AD41		
1:10	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0		
1:100	2.75	2.44	2.62	2.28	>3.0	2.40	>3.0		
1:1000	0.24*	0.22*	0.25*	0.15*	1.60	0.26*	0.73		
1:2000	0.11	0.09	0.09	0.07	0.94	0.15	0.27*		
1:4000	0.05	0.04	0.06	0.03	0.46	0.08 -	0.12		
1:8000	0.05	0.03	0.02	0.02	0.25	0.06	0.06		
1:16000	0.02	0.02	0.02	0.02	0.15*	0.05	0.04		*limiti di rilevabilità

## RIPRODUCIBILITÀ

### Intra-esame

Ogni campione\* è stato testato in un singolo test 21 volte e sono stati calcolati il valore medio e il coefficiente di variazione.

	Campione Negativo	Campione I	Campione II	Campione III
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.012	0.232	0.744	1.713
CV	56%	10%	14%	8%
	Coltura Negativa	Colt. I	Colt. II	Colt. III
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.017	0.181	0.418	1.318
CV	35%	6%	7%	7%

\*Un campione positivo è stato diluito in una sospensione fecale e nel surnatante di una coltura cellulare per rappresentare un campione basso (vicino al cut-off), medio e alto positivo.

### Intra-esame

Ogni campione\* è stato testato in 21 diverse sedute da tre diversi tecnici e sono stati calcolati il valore medio e il coefficiente di variazione.

	Campione Negativo	Campione I	Campione II	Campione III
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.026	0.129	0.474	0.990
CV	48%	9%	12%	10%
	Coltura Negativa	Colt. I	Colt. II	Colt. III
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.017	0.198	0.508	1.547
CV	59%	10%	10%	9%

\*Un campione positivo è stato diluito in una sospensione fecale e nel surnatante di una coltura cellulare per rappresentare un campione basso (vicino al cut-off), medio e alto positivo.

## CROSS-REATTIVITÀ

Mediante il test **PREMIER Adenoclone**, sono stati testati patogeni intestinali comuni e virus. E non hanno mostrato cross reattività nel test. Per la valutazione delle reazioni crociate sono state analizzate sospensioni di colture contenenti da 10<sup>7</sup> a 10<sup>9</sup> organismi per ml con la seguente eccezione: calcivirus, SRV, rotavirus, norwalk virus e astrovirus sono risultati positivi in campioni fecali testati mediante microscopia elettronica; *Clostridium difficile* era positivo per la tossina. Feci ed urine sono state testate e sono risultate negative.

### Microorganismo

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

### Virus

Coxsackievirus A-9	Rhinovirus 3	Echovirus 6
Coxsackievirus B-3	Rhinovirus 17	Echovirus 7
Coxsackievirus B-4	Rhinovirus 43	Echovirus 9
Coxsackievirus B-5	Varicella zoster	Echovirus 11
Poliovirus I	Chlamydia trachomatis	Echovirus 17
Poliovirus II	Simian foamyvirus 2	Echovirus 18
Poliovirus III	Simian foamyvirus 8	Echovirus 22
Human Coronavirus	Measles	Herpes simplex 1
Reovirus 1	Respiratory Syncytial virus	Herpes simplex 2
Reovirus 2	Cytomegalovirus	Small round virus (SRV)
Reovirus 3	Influenza A	Rotavirus
Parainfluenza-1	Influenza B	Norwalk virus
Parainfluenza-2	Calicivirus	Astrovirus
Parainfluenza-3	Papovavirus SV-40	Myxovirus-Paramyxovirus SV-5

\*Risultati falsi positivi potrebbero verificarsi in presenza di alti livelli di *S. aureus* che presenta la proteina A (sierogruppo Cowan). L'enterocolite da *Stafilococco* non è un'infezione comune, in genere è stata descritta in pazienti adulti ed è estremamente rara nei neonati e nei bambini<sup>25, 26</sup>.

FRANÇAIS

# PREMIER® ADENOCLONE®

Test ELISA pour la détection directe des antigènes d'Adenovirus dans des échantillons de selles humaines, et pour la confirmation de présence d'Adenovirus dans des cultures cellulaires.

REF 696007

IVD Dispositif médical de diagnostic in vitro

## BUT DE LA METHODE

Le **Premier Adenoclone** est un test immunoenzymatique (ELISA) pour la détection qualitative des adénovirus humains directement dans des échantillons de selles et pour confirmer la présence d'adénovirus dans des cultures cellulaires réalisées à partir de prélèvements pulmonaires, ophtalmiques ou entériques.

## RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Les adénovirus humains regroupent 41 sérotypes connus, classés principalement en fonction de leur sérologie et de l'empreinte de leur ADN en électrophorèse. C'est une famille de virus à ADN, dépourvus d'enveloppe, à capsidie icosaédrique composée de 252 capsomères. Le virion contient un certain nombre de protéines associées au genre et à la spécificité du type. Celles associées à la spécificité de genre (groupe) de l'adénovirus sont la portion alpha de l'hexamère, le pentamère, la portion delta de la fibre et du polypeptide IIIa. L'anticorps monoclonal du test **Premier Adenoclone** est dirigé contre l'antigène de l'hexamère (spécifique de groupe) que l'on retrouve dans les adénovirus humains, simien, canin, porcine, murin et bovin. Cet anticorps monoclonal a été montré réagissant avec les 41 types d'adénovirus humains par ELISA<sup>1</sup>. Les adénovirus peuvent être la cause d'une variété de maladies cliniques chez l'homme, comprenant les maladies respiratoires (pharyngites aiguës fébriles, fièvres pharyngoconjonctivales, maladies respiratoires aiguës, pneumonies), oculaires (kératoconjonctivite épidémique, conjonctivites dites de « piscine ») et les gastro-entérites<sup>2-4</sup>. L'identification des adénovirus est généralement effectuée par multiplication dans des cultures cellulaires en suivant l'apparition caractéristique de l'effet cytopathogène (ECP). Les lignées cellulaires sensibles aux adénovirus sont des lignées cellulaires continues d'origine épithéliale tels que les cellules HeLa, HEK, Hep-2, KB et Graham 293<sup>2-3</sup>. Généralement les effets cytopathogènes se produisent dans les 2 à 7 premiers jours avec les adénovirus de types 1-7. Cependant, d'autres souches, particulièrement le sous-groupe D, peuvent demander jusqu'à 28 jours avant que des ECP reconnaissables se développent<sup>16</sup>. La confirmation de l'isolement de l'adénovirus dans des cultures cellulaires après ECP se fait entre autre par des méthodes d'immunofluorescence, de radio-immunoessai, d'hybridation d'ADN, immuno-enzymatiques et d'empreinte électrophorétique de l'ADN<sup>17-21</sup>. Le test **Premier Adenoclone** offre un moyen simple, rapide, et précis pour confirmer la présence d'adénovirus dans des isolats de cultures cellulaires.

Le deuxième virus le plus couramment rencontré dans les selles ou les prélèvements rectaux de patients ayant des diarrhées est l'adénovirus<sup>22</sup>. Les adénovirus de type 40 et 41 ont été découverts pour la première fois par une observation en microscopie électronique (ME) d'extraits de selles et sont le plus souvent associés à des gastro-entérites<sup>22</sup>. Ces types d'adénovirus peuvent être isolés dans les cellules Graham 293<sup>5</sup>. Le test **Premier Adenoclone** peut être utilisé pour des tests directs d'échantillons de selles, réduisant ainsi le temps requis par la technique traditionnelle d'isolement par culture cellulaire.

## PRINCIPE DU TEST

Le test **Premier Adenoclone** utilise des anticorps monoclonaux en phase solide dans un essai de type sandwich. Des micropuits sécables sont recouverts d'anticorps monoclonal anti-adénovirus. Une aliquote de la suspension fécale ou du milieu non dilué de la culture cellulaire est ajoutée dans les micropuits et incubée simultanément avec un anticorps monoclonal anti-adénovirus conjugué à la peroxydase de Raifort, entraînant la prise en sandwich de l'antigène de l'adénovirus entre la phase solide et l'anticorps couplé à l'enzyme. Après 60 minutes d'incubation à température ambiante, les micropuits sont rincés à l'eau distillée pour éliminer les échantillons et l'excès d'anticorps couplés à l'enzyme non fixés. Le substrat de l'enzyme (peroxyde d'urée) et le chromogène (tétraméthylbenzidine) sont ajoutés dans les micropuits et incubés pendant 10 minutes à température ambiante. Tout conjugué fixé à dans les micropuits va permettre au substrat incolore de se transformer en un produit bleu.

## 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 Murin, spécifiques de groupe, anti-adénovirus.
2. **Contrôle Négatif / Solution de dilution des échantillons** - Tampon Phosphate salin contenant 0.02% de thimerosal comme conservateur.
3. **Conjugué enzymatique** - Anticorps monoclonal Murin anti-adénovirus conjugué à la peroxydase de Raifort dans une solution protéique tamponnée contenant de la gentamicine et 0.02% de thimerosal comme conservateur.
4. **Contrôle Positif** - Adénovirus (AD41) inactivé en solution avec 0,02% de thimerosal comme conservateur.
5. **Substrat A** - Solution tamponnée contenant du peroxyde d'urée.
6. **Substrat B** - Solution tamponnée contenant le tétraméthylbenzidine.
7. **Solution d'arrêt** - Acide sulfurique 1N. **Attention:** Eviter tout contact avec la peau. En cas de contacts accidentels, rincer abondamment à l'eau.
8. **Support de barrettes de micropuits**
9. **Pipettes de transfert d'échantillons**

## MATERIEL NON FOURNI

1. Tubes à essai, 12x75 mm
2. Eau distillée ou désionisée
3. Papier absorbant
4. Micro Pipettes de précision ou pipettes capables de délivrer des volumes de 100 µL et 1000 µL (optionnel)
5. Conteneur à déchets contenant une dilution au 1:10 d'eau de javel. Pour le passage en autoclave utiliser un désinfectant.
6. Lecteur de plaque ELISA pour lire l'absorbance à 450 nm (optionnel)
7. Système de distribution d'eau, tels qu'une pipette multicanaux, seringue avec tubulure reliée à une bouteille de lavage.
8. Minuteur (1 heure minimum)
9. Ecouvillons stériles et milieu de transport viral (le plus souvent une solution saline physiologique contenant une protéine de stabilisation du virus et un antibiotique). Le milieu ne doit être inhibiteur ni pour l'adénovirus ni pour les lignées cellulaires<sup>16</sup>.
10. Cultures cellulaires sensibles à l'adénovirus et un microscope photonique pour observer les cultures. Les cultures cellulaires sensibles à la croissance de l'adénovirus sont des lignées cellulaires continues d'origine épithéliale tels que HeLa, HEK, Hep-2, KB et Graham 293<sup>2-3</sup>. Seules les cellules Graham 293 doivent être utilisées pour l'isolement des adénovirus type 40 et 41<sup>1</sup>.
11. Cultures contrôles positives à l'adénovirus, soit ATCC#VR-2, Adénovirus type 2.

## PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs avec la bouche. Eviter tout contact avec des coupures cutanées ou les muqueuses.
3. Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones de manipulation des échantillons ou des réactifs du coffret.
4. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons et se laver les mains une fois le protocole terminé. Les échantillons de patients, les échantillons contrôlés ainsi que tout matériel ayant été en contact avec ces derniers doivent être manipulés avec précaution (Biosafety 2), comme recommandé dans le manuel CDC/NIH «Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories.

- ATTENTION : Du fait de l'affinité de l'adénovirus pour les régions oculaires, éviter tout contact entre les mains et les yeux durant la manipulation des échantillons ou lors de la réalisation des tests de diagnostic<sup>16</sup>.
- Eviter tout contact de la Solution d'arrêt avec la peau (acide sulfurique 1N). Ce produit peut entraîner des irritations et des brûlures. En cas de contact accidentel, rincer abondamment à l'eau. Avant élimination, tout le matériel utilisé pour ce protocole doit être autoclavé à 121 C pendant au moins 1 heure et les déchets liquides doivent être mélangés à de l'eau de javel diluée au 1:10 pendant au moins 30 minutes. ATTENTION: Les déchets liquides contenant la Solution d'arrêt doivent être neutralisés avant d'être mélangés à l'eau de javel.
- Eviter les éclaboussures et la formation d'aérosols.
- Ne pas utiliser les réactifs du coffret **Premier Adenocclone** après la date d'expiration. Chacun des réactifs a été optimisé pour obtenir une performance maximale. Une dilution ou un mauvais emploi de ces réactifs peut entraîner une perte de sensibilité. Toutes modifications du temps d'incubation et des températures peuvent donner des résultats erronés.
- Ne pas mélanger les réactifs de coffrets **Premier Adenocclone** de lots différents.
- Eviter toute contamination microbienne des réactifs, sinon des résultats incorrects peuvent se produire. La contamination des échantillons peut donner de faux résultats.
- Utiliser des techniques aseptiques, un équipement et du matériel stériles pour tous les protocoles de culture cellulaire.
- Utiliser des pipettes ou des embouts de pipettes différents pour chaque échantillon, contrôle et réactif. Eviter la contamination avec des ions métalliques.
- NE PAS REUTILISER LES MICROPUIITS.

#### DANGER ET MISES EN GARDE

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

#### DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

Conserver les réactifs du coffret à 2-8 C. Ramener les réactifs du coffret à température ambiante (20-30 C) avant utilisation et les replacer immédiatement au réfrigérateur ensuite. Laisser revenir les micropuits à température ambiante dans leur sachet. Replacer les micropuits non utilisés dans leur emballage d'aluminium d'origine. Les micropuits restent stables durant toute la période de validité de ce coffret une fois ouvert.

#### CAUSES D'INSTABILITE OU DE DETERIORATION

Les conditions décrites ci-dessous peuvent être les indices d'une détérioration des réactifs:

- Toute contamination microbienne visible ou une forte précipitation.
- Toute couleur bleue dans les Solutions Substrats avant l'addition dans les micropuits.
- Une valeur d'absorbance à 450 nm supérieure à 0,150 pour le contrôle Négatif peut indiquer une détérioration des réactifs.
- Une valeur d'absorbance de moins de 0,3 pour le contrôle Positif peut être le signe d'une détérioration des réactifs.

