

# IMAGEN hMPV EL

**REF** **K612511-2**

Εξέταση άμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του ανθρώπινου ιού metarnevovirus (hMPV).

## 1. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Η εξέταση IMAGEN™ του ανθρώπινου ιού metarnevovirus (hMPV) είναι μια ποιοτική εξέταση ανοσοφθορισμού για την άμεση ανίχνευση του ιού hMPV σε κλινικά δείγματα.

## 2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ανθρώπινος ιός metarnevovirus (hMPV) είναι ένας σφαιρικός ιός RNA με περίβλημα, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια *Paramyxoviridae*, στην υποοικογένεια *Paramyxovirinae* και κατατάσσεται στο γένος *Metarnevovirus*<sup>1</sup>. Ο hMPV είναι το μοναδικό μέλος του γένους που προσβάλλει τον άνθρωπο, ενώ στα υπόλοιπα μέλη συγκαταλέγονται οι ιοί rnevovirus των πτηνών A, B, C και D<sup>2-3</sup>.

Ο ιός περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2001 στην Ολλανδία και έκτοτε έχει διαπιστωθεί η παγκόσμια εξάπλωσή του και η συσχέτισή του με ένα μεγάλο ποσοστό λοιμώξεων του αναπνευστικού στα νήπια και τα παιδιά, αν και προσβάλει όλες τις ηλικιακές ομάδες<sup>4,5</sup>.

Ο ιός hMPV, όπως και άλλοι ιοί του αναπνευστικού συμπεριλαμβανομένων του ιού RSV και της γρίπης, ευθύνεται για εποχικές επιδημίες με ιδιαίτερη έξαρση στους χειμερινούς μήνες, ενώ τα συμπτώματα είναι σε μεγάλο βαθμό όμοια με εκείνα των ασθενών που έχουν προβληθεί από τον ιό RSV, όπως, κατά κύριο λόγο, πυρετός με συμπτώματα του ανώτερου αναπνευστικού, όπως βήχας και ρινική συμφόρηση<sup>5,6</sup>. Ωστόσο, ο ιός hMPV έχει συσχετιστεί και με πιο σοβαρές ασθένειες καθώς και με συμπτώματα της κατώτερης αναπνευστικής οδού, όπως η πνευμονία και βρογχιλίτιδα<sup>5,7</sup>. Επίσης, ο ιός hMPV έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση άσματος και συριγμού στα μολυσμένα άτομα, παρότι υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι δεν συνιστά σύνηθες αίτιο συριγμού, όπως ο ιός RSV οι ρινοϊοί<sup>8,9</sup>. Έχει αποδειχθεί ότι ο ιός hMPV σχετίζεται με συνλοίμωξεις που σχετίζονται κυρίως με τον ιό RSV<sup>10</sup>.

Οι διαγνωστικές μέθοδοι έχουν βασιστεί στην PCR, καθώς ο ιός hMPV αναπτύσσεται αργά στις περισσότερες κυτταρικές γραμμές που χρησιμοποιούνται συνήθως για την απομόνωση των ιών του αναπνευστικού<sup>11,12</sup>. Ωστόσο, έχουν περιγραφεί μονοκλωνικά αντισώματα με τα οποία μπορεί να ανιχνευθεί ο ιός hMPV σε υλικά ρινοφαρυγγικής αναρρόφησης με αποτέλεσμα να παρέχεται πλέον τεκμηρίωση της λογικής στην οποία βασίζεται η παραδοσιακή ανάλυση ανοσοφθορισμού<sup>13</sup>.

Με την εξέταση άμεσου ανοσοφθορισμού, στην οποία χρησιμοποιούνται ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα, παρέχεται γρήγορη, ευαίσθητη και εξειδικευμένη μέθοδος άμεσης ανίχνευσης του ιού hMPV σε κλινικά δείγματα, όπως τα υλικά ρινοφαρυγγικής αναρρόφησης.

Η εξέταση IMAGEN hMPV είναι μια εξέταση άμεσου ανοσοφθορισμού για την γρήγορη ανίχνευση και ταυτοποίηση

του ιού hMPV σε ανθρώπινα κλινικά δείγματα. Στην εξέταση χρησιμοποιούνται δύο μονοκλωνικά αντισώματα με στόχο την ανίχνευση ειδικών δομικών πρωτεϊνών που εκφράζονται σε όλα τα στελέχη του ανθρώπινου metarnevovirus.









## 3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η εξέταση IMAGEN hMPV περιλαμβάνει μονοκλωνικά αντισώματα, συζευγμένα με ισοθειοκυανική φλουορεσκείνη (FITC). Τα συζευγμένα αντισώματα συνδέονται κυρίως με ικά αντιγόνα που βρίσκονται σε όλα τα στελέχη του ιού hMPV. Το Αντιδραστήριο χρησιμοποιείται σε μια τεχνική άμεσου ανοσοφθορισμού ενός βήματος.



Τα δείγματα επωάζονται με το Αντιδραστήριο που περιέχει αντισώματα συζευγμένα με FITC για 15 λεπτά και στη συνέχεια το πλεονάζον Αντιδραστήριο ξεπλένεται με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Η χρωματισμένη περιοχή στερεώνεται και εξετάζεται στο μικροσκόπιο με τη χρήση φωτισμού επιφθορισμού. Εάν εντοπιστεί αντιγόνο του ιού hMPV, διαφαίνεται χαρακτηριστικό έντονο πράσινο χρώμα εντός των μολυσμένων κυττάρων, το οποίο δημιουργεί αντίθεση με την κόκκινη χρώση του υποβάθρου των μη μολυσμένων κυττάρων.