Si l'une des conditions mentionnées ci-dessus est observée contacter le Centre de Support Technique.

#### PREPARATION DES REACTIFS

- Ramener tous les réactifs à température ambiante (20-30 C) avant utilisation.
- Replacer immédiatement tous les réactifs à 2-8 C après utilisation.
- Eviter que les micropuits sèchent entre les étapes.
- Préparer la vaisselle de décontamination pour l'élimination des réactifs et du matériel.
- La reproductibilité des tests ELISA est largement dépendante de la régularité avec laquelle les micropuits sont lavés. Suivre très attentivement les recommandations concernant la séquence de lavage comme résumé dans la procédure du test ELISA.

#### PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

L'étape de prélèvement des échantillons est une étape critique dans l'isolement de l'adénovirus en culture cellulaire et doit être effectuée uniquement par du personnel qualifié. Le temps optimum pour le prélèvement des échantillons est le plus tôt possible après le début des symptômes. L'adénovirus est généralement isolé à partir d'échantillons pulmonaire, ophtalmique ou rectal, mais a été retrouvé pratiquement dans tous les organes chez l'homme<sup>16</sup>. Le site de l'infection doit être prélevé minutieusement à l'aide d'un écouvillon pour recueillir les cellules épithéliales. Placer directement l'écouvillon dans environ 3 mL de milieu de transport viral et remuer vigoureusement<sup>16</sup>. L'échantillon conservé dans de la glace doit être envoyé le plus rapidement possible au laboratoire (selon le Code de Régulation Fédérale, 42 CFR). Des prélèvements nasopharyngés par aspiration, des sécrétions ou des échantillons de lavage peuvent être également recueillis. Il est généralement plus efficace et pratique de collecter 2 à 5 mL de sécrétions nasopharyngées par aspiration, en utilisant un petit tube inséré dans le nez du patient et connecté à un flacon de récupération d'échantillon. Ce système est commercialisé comme «piège à mucus». Dans le cas où les sécrétions nasales par aspiration seraient insuffisantes, un lavage nasal à l'aide de 1 à 2 mL de solution saline stérile peut être effectué et utilisé. Un volume minimum de 0,2 mL de sécrétion doit être récupéré.

Les prélèvements rectaux ou les échantillons de selles prélevés pour la mise en culture doivent être placés dans 1 mL de milieu de transport viral. Il faut s'assurer lors de l'utilisation des prélèvements rectaux par écouvillon que l'on obtienne une quantité suffisante de matière fécale (30 à 50 mg de matière brute).

Tous les échantillons doivent être maintenus à une température de 2-8 C dans la glace et ne pas être congelés à moins qu'un délai de plus de 72h soit prévu avant l'inoculation de la culture cellulaire. Dans ces conditions, congeler rapidement l'échantillon dans de la carboxylate et de l'acétone ou un alcool et conserver l'échantillon à -20 C ou moins jusqu'à un mois. Eviter les congélations lentes (en plaçant l'échantillon dans le freezer à -20 C) car cela détruit le pouvoir infectieux des adénovirus d'échantillons cliniques. Ne pas conserver les échantillons dans un freezer à dégivrage automatique. Eviter les congélations et décongélations répétées.

Pour les essais directs d'échantillons de selles : Les échantillons de selles ou rectaux (sur écouvillons) doivent être collectés dans des conteneurs ne contenant ni milieu, ni conservateur, ni sérum animal, ni ions métalliques, ni agents oxydants ou détergents dans la mesure où tous ces additifs peuvent interférer avec le test **Premier Adenocclone**. Il faut s'assurer lors de l'utilisation des prélèvements rectaux par écouvillon que l'on obtienne une quantité suffisante de matière fécale (30 à 50 mg). Les échantillons dilués peuvent être conservés à 2-8 C pendant 3 jours sans risque d'interférence avec les performances du test. Si des temps de conservation plus longs sont à envisager, placer les échantillons de selles non dilués à -20 C ou moins. Ne pas conserver dans un freezer à dégivrage automatique. Eviter les congélations et décongélations répétées.

#### PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'ISOLEMENT

Les cultures de cellules sensibles à la croissance des adénovirus sont des lignées cellulaires continues d'origine épithéliale telles que HeLa, HEK, Hep-2, KB et Graham 293<sup>2,3</sup>. Seules les cellules Graham 293 doivent être utilisées pour l'isolement des adénovirus types 40 et 41<sup>5</sup>. Différentes lignées cellulaires tout comme différents repiquages de la même lignée cellulaire peuvent entraîner de grandes variations de la sensibilité virale. Chaque laboratoire doit établir son propre contrôle de qualité pour s'assurer que les cultures cellulaires sont acceptables pour l'isolement en routine par culture.

Les écouvillons arrivant dans un milieu de transport viral doivent être agités vigoureusement et l'élimination de l'excès de liquide se fait en pressant fermement l'écouvillon contre les parois du tube. Inoculer aux cultures cellulaires sensibles<sup>16</sup>. Ne pas accepter d'écouvillons ayant séchés pour l'isolement viral.

Tous les prélèvements par aspirations, les sécrétions et les liquides de lavage doivent être mélangés vigoureusement à l'aide d'une pipette pour obtenir une suspension homogène. La suspension devra alors être traitée par un antibiotique et inoculée à la culture cellulaire sensible<sup>16,26,27</sup>.

Les échantillons de selles peuvent être utilisés soit directement (voir procédure du test) soit préparés pour l'isolement en culture. Dans ce cas, écraser quelques grammes de matériel fécal à l'aide d'un mortier, d'un pilon, de sable stérile ou tout autre abrasif. Ajouter un volume de diluant (soit le milieu de culture) contenant l'antibiotique de telle manière à obtenir une suspension à 10%. Clarifier par centrifugation et inoculer aux cellules Graham 293<sup>16</sup>.

L'idéal serait que les échantillons en culture soient contrôlés tous les jours afin de suivre le développement de l'effet cytopathogène (ECP) caractéristique des adénovirus. Les cellules en mono couche infectées par un adénovirus s'agglissent, prennent une forme rondo et deviennent réfractaires, pour finalement s'agglutiner en clusters irréguliers en forme de grappes. Ces modifications sont généralement associées à une augmentation de l'acidité du milieu de culture. Le temps nécessaire au développement de l'effet cytopathogène dépend de la souche de l'adénovirus et de sa concentration dans l'échantillon. Généralement, l'ECP se produit dans les 2 à 7 premiers jours avec les adénovirus 1,2,3,4,5,6 et 7. Les autres souches d'adénovirus, en particulier celles du sous-groupe D, peuvent demander jusqu'à 28 jours avant qu'un ECP identifiable se développe ou peuvent même demander un repiquage en aveugle de culture cellulaire<sup>16</sup>. Les cultures peuvent être utilisées lorsque l'on observe un ECP d'au moins 25%.

#### PREPARATION DES ECHANTILLONS

##### Test d'échantillons liquides de culture cellulaire

Lorsque les cultures démontrent au moins 25 à 50% d'ECP, ajouter 2 gouttes (100 µL) du surageant de culture directement dans les micropuits en utilisant la pipette de transfert d'échantillon. **NE PAS DILUER LE SURAGEANT DE CULTURE**

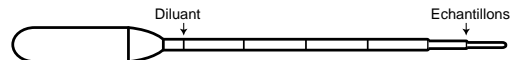
##### Test direct des échantillons de selles

Ajouter 1 mL de diluant d'échantillon dans un tube correctement annoté à l'aide de la pipette de transfert. Ajouter les échantillons comme suit:

- Selles solides - aspirer l'échantillon dans la pipette de transfert jusqu'à la première graduation.
- Selles liquides - aspirer l'échantillon dans la pipette de transfert jusqu'à la première graduation.
- Prélèvement rectal par écouvillon - remuer l'écouvillon dans 1ml de diluant d'échantillon pour libérer le matériel fécal. Presser fermement l'écouvillon contre les parois du tube pour récupérer le liquide. Bien mélanger. *Ne pas diluer davantage.*

Resuspension l'échantillon dans 1ml de diluant d'échantillon avec la pipette de transfert en l'aspirant et l'expulsant vigoureusement à plusieurs reprises jusqu'à l'obtention d'une solution adéquate pour de test

#### Pipettes de transfert pour échantillons



En utilisant la pipette de transfert, ajouter 2 gouttes du liquide non dilué du surageant de culture ou de l'échantillon de selles dilué dans les puits. Voir la section Procédure du test pour les détails.

#### PROCEDURE DE TEST

- Détacher un nombre suffisant de puits pour les échantillons et les contrôles, et les placer dans le support de barrettes de micropuits. Noter la position des échantillons.
- Ajouter 2 gouttes (100 µL) de l'échantillon fécal dilué, du liquide non dilué du surageant de culture cellulaire, du contrôle négatif (diluant de l'échantillon) ou du contrôle positif dans le fond des micropuits.
- Ajouter 2 gouttes (100 µL) de conjugué entymatique dans chaque puits. Mélanger doucement en remuant la plaque.
- Incuber à température ambiante (20-30 C) pendant 60 ± 5 minutes.
- Jeter le liquide du puits dans le récipient à déchets. Eliminer entièrement le liquide des puits en tapant vigoureusement la plaque retournée contre du papier absorbant.
- Remplir entièrement les puits avec de l'eau distillée et éliminer le liquide comme dans l'étape 5.
- Répéter 4 fois la procédure de lavage (étapes 5 et 6) pour un total de 5 lavages.
- Ajouter 2 gouttes (100 µL) de la Solution Substrat A (peroxyde d'urée) dans chaque puits.
- Ajouter 2 gouttes (100 µL) de la Solution Substrat B (TMB) dans chaque puits.
- Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
- Après lecture et enregistrement des résultats, éliminer les puits utilisés, et le papier absorbant selon le protocole d'élimination des déchets potentiellement infectieux.

#### Procédure Spectrophotométrique - (optionnelle) -

Le dosage spectrophotométrique peut être fait en ajoutant 2 gouttes (100 µL) de la Solution d'arrêt (acide sulfurique 1N) dans chacun des puits après le temps d'incubation de l'étape 10. Dans les 60 minutes, lire l'absorbance de chaque micropuits à 450 nm en utilisant un filtre de référence <math>600\text{ nm}</math> (optionnel) et en réalisant le blanc contre l'air.

#### INTERPRETATION DES RESULTATS

- Détermination visuelle. Tout échantillon développant une couleur bleue plus intense que celle du contrôle négatif est considéré comme un résultat positif. Tout échantillon avec une couleur équivalente ou moins intense que le contrôle négatif est considéré comme un résultat négatif.
- Détermination spectrophotométrique. Les échantillons avec une  $DO_{450\text{nm}}$  supérieure à 0,15 sont considérés comme des résultats positifs. Les échantillons avec une  $DO_{450\text{nm}}$  égale ou inférieure à 0,15 sont considérés comme des résultats négatifs. Parfois, une différence peut être observée entre la détermination visuelle et spectrophotométrique avec des échantillons contenant de faibles taux d'antigènes. La méthode spectrophotométrique, étant une méthode plus objective, est légèrement plus précise.

REMARQUE: Un précipité peut se former dans les échantillons hautement positifs. Cela n'affecte en aucun cas les résultats.

#### CONTROLE DE QUALITE

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

Le test **Premier Adenocclone** est fourni avec un contrôle positif et négatif (Diluant de l'échantillon), qui doivent être utilisés dans chaque série de tests. Ces contrôles sont utilisés pour s'assurer de la qualité des réactifs du coffret. Le puits du contrôle positif doit avoir une couleur bleue marquée avec une absorbance à 450 nm supérieure à 0,3. Le contrôle négatif doit rester incolore et avoir une absorbance à 450 nm inférieure à 0,15.

En plus des contrôles positif et négatif fournis, lorsque l'on réalise une identification par culture cellulaire, deux autres types de contrôles peuvent être utilisés à la discrétion du laboratoire. Ces contrôles garantissent que le système de culture cellulaire utilisé est correct:

- Le surageant de cellules non infectées du même lot que celui utilisé pour l'isolement du virus peut être testé comme un contrôle négatif.
- Le surageant de cellules infectées à partir d'un échantillon positif à un adénovirus connu (ECP de 25% ou plus) peut être utilisé comme un contrôle positif.

Le puits du surageant des cellules non infectées doit être incolore avec une absorbance à 450 nm inférieure à 0,15. Le surageant des cellules infectées par un positif connu doit être bleu. L'absorbance à 450 nm dépendra du degré d'infection, mais doit être supérieure à 0,15.

Si les contrôles positif et négatif fournis avec le coffret ne donnent pas les résultats décrits, ci-dessus, contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance. Si les contrôles positif et négatif fournis donnent des résultats corrects mais que ce ne soit pas le cas des contrôles des cultures cellulaires, il sera nécessaire de faire une évaluation de la lignée cellulaire et de la procédure.

#### VALEURS ATTENOUES

Le taux de positivité peut varier en fonction de la situation géographique, la méthode de prélèvement des échantillons, la manipulation et le transport, le système de culture utilisé ou du test employé et généralement de l'environnement sanitaire de la population des patients inclus dans l'étude.

La fréquence des infections à adénovirus variera avec le syndrome clinique et l'âge de l'individu. Chez les enfants de moins de 5 ans, 5% environ des maladies respiratoires aiguës sont dues à un adénovirus<sup>16</sup>.