## 4. ΟΡΙΣΜΟΙ



Στις πληροφορίες του προϊόντος έχουν χρησιμοποιηθεί τα ακόλουθα σύμβολα και ορισμοί.

	Κωδικός προϊόντος και αριθμός καταλόγου
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Περιέχει επαρκή ποσότητα για <N> εξετάσεις
	Κατασκευαστής
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Ημερομηνία λήξης
	Αριθμός παρτίδας
	Περιορισμοί θερμοκρασίας


## 5. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ


 50 – Κάθε κιτ περιέχει υλικά που επαρκούν για 50 άμεσα δείγματα.  - Η διάρκεια ζωής του κιτ αναγράφεται στο εξωτερικό μέρος του φιαλιδίου.

### 5.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ IMAGEN hMPV

	Φυλλάδιο οδηγιών χρήσης.
	Αντικειμενοφόρες Πλάκες Θετικού Ελέγχου υποδοχών (2 τεμ.), οι οποίες περιέχουν κύτταρα αφρικανικού πράσινου πύθηνου (VERO), καθλωμένα σε ακετόνη και μολυσμένα με τον ιό hMPV.

Ενα φιαλίδιο με καθένα από τα παρακάτω:

	3mL Στερεωτικού Υγρού. Το Στερεωτικό Υγρό περιέχει έναν αναστολέα φωτοελακάνωσης σε διάλυμα γλυκερόλης (pH 10,0).
---	---

	1,4mL Αντιδραστήριου του IMAGEN hMPV. Το Αντιδραστήριο αποτελείται από ένα μείγμα καθαρών μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού, ειδικών του hMPV και συζευγμένων με FITC. Τα μονοκλωνικά αντισώματα κατευθύνονται στην πρωτεΐνη Σύζευξης και την Νουκλεοπρωτεΐνη του ιού hMPV.
---	---

### 5.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ, ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΕΚ ΝΕΟΥ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΚΙΤ

Για τη διασφάλιση της βέλτιστης απόδοσης του κιτ, είναι σημαντικό όλα τα μη χρησιμοποιημένα συστατικά του κιτ να φυλάσσονται σύμφωνα με τις ακόλουθες οδηγίες.

### 5.3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΕΣ ΠΛΑΚΕΣ ΘΕΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ -

Οι Αντικειμενοφόρες Πλάκες Θετικού Υλικού Ελέγχου παρέχονται σε ατομικές συσκευασίες σε σφραγισμένες θήκες λεπτού φύλλου με άζωτο. Φυλάξτε τις μη χρησιμοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες στους 2-8°C. Η αντικειμενοφόρος πλάκα θα πρέπει να αφήνεται στη θήκη της επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C) πριν από το άνοιγμα της συσκευασίας της.

Χρωματίστε την αντικειμενοφόρο πλάκα αμέσως μετά το άνοιγμα της συσκευασίας της.

### 5.4. ΥΓΡΟ ΣΤΕΡΕΩΣΗΣ-

Ετοίμο για χρήση. Φυλάξτε το μη χρησιμοποιημένο υγρό στους 2-8°C. Το Στερεωτικό Υγρό πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C) επί 5 λεπτά πριν από τη χρήση.

### 5.5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ -

Ετοίμο για χρήση. Φυλάξτε το μη χρησιμοποιημένο Αντιδραστήριο στους 2-8°C. Το Αντιδραστήριο θα πρέπει να αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C) επί 5 λεπτά πριν από τη χρήση.

## 6. ΠΡΟΣΘΕΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

### 6.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φρέσκια ακετόνη (για μονιμοποίηση).

Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) με pH 7,5 για πλύση κεχρωσμένων δειγμάτων και για παρασκευή δειγμάτων.

### 6.2. ΠΑΡΕΛΚΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα προϊόντα προορίζονται για χρήση σε συνδυασμό με την εξέταση IMAGEN hMPV. Επικοινωνήστε με την τοπική θυγατρική ή το διανομέα της Οκιοϊδ για περαιτέρω πληροφορίες.

Γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου επιστρωμένες με Teflon, με μία υποδοχή διαμέτρου 6mm (100 αντικειμενοφόρες πλάκες ανά κουτί) που διατίθενται από την τοπική θυγατρική ή το διανομέα της Οκιοϊδ, (αρ. κωδικού S611430-6).

Αντικειμενοφόρος Πλάκα Θετικού Ελέγχου IMAGEN hMPV (Κωδικός S612830-2).

## 7. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ


Απαιτείται ο ακόλουθος εξοπλισμός:

- Πυέτες ακριβείας και αναλώσιμα ρύγχη για χορήγηση 25μL Λουτρό πλύσης
- Καλυπτρίδες κατάλληλες για κάλυψη υποδοχής διαμέτρου 6mm
- Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου για την παρασκευή δειγμάτων με υποδοχές διαμέτρου 6mm
- Μη φθορίζον έλαιο εμβάπτισης
- Μικροσκόπιο επιφθορισμού με σύστημα φίλτρου για FITC (μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης 490nm, μέσο μήκος κύματος εκπομπής 520nm) και μεγέθυνση x200-x1000
- Θάλαμος επώασης στους 37°C
- Φυγόκεντρος χαμηλής ταχύτητας
- Εξαγωγέας βλέννας (μόνο για ρινοφαρυγγικά δείγματα)

## 8. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Οποιοσδήποτε εκτελεί έναν προσδιορισμό με το προϊόν αυτό πρέπει να είναι εκπαιδευμένος στη χρήση του και πεπειραμένος σε εργαστηριακές διαδικασίες.

### 8.1. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

 Το Αντιδραστήριο IMAGEN hMPV περιέχει 15mmol/L αζιδίου του νατρίου, το οποίο είναι δηλητήριο. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να αντιδράσει με το χαλκό και το μόλυβδο των συστημάτων υδραυλικών σωληνώσεων για να σχηματίσει εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Να απορρίπτετε πάντοτε υλικά που περιέχουν αζίδιο εκπλένοντας με μεγάλες ποσότητες νερού.

8.1.2 Ο hMPV στην Αντικειμενοφόρο Πλάκα Θετικού ελέγχου έχει δειχθεί ότι είναι μη μολυσματικός σε κυτταροκαλλιέργεια, ωστόσο, ο χειρισμός και η απόρριψη της αντικειμενοφόρου πλάκας θα πρέπει να γίνεται ως εάν ήταν δυνητικώς μολυσματική.

8.1.3 Στο Αντιδραστήριο υπάρχει κυανή χρωστική Evans. Πρέπει να αποφεύγεται η επαφή με το δέρμα.

8.1.4 Πρέπει να δίνεται προσοχή κατά τη χρήση του Υγρού Στερέωσης, διότι ενδέχεται να προκαλέσει ερεθισμό του δέρματος. Σε περίπτωση επαφής, θα πρέπει να εκπλένεται το δέρμα με νερό.

8.1.5 Μην τρώτε, μην πίνετε, μην κανίζετε, μη φυλάσσετε και μην προετοιμάζετε τρόφιμα και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά εντός του καθορισμένου χώρου εργασίας.

8.1.6 Μην αναρροφάτε με πιπέτα υλικά με το στόμα.

8.1.7 Φοράτε αναλώσιμα γάντια κατά το χειρισμό κλινικών δειγμάτων και μολυσμένων κυττάρων και πλένετε πάντοτε τα χέρια σας μετά την εργασία με μολυσματικά υλικά.

8.1.8 Απορρίπτετε όλα τα κλινικά δείγματα σύμφωνα με την τοπική νομοθεσία.

8.1.9 Διατίθενται δελτία δεδομένων ασφαλείας για τον επαγγελματία χρήστη κατόπιν αιτήματος.

### 8.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

8.2.1 Τα συστατικά δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες. Μην αναμειγνύετε μεταξύ τους αντιδραστήρια από διαφορετικούς αριθμούς παρτίδας.

8.2.2 Τα αντιδραστήρια παρέχονται σε σταθερές συγκεντρώσεις εργασίας. Εάν τα αντιδραστήρια δεν φυλαχθούν υπό τις συνθήκες που αναφέρονται λεπτομερώς στην ενότητα 5, η απόδοση της εξέτασης θα επηρεαστεί δυσμενώς.

8.2.3 Παρασκευάστε φρέσκο ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (PBS) όπως απαιτείται κατά την ημέρα χρήσης.

8.2.4 Αποφεύγετε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων

8.2.5 Τα αντιδραστήρια δεν πρέπει να καταψύχονται.

## **9. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Η συλλογή και παρασκευή των δειγμάτων είναι καθοριστικής σημασίας για τη διάγνωση του hMPV με τη μέθοδο άμεσου ανοσοφθορισμού. Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται από τη θέση της λοίμωξης κατά τη διάρκεια του μέγιστου χρόνου αποβολής του ιού και να παρασκευάζονται με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να διατηρούνται άθικτα τα κύτταρα που είναι ελεύθερα από προσκολλούμενη βλέννα.

Το συνιστώμενο αναπνευστικό δείγμα είναι ένα υλικό ρινοφαρυγγικής αναρρόφησης το οποίο, όταν συλλεχθεί σωστά, θα πρέπει να παρέχει μεγάλους αριθμούς επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος.

### **9.1. ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΗΣ/ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΑ**

#### **Συλλογή**

Συλλέγετε τις εκκρίσεις από την περιοχή του ρινοφάρυγγα σε εξαγωγέα βλέννας μέσω σωλήνα σίτισης μεγέθους 8. Ο εξαγωγέας βλέννας και η σωλήνωση θα πρέπει να αποστέλλονται στο εργαστήριο το συντομότερο δυνατό για επεξεργασία. Για τη χρώση άμεσου ανοσοφθορισμού είναι απαραίτητες τεχνικές διαχωρισμού κυττάρων. Για ενοφθαλμισμό καλλιέργειας ιού είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί δείγμα ή υλικό υπερκείμενου από τεχνικές διαχωρισμού κυττάρων.

#### **Διαχωρισμός κυττάρων**

Εάν είναι απαραίτητο, προσθέστε 2mL αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) στο δείγμα πριν από τη φυγοκέντρηση, έτσι ώστε να μειωθεί το ιξώδες και να αραιωθεί η βλέννα. Φυγοκεντρίστε τον εξαγωγέα βλέννας σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C) επί 10 λεπτά στα 380g. Αφαιρέστε το υπερκείμενο, το οποίο είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για κνταροκαλλιέργεια. Εναυώρηστε το ίζημα κυττάρων σε 2mL PBS και αναρροφήστε και εκροφήστε εναλλάξ απαλά τα κύτταρα με μια πιπέτα με ευρύ διαμέτρημα ή υποβάλετε σε απαλή περιδίνηση, έως ότου διασπαστεί η βλέννα και απελευθερωθεί το κυτταρικό υλικό.