Les adénovirus sont responsables approximativement de 10% des pneumonies infantiles<sup>7</sup>. Les cystites hémorragiques aiguës chez l'enfant peuvent être causées par des adénovirus dans 20 à 70% des cas<sup>8,9</sup>. Les adénovirus entériques (types 40 et 41) sont impliqués dans environ 10% des patients de pédiatrie présentant des gastro-entérites, qui apparaissent le plus fréquemment chez les enfants de moins de 2 ans<sup>10</sup>. Les caractéristiques de performance n'ont pas encore été complètement déterminées sur le test direct d'échantillon de selles néonatales. L'absence de résultat faussement positif doit être déterminée dans chaque laboratoire avant que les selles du nouveau-né soient testées directement.

Chez les adultes, les adénovirus ont parfois été impliqués dans les cervicites<sup>4</sup>, et dans les maladies respiratoires, en particulier lors du service militaire<sup>11</sup>. Les infections oculaires tels que la kératoconjonctivite épidémique et la conjonctivite Bile de « piscine », causées par des adénovirus, peuvent se produire dans tous les groupes d'âge<sup>12,13</sup> et celles de tous les groupes qui sont immunodéficientes peuvent s'infecter<sup>14,15</sup>.

#### LIMITES DU TEST

Le test **Premier Adenoclone** est un test hautement spécifique et sensible pour l'antigène de l'adénovirus. L'anticorps monoclonal dans ce test réagit avec l'antigène de l'hexon spécifique du groupe. Il détectera les 41 sérotypes connus, mais ne pourra pas être utilisé pour différencier les types entre eux.

Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection à adénovirus chez le patient. L'absence de détection de l'adénovirus peut être le résultat de facteurs tels qu'un prélèvement d'échantillon à un temps impropre de la maladie lorsque trop peu de virions sont présents, un prélèvement et une manipulation inadéquats des échantillons, un problème dans la culture cellulaire, etc.

Un résultat négatif dans le cas d'échantillons de selles n'exclut pas la présence d'une infection à adénovirus non-entérique dans d'autres liquides corporels. Si une infection pulmonaire ou oculaire est suspectée, ce sont les échantillons du site d'infection qui doivent être mis en culture.

Tous les résultats positifs doivent être interprétés avec prudence car l'adénovirus est capable de latence ou de recrudescence. Une latence asymptomatique peut se produire jusqu'à 18 mois après l'infection<sup>24</sup>. Les adénovirus entériques peuvent être trouvés dans des selles d'enfants asymptomatiques<sup>25</sup>. Les résultats du test doivent être interprétés en conjonction avec les informations disponibles des études épidémiologiques ou des observations cliniques des patients ou avec d'autres procédures de diagnostic<sup>4</sup>.

La co-infection avec des pathogènes bactériens est possible. Aussi, des tests bactériologiques doivent être réalisés en parallèle avec ce test pour exclure toute cause bactériologique. L'utilisation du test **Premier Adenoclone** pour les essais directs d'échantillons autres que les échantillons de selles n'est pas conseillée dans la mesure où une quantité insuffisante d'antigène, un prélèvement d'échantillon inadéquat ou impropre peut donner des résultats négatifs. Ce test est destiné à la confirmation de la présence de l'adénovirus en culture ou au test direct des échantillons de selles. Un résultat positif dans les fèces, associé à la présence de diarrhées, est fortement indicateur d'une gastro-entérite à adénovirus<sup>10</sup>. Les gastro-entérites virales sont le plus souvent associées aux adénovirus type 40 et 41.

Des faux positifs peuvent se produire en présence de taux élevé de *S.aureus* possédant une protéine A comme la souche Cowan. *Staphylococcus enterocolitis* est une maladie rare, généralement décrite chez les patients adultes, et extrêmement rare chez les nourrissons et les enfants<sup>25,26</sup>.

#### PERFORMANCES DU TEST

La procédure **Premier Adenoclone** a été testée dans quatre laboratoires à New York, en Californie et dans le Massachusetts pour la confirmation de la présence d'adénovirus en culture cellulaire ou dans le test direct des échantillons de selles. Les résultats du test **Premier Adenoclone** ont été comparés à l'apparition des effets cytopathogènes (ECP) dans des cultures cellulaires et par microscopie électronique (ME) pour les échantillons de selles. Le test **Premier Adenoclone** a montré une excellente corrélation avec ces deux méthodes.

Méthode de lecture	Premier Site		Deuxième Site		Troisième Site		Quatrième Site	
	S	S, V	S, V	V	S, V	S, V	S, V	S, V
	+	-	+	-	+	-	+	-
<b>Premier Adenoclone</b> <sup>®</sup>	75	0	70	0	22	0	23	0
	0	115	1	160	0	51	1	49
Sensibilité	100%		99%		100%		96%	
Spécificité	100%		100%		100%		100%	
Corrélation	100%		99%		100%		99%	

\*S: Détermination spectrophotométrique; V: Détermination visuelle

REMARQUE: La corrélation entre la détermination spectrophotométrique et visuelle est de 100%

#### LIMITES DU TEST

##### Suspension de selles

Des dilutions sérielles de quatre échantillons de selles positives à l'adénovirus, avec un taux connu de particules par mL déterminé par ME, ont été réalisées et testées selon la procédure **Premier Adenoclone** afin de montrer le seuil de détection de ce test. Les résultats montrent qu'un nombre de particule d'adénovirus aussi faible que 10<sup>7</sup> par mL peut être détecté par le test **Premier Adenoclone**.

Particules / mL	Echantillon N 1 de selles non-entériques	Echantillon N 2 de selles non-entériques	Echantillon N 3 de selles Ad 41	Echantillon N 4 de selles Ad 40
	A <sub>450</sub>	A <sub>450</sub>	A <sub>450</sub>	A <sub>450</sub>
10 <sup>8</sup>	1,78	-	-	-
10 <sup>7</sup>	,26*	>2,00	>2,00	-
10 <sup>6</sup>	,04	1,06	>2,00	>2,00
10 <sup>5</sup>	,03	,17*	1,73	>2,00
10 <sup>4</sup>	-	,04	,21*	,58*

#### CULTURE CELLULAIRE

Les résultats obtenus par le test **Premier Adenoclone** sur des dilutions sérielles de surnageant de culture d'adénovirus différents avec un ECP de +3, sont montrés dans le tableau ci-dessous. Les astérisques indiquent la sensibilité relative du test **Premier Adenoclone** pour le sérotype de l'adénovirus testé. L'anticorps monoclonal utilisé dans le **Premier Adenoclone** a été montré comme réagissant avec tous les sous-groupes humains tout comme avec les surnageants de culture qui infectent les singes, les chiens, le bétail et les porcs<sup>2</sup>.

	TYPE A			TYPE B			TYPE C			
	AD12	AD18	AD31	AD3	AD7	AD21	AD1	AD2	AD5	AD6
1:10	>3.0	>3.0	>3.0	1.78	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0
1:100	2.13	0.64*	2.09	0.49*	>3.0	2.36	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0
1:1000	0.21**	0.05	0.15*	0.09	1.56	0.24	>3.0	1.67	0.57	2.52
1:2000	0.08	0.02	0.06	0.05	0.71*	0.08	1.66	0.70	0.23*	1.26
1:4000	0.04	0.01	0.03	0.04	0.15	0.04	0.65	0.19*	0.12	0.60
1:8000	0.02	0.02	0.02	0.03	0.07	0.02	0.22*	0.11	0.06	0.35
1:16000	0.02	0.02	0.02	0.02	0.07	0.02	0.11	0.07	0.03	0.19*

	TYPE D			TYPE E			ENTÉRIQUES	
	AD9	AD22	AD37	AD39	AD4	AD40	AD41	
1:10	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	
1:100	2.75	2.44	2.62	2.28	>3.0	2.40	>3.0	
1:1000	0.24*	0.22*	0.25*	0.15*	1.60	0.26*	0.73	
1:2000	0.11	0.09	0.09	0.07	0.94	0.15	0.27*	
1:4000	0.05	0.04	0.06	0.03	0.46	0.08	0.12	
1:8000	0.05	0.03	0.02	0.02	0.25	0.06	0.06	
1:16000	0.02	0.02	0.02	0.02	0.15*	0.05	0.04	*Seuil de détection

#### REPRODUCTIBILITE DU TEST

##### Infra Essai

Chaque échantillon\* a été testé 21 fois au cours d'un seul et même essai, et la moyenne et le coefficient de variation ont été déterminés.

	Selle Négative	Selle 1	Selle 2	Selle 2
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.012	0.232	0.744	1.713
CV	56%	10%	14%	8%

	Culture Négative	Culture 1	Culture 2	Culture 3
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.017	0.181	0.418	1.318
CV	35%	6%	7%	7%

\*Un échantillon positif a été dilué dans une suspension de selles à 5% et dans le surnageant de culture cellulaire pour représenter un échantillon faible (proche de la valeur seuil), moyen et élevé.

##### Inter Essais

Chaque échantillon a été testé individuellement dans 21 essais différents réalisés par trois techniciens, et la moyenne et le coefficient de variation ont été déterminés.

	Selle Négative	Selle 1	Selle 2	Selle 2
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.012	0.129	0.474	0.990
CV	48%	9%	12%	10%

	Culture Négative	Culture 1	Culture 2	Culture 3
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.017	0.198	0.508	1.547
CV	59%	10%	10%	9%

\*Un échantillon positif a été dilué dans une suspension de selles à 5% et dans le surnageant de culture cellulaire pour représenter un échantillon faible (proche de la valeur seuil), moyen et élevé.

#### TEST DE REACTIVITE CROISEE

Les micro-organismes et les virus suivants ont été testés à l'aide du test **Premier Adenoclone** et n'ont montré aucune réactivité croisée dans ce test. Tous les tests de réactivité croisée ont été réalisés avec des cultures stocks contenant un nombre estimé d'organismes infectieux de 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> par ml excepté dans les cas suivants : Calicivirus, SRV, Rotavirus, virus Norwalk et Astrovirus testés comme des selles positives par ME; *Costridium difficile* a été testé comme positif à la toxine. Les selles et urines ont été testés et trouvées négatives.

##### Microorganismes

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> * (Cowan)	<i>Mycoplasma arginini</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma hyorhithis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Mycoplasma orale</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	

##### Virus

Coxsackievirus A-9	Rhinovirus 3	Echovirus 6
Coxsackievirus B-3	Rhinovirus 17	Echovirus 7
Coxsackievirus B-4	Rhinovirus 43	Echovirus 9
Coxsackievirus B-5	Varicella zoster	Echovirus 11
Poliovirus I	Chlamydia trachomatis	Echovirus 17
Poliovirus II	Simian foamyvirus 2	Echovirus 18
Poliovirus III	Simian foamyvirus 8	Echovirus 22
Human Coronavirus	Measles	Herpes simplex 1
Reovirus 1	Respiratory Syncytial virus	Herpes simplex 2
Reovirus 2	Cytomegalovirus	Small round virus (SRV)
Reovirus 3	Influenza A	Rotavirus
Parainfluenza-1	Influenza B	Norwalk virus
Parainfluenza-2	Calicivirus	Astrovirus
Parainfluenza-3	Papovavirus SV-40	Myxovirus-Paramyxovirus SV-5

\*Des résultats faussement positifs peuvent se produire avec des taux élevés de *S. aureus* possédant une protéine A comme la souche Cowan. *Staphylococcus enterocolitis* est une maladie rare, généralement décrite chez les patients adultes, et extrêmement rare chez les nourrissons et les enfants<sup>25,26</sup>.

## ESPAÑOL

# PREMIER<sup>®</sup> ADENOCLONE<sup>®</sup>

Inmunoensayo enzimático para la detección directa del antígeno de Adenovirus en muestras de materia fecal humana y para la confirmación de Adenovirus en Cultivo Celular

REF 696007

IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

#### USO INDICADO

La prueba **Premier Adenoclone** es un inmunoensayo enzimático (EIA) para la detección cualitativa de adenovirus humanos directamente de muestras de materia fecal humana y para la confirmación de la presencia de adenovirus en aislados de cultivo celular procedentes de muestras respiratorias, oftálmicas o entéricas.

#### RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Se conocen 41 tipos de Adenovirus humanos clasificados principalmente por serología y por tipaje electrofórico de ADN. Son virus sin envoltura y con simetría icosaédrica de 252 capsómeros que contienen ADN. El virión contiene una cantidad de proteínas asociadas con la especificidad del género y del tipo. Las asociadas con la especificidad del género (grupo) son la porción alfa de la hexona, la base de la pentona, la porción delta de la fibra y el polipéptido ulla. En la prueba **Premier Adenoclone**, el anticuerpo monoclonal es dirigido contra el antígeno hexona reactiva de grupo compartido por los adenovirus humanos, de simios, caninos, porcinos, murinos y bovinos. Este anticuerpo monoclonal ha mostrado su reacción, a través de la prueba EIA, con cada uno de los 41 tipos de adenovirus humanos<sup>1</sup>.

Los adenovirus pueden causar varias enfermedades clínicas en los humanos, entre ellas respiratorias (faringitis febril aguda, fiebre faringo-conjuntival, enfermedad respiratoria aguda, neumonía), oculares (queratoconjuntivitis epidémica, conjuntivitis "de piscina" transmitidas por el agua) y gastroenteritis<sup>2-4</sup>.

La identificación de adenovirus es generalmente llevada a cabo a través de cultivo tisular seguido por la aparición de un efecto citopático característico (CPE). Las líneas celulares susceptibles a los adenovirus son líneas celulares continuas de origen epitelial tales como HeLa, HEK, HEP-2, KB y Graham 293<sup>2, 3</sup>. Generalmente el CPE acontece en 2 a 7 días con los adenovirus tipo 1 a 7. No obstante, otras cepas, especialmente del subgrupo D, pueden requerir hasta 28 días para que el CPE reconozca su desarrollo<sup>16</sup>. La confirmación de un aislado de adenovirus en cultivo celular después del CPE incluye el ensayo inmunofluorescente, el radioinmunoensayo, la hibridación ADN, el enzimoimmunoensayo y el tipaje electroforético del ADN<sup>17,21</sup>. La prueba **Premier Adenoclone** ofrece un método simple, rápido y preciso para confirmar la presencia de adenovirus en los aislados de cultivo celular.