Αποφύγετε την έντονη αναρρόφηση και εκρόφηση εναλλάξ με πιπέτα ή την περιδίνηση, για την πρόληψη τυχόν βλάβης στα κύτταρα. Μόλις ληφθεί ένα ομαλό εναιώρημα, προσθέστε επιπλέον PBS ανάλογα με τις ανάγκες, αναρροφώντας και εκροφώντας εναλλάξ με πιπέτα ή υποβάλλοντας σε περιδίνηση μετά την προσθήκη του επιπλέον όγκου για την περαιτέρω πλύση των κυττάρων.

Αφαιρέστε και απορρίψτε τυχόν ορατά ψήγματα βλέννας που απομένουν στο σημείο αυτό. Η περίσσεια βλέννας πρέπει να αφαιρείται διότι θα αποτρέπει την επαρκή διείσδυση του Αντιδραστήριου και ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα μη ειδικό φθορισμό.

Εάν παραμείνει όλη η ποσότητα των εκκρίσεων στο σωλήνα σίτισης και δε φθάνει καθόλου στον εξαγωγέα βλέννας, εκπλύνετε όλες τις εκκρίσεις από το σωλήνα με PBS. Αυτό επιτυγχάνεται καλύτερα με εισαγωγή μιας πιπέτας Pasteur στο άκρο του σωλήνα, το οποίο έχει προσαρτηθεί στον εξαγωγέα βλέννας. Αναρροφήστε το κατάλληλο υγρό στο σωλήνα και εκωθήστε το επανειλημμένα έως ότου αποκολληθούν οι εκκρίσεις που είναι προσκολλημένες στο τοίχωμα του σωλήνα. Αναρροφήστε και εκροφήστε εναλλάξ με πιπέτα τον εναιώρημα, έως ότου διασπαστεί επαρκώς η βλέννα.

## **Παρασκευή αντικειμενοφόρων πλακών**

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας διαχωρισμού των κυττάρων, φυγοκεντρίστε το κυτταρικό εναιώρημα που έχει προκύψει, σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C) επί 10 λεπτά στα 380g, και απορρίψτε το υπερκείμενο. Επανεναιώρηστε το ίζημα κυττάρων σε επαρκές PBS για την αραιώση τυχόν βλέννας που απομένει, ενώ διατηρείτε ταυτόχρονα υψηλή κυτταρική πυκνότητα. Τοποθετήστε 25μL του επανεναιωρημένου ιζήματος κυττάρων στην περιοχή υποδοχής στην αντικειμενοφόρο πλάκα 6 mm. Αφήστε το δείγμα να στεγνώσει στον αέρα τελείως σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C) και κατόπιν μονιμοποιήστε το σε φρέσκια ακετόνη σε θερμοκρασία δωματίου (15-3°C) επί 10 λεπτά. Εάν το δείγμα δε χρωματιστεί αμέσως, φυλάξτε το στους 4°C ολονυκτίως ή καταψύξτε στους -20°C για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης.

## **10. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ**

ΠΑΡΑΚΑΛΟΥΜΕ ΑΝΑΤΡΕΪΤΕ ΣΤΗΝ ΕΝΟΤΗΤΑ 8.2 “ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ” ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ.

### **10.1. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ**

Προσθέστε 25μL του Αντιδραστήριου IMAGEN hMPV στο μονιμοποιημένο κυτταρικό παρασκεύασμα στην αντικειμενοφόρο πλάκα (δείτε την ενότητα 9) ή σε μια Αντικειμενοφόρο Πλάκα Θετικού Ελέγχου. Βεβαιωθείτε ότι το Αντιδραστήριο καλύπτει ολόκληρη την περιοχή της υποδοχής.

### **10.2. ΠΡΩΤΗ ΕΠΩΑΣΗ**

Επιβάστε τις αντικειμενοφόρες πλάκες με Αντιδραστήριο σε έναν **υγρό θάλαμο** για **15 λεπτά** στους **37°C**. **Μην** αφήσετε το αντιδραστήριο να στεγνώσει πάνω στο δείγμα, καθώς αυτό θα προκαλέσει εμφάνιση μη ειδικής χρώσης.

### **10.3. ΠΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΟΥ ΠΛΑΚΑΣ**

Εκπλύνετε την περίσσεια του Αντιδραστήριου με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), κατόπιν πλύνετε απαλά την αντικειμενοφόρο πλάκα σε αναδευόμενο λουτρό που περιέχει PBS επί 5 λεπτά. Αποστραγγίστε το PBS και αφήστε την αντικειμενοφόρο πλάκα να στεγνώσει στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C).

### **10.4. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΥΓΡΟΥ ΣΤΕΡΕΩΣΗΣ**

Προσθέστε μια σταγόνα του Υγρού Στερέωσης IMAGEN hMPV στο κέντρο κάθε υποδοχής και τοποθετήστε μια καλυπτρίδα πάνω από το Υγρό Στερέωσης και το δείγμα, διασφαλίζοντας ότι δεν έχουν παγιδευτεί φυσαλίδες αέρα.

### **10.5. ΑΝΑΓΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΟΥ ΠΛΑΚΑΣ**

Εξετάστε ολόκληρη την υποδοχή που περιέχει το κερωσμένο δείγμα με χρήση μικροσκοπίου επιφθορισμού. Ο φθορισμός (δείτε την ενότητα 11) θα πρέπει να είναι ορατός σε μεγέθυνση x400. (Για καλύτερα δυνατά αποτελέσματα, η ανάγνωση των δειγμάτων θα πρέπει να γίνεται αμέσως μετά τη χρώση, αλλά τα δείγματα είναι δυνατό να φυλάσσονται στους 2-8°C, στο σκοτάδι, επί 2 ώρες το πολύ).

Εξαιτίας της μεταβλητής φύσης εμφάνισης του κυττάρου που έχει προσβληθεί από τον ιό hMPV, συνιστάται τα δείγματα με φθορισμό έντονου πράσινου χρώματος σε μια μικρή περιοχή του ειδικού κυττάρου υπό μεγέθυνση x400 να εξετάζονται με μεγέθυνση x1000 με τη χρήση ελαίου καταδυτικού φακού με στόχο την επιβεβαίωση της κατάστασής τους.

## **11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ**

### **11.1. ΥΛΙΚΑ ΕΛΕΓΧΟΥ**

#### **11.1.1 Αντικειμενοφόρες Πλάκες Θετικού Ελέγχου**

Μετά το χρωματισμό και την παρατήρησή της (δείτε την ενότητα 10), η αντικειμενοφόρος πλάκα ελέγχου θα πρέπει να εμφανίζει κύτταρα με ενδοκυττάρια κυτταροπλασματικά κοκκία με φθορισμό πράσινου μήλου, τα οποία σχηματίζουν αντίθεση με ένα κόκκινο υπόβαθρο του αντικεχρωσμένου δείγματος. Τα κύτταρα αυτά είναι ελαφρώς μεγαλύτερα από τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος, αλλά εμφανίζουν παρόμοιο κυτταροπλασματικό φθορισμό όταν μολύνονται με τον hMPV.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες θετικού ελέγχου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ικανοποιητικής εκτέλεσης της διαδικασίας χρώσης.

#### **11.1.2 Αρνητικό υλικό ελέγχου**

Εάν απαιτείται αρνητικό υλικό ελέγχου, συνιστώνται μη μολυσμένα άθικτα κύτταρα του τύπου που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια και την απομόνωση ιών του αναπνευστικού. Τα κύτταρα θα πρέπει να παρασκευάζονται, να μονιμοποιούνται και να χρωματίζονται (δείτε την ενότητα 10).

### **11.2. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

#### **11.2.1 Εμφάνιση κυττάρων μολυσμένων από τον hMPV**

Σε επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος μολυσμένα από τον hMPV παρατηρούνται ενδοκυττάρια κυτταροπλασματικά κοκκία με φθορισμό χρώματος πράσινου μήλου.

Στον συγκεκριμένο ιό έχει παρατηρηθεί μια ελαφρά χρώση και για όλα τα κύτταρα για τα οποία υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι θετικά βάσει της εξέτασης υπό μεγέθυνση x400, θα πρέπει να γίνεται επιβεβαίωση της κατάστασής τους με μεγέθυνση x1000 με τη βοήθεια ελαίου καταδυτικού φακού.

Τα μη μολυσμένα κύτταρα έχουν κόκκινη χρώση με αντίχρωση Evans blue.

#### **11.2.2 Ερμηνεία**

Θετική διάγνωση γίνεται όταν ένα ή περισσότερα κύτταρα παρουσιάζουν τυπικό φθορισμό στο μονιμοποιημένο, κεχρωσμένο δείγμα.

Αρνητική διάγνωση πραγματοποιείται όταν τα χρωματισμένα καθηλωμένα δείγματα δεν παρουσιάζουν φθορισμό μετά τη χρώση με Αντιδραστήριο.

Για απευθείας κεχρωσμένα δείγματα ρινοφαρυγγικής αναρρόφησης, πρέπει να υπάρχουν ορατά τουλάχιστον 20 μη μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος εντός της υποδοχής της αντικειμενοφόρου πλάκας προτού αναφερθεί ένα αρνητικό αποτέλεσμα (εάν υπάρχουν ανεπαρκή κύτταρα, δείτε την ενότητα 11.2.3).

#### **11.2.3 Ανεπαρκή κύτταρα**

Εάν υπάρχουν ανεπαρκή κύτταρα στο παρασκεύασμα της υποδοχής της αντικειμενοφόρου πλάκας, το υπόλοιπο του κλινικού δείγματος θα πρέπει να φυγοκεντρίζεται στα 380g επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C). Επανεναιωρήστε τα κύτταρα σε μικρότερο όγκο PBS πριν από την αναδιανομή (25μL) στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Εναλλακτικά, θα πρέπει να ζητήσετε ένα επαναληπτικό δείγμα.

## **12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΑΠΟΔΟΣΗΣ**

12.1. Το Αντιδραστήριο FITC ενδέχεται να χρωματίζει μη ειδικά τα στελέχη του *Staphylococcus aureus* που περιέχουν μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης A.

Αυτό οφείλεται στη μη ανοσιακή αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης A με την περιοχή Fc του μονοκλωνικού αντισώματος, μια παρατήρηση που αναφέρεται και για άλλους προσδιορισμούς φθορισμού που βασίζονται σε μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα<sup>14</sup>.