El segundo virus más comúnmente encontrado en muestras fecales o hisopos rectales de pacientes con diarrea es el adenovirus<sup>22</sup>. Los adenovirus tipos 40 y 41 fueron descubiertos mediante el uso de microscopía electrónica (EM) examinando extractos de materia fecal, y se asocian muy a menudo con gastroenteritis<sup>22</sup>. Estos tipos de adenovirus se pueden aislar a través de células Graham 293<sup>3</sup>. La prueba **Premier Adenoclone** puede ser utilizado para analizar directamente las muestras fecales y de este modo se reduce el tiempo requerido por el método tradicional de aislamiento en cultivo celular.

#### PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

La prueba **Premier Adenoclone** utiliza anticuerpos monoclonales en un ensayo tipo sándwich de fase sólida. Los micropocillos en tiras desprendibles están recubiertos de anticuerpo monoclonal anti-adenovirus. Se añade una alícuota de suspensión fecal o fluido de cultivo celular sin diluir al micropocilo y se incuban simultáneamente con un anticuerpo monoclonal anti-adenovirus conjugado a su vez con peroxidasa de rábano. Como resultado tendremos al antígeno adenovirus formando un sándwich entre la fase sólida y el conjugado de enzima. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, la muestra del pocilo se lava con agua destilada o desionizada para retirar el espécimen no unido y el exceso de los anticuerpos marcados con enzima. Enseguida se añaden a los pocillos el sustrato enzimático (peróxido de urea) y el cromógeno (tetrametilbenzidina) y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. El complejo enzima-conjugado unido en los micropocillos hace que el sustrato cambie de incoloro a azul.

#### REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

- Micropocillos** : recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-adenovirus específico de grams.
- Diluyente de muestra / control negativo**: Solución salina tamponada con fosfato y con 0,02% de timerosal como conservante.
- Conjugado enzimático**: peroxidasa de rábano conjugada a anticuerpo monoclonal murino anti-adenovirus, en una solución proteica tamponada, con gentamicina y 0,02% de timerosal como conservantes.
- Control Positivo** : adenovirus inactivado (AD41) en solución tampón con 0,02% de timerosal como conservante.
- Sustrato Parte A** : la solución tampón sustrato contiene peróxido de urea.
- Sustrato parte B** : la solución tampón sustrato contiene tetrametilbenzidina.
- Solución de parada (STOP)** : contiene ácido sulfúrico 1N. **Precaución**: evite el contacto con la piel. En caso de contacto, lava con agua abundante.
- Soporte para tiras de micropocillos**
- Pipetas de transferencia de muestras**

#### MATERIALES NO PROPORCIONADOS

- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
- Agua desionizada o destilada.
- Papal absorbente.
- Micropipetas de precisión y puntas de micropipeta para dispensar 100 µL y 1000 µL (opcional).
- Recipiente para desechos con blanqueador de uso doméstico diluido 1:10. Para esterilizar en el autoclave, utilizar un desinfectante yodóforo.
- Lector de placa de micropocillos capaz de leer absorbancias a 450 nm (opcional).
- Dispositivo para dispensar la solución de lavado como una pipeta multicanal, jeringa múltiple, botella de lavado, etc.
- Cronómetro (mínimo 1 hora).
- Hisopos estériles y medio de transporte viral (de manera común una solución salina equilibrada y que contenga proteína estabilizante viral y antibióticos). El medio no debe ser inhibitorio para los adenovirus ni para las líneas celulares<sup>16</sup>.
- Cultivos celulares susceptibles a adenovirus y un microscopio de luz para examinar los cultivos. Los cultivos celulares susceptibles al crecimiento de adenovirus son líneas celulares continuas de origen epitelial como HeLa, HEK, HEP-2, KB y Graham 293<sup>2, 3</sup>. Se deberían utilizar solamente las células Graham 293 para el aislamiento de los adenovirus tipos 40 y 41<sup>3</sup>.
- Cultivos control positivo de adenovirus, por ejemplo ATCC#VR-2, Adenovirus tipo 2.

#### PRECAUCIONES

- Todo los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
- No pipetee las muestras o los reactivos con la boca. Evite el contacto con la piel lastimada o las membranas mucosas.
- No fumar, comer o beber en áreas donde se manipulan muestras o reactivos del equipo.
- Use guantes desechables para manejarlas muestras: lávese las manos después de completar el ensayo. Las muestras de pacientes, los controles del ensayo y todos los materiales que entran en contacto con ellos deben manipularse siguiendo las pautas de Bioseguridad nivel 2, como lo recomienda el manual del CDC/ NIH (Center for Disease Control/National Institutes of Health) "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Bioseguridad en los Laboratorios de Microbiología y Biomédica).
- PRECAUCIÓN**: Debido a la afinidad de los adenovirus para el área ocular, el contacto de la mano con los ojos debe ser cuidadosamente evitado durante el proceso de las muestras o mientras se realizan las pruebas diagnósticas<sup>16</sup>.
- Evite que la solución de parada (ácido sulfúrico 1N) entre en contacto con la piel. Puede causar irritación y quemaduras. En caso de contacto, lave con agua abundante.
- Desheche todos los materiales utilizados para realizar la prueba después de esterilizarlos en un autoclave a 121 C, durante una hora como mínimo. Los desechos líquidos pueden eliminarse mezclándolos con blanqueador de uso doméstico diluido 1:10 durante un mínimo de 30 minutos. **PRECAUCIÓN**: Los desechos líquidos que contienen solución de parada deben neutralizarse antes de ser añadidos al blanqueador de uso doméstico.
- Evite salpicar o formar aerosoles.
- No use los reactivos de la prueba **Premier Adenoclone** después de la fecha de caducidad del equipo. Cada reactivo ha sido optimizado para proporcionar el máximo rendimiento. La dilución o adulteración de estos reactivos puede conllevar una pérdida de la sensibilidad. Los tiempos y las temperaturas de incubación distintos a los especificados pueden producir resultados erróneos.
- No intercambie o mezcle lotes distintos de reactivos de la prueba **Premier Adenoclone**.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos, la cual puede producir resultados incorrectos. La contaminación de las muestras puede producir resultados erróneos.
- Utilice un sistema aséptico y equipamiento y materiales estériles para todos los procedimientos de cultivo tisular.
- Use pipetas o puntas de pipetas distintas para cada muestra, control y reactivo.
- NO REUTILICE LOS MICROPOCILLOS.

#### DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

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

#### VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

Almacene los reactivos del equipo entre 2-8 C. Antes de utilizarlos, permita que los reactivos del equipo alcancen la temperatura ambiente (20-30 C), y refrigérelos de nuevo entre 2-8 C inmediatamente después de usarlos. Mantenga los micropocillos en la bolsa hasta que ésta alcance la temperatura ambiente. Vuelva a colocar todos los micropocillos no utilizados no su bolsa original. Una vez abierto el equipo, los micropocillos son estables hasta la fecha de caducidad indicada.

#### SIGNOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO

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

- Cualquier evidencia de contaminación microbiana o demasiada precipitación.

- Cualquier indicio de coloración azul en las soluciones de sustrato: antes de añadirles a los micropocillos.
- Un valor de control negativo mayor de 0,150 unidades de absorbancia a 450 nm puede indicar que los reactivos se han deteriorado.
- Un valor de control positivo menor de 0,3 unidades de absorbancia puede indicar que los reactivos se han deteriorado.

Si se observan cualquiera de las condiciones arriba mencionadas, comuníquese con nuestro Departamento de Asistencia Técnica en 1-800-343-3858.

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Antes de utilizarlos, deje que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-30 C).
- Coloque de nuevo todos los reactivos entre 2-8 C inmediatamente después de utilizarlos.
- No permita que los micropocillos se sequen entre un paso y otro.
- Prepare un recipiente de descontaminación para desechar los reactivos y los materiales.
- La obtención de resultados reproducibles en cualquier ensayo EIA depende en gran parte de la uniformidad en el lavado de los micropocillos. Siga la secuencia de lavado cuidadosamente tal como se indica en el procedimiento del ensayo EIA.

#### RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

La recolección de una muestra apropiada es un paso crítico para el aislamiento de adenovirus en cultivo celular por lo que ésta debe ser solamente realizada por personal con experiencia. El momento óptimo para la recolección de la muestra es lo antes posible una vez aparecen los síntomas. Los adenovirus son muy comúnmente aislados en muestras respiratorias, oftálmicas y rectales pero también han sido recuperados en virtualmente todos los sistemas orgánicos del hombre<sup>16</sup>. Para recoger células epiteliales, debe pasarse el hisopo a fondo y cuidadosamente por el lugar de la infección. Después, colocar el hisopo directamente en aproximadamente 3 mL de medio de transporte viral y hacerlo rotar vigorosamente<sup>16</sup>. La muestra debe colocarse en hielo y enviarse rápidamente al laboratorio de acuerdo con estipulado por el Código de Regulación Federal número 42 (CFR)<sup>72</sup>.

De otro modo, se pueden recoger aspirados, secreciones o lavados nasofaríngeos<sup>16</sup>. Es generalmente más efectivo y conveniente recoger de 2 a 5 mL de secreciones nasofaríngeas por aspiración, utilizando un tubo pequeño conectado a una botella para recogida de muestra y con el tubo insertado en la nariz del paciente. Este sistema está disponible comercialmente y se llama sifón mucoso. En los casos en que las secreciones nasales sean insuficientes, se pueden emplear lavados nasales con 1-2 mL de solución salina estéril a través de los nasales. Se debe recoger un mínimo de 0,2 mL de secreción.

Los hisopos rectales o muestras fecales recogidos para cultivo deben ser colocados en 1 mL de medio de transporte viral. Debe tenerse cuidado cuando se utilicen hisopos rectales ya que se debe asegurar la obtención de suficiente muestra fecal (de 30 a 50 mg de materia fecal pura).

Todas las muestras deben ser mantenidas entre 2-8 C, en hielo, y no congelarse a menos que no puedan ser inoculadas en el cultivo celular antes de 72 horas. En estos casos, congelar rápidamente la muestra en un bano de hielo seco y acetona o alcohol y almacenar a -20 C o menos hasta un mes como máximo. Evite la congelación lenta (como los congeladores a -20 C) ya que esto puede destruir la infectividad de los adenovirus en las muestras clínicas. No almacene las muestras en un congelador con descongelación automática. Evite la congelación y descongelación repetida de las muestras.

Para el análisis directo de muestras fecales: las muestras de materia fecal o los hisopos rectales deben recolectarse en recipientes que no contengan medio, agentes conservantes, suero animal, iones metálicos, agentes oxidantes o detergente, ya que cualquiera de estos aditivos puede interferir con la prueba **Premier Adenoclone**. Se debe tener cuidado al usar hisopos rectales para asegurar la obtención de suficiente cantidad de materia fecal (30 a 50 mg). Las muestras diluidas pueden guardarse entre 2-8 C durante 3 días sin que esto interfiera con el rendimiento del ensayo. Para el almacenamiento de larga duración de las muestras sin diluir, se recomienda almacenar a una temperatura de -20 C o inferior. Evite la congelación y descongelación repetida de las muestras. No las almacene en congeladores con descongelación automática.

#### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO

Los cultivos celulares susceptibles al crecimiento de adenovirus son líneas celulares continuas de origen epitelial como HeLa, HEK, HEP-2, KB y Graham 293<sup>2, 3</sup>. Se deberían utilizar solamente las células Graham 293 para el aislamiento de los adenovirus tipos 40 y 41<sup>3</sup>. Diferentes líneas celulares así como diferentes secciones de la mismas líneas celulares, pueden variar ampliamente en cuanto a la sensibilidad viral. Cada laboratorio debería establecer sus propios procedimientos de Control de Calidad para asegurar la aceptación de células de cultivo tisular para aislamiento en cultivo tisular rutinario.

Los hisopos provenientes de medio de transporte viral deben rotarse vigorosamente, y a su vez, se debe sacar el exceso de fluido de los mismos presionándolos firmemente contra los lados del tubo. El fluido se inocula en cultivos celulares susceptibles<sup>16</sup>. No aceptar hisopos secos para el aislamiento viral.

Todos los aspirados, secreciones y lavados deben ser vigorosamente pipeteados para obtener así una suspensión homogénea. La suspensión debe después ser tratada con antibióticos e inoculada al cultivo celular susceptible<sup>16, 26, 27</sup>.

Las muestras fecales pueden procesarse directamente (ver procedimiento del ensayo) o pueden ser preparadas para el aislamiento en cultivo celular. Para éste último, pulverizar unos pocos gramos de materia fecal con un mortero, arena estéril u otro abrasivo. Añadir ese volumen de diluyente (por ejemplo medio de cultivo) a antibióticos de manera que resulte una suspensión del 10%. Aclarar por centrifugación e inocularla a las células Graham 293<sup>16</sup>.

De manera ideal, los cultivos celulares de las muestras deben ser monitoreados diariamente para el desarrollo de los efectos citopáticos característicos (CPE) de los adenovirus. Las células de una monocapa infectada por adenovirus se ensanchan, redondean y son refráctiles. Finalmente se agregan formando grupos como racimos de uvas. Estos cambios están generalmente asociados con un incremento de la acidez del medio de cultivo. El tiempo requerido para el desarrollo del CPE depende de la cepa de adenovirus y de la concentración de virus infecciosos de la muestra. Generalmente el CPE se da entre 2 y 7 días en los tipos de adenovirus 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. Otras cepas de adenovirus, especialmente las del subgrupo D, pueden requerir hasta 28 días para el desarrollo de un CPE reconocible o incluso pueden requerir un pase a cultivo celular ciego<sup>16</sup>. Se considera que los cultivos están listos para la confirmación cuando por lo menos el 25% del CPE es evidente.

#### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

##### Ensayo con el Fluido de la muestra de cultivo tisular

Cuando los cultivos tisulares exhiban al menos del 25% al 50% del CPE, añada 2 gotas (100 µL) de fluido del cultivo tisular directamente dentro de los micropocillos utilizando una pipeta de transferencia de muestra. **NO DILUYA EL FLUIDO DEL CULTIVO TISULAR.**

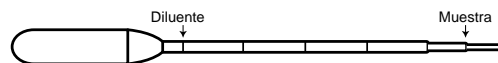
##### Ensayo con muestra fecal directa

Añada 1 mL de diluyente de muestra a un tubo apropiadamente rotulado, utilizando una pipeta de transferencia o de precisión. Dispense las muestras de través de uno de los métodos siguientes:

- Materia fecal sólida: empuje la muestra hacia la pipeta de transferencia hasta la primer marca (ver figura).
- Materia fecal líquida: aspire la muestra con la pipeta de transferencia hasta la primer marca (ver figura).
- Hisopo rectal: inmersa el hisopo en un (1) mL de diluyente de muestra y mezcle con un movimiento circular para que la materia fecal se desprenda. Presione el hisopo firmemente contra la pared del tubo para extraer el líquido. Mezcle bien. *No diluya más esta muestra.*

Resuspenda la muestra en 1 mL de diluyente de muestra con una pipeta de transferencia, aspirando y dispensando la solución vigorosamente hasta que se obtenga la solución homogénea de trabajo.

#### Pipetas de transferencia de muestras



Use la pipeta de transferencia de muestra para añadir dos gotas (100 µL) de cultivo tisular sin diluir o muestra de materia fecal diluida a los pocillos. Vea el procedimiento de la prueba para los detalles.



## PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Desprenda el número de micropocillos requeridos para las muestras y los controles. Coloque los micropocillos en el soporte para micropocillos. Registre la posición de las muestras.
- Anada 2 gotas (100 µL) de la muestra de materia fecal diluida o del cultivo tisular sin diluir, del control negativo (diluyente de muestra) y del control positivo al fondo de los micropocillos separados.
- Anada 2 gotas (100 µL) del conjugado enzimático a cada micropocillo. Mezcle suavemente con movimientos circulares sobre la mesa.
- Incuba a temperatura ambiente (20-30 C) durante 60 ± 5 minutos.
- Vierta el líquido de los pocillos en un recipiente de desecho. Golpee el soporte de micropocillos invertido sobre papel absorbente para asegurar que todo el líquido de los pocillos sea retirado.
- Llene todos los pocillos con agua desionizada en exceso y vierta el líquido como en el Paso 5.
- Repita el procedimiento de lavado (Pasos 5 y 6) cuatro veces más hasta un total de 5 lavados.
- Anada 2 gotas (100 µL) de la solución de Substrato A (peróxido de urea) a cada micropocillo.
- Anada 2 gotas (100 µL) de solución de Substrato B (TMP) a cada micropocillo.
- Incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Después de leer y registrar los resultados, desechará los pocillos y el papel absorbente utilizados en un recipiente para materiales biológicos peligrosos. Las determinaciones visuales pueden realizarse después de la incubación de 10 minutos del paso 10, y deberán leerse dentro de los 10 minutos posteriores. Las muestras que presentan una coloración azul más fuerte que el control negativo son positivas. Las muestras que exhiban la misma intensidad de color o menor que el control negativo son negativas.

### Opcional — Procedimiento Espectrofotométrico

Las determinaciones espectrofotométricas pueden realizarse añadiendo 2 gotas (100 µL) de solución de parade (ácido sulfúrico 1N) a cada micropocillo, después de la incubación del paso 10. Leer la absorbancia de cada micropocillo a 450 nm, usando un filtro de referencia > 600 nm (opcional) contra un blanco en aire dentro de los 60 minutos posteriores.

## INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

- Determinación visual: Cualquier muestra que presente un color azul más intenso que el del control negativo es considerada positiva. Cualquier muestra que presente un color igual o menos intenso que el control negativo es considerada negativa.
- Determinación espectrofotométrica: Las muestras que den unidades de absorbancia ( $A_{450}$ ) mayores de 0,150 son consideradas positivas. Las muestras con absorbancias iguales o menores de 0,150 son consideradas negativas. En muestras que contienen bajas cantidades de antígeno, ocasionalmente puede haber una discrepancia entre un resultado de la determinación visual y la espectrofotométrica. La determinación espectrofotométrica es un método objetivo y por lo tanto más preciso.  
NOTA: En las muestras altamente positivas puede formarse un precipitado. Esto no afectará los resultados.

## CONTROL DE CALIDAD

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

La prueba **Premier Adenoclone** viene provisto con un control positivo y un control negativo (diluyente de muestra), los cuales deberán usarse cada vez que se realiza el ensayo. Estos reactivos se utilizan para asegurar que los reactivos del equipo están funcionando correctamente. El pocillo del control positivo deberá ser definitivamente azul, con una absorbancia mayor de 0,30 a 450 nm. El control negativo no debe tener color visible y una absorbancia menor de 0,150 a 450 nm.

Además de los controles positivo y negativo provistos, cuando se realice la confirmación en cultivo tisular, otros dos tipos de controles pueden ser utilizados a discreción del laboratorio. Estos controles aseguran que el sistema de cultivo tisular empleado esta funcionando adecuadamente:

- El sobrenadante celular no infectado del mismo lote que los usados para aislar el virus, se puede utilizar como control negativo.
- El sobrenadante celular infectado de una conocida muestra positiva de adenovirus (25% de CPE o superior), se puede utilizar como control positivo.

El pocillo del sobrenadante celular no infectado debe ser incoloro con una absorbancia menor de 0.150 a 450 nm. El sobrenadante celular infectado proveniente de la muestra positiva conocida debe ser azul. La absorbancia a 450 nm. dependerá del grado de la infección, pero debería ser mayor de 0.150.

Si los controles positivo y negativo suministrados dentro del equipo no funcionan adecuadamente, contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local. Si los controles positivo y negativo suministrados funcionan adecuadamente pero los controles del cultivo tisular no lo hacen, se requiere una evaluación de las líneas celulares y de los procedimientos implicados.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La prueba **Premier Adenoclone** es altamente específico y sensible para el antígeno de adenovirus. El anticuerpo monoclonal en este ensayo reacciona con el antígeno hexona específico de grupo. Detectará todos los 41 serotipos conocidos, pero no puede ser utilizado para diferenciar un tipo de otro.

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección adenovirica en el paciente. El error al no detectar adenovirus puede deberse a que la muestra fue recolectada en una etapa inapropiada de la enfermedad cuando hay pocos viriones presentes, a un muestreo o una manipulación de la muestra inapropiados, a un error en el cultivo celular, etc.

Un resultado negativo en una muestra de materia fecal puede no excluye la presencia de una infección con adenovirus no entérico en otros fluidos del cuerpo. Si se sospecha que existe una infección respiratoria u oftálmica, las muestras del lugar de la infección deberán cultivarse.

Todos los resultados positivos deben ser interpretados con cuidado, ya que los adenovirus son capaces de permanecer latentes y reocurrir. La liberación viral asintomática pueden ocurrir hasta 18 meses después de la infección<sup>24</sup>. Los adenovirus entéricos pueden encontrarse en la materia fecal de niños asintomáticos<sup>23</sup>. Los resultados del ensayo deberán interpretarse en conjunto con la información disponible de estudios epidemiológicos o evaluaciones clínicas del paciente u otros procedimientos de diagnóstico<sup>24</sup>

Puede darse la coinfección con patógenos bacterianos. Por lo tanto, los análisis bacteriológicos deberán realizarse en paralelo con este ensayo para descartar una etiología bacteriológica.

No se recomienda la utilización del equipo **Premier Adenoclone** con la finalidad de analizar directamente muestras que no sean fecales ya que una insuficiencia de antígeno o una inadecuada recogida de la muestra puede causar resultados negativos. Se sugiere utilizar esta prueba para confirmación de cultivo o para muestras fecales directas. Un resultado positivo en heces en asociación con diarrea es altamente indicativo de una gastroenteritis adenoviral<sup>10</sup>. Los adenovirus tipos 40 y 41 han sido muy a menudo asociados a las gastroenteritis virales.

Falsos positivos también pueden ocurrir si se encuentran presentes altos niveles de la proteína A de *S. aureus*, como en la cepa Cowan. La *enterocolitis estafilocócica* es una enfermedad poco común que generalmente está descrita en pacientes adultos y es extremadamente rara en infantes y niños<sup>25, 26</sup>.

## VALORES ESPERADOS

La frecuencia de resultados positivos puede variar dependiendo de la localización geográfica, el método de recogida, manipulación y transporte de la muestra, el sistema de cultivo celular utilizado o la prueba empleada y el ambiente sanitario general de la población de pacientes bajo estudio.

La frecuencia de la infección adenovirica variará con el síndrome clínico y la edad del individuo. En niños menores de 5 años, aproximadamente el 5% de los casos de la enfermedad respiratoria aguda son debidos a adenovirus<sup>5</sup>.

Aproximadamente el 10% de los casos de neumonía en la infancia pueden ser de etiología adenovirica<sup>7</sup>. La cistitis hemorrágica aguda en niños puede ser debida a adenovirus del 20 al 70% de los casos<sup>8, 9</sup>. Los adenovirus entéricos (tipos 40 y 41) han estado implicados en aproximadamente el 10% de los pacientes pediátricos con gastroenteritis, y aparecen más frecuentemente en niños menores de 2 años<sup>10</sup>.

Las características de funcionamiento aún no han sido totalmente determinadas para analizar directamente muestras de materia fecal neonatal. Cada laboratorio debería determinar la ausencia de resultados falsos positivos antes de procesar directamente muestras fecales neonatales.

En adultos, los adenovirus han sido implicados a veces en la cervicitis<sup>4</sup> y en la enfermedad respiratoria aguda, especialmente en reclutas militares<sup>11</sup>. Las infecciones oculares como la queratoconjuntivitis epidémica y la llamada "conjuntivitis de piscina" debidas a adenovirus, pueden presentarse en cualquier grupo de edad<sup>12, 13</sup> y los inmunodeprimidos de cualquier grupo pueden resultar infectados por adenovirus<sup>14</sup>.

Método de Determinación*	#I		#II		#III		#IV	
	E		E, V		V		E, V	
	Cultivo Celular		Suspensión Fecal		Cultivo Celular		Cultivo Celular	
Premier Adenoclone®	+	75	-	0	+	70	-	0
	-	0	+	115	-	1	+	160
Sensitividad		100%		99%		100%		96%
Especificidad		100%		100%		100%		100%
Correlación		100%		99%		100%		99%

\*E=determinación espectrofotométrica;V=determinación visual

NOTA: Hubo 100% de correlación entre la determinación visual y la espectrofotométrica

## LIMITES DE DETECCIÓN

### SUSPENSION FECAL

Cuatro muestras fecales de adenovirus con contenido de partículas por EM per mL, fueron diluidas en serie y probadas con **Premier Adenoclone** para demostrar el limite de detección. Los resultados demuestran que la prueba **Premier Adenoclone** detecta partículas de adenovirus hasta 10<sup>7</sup> por mL.

Partículas / mL	No.1	No.2	No.3	No.4
	Muestra fecal no entérica	Muestra fecal no entérica	Muestra fecal positiva AD 41	Muestra fecal positiva AD 40
	$A_{450}$	$A_{450}$	$A_{450}$	$A_{450}$
10 <sup>8</sup>	1,78	-	-	-
10 <sup>7</sup>	,26*	>2,00	>2,00	-
10 <sup>6</sup>	,04	1,06	>2,00	>2,00
10 <sup>5</sup>	,03	,17*	1,73	>2,00
10 <sup>4</sup>	-	,04	,21*	,58*

## CULTIVO CELULAR

La siguiente tabla muestra los resultados del análisis con diluciones seriadas de diferentes sobrenadantes de cultivos positivos para Adenovirus (efecto citopático equivalente a tres cruces (+ 3)), al ser analizadas con la prueba **Premier Adenoclone**. Los asteriscos indican la sensibilidad relativa de la prueba **Premier Adenoclone** por el serotipo de virus analizado. Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal utilizado por la prueba **Premier Adenoclone** reacciona con todos los subgrupos humanos, al igual que con aquellos aislados que infectan monos, perros, vacas y cerdos<sup>5</sup>.

	Tipo A			Tipo B			Tipo C			
	AD12	AD18	AD31	AD3	AD7	AD21	AD1	AD2	AD5	AD6
1:10	>3.0	>3.0	>3.0	1.78	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0
1:100	2.13	0.64*	2.09	0.49*	>3.0	2.36	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0
1:1000	0.21**	0.05	0.15*	0.09	1.56	0.24	>3.0	1.67	0.57	2.52
1:2000	0.08	0.02	0.06	0.05	0.71*	0.08	1.66	0.70	0.23*	1.26
1:4000	0.04	0.01	0.03	0.04	0.15	0.04	0.65	0.19*	0.12	0.60
1:8000	0.02	0.02	0.02	0.03	0.07	0.02	0.22*	0.11	0.06	0.35
1:16000	0.02	0.02	0.02	0.02	0.07	0.02	0.11	0.07	0.03	0.19*

	Tipo D				Tipo E		Entérico	
	AD9	AD22	AD37	AD39	AD4	AD40	AD41	
1:10	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	
1:100	2.75	2.44	2.62	2.28	>3.0	2.40	>3.0	
1:1000	0.24*	0.22*	0.25*	0.15*	1.60	0.26*	0.73	
1:2000	0.11	0.09	0.09	0.07	0.94	0.15	0.27*	
1:4000	0.05	0.04	0.06	0.03	0.46	0.08 -	0.12	
1:8000	0.05	0.03	0.02	0.02	0.25	0.06	0.06	
1:16000	0.02	0.02	0.02	0.02	0.15*	0.05	0.04	

\*Limites de detección

## PRECISION DEL TEST

### Variabilidad dentro de la misma prueba

Cada muestra\* fue analizada durante un mismo ensayo veintiuna veces. La media y el coeficiente de variación fueron determinados.