Ωστόσο, η χρώση αυτή δε δίνει την τυπική ενδοκυττάρια μορφολογία φθορισμού που παρατηρείται σε κύτταρα που είναι μολυσμένα με τον hMPV (δείτε την ενότητα 11.2.1) και θα πρέπει να ερμηνεύεται ως μη ειδική χρώση.

12.2. Χρησιμοποιείτε μόνον το Υγρό Στερέωσης που παρέχεται.

12.3. Η οπτική εμφάνιση της εικόνας φθορισμού που λαμβάνεται ενδέχεται να ποικίλει λόγω του τύπου μικροσκοπίου και της φωτεινής πηγής που χρησιμοποιείται.

12.4. Συνιστάται η χρήση 25μL Αντιδραστήριου για την κάλυψη της περιοχής της υποδοχής διαμέτρου 6mm. Τυχόν μείωση του όγκου αυτού ενδέχεται να οδηγήσει σε δυσκολίες στην κάλυψη της περιοχής του δείγματος και να μειώσει την ευαισθησία.

12.5. Όλα τα αντιδραστήρια παρέχονται σε σταθερές συγκεντρώσεις εργασίας. Η απόδοση της εξέτασης ενδέχεται να επηρεαστεί εάν τα αντιδραστήρια τροποποιηθούν με οποιονδήποτε τρόπο ή δε φυλαχθούν υπό τις συνιστώμενες συνθήκες, όπως περιγράφεται στην ενότητα 5.

12.6. Τυχόν αποτυχία ανίχνευσης του hMPV ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα παραγόντων όπως π.χ. συλλογή του δείγματος σε ακατάλληλο χρονικό σημείο της νόσου, εσφαλμένη δειγματοληψία ή/και χειρισμός του δείγματος, αποτυχία της κυτταροκαλλιέργειας κ.λπ. Η εξαγωγή αρνητικού αποτελέσματος δεν αποκλείει την πιθανότητα μόλυνσης από τον hMPV.

12.7. Η παρουσία του hMPV σε ρινοφαρυγγικές εκκρίσεις δεν αποκλείει απαραίτητα την πιθανότητα συνοδού λοίμωξης από άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς.

12.8. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με πληροφορίες που είναι διαθέσιμες από επιδημιολογικές μελέτες, την κλινική εκτίμηση του ασθενούς και άλλες διαγνωστικές διαδικασίες.

12.9. Για την παρασκευή των δειγμάτων συνιστάται η χρήση υποδοχών ελάχιστης διαμέτρου 6mm. Η χρήση αντικειμενοφόρων πλακών με υποδοχές διαμέτρου μικρότερης των 6 mm είναι πιθανό να περιορίσει την πιθανότητα ανίχνευσης μικρών θετικών κυττάρων σε ασθενή θετικά δείγματα.

### 13. ANAMENOMENES TIMEΣ

Το ποσοστό ανίχνευσης για τον hMPV επηρεάζεται από το χρόνο της συλλογής των δειγμάτων, καθώς και από το χειρισμό, τη φύλαξη και τη μεταφορά των δειγμάτων. Επίσης, εξαρτάται από την ηλικία, τη συνολική υγεία, τη γεωγραφική περιοχή και την κοινωνικοοικονομική κατάσταση του πληθυσμού που εξετάζεται. Ο hMPV είναι διαδεδομένος σε όλον τον κόσμο και σχετίζεται με σοβαρές εποχικές λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού<sup>6,9,12</sup>. Στα θερμά κλίματα, οι ετήσιες εξάρσεις των μολύνσεων από τον ιό hMPV εμφανίζονται κυρίως κατά τους χειμερινούς μήνες<sup>6</sup>. Στη διάρκεια των περιόδων αυτών συνήθως είναι πιο έντονη η εμφάνιση λοιμώξεων της κατώτερης αναπνευστικής οδού. Επομένως, στη διάρκεια των εποχικών εξάρσεων, αναμένεται ότι μεγάλη ποσότητα υλικού ρινοφαρυγγικής αναρρόφησης είναι θετικό στον ιό hMPV. Ο ιός hMPV προσβάλλει όλες τις ηλικιακές ομάδες, ωστόσο, τα συμπτώματα είναι πιο έντονα στα παιδιά και τους ηλικιωμένους<sup>12</sup>.

### 14. ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

#### 14.1. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Η εξέταση IMAGEN hMPV αξιολογήθηκε σε δύο ευρωπαϊκά κέντρα δοκιμών σε υλικό ρινοφαρυγγικής έκκρισης από εσωτερικούς νοσηλευόμενους ασθενείς που εμφάνιζαν συμπτώματα αναπνευστικής λοίμωξης.

Το κέντρο δοκιμών 1 εξέτασε 91 δείγματα (41 ανδρών, 47 γυναικών, 3 απροσδιόριστου φύλου, με εύρος ηλικιών από 1 ημέρα έως 66 έτη) τα οποία συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της χειμερινής περιόδου επιδημιών 2006-2007 με την εξέταση IMAGEN™ hMPV και τη διαγνωστική εξέταση hMPV που εφαρμόζει το κέντρο, την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αναστροφής μεταγραφικής (RT-PCR).

Το αποτέλεσμα καταγραφόταν ως θετικό όταν ήταν θετικό το αποτέλεσμα και των δύο εξετάσεων IMAGEN hMPV και RT-PCR.