	Neg Materia Fecal	Materia Fecal 1	Materia Fecal 2	Materia Fecal 3
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.012	0.232	0.744	1.713
CV	56%	10%	14%	8%
	Cultivo Negativo	Cult. 1	Cult. 2	Cult. 3
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.017	0.181	0.418	1.318
CV	35%	6%	7%	7%

\*Una muestra positiva se diluyó al 5% en una suspensión de materia fecal y en fluido de cultivo tisular, con el objeto de representar muestras con resultado positivo bajo (cerca del punto de corte), positivo medio, y positivo alto.

### Variabilidad entre prueba y prueba

Cada muestra\* se corrió individualmente en veintinueve ensayos diferentes, los cuales fueron realizados por tres técnicos. Se determinaron la media y el coeficiente de variación.

	Neg Materia Fecal	Materia Fecal 1	Materia Fecal 2	Materia Fecal 3
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.026	0.129	0.474	0.990
CV	48%	9%	12%	10%
	Cultivo Negativo	Cult. 1	Cult. 2	Cult. 3
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.017	0.198	0.508	1.547
CV	59%	10%	10%	9%

\*Una muestra positiva se diluyó al 5% en una suspensión de materia fecal y en fluido de cultivo tisular, con el objeto de representar muestras con resultado positivo bajo (cerca del punto de corte), positivo medio y positivo alto.

## REACTIVIDAD CRUZADA

La siguiente lista de microorganismos y virus fue analizada con la prueba **Premier Adenoclone** y ninguno de éstos demostró reactividad cruzada con el ensayo. Todas las pruebas de reactividad cruzada utilizaron cultivos de laboratorio que se estimaba contenían entre 10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup> organismos infectantes por mililitro con las siguientes excepciones: calicivirus, virus respiratorio sincitial (RSV), rotavirus, virus Norwalk y astrovirus. Estas últimas fueron analizadas en muestras de materia fecal positiva mediante microscopía electrónica. El *Clostridium difficile* fue analizado en una muestra con resultado positivo para la toxina producida por el mismo. Muestras de materia fecal y orina también fueron analizadas y dieron resultado negativo.

## Microorganismos

*Pseudomonas aeruginosa*  
*Enterobacter aerogenes*  
*Enterobacter cloacae*  
*Klebsiella pneumoniae*  
*Serratia marcescens*  
*Escherichia coli*

*Staphylococcus aureus\** (Cowan)  
*Clostridium difficile*  
*Candida albicans*  
*Proteus mirabilis*  
*Acholeplasma laidlawii*

*Mycoplasma arginini*  
*Mycoplasma hominis*  
*Mycoplasma hyorhinis*  
*Mycoplasma orale*  
*Mycoplasma pneumoniae*

## Virus

Coxsackievirus A-9  
Coxsackievirus B-3  
Coxsackievirus B-4  
Coxsackievirus B-5  
Poliovirus I  
Poliovirus II  
Poliovirus III  
Human Coronavirus  
Reovirus 1  
Reovirus 2  
Reovirus 3  
Parainfluenza-1  
Parainfluenza-2  
Parainfluenza-3

Rhinovirus 3  
Rhinovirus 17  
Rhinovirus 43  
Varicella zoster  
Chlamydia trachomatis  
Simian foamyvirus 2  
Simian foamyvirus 8  
Measles  
Respiratory Syncytial virus  
Cytomegalovirus  
Influenza A  
Influenza B  
Calicivirus  
Papovavirus SV-40

Echovirus 6  
Echovirus 7  
Echovirus 9  
Echovirus 11  
Echovirus 17  
Echovirus 28  
Echovirus 22  
Herpes simplex 1  
Herpes simplex 2  
Small round virus (SRV)  
Rotavirus  
Norwalk virus  
Astrovirus  
Myxoviruses-Paramyxoviruses SV-5

\* Falsos positivos también pueden ocurrir si se encuentran presentes altos niveles de la proteína A de *S. aureus*, como en la cepa Cowan. La *enterocolitis estafilocócica* es una enfermedad poco común que generalmente ha sido descrita en pacientes adultos y es extremadamente rara en infantes y niños<sup>25, 26</sup>.

## DEUTSCH

# PREMIER® ADENOCLONE®

ELISA zum direkten Nachweis von Adenovirus-Antigen in humanen Stuhlproben und zur Identifizierung von Adenoviren in Zellkulturen

REF 696007

IVD In-vitro-Diagnostikum

## VERWENDUNGSZWECK

**Premier Adenoclone** ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) zum qualitativen Nachweis von humanpathogenen Adenoviren direkt aus Stuhlproben oder zur Identifizierung von Adenoviren in Proben aus dem Atmungsstrakt, den Augen oder dem Darm, die in Zellkulturen angezüchtet wurden.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTS

Es gibt 41 bekannte Typen von humanpathogenen Adenoviren, die vorrangig serologisch oder durch DNA-Elektrophorese klassifiziert sind. Die Viren sind unbehüllte, DNA-haltige Icosaeder, 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 Polypetid IIIa. Der monoklonale Antikörper in **Premier Adenoclone** ist gegen das Gruppen-reaktive Hexon-Antigen gerichtet, das all denjenigen Adenoviren gemeinsam ist, die für Menschen, Affen, Hunde, Schweine, Mäuse, Ratten oder Rinder pathogen sind. Es konnte gezeigt werden, daß dieser monoklonale Antikörper im ELISA mit allen 41 humanpathogenen Adenovirus-Typen reagiert<sup>1</sup>.

Adenoviren können eine Vielzahl von klinischen Erkrankungen beim Menschen auslösen einschließlich Erkrankungen des Atmungsstraktes (akute fibrige Pharyngitis, Pharyngokonjunktivale, akute Atemwegserkrankungen, Lungentzündung), Erkrankungen der Augen (epidemische Keratokonjunktivitis, die „swimming pool“-Konjunktivitis) und Gastroenteritiden<sup>2-4</sup>.

Die Identifizierung von Adenoviren erfolgt in Gewebekulturen im allgemeinen durch das Auftreten charakteristischer zytotoxischer Effekte (CPE). Zelllinien, die empfindlich gegen Adenoviren sind, sind kontinuierliche Zelllinien epithelialen Ursprungs wie HeLa, HEK, Hep-2, KB und Graham<sup>2, 3</sup>. CPE treten bei Adenoviren des Typs 1-7 innerhalb von 2 - 7 Tagen auf. Bei anderen Stämmen dagegen, insbesondere bei der Untergruppe D, kann es bis zu 28 Tagen dauern, bis sich erkennbare CPE zeigen<sup>10</sup>. Zur Bestätigung der Identifizierung von Adenoviren in Zellkulturen durch CPE wurden bisher Immunfluoreszenztests, Radioimmunoassays, die DNA-Hybridisierung, Enzymimmunoassays und die DNA-Elektrophorese eingesetzt<sup>17-21</sup>. **Premier Adenoclone** bietet ein einfaches, schnelles und präzises Verfahren, um das Vorkommen von Adenoviren in Zellkulturen zu bestätigen.

Die am zweithäufigsten gefundenen Viren in Stuhlproben oder rektalen Abstrichen von Patienten mit Diarrhoe<sup>22</sup> sind Adenoviren. Diese anspruchsvollen Viren des Typs 40 und 41 wurden erstmals elektronenmikroskopisch in Stuhlextrakten entdeckt und sind am häufigsten mit Gastroenteritis assoziiert<sup>23</sup>. Diese Adenovirus-Typen können in Graham 293 Zellen identifiziert werden<sup>3</sup>. **Premier Adenoclone** kann zur direkten Untersuchung von Stuhlproben eingesetzt werden, und reduziert so die Untersuchungszeit der traditionellen Identifizierung in Zellkulturen.

## BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

**Premier Adenoclone** verwendet monoklonale Antikörper und ist ein Festphasen-Sandwich-ELISA. Mitrotiter-Kavitäten zum Auseinanderbrechen sind mit einem monoklonalen anti-Adenovirus-Antikörper beschichtet. Ein Aliquot der fäkalen Suspension oder der unverdünnten Zellkultur-Flüssigkeit wird in eine Kavität gegeben und gleichzeitig mit einem monoklonalen anti-Adenovirus-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 (Harnstoffperoxid) und Chromogen (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.

## REAGENZEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

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

- Halter für Mikrotiter-Kavitäten**
- Transfer-Pipetten für Proben**

## BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

- Reagenzröhrchen (12 x 75 mm)
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Papiertücher
- Präzisions-Mikropipettenspitzen für 100 µL oder 1000 µL (wahlweise)
- Abfallbehälter mit einer 1:10 Verdünnung von Haushaltsbleichmittel; zum Autoklavieren ein Jodhaltiges Desinfektionsmittel verwenden.
- ELISA-Plattenphotometer für Extinktionsmessungen bei 450nm (wahlweise)
- Multikanal-Pipette, Mehrfach-Spritze, Waschflasche oder andere Hilfsmittel zum Einfüllen der Waschlösung
- Stoppuhr (mindestens für 1 Stunde)
- Sterile Abstrichpfeder und Virus-Transportmedium (gewöhnlich eine isotonische Kochsalzlösung mit einem Virus-stabilisierenden Protein und mit Antibiotika). Das Medium darf weder das Adenovirus noch die Zelllinien im Wachstum hemmen<sup>16</sup>.
- Gegen Adenoviren empfindliche Zellkulturen und ein Lichtmikroskop zur Untersuchung der Kulturen empfindlich. Für das Wachstum von Adenoviren sind die kontinuierlichen Zelllinien epithelialen Ursprungs wie HeLa, HEK, Hep-2, KB und Graham 293<sup>2, 3</sup>. Für die Identifizierung von Adenovirus Typ 40 und 41<sup>3</sup> sollten nur Graham 293 Zellen verwendet werden<sup>3</sup>.
- Adenovirus positive Kontroll-Kulturen, z.B. ATCC#VR-2, Adenovirus Typ 2.

## VORSICHTSMASSNAHMEN

- Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen mit den Proben oder den Test-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- 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.
- VORSICHT: Wegen der Anfälligkeit der Augenregion für Adenoviren sollte der Hand-Augen-Kontakt während der Probenvorbereitung und der Testdurchführung sorgfältig vermieden werden
- Hautkontakt mit der Stopp-Lösung (1N Schwefelsäure). Sie könnte Irritationen und Verätzungen verursachen. Falls es zu einem Kontakt kommt, mit Wasser spülen.
- 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.
- Vermeiden Sie jedes Verspritzen oder Zerstäuben.
- Premier Adenoclone** Reagenzien nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden. Jedes Reagenz ist in seiner Konzentration und Zusammensetzung optimiert worden. Verdünnung oder Verfälschung dieser Reagenzien kann zu einem Verlust der Sensitivität führen. Von den Angaben abweichende Inkubationszeiten und Temperaturen können falsche Ergebnisse zur Folge haben.
- Reagenzien von **Premier Adenoclone** mit unterschiedlichen Chargennummern sollten nicht ausgetauscht oder gemischt werden.
- Mikrobiellen Befall der Reagenzien vermeiden, er könnte die Ergebnisse verfälschen. Die Kontamination der Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Bei jeder Handhabung von Zellkulturen aseptische Vorgehensweise und sterile Geräte und Materialien verwenden.
- Für jede Probe, Kontrolle oder jedes Reagenz sollen gesonderte Pipetten oder Pipetten-Spitzen verwendet werden.
- Mikrotiter-Kavitäten 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](http://www.meridianbioscience.com) (US version) / [www.meridianbioscience.eu](http://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 (20-30°C) bringen und nach Gebrauch sofort wieder auf 2-8°C abkühlen. Mikrotiter-Platten im Beutel belassen, bis er Raumtemperatur erreicht hat. Alle unbenutzten Mikrotiter-Kavitäten in den Originalbeutel zurücklegen. Nach dem Öffnen sind die Mikrotiter-Kavitäten während der gesamten Haltbarkeitsdauer des Test-Kits stabil.

## ANZEICHEN VON QUALITÄTSMINDERUNG

Die folgenden Umstände können einen Verfall der Reagenzien anzeigen.

- Jeder offensichtliche mikrobielle Befall oder deutliche Niederschlag
  - Jede Blaufärbung in der Substratlösung, bevor sie den Kavitäten zugesetzt wird.
  - Ein Extinktionswert der Negativ-Kontrolle >0,150 bei einer Wellenlänge von 450 nm kann einen Verfall der Reagenzien anzeigen.
  - Ein Extinktionswert der Positiv-Kontrolle <0,3 kann einen Verfall der Reagenzien anzeigen.
- Wenn eine der obigen Beobachtungen gemacht wird, kontaktieren Sie Meridian Bioscience.

## VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen (20-30°C).
- Sofort nach Gebrauch alle Reagenzien wieder auf 2-8°C abkühlen.
- Zwischen den Arbeitsschritten die Kavitäten nicht austrocknen lassen.
- Ein Desinfektions-Gefäß zur Entsorgung von Reagenzien und Materialien bereitstellen.
- 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

Die richtige Probenahme ist entscheidend für die Identifizierung von Adenoviren in Zellkulturen und sollte nur von erfahrenem Personal durchgeführt werden. Der beste Zeitpunkt zur Probenahme liegt möglichst bald nach dem Auftreten der Symptome. Adenoviren werden hauptsächlich im Atmungsstrakt, im Auge und in rektalen Proben identifiziert, aber sie wurden bereits in praktisch jedem menschlichen Organ gefunden<sup>16</sup>. Der Ort der Infektion sollte gründlich abgestrichen werden, um epitheliale Zellen zu gewinnen. Den Abstrichpfeder direkt in ungefähr 3 mL Virus-Transportmedium geben und kräftig schütteln<sup>16</sup>. Die Proben sollten sofort auf Eis ins Labor geschickt werden gemäß dem 42 CFR (Code of Federal Regulation) 72.

Auch aspiriertes, sezerniertes oder ausgespültes nasopharyngeales Material kann untersucht werden<sup>16</sup>. Es ist gewöhnlich effektiver und angenehmer, 2-5 mL nasopharyngeales Sekret mit einem kleinen Schlauch, der in die Nase des Patienten eingeführt wird und mit einer Proben-Sammelflasche verbunden ist, abzusaugen. Dieses System zur Schleimgewinnung gibt es als Fertigprodukt zu kaufen. Wenn die Nasensekrete nicht ausreichen, können Spülungen der Nase mit 1-2 mL steriler Kochsalzlösung durch das Nasenloch durchgeführt werden. Ein Minimum von 0,2 mL Sekret sollte gewonnen werden. Rektale Abstriche oder Stuhlproben, die angezüchtet werden sollen, sollten in 1 ml Virus-Transportmedium (30-50 mg reiner Stuhl) abgenommen werden, daß genügend fäkales Material (3-50 mg

Alle Proben sollten bei 2-8 °C auf Eis gelagert und nicht eingefroren werden, außer, wenn eine Verzögerung von 72 Stunden bis zu dem Animpfen der Kultur abzusehen ist. In solchen Fällen sollten die Proben schnell in einem Bad mit Trockeneis und Aceton oder Alkohol eingefroren werden und bei -20 °C oder kälter bis zu einem Monat lang eingefroren werden. Vermeiden Sie ein langsames Einfrieren (z.B. indem die Proben in ein-20 °C Gefriergerät gelegt werden), da dadurch die Infektiosität der Adenoviren in klinischen Proben verloren gehen kann. Proben nicht in einem selbstabtauhenden Gefriergerät lagern. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben. Wenn die Stuhlproben direkt untersucht werden sollen: Stuhlproben oder rektale Abstriche sollten nicht in Gefäße mit Nähniedern, Konservierungsmitteln, Tierseren, Metallionen, oxidierenden Stoffen oder Detergenzien überführt werden, da diese den **Premier Adenoclone**-Test beeinträchtigen könnten. Bei rektalen Abstrichen sollte darauf geachtet werden, daß genügend fäkales Material (30 bis 50 mg) erhalten wird. Verdünnte Proben können bei 2-8 °C 3 Tage lang ohne Beeinträchtigung der Testergebnisse gelagert werden. Für die langfristige Lagerung unverdünnter Proben wird eine Temperatur von -20 °C oder kälter empfohlen. Nicht in selbstabtauhenden Gefrierschränken lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

#### VORBEREITUNG DER PROBEN ZUR KULTIVIERUNG IN ZELLKULTUREN

Gegenüber dem Wachstum von Adenoviren Empfindliche Zellkulturen sind die kontinuierlichen Zelllinien epithelialen Ursprungs wie HeLa, Hep-2, KB und Graham 293<sup>2, 3</sup>. Für die Identifizierung von Adenoviren Typ 40 und 41 sollten nur Graham 293 Zellen verwendet werden<sup>5</sup>. Verschiedene Zelllinien zeigen wie die verschiedenen Passagen derselben Zelllinie stark abweichende Virus-Sensitivitäten. Jedes Labor sollte seine eigenen Qualitätskontroll-Verfahren entwickeln, um die Eignung der Gewebekulturzellen für die routinemäßige Virus-Anzucht sicherzustellen.

Abstriche, die in Virus-Transportmedium eintreffen, sollten stark geschüttelt werden; die Abstrichtupfer sollten durch starkes Pressen an die Wand des Gefäßes ausgedrückt werden. In empfindliche Zellkulturen einimpfen<sup>16</sup>. Getrocknete Abstriche können zur Virus-Identifizierung nicht angenommen werden.

Alle aspirierten, sezernierten oder ausgespülten Proben sollten mit der Pipette kräftig vermischt werden, um eine homogene Suspension zu erhalten. Die Suspension sollte dann mit Antibiotika behandelt werden und in eine empfindliche Zellkultur eingepimpft werden<sup>14, 25, 27</sup>.

Stuhlproben können entweder direkt eingesetzt (siehe "Testdurchführung") oder zur Identifizierung in Zellkulturen vorbereitet werden. In letzterem Fall wenige Gramm des fäkalen Materials in einem Mörser mit sterilem Sand oder anderem Schleifmittel mahlen. Stellen Sie mit einem Antibiotium-haltigen Verdünnungsmittel (z.B. Kulturmedium) eine 10%ige Suspension her. Abzentrifugieren und in Graham 293 Zellen einimpfen<sup>16</sup>.

Die Entwicklung von Adenovirus-typischen zytotoxischen Effekten (CPE) in den beimpften Zellkulturen sollte idealerweise täglich kontrolliert werden. Die Zellen der mit Adenoviren infizierten Zellschicht vergrößern sich, runden sich ab, werden lichtbrechend und klumpen eventuell zu unregelmäßigen traubenförmigen Aggregaten zusammen. Diese Veränderungen sind im allgemeinen mit einer Ansäuerung des Kulturmediums verbunden. Die Zeitspanne bis zur Entwicklung von CPE hängt vom Adenovirus-Stamm und von der Konzentration des infektiösen Virus in der Probe ab. Bei den Adenoviren des Typs 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 treten CPE gewöhnlich innerhalb von 2 - 7 Tagen auf. Bei anderen Adenovirus-Stämmen, insbesondere bei denjenigen der Gruppe D, können bis zu 28 Tage und eventuell sogar eine ganze Passage ohne CPE nötig sein, bevor sich erkennbare CPE bilden<sup>15</sup>. Adenoviren sollten dann als identifiziert betrachtet werden, wenn mindestens 25% der Zellen in der Zellkultur von CPE betroffen sind.

#### VORBEREITUNG

##### Untersuchung von Proben in Gewebekultur

Wenn die Gewebekultur mindestens 25-50% CPE zeigt, mit der Transferpipette 2 Tropfen (100 µL) der Gewebekultur direkt in die Mikroiter-Kavität geben. GEWEBEKULTUREN NICHT VERDÜNNEN.

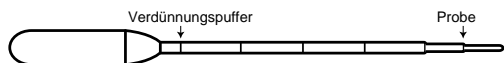
##### Direkte Untersuchung von Stuhlproben

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

1. Fester Stuhl: Probe bis zur ersten Markierung in die Transfer-Pipette drücken (siehe Abbildung unten).
2. Flüssiger Stuhl: Probe mit der Transfer-Pipette bis zur ersten Markierung hochziehen (siehe Abbildung unten).
3. 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 ausdrücken, Sorgfältig mischen. *Nicht weiter verdünnen.*

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

##### Transferpipetten für Proben



Mit der Transferpipette 2 Tropfen entweder der unverdünnten Gewebekultur oder der verdünnten Stuhlprobe in die Kavitäten geben. Einzelheiten siehe "Testdurchführung".

#### TESTDURCHFÜHRUNG

1. Eine ausreichende Zahl von Kavitäten für Proben und Kontrollen abbrechen und in den Halter für die Kavitäten einsetzen. Die Plätze 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 (20-30 °C) 60 ±5 Minuten inkubieren.
5. Die Flüssigkeit aus den Kavitäten in einen Abfallbehälter auskippen. Den Kavitäten-Halter umgedreht auf Papiertuchern kräftig ausklopfen, um sicher zu gehen, 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-Lösung in jede Kavität geben.
9. 2 Tropfen (100 µL) Chromogen-Lösung 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 der 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 (gegebenfalls mit einem Referenzfilter >600 nm) nach einem Abgleich gegen Luft innerhalb von 60 Minuten abgelesen.

#### INTERPRETATION 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  $\leq 0,150$  oder niedriger 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. Diese beeinflussen die Ergebnisse nicht.

#### QUALITÄTSKONTROLLE

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

**Premier Adenoclone** wird mit Positiv-Kontrolle und einer Negativ-Kontrolle (Proben-Verdünnungspuffer) geliefert, die bei jedem Testlauf mitlaufen 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.

Bei der Identifizierung von Adenoviren aus Zellkulturen können zusätzlich zu den Positiv- und Negativ-Kontrollen des Test-Kits zwei weitere Kontrollen zur Überprüfung des im jeweiligen Labor benutzten Gewebekultur-Systems durchgeführt werden. Diese Kontrollen stellen sicher, daß das Gewebekultur-System einwandfrei funktioniert:

- Als Negativ-Kontrolle kann der nicht infizierte Zellüberstand von derselben Charge, die zur Identifizierung des Virus eingesetzt wird, benutzt werden.
- Als Positiv-Kontrolle kann der infizierte Zellüberstand einer bekannt Adenovirus-positiven Probe (25% CPE oder mehr) benutzt werden.

Die Kavität mit dem nicht infizierten Zellüberstand sollte farblos mit einer Extinktion <0,150 bei 450 nm sein. Der infizierte Zellüberstand einer bekannt positiven Probe sollte sich blau färben. Die Extinktion bei 450 nm hängt stets vom Infektionsgrad ab und sollte jedoch >0,150 sein.

Wenn die Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrolle des Test-Kits nicht wie erwartet ausfallen, setzen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA); (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer. Wenn die Positiv- und Negativ-Kontrollen des Test-Kits zufriedenstellende Ergebnisse liefern, nicht jedoch die Gewebekultur-Kontrollen, müssen die Zelllinien und ihre Verarbeitung überprüft werden.

#### ERWARTETE WERTE

Die Rate positiver Ergebnisse kann in Abhängigkeit der geographischen Lage, der Methode zur Probenahme, -handhabung und des -transports, dem benutzten Zellkultur-System oder dem eingesetzten Test sowie der allgemeinen Gesundheitsbedingungen der untersuchten Patientenpopulation variieren.

Die Häufigkeit der Adenovirus-Infektion hängt ab von den klinischen Symptomen und dem Alter der Patienten. Bei Kindern unter 5 Jahren werden 5% der akuten Atemwegserkrankungen von Adenoviren verursacht<sup>8</sup>.

Ungefähr 10% der kindlichen Lungenentzündungen können auf Adenoviren zurückgeführt werden<sup>7</sup>. Die akute hämorrhagische Zystitis bei Kindern wird durch Adenoviren in 20 - 70% der Fälle ausgelöst<sup>8, 9</sup>. Intestinale Adenoviren (Typ 40 und 41) werden bei rund 10% der pädiatrischen Patienten mit einer Gastroenteritis gefunden und kommt am häufigsten bei Kindern unter 2 Jahren vor<sup>10</sup>. Die Testcharakteristika für die Untersuchung von Neugeborenen-Stuhlproben sind bisher noch nicht vollständig erstellt worden. In jedem einzelnen Labor sollte das Fehlen falsch positiver Ergebnisse überprüft werden, bevor Neugeborenen-Stühle direkt untersucht werden.

Bei Erwachsenen wurden Adenoviren zeitweise mit Zervizitis in Zusammenhang gebracht<sup>4</sup> sowie mit akuten Atemwegserkrankungen - insbesondere bei Rekruten<sup>11</sup>. Augeninfektionen wie die durch Adenoviren verursachte epidemische Keratokonjunktivitis und die sogenannte "swimming pool"-Konjunktivitis können in jeder Altersgruppe<sup>12, 13</sup> auftreten. Darüberhinaus können sich alle immunsupprimierten Patienten mit Adenoviren infizieren<sup>14, 15</sup>.

#### EINSCHRÄNKUNGEN

**Premier Adenoclone** ist hochspezifisch und -sensitiv für Adenovirus-Antigen, Der monoklonale Antikörper dieses Tests reagiert mit dem Gruppen-spezifischen Hexon-Antigen. Er erkennt alle 41 bekannten Serotypen, aber kann nicht zu ihrer Differenzierung eingesetzt werden.

Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Adenovirus-Infektion des Patienten nicht aus. Ein Mißlingen des Nachweises kann bedingt sein durch Faktoren wie einem ungünstigen Zeitpunkt der Probenahme (wenn zu wenig Virionen vorhanden sind) oder einer falschen Probenahme oder -handhabung oder einem Versagen der Zellkultur. Durch ein negatives Ergebnis bei Stuhlproben kann eine Infektion anderer Körperflüssigkeiten mit nicht-intestinalen Adenoviren nicht ausgeschlossen werden. Bei Verdacht auf Infektion des Atemtraktes oder der Augen sollten Proben vom Infektionsort in Kultur genommen werden.

Alle positiven Ergebnisse müssen vorsichtig interpretiert werden, da Adenoviren zur Latenz und zu Rezidiven fähig sind. Die asymptotische Ausscheidung kann bis zu 18 Monate nach der Infektion andauern<sup>24</sup>. Intestinale Adenoviren können im Stuhl von Beschwerde-freien Kindern gefunden werden<sup>25</sup>. Die Testergebnisse sollten in Zusammenhang mit den Informationen aus epidemiologischen Studien, klinischen Erhebungen und anderen diagnostischen Verfahren interpretiert werden<sup>24</sup>. Begleitinfektionen mit bakteriellen Keimen sind möglich. Daher sollten bakteriologische Tests parallel zu diesem Test durchgeführt werden, um eine bakteriologische Ätiologie auszuschließen.

Der direkte Einsatz von **Premier Adenoclone** bei anderen Probenmaterialien als Stuhlproben ist nicht zu empfehlen, da ein unpassendes Antigen oder eine falsche Probenahme negative Ergebnisse verursachen kann. Dieser Test ist für die Identifizierung aus Zellkulturen oder aus direkten Stuhlproben geeignet. Ein positives Ergebnis im Stuhl bei gleichzeitiger Diarrhoe ist ein nahezu eindeutiger Hinweis auf eine adenovirale Gastroenteritis<sup>10</sup>. Am häufigsten wurden Adenoviren des Typs 40 und 41 mit der viralen Gastroenteritis in Zusammenhang gebracht.

Falsch positive Ergebnisse könnten bei einer hohen Konzentration eines *S. aureus* mit Protein A (z.B. des Cowan Stamma) auftreten. Die *Staphylokokken-Enterokolitis* ist eine ungewöhnliche Erkrankung, die hauptsächlich bei Erwachsenen und nur extrem selten bei Säuglingen und Kindern<sup>25, 26</sup> beobachtet wurde.