Η συνολική συχνότητα εμφάνισης δειγμάτων μολυσμένων από hMPV στη συγκεκριμένη δοκιμή ανήλθε σε 3,4%. Τα αποτελέσματα της εξέτασης IMAGEN hMPV συμφώνησαν με τα αντίστοιχα της μεθόδου αναφοράς PCR σε ποσοστό 100%. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα ευρήματα του κέντρου δοκιμών 1.

#### Πίνακας 1: Διάγνωση λοίμωξης από hMPV με τις εξετάσεις IMAGEN hMPV και RT-PCR

		RT-PCR	
		+	-
IMAGEN hMPV	+	3	0
	-	0	88

Συμφωνία Συνολικών Αποτελεσμάτων: 100%

Διάστημα Εμπιστοσύνης 95%: 96-100%

Συμφωνία Θετικών: 100%

Διάστημα Εμπιστοσύνης 95%: 29,2-100%

Συμφωνία Αρνητικών: 100%

Διάστημα Εμπιστοσύνης 95%: 95,9-100%

Το κέντρο δοκιμών 2 εξέτασε 359 δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν κατά τη χειμερινή περίοδο επιδημιών 2006-2007 από διάφορους ασθενείς (219 άνδρες, 140 γυναίκες με εύρος ηλικιών από 8 ημέρες έως 73 έτη) με την εξέταση IMAGEN hMPV και μια μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού δεξαμενής μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Τα δείγματα που κρίθηκαν θετικά με βάση είτε την εξέταση IMAGEN hMPV είτε την μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού δεξαμενής μονοκλωνικών αντισωμάτων επιβεβαιώθηκαν από την ανάλυση πραγματικού χρόνου RT-PCR που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο από συγκεκριμένο κέντρο. Τα δείγματα που κρίθηκαν θετικά με βάση είτε τη μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού δεξαμενής μονοκλωνικών αντισωμάτων είτε τις εξετάσεις IMAGEN hMPV και RT-PCR θεωρήθηκαν ως επιβεβαιωμένο θετικό δείγμα.

Η συνολική συχνότητα εμφάνισης του ιού hMPV στη συγκεκριμένη σειρά δοκιμαστικών δειγμάτων ανήλθε σε 3,3%. Τα συνολικά αποτελέσματα της εξέτασης IMAGEN hMPV συμφώνησαν σε ποσοστό 99,2% με την δεξαμενή μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα ευρήματα του κέντρου δοκιμών 2 για την εξέταση IMAGEN hMPV και τη δεξαμενή μονοκλωνικών αντισωμάτων.

#### Πίνακας 2: Διάγνωση λοίμωξης από hMPV με την εξέταση IMAGEN hMPV και μια Δεξαμενή Μονοκλωνικών Αντισωμάτων

		Δεξαμενή Μονοκλωνικών Αντισωμάτων	
		+	-
IMAGEN hMPV	+	9a	1a
	-	2a	347

α) Δείγματα που κρίθηκαν θετικά για τον ιό hMPV βάσει της εξέτασης πραγματικού χρόνου RT-PCR

Συμφωνία Συνολικών Αποτελεσμάτων: 99,2%

Διάστημα Εμπιστοσύνης 95%: 97,6-99,8%

Συμφωνία Θετικών: 81,8%

Διάστημα Εμπιστοσύνης 95%: 48,2-97,7%

Συμφωνία Αρνητικών: 99,7%

Διάστημα Εμπιστοσύνης 95%: 98,4-100%

Επίσης, το κέντρο δοκιμών 2 έλεγξε το kit του IMAGEN hMPV συγκρίνοντάς το με το kit ELISA που διατίθεται στο εμπόριο με ένα υποσύνολο δειγμάτων. Εξετάστηκαν 153 δείγματα από κλινικά δείγματα που συλλέχθηκαν επίσης κατά την χειμερινή περίοδο επιδημιών 2006-2007 από διάφορους ασθενείς (100 άνδρες, 53 γυναίκες με εύρος ηλικιών από 7 ημέρες έως 69 έτη).

Τα δείγματα που κρίθηκαν θετικά βάσει της εξέτασης IMAGENhMPV ή της εξέτασης EIA που διατίθεται στο εμπόριο εξετάστηκαν και από την ανάλυση πραγματικού χρόνου RT-PCR για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Η συνολική συχνότητα εμφάνισης του ιού hMPV στη συγκεκριμένη σειρά δοκιμαστικών δειγμάτων ανήλθε σε 7,8%. Τα συνολικά αποτελέσματα της εξέτασης IMAGEN hMPV συμφώνησαν σε ποσοστό 97,4% με την εξέταση EIA που διατίθεται στο εμπόριο. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα ευρήματα του κέντρου δοκιμών 2 με το συγκεκριμένο υποσύνολο.

#### Πίνακας 3: Διάγνωση λοίμωξης από hMPV με την εξέταση IMAGEN hMPV και μία EIA που διατίθεται στο εμπόριο

		EIA	
		+	-
IMAGEN hMPV	+	8a	2a
	-	2a	141

α) Δείγματα που κρίθηκαν θετικά για τον ιό hMPV βάσει της εξέτασης πραγματικού χρόνου RT-PCR

Συμφωνία Συνολικών Αποτελεσμάτων: 97,4%

Διάστημα Εμπιστοσύνης 95%: 93,4-99,3%

Συμφωνία Θετικών: 80,0%

Διάστημα Εμπιστοσύνης 95%: 44,4-97,5%

Συμφωνία Αρνητικών: 98,6%

Διάστημα Εμπιστοσύνης 95%: 95,0-99,8%

#### 14.2. ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η εξέταση IMAGEN hMPV είναι ιδιαίτερος εξειδικευμένη για αντιγόνα του ανθρώπινου metapneumovirus. Δεν έχει παρατηρηθεί διασταυρούμενη αντιδραστικότητα κατά την εξέταση των μικροοργανισμών που παρατίθενται στη συνέχεια. Η εξέταση πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακές καλλιέργειες γνωστών οργανισμών.