#### LEISTUNGSMERKMALE

**Premier Adenoclone** wurde in vier klinischen Labors der USA (in New York, Kalifornien und Massachusetts) zur Bestätigung des Tests mit Zellkulturen und der direkten Testdurchführung mit Stuhlproben überprüft. Die Ergebnisse des **Premier Adenoclone** wurden mit der Untersuchung zytotoxischer Effekte (CPE) in Zellkulturen und der Elektronenmikroskopie in Stuhlproben verglichen. Der **Premier Adenoclone** Test schnitt im Vergleich mit beiden Testmethoden ausgezeichnet ab.

Bestimmungsmethode*	Site I		Site II		Site III		Site IV		
	S	S, V	S, V	S, V	V	S, V	S, V	S, V	
<b>Premier Adenoclone®</b>	+	75	0	+	0	22	0	23	0
Sensitivität	-	0	115	1	160	0	51	1	49
Spezifität		100%		99%		100%		96%	
Übereinstimmung		100%		99%		100%		99%	

\*S=Spektrophotometrische Auswertung; V: Visuelle Auswertung

WICHTIG: Es bestand eine 100%-ige Übereinstimmung zwischen der spektrophotometrischen und der visuellen Auswertung.

## NACHWEISGRENZEN STUHLSPENSION

Vier Adenovirus positive Stuhlproben, deren Konzentration pro mL durch EM bestimmt wurde, wurden in Verdünnungsreihen mit dem **Premier Adenoclone** getestet, um die Nachweisgrenzen festzustellen. Die Ergebnisse zeigen, daß Konzentrationen bis zu einer unteren Grenze von 10<sup>7</sup> pro mL von **Premier Adenoclone** nachgewiesen werden können.

Partikel/ mL	Nicht enterogen	Nicht enterogen	Ad 41	Ad 40
	Stuhl 1	Stuhl 2	Stuhl 3	Stuhl 4
	A <sub>450</sub>	A <sub>450</sub>	A <sub>450</sub>	A <sub>450</sub>
10 <sup>9</sup>	1.78	-	-	-
10 <sup>7</sup>	.26*	>2.00	>2.00	-
10 <sup>6</sup>	.04	1.06	>2.00	>2.00
10 <sup>5</sup>	.03	.17*	1.73	>2.00
10 <sup>4</sup>	-	.04	.21*	.58*

## ZELLKULTUREN

Die folgende Tabelle zeigt Verdünnungsreihen von verschiedenen Adenovirus Überständen aus 3+ CPE Kulturen, die mit dem **Premier Adenoclone** Adenovirus Kit getestet wurden. Sternchen zeigen die relative Sensitivität von **Premier Adenoclone** in Bezug auf den Adenovirus Serotyp, der getestet wurde. Es zeigte sich, daß der monoklonale Antikörper, der in **Premier Adenoclone** verwendet wird, mit allen humanen Subgruppierungen ebenso wie mit Isolat, die Affen, Hunde, Rinder und Schweine infizieren, reagiert.

	TYP A			TYP B			TYP C			
	AD12	AD18	AD31	AD3	AD7	AD21	AD1	AD2	AD5	AD6
1:10	>3.0	>3.0	>3.0	1.78	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0
1:100	2.13	0.64*	2.09	0.49*	>3.0	2.36	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0
1:1000	0.21**	0.05	0.15*	0.09	1.56	0.24	>3.0	1.67	0.57	2.52
1:2000	0.08	0.02	0.06	0.05	0.71*	0.08	1.66	0.70	0.23*	1.26
1:4000	0.04	0.01	0.03	0.04	0.15	0.04	0.65	0.19*	0.12	0.60
1:8000	0.02	0.02	0.02	0.03	0.07	0.02	0.22*	0.11	0.06	0.35
1:16000	0.02	0.02	0.02	0.02	0.07	0.02	0.11	0.07	0.03	0.19*

	TYP D				TYP E		ENTERISCHER TYP	
	AD9	AD22	AD37	AD39	AD4	AD40	AD41	
1:10	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	>3.0	
1:100	2.13	2.44	2.62	2.28	>3.0	2.40	>3.0	
1:1000	0.24*	0.22*	0.25*	0.15*	1.60	0.26*	0.73	
1:2000	0.11	0.09	0.09	0.07	0.94	0.15	0.27*	
1:4000	0.05	0.04	0.06	0.03	0.46	0.08	0.12	
1:8000	0.05	0.03	0.02	0.02	0.25	0.06	0.06	
1:16000	0.02	0.02	0.02	0.02	0.15*	0.05	0.04	*Nachweisgrenzen

## REPRODUZIERBARKEIT

### Innerhalb eines Testlaufs

Jede Probe\* wurde einundzwanzig Mal in einem Testlauf analysiert und der Durchschnitt und Koeffizient der Variation berechnet.

	Neg Stuhl	Stuhl 1	Stuhl 2	Stuhl 3
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.012	0.232	0.744	1.713
CV	56%	10%	14%	8%

	Neg Kultur	Kultur 1	Kultur 2	Kultur 3
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.017	0.181	0.418	1.318
CV	35%	6%	7%	7%

\*Eine positive Probe wurde in einer 5%-igen Stuhlsuspension und in Zellkulturflüssigkeit verdünnt, um eine niedrige (nahe der Bestimmungsgrenze), eine mittlere und eine hohe Probe zu ergeben.

### Zwischen den Testläufen

Jede Probe wurden einzeln in einundzwanzig verschiedenen Testläufen untersucht und der Durchschnitt und Koeffizient der Variation berechnet.

	Neg Stuhl	Stuhl 1	Stuhl 2	Stuhl 3
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.026	0.129	0.474	0.990
CV	48%	9%	12%	10%

	Neg Kultur	Kulture 1	Kulture 2	Kulture 3
N	21	21	21	21
$\bar{x}$	0.017	0.198	0.508	1.547
CV	59%	10%	10%	9%

\*Eine positive Probe wurde in einer 5%-igen Stuhlsuspension und in Zellkulturflüssigkeit verdünnt, um eine niedrige (nahe der Bestimmungsgrenze), eine mittlere und eine hohe Probe zu ergeben.

## KREUZREAKTIVITÄT

Die folgenden Mikroorganismen und Viren wurden im **Premier Adenoclone** getestet und zeigten keine Kreuzreaktionen. Alle Kreuzreaktionstests verwendeten gezüchtete Kulturen, die eine geschätzte Konzentration von 10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup> Erregern pro ml enthielten. Ausnahmen: Calcivirus, SRV, Rotavirus, Norwalkvirus und Astrovirus wurden als durch EM positive Stuhlproben getestet; *Clostridium difficile* wurde als Toxin positiv getestet. Stuhl und Urin wurde getestet und als negativ eingestuft.

### Mikroorganismen

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

### Viren

Coxsackievirus A-9	Rhinovirus 3	Echovirus 6
Coxsackievirus B-3	Rhinovirus 17	Echovirus 7
Coxsackievirus B-4	Rhinovirus 43	Echovirus 9
Coxsackievirus B-5	Varicella zoster	Echovirus 11
Poliovirus I	Chlamydia trachomatis	Echovirus 17
Poliovirus II	Simian foamyvirus 2	Echovirus 18
Poliovirus III	Simian foamyvirus 8	Echovirus 22
Human Coronavirus	Measles	Herpes simplex 1
Reovirus 1	Respiratory Syncytial virus	Herpes simplex 2
Reovirus 2	Cytomegalovirus	Small round virus (SRV)
Reovirus 3	Influenza A	Rotavirus
Parainfluenza-1	Influenza B	Norwalk virus
Parainfluenza-2	Calicivirus	Astrovirus
Parainfluenza-3	Papovavirus SV-40	Myxoviruses-Paramyxoviruses SV-5

\* Falsch positive Ergebnisse können mit hohen Werten von *S. aureus*, das Protein A enthält, wie z. B. dem Cowan Stamm, erzielt werden. Durch *Staphylokokken* ausgelöste *Enterocolitis* ist eine seltene Krankheit, die gewöhnlich bei erwachsenen Patienten auftritt und bei Säuglingen und Kindern extrem selten ist.<sup>25,26</sup>

## REFERENCES

- Cepko CL, Whetstone CA, and Sharp PA. Adenovirus hexon monoclonal antibody that is group specific and potentially useful as a diagnostic reagent. J Clin Microbiol 1983;17:360-364.
- 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. Virology, 94:259-265, 1987.
- Horwitz MS. Adenoviral Diseases. In B.N. Fields, ed. Virology, Raven Press, New York, pp. 477-495.
- Laverty CR, Russell P, Black J, Kappagoda N, Benn RAV, and Booth N. Adenovirus infection of the cervix. Acta Cytol. 21:114-117, 1977.
- Takiff HR, Straus SE, and Garon CF. Propagation and *in vitro* studies of previously non-cultivable enteric adenoviruses in 293 cells, Lancet 11:832-834, 1981.
- Brandt CD, Kim HW, Vargosdo AJ, Jeffries BC, Arrobio JO, Rindge B, Parrott RH, and Chanock RM. Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. Am J Epidemiol 1969;90: 484-500.
- Mallet R, Riberre M, Bonenfant F, Labruno B, and Reyrole L. Les pneumopathies graves a adenovirus. Arch. Fr. Pediatr. 23:1057-1073,1966.
- Mufson MA, Belshe RB, Horrigan TJ, and Zollar LM. Cause of acute hemorrhagic cystitis in children. Am J Dis Child 1973;126:605-609.
- Numazaki Y, Kumasaka T, Yano N, Yamanaka M, Miyazawa T, Takai S, and Ishida N. Further study of acute hemorrhagic cystitis due to adenovirus type 11. N Engl J Med 1973;289:344-347.
- Uhnou I, 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.
- McGagab WJ. *Mycoplasma pneumoniae* and adenovirus respiratory illnesses in military and university personnel, 1959-1966. Am. Rev. Respir. Dis. 97:345-358, 1968.
- Kemp MC, Hierholzer JC, Cabradilla CP, and Objesti JF. The changing etiology of epidemic keratoconjunctivitis: Antigenic and restriction enzyme analysis of adenovirus types 19 and 37 isolated over a 10 year period. J Infect Dis 1983;148:29-33.
- Foy HM, Cooney MK, and Hatlen JB. Adenovirus type 3 epidemic associated with intermittent chlorination of a swimming pool. Arch. Environ. Health. 17:795-802, 1968.
- De Jong PJ, Valderrama G, Spigland I, and Horwitz MS. Adenovirus isolates from the urines of patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Lancet 1:1293-1296, 1983.
- Siegel RP, Kikman SH, Arayata RB, and Bottone EJ. Fatal disseminated adenovirus 11 pneumonia in an agammaglobulinemic patient. Am J Med 1981;71:1062-1067.
- Lennette EH, Schmidt NJ. Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial infections, Fifth edition, 1979, American Public Health Associates, Inc., Washington, D.C., pp 241-242, pp 229-255.
- Darougar S, Walpita P, Thaker U, Viswalingam N, and Wishart MS. Rapid culture test for adenovirus isolation. Br J Ophthalmol 1984;68:405-408.
- Gomel SA, Nascimento JP, Siquiera MM, Krawczuk MM, Pereira HG, and Russel WC. In situ hybridization with biotinylated DNA probes: a rapid diagnostic test for adenovirus upper respiratory infections. J Virol Methods 1985;12:105-110.
- Kidd AH, Harley EH, and Erasmus MJ. Specific detection and typing of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens by dot-blot hybridization. J Clin Microbiol 1985;22:934-939.
- Lehtomaki K, Julkunen I, Sandelin K, Salonen J, Virtanen NL, Ranki M, and Hoyt T. Rapid diagnosis of respiratory infections in young adult men. J Clin Microbiol 1986;24:108-111.
- Shuster V, Matz B, Wiegand H, Traub B, and Neumann-Haefelin D. Detection of herpes simplex virus and adenovirus DNA by dot-blot hybridization using *in vitro* synthesized RNA transcripts. J Viral Methods 1986;13:291-299.
- Lennette EH, Schmidt NJ. Diagnostic procedures for viral rickettsial and chlamydial infections, Fifth edition, 1979, American Public Health Associates, Inc., Washington, D.C., pp 942-943.
- Cukor G, and Blacklow NR. Human viral gastroenteritis. Microbiological Reviews. 48:157-179,1984.
- Greenburg SS, and Krilov L. Laboratory diagnosis of viral respiratory disease. Cumitech No. 21, ASM Drew, W.L., Rubin, S.J. editors, March 1986.
- 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 1:945-950. 1954.
- Lennette EH, Schmidt NJ. Diagnostic procedures for viral rickettsial and chlamydial infections, Fifth edition, 1979, American Public Health Associates, Inc., Washington, D.C., p. 81.



SN11246










REV. 01/15

	<b>Meridian Bioscience, Inc.</b> 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
	<b>Meridian Bioscience Europe s.a./n.v.</b> 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
	<b>Meridian Bioscience Europe France</b> 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
	<b>Meridian Bioscience Europe b.v.</b> 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 símbolos, Erläuterung der graphischen symbole)**

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	<b>CONTROL +</b>	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
<b>LOT</b>	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	<b>CONTROL -</b>	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo médico-diagnóstico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	<b>EC REP</b>	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
<b>CE</b>	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.	<b>SMP   PREP   DIL   SPE</b>	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
<b>REF</b>	Catalogue number / Numero di 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	<b>BUF   RXN</b>	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	<b>SOLN   STOP</b>	Stopping Solution / Solutione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	<b>CONJ   ENZ</b>	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugé enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
<b>SN</b>	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	<b>CONTROL</b>	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
<b>TEST</b>	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	<b>REAG</b>	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	<b>BUF   WASH</b>	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
<b>BUF</b>	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
<b>CONJ</b>	Conjugate / Coniugato / Conjugé / Conjugado / Konjugat	<b>DIL   SPE</b>	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillon / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	<b>BUF   WASH   20X</b>	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
		<b>DET   REAG</b>	Detection Reagent / Reagente Diretta / 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.