#### Βακτήρια

*Chlamydia trachomatis*

*Chlamydia pneumoniae*

*Haemophilus influenzae*

*Legionella pneumophila*

*Moraxella catarrhalis*

*Mycoplasma pneumoniae*

*Neisseria meningitidis*

*Neisseria gonorrhoeae*

*Neisseria lactamica*

*Streptococcus pneumoniae*

#### Ιοί

Parainfluenza 1, 2, 3

Γρίπη Α και Β

Μεγαλοκυτταροϊός

Στελέχη Ιού Cocksackie B1, B2,

B3, B4, B5 και B6

Ιός Echo, τύποι 4, 6, 9, 11, 30 και 34

Varicella Zoster

Αδενοϊός

Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός

Ιός απλού έρπητα, τύποι 1 και 2

### 15. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

#### 1. Frank R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L., Brown F. (1992)

Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology Supplement 2, Spurger Velacy, New York, pp 245–246.

#### 2. Easton A.J., Domachowske J.B., Rosenberg H.F. (2004)

Animal Pneumoviruses: Molecular genetics and Pathogenesis. Clinical Microbiology Reviews Apr. 200, p. 390-412

#### 3. Viazov S., Scheidhauer, R., Fiedler M., Roggendorf M. (2003)

High Prevalence of Human Metapneumovirus Infection in Young Children and Genetic Heterogeneity of the Viral isolates. Journal of Clinical Microbiology 41: 3043–3045.

#### 4. van den Hoogen B.G., de Jong J.C., Groen J., Kuiken T., de Groot R., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. (2001)

A Newly Discovered Human Pneumovirus Isolated from Young Children with Respiratory Tract Disease.

Nature Medicine 7: 719-724

#### 5. Bastien N., Ward D., Van Caeseel P., Brandt K., Lee S.H.S., McNabb G., Klisko B., Chan E., Li Y. (2003)

Human Metapneumovirus in the Canadian Population.

Journal of Clinical Microbiology 41: 4642–4646

#### 6. Hamelin M-E., Abed Y., Boivin G. (2004)

Human Metapneumovirus: A New Player among Respiratory Viruses.

Emerging Infections 38: 983–990.

#### 7. Mullins J.A., Erdman D.D., Weinberg G.A., Edwards K., Hall K.B., Walker F.J., Iwane M., Anderson L.J. (2004)

Human Metapneumovirus Infection among Children Hospitalised With Acute Respiratory Illness.

Emerging Infectious Diseases 10: 700 – 705.

#### 8. Kashiwa H., Shimozono H., Takao S. (2004)

Clinical Pictures of Children with Human Metapneumovirus Infection: Comparison with Respiratory Syncytial Virus Infection.

Japanese Journal of Infectious Disease 57: 80-82.

#### 9. Jartti T., Lehtinen P., Vuorinen T., Osterback R., van den Hoogen B., Osterhaus A.D.M.E., Ruuskanen A. (2004)

Respiratory Picornaviruses and Respiratory Syncytial Virus as Causative Agents of Acute Expiratory Wheezing in Children.

Emerging Infectious Diseases 10: 1095 – 1101.

#### 10. Schildgen O., Simon A., Wilkesmann a., Williams J., Eis-Hubinger A-M., Kupfer B., Roggendorf M., Viazov S. (2006)

The Human Metapneumovirus: Biology, Epidemiological Features, and Clinical Characteristics of Infection.

Reviews in Medical Microbiology 17: 11–25.

#### 11. Mackay I.M., Jacob K.C., Woolhouse D., Waller K., Szymis M.W., Whitley D.M., Siebert D.J., Nissen M., Sloots T.P. (2003)

Molecular Assays for Detection of Human Metapneumovirus.

Journal of Clinical Microbiology 41: 100–105.

**12.Crowe J.E. (2004)**

Human Metapneumovirus as a Major Cause of Human Respiratory Tract Disease. The Pediatric Infectious Disease Journal Supplement Article 23: S215–S221

**13.Percivalle E., Sarasini A., Visai L., Revello M.G., Gerna G. (2005)**

Rapid Detection of Human Metapneumovirus Strains in Nasopharyngeal Aspirates and Shell Vial Cultures by Monoclonal Antibodies. Journal of Clinical Microbiology 43: 3443–3446.

**14.Krech T., Gerhard Fsadni D., Hofmann N., Miller S.M. (1985)**

Interference of Staphylococcus aureus in the Detection of Chlamydia trachomatis by Monoclonal Antibodies.

The Lancet. 1161 1162.



IFU X7854A Αναθεωρημένο Ιούνιος 2012



Oxoid Ltd,

Wade Road,

Basingstoke, Hants, RG24 8PW UK

Για όλα τα ερωτήματά σας, παρακαλούμε επικοινωνήστε με την τοπική θυγατρική ή το διανομέα της Oxoid.