



Key Code TSMX7852A
www.oxid.com/ifu
Europe +800 135 79 135
US 1 855 2360 190
CA 1 855 805 8539
ROW +31 20 794 7071

# IMAGEN Respiratory Screen

**[REF]** K612011-2 .....▽∑100 **FR**

### 1. DOMAINE D’UTILISATION

La trousse IMAGEN™ Dépistage des virus respiratoires est un dosage qualitatif par immunofluorescence indirecte pour la détection présomptive du virus syncytial respiratoire (VRS), des virus influenza A et B, des virus parainfluenza 1, 2 et 3, et des adénovirus dans les échantillons respiratoires (aspirations nasopharyngées) et dans les cultures cellulaires. Le dosage ne permet pas de différencier les virus. Chaque virus devra être identifié et sa présence confirmée à l’aide d’anticorps monoclonaux monospécifiques marqués au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) comme ceux de la gamme IMAGEN ou par d’autres méthodes.

Les résultats obtenus sur des prélèvements respiratoires directs doivent être confirmés par culture cellulaire.

### 2. RESUME

Les infections dues aux virus respiratoires constituent un problème majeur de santé publique dans le monde entier car elles sont liées à la majeure partie des épidémies de maladies respiratoires<sup>1,2,3</sup>. Les virus respiratoires affectent les individus quel que soit leur âge, cependant les infections sont plus graves chez les nouveau-nés, les personnes âgées et les populations immunodéprimées, conduisant le plus souvent à l’hospitalisation des patients<sup>4</sup>. Les infections nosocomiales surviennent dans les services de pédiatrie et de gériatrie, entraînant une recrudescence des hospitalisations, une prise en charge prolongée des patients et une augmentation de la morbidité et de la mortalité<sup>5,6</sup>. Les infections respiratoires chez les nouveau-nés peuvent entraîner une obstruction des voies respiratoires et conduire à une détresse respiratoire.

Les principaux virus responsables des infections des voies respiratoires basses sont le virus syncytial respiratoire (VRS), les virus influenza A et B, les virus parainfluenza 1, 2 et 3 et les adénovirus. Les taux de prévalence attendus pour chacun de ces virus sont détaillés (avec les références) dans la Section 13, Valeurs Attendues.

Le VRS et les virus parainfluenza sont des virus saisonniers, et sont responsables d’infections des voies respiratoires basses chez les nouveau-nés et les jeunes enfants. Ils entraînent fréquemment des bronchiolites, des laryngo-trachéites, des bronchites et parfois des pneumonies<sup>7,8,9</sup>.

Les virus influenza A et B sont responsables d’épidémies saisonnières dans le monde entier de maladies respiratoires chez l’adulte et les nouveau-nés. Les symptômes vont d’infections bénignes des voies respiratoires hautes à des pneumonies graves<sup>10,11</sup>. Une pneumonie aiguë chez les patients âgés ou immunodéprimés peut être mortelle en particulier lorsqu’elle est associée à des infections microbiennes secondaires.

Les infections à adénovirus entraînent des maladies respiratoires, oculaires et entériques<sup>12</sup>. Les adénovirus sont considérés comme étant responsables de 5% des maladies respiratoires aiguës chez l’enfant de moins de 4 ans, et comme étant une cause courante de pharyngites chez les jeunes enfants<sup>13</sup>.

Un diagnostic rapide des infections virales respiratoires constitue un facteur important de la prise en charge des patients, de la prévention et du contrôle des épidémies, et permet d’avoir recours à une thérapie antivirale, en particulier dans les cas d’infections par le virus influenza A et le VRS<sup>3,14,15,16</sup>.

Les méthodes utilisées pour diagnostiquer les infections virales respiratoires aiguës, comprennent les tests de détection directe des protéines virales par immunofluorescence et/ou dosages immunoenzymatiques, à partir d’aspirations rhino-pharyngées, l’isolement et l’identification des virus dans les cultures cellulaires en monocouches, ou la mise en évidence d’une réponse immunitaire par des techniques sérologiques.

Les tests d’immunofluorescence tels que les tests IMAGEN RSV et IMAGEN Virus Influenza A et B, sont désormais largement utilisés pour la détection directe de protéines des virus respiratoires dans les préparations de cellules issues d’aspirations rhino-pharyngées, ou de cultures en monocouches<sup>17,18</sup>. Les tests d’immunofluorescence utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques sont rapides et permettent d’apprécier la qualité de l’échantillon à tester<sup>2,17</sup>. Les systèmes de culture stimulée par centrifugation permettent d’isoler rapidement les virus respiratoires en culture cellulaire, et, utilisées en association avec les tests par immunofluorescence, permettent un diagnostic rapide de l’infection respiratoire<sup>19</sup>.

Dans toute population, divers virus respiratoires peuvent circuler simultanément, causant des infections ayant des symptômes cliniques similaires.

La prévalence des échantillons positifs varie selon la démographie de la population, la saison, le type d’échantillons testés, et le moment du prélèvement de l’échantillon dans le cours de l’infection. Un test de dépistage des virus respiratoires par immunofluorescence constitue une méthode de détection rapide et économique. Les virus peuvent ensuite être identifiés individuellement à l’aide d’anticorps monoclonaux monospécifiques conjugués au FITC (isothiocyanate de fluorescéine).

Le test IMAGEN Dépistage des virus respiratoires est un test par immunofluorescence indirecte pour la détection de virus respiratoires, dont le virus syncytial respiratoire, les virus influenza A et B, les virus parainfluenza 1, 2 et 3, et les adénovirus, dans les échantillons cliniques et dans les cultures cellulaires monocouches. La présence d’un virus respiratoire est indiquée par un résultat de dépistage positif. Tout virus présent peut être identifié par immunofluorescence directe avec des réactifs anticorps monoclonaux conjugués au FITC (isothiocyanate de fluorescéine), spécifiques de chaque virus respiratoire (voir Sections 6.1 et 11.4).

### 3. PRINCIPE DU TEST

Le test IMAGEN Dépistage des virus respiratoires est constitué d’un pool d’anticorps monoclonaux. Chacun d’entre eux possède une spécificité particulière le VSR respiratoire, les virus influenza A et B, les virus parainfluenza 1, 2 ou 3 ou l’adénovirus. Le réactif de dépistage que constitue le pool d’anticorps est utilisé dans le cadre d’une technique de marquage par immunofluorescence indirecte en deux étapes. Le contrôle négatif fourni permet de vérifier la spécificité du marquage. Les échantillons sont

marqués avec le réactif de dépistage et/ou le réactif de contrôle négatif pendant 15 minutes. Le réactif non lié, en excès, est alors éliminé par lavage avec une solution saline de tampon phosphate (PBS). Les échantillons sont ensuite marqués avec un conjugué FITC secondaire pendant 15 minutes. L’excès de réactif non lié est éliminé par lavage dans du PBS. Les zones marquées sont montées entre lames et lamelles et observées au microscope à épifluorescence. Un résultat positif sera indiqué par la présence caractéristique de fluorescence intracellulaire vert pomme dans les cellules infectées, contrastant avec le fond coloré en rouge des cellules non infectées. Les virus respiratoires dépistés peuvent être identifiés de manière spécifique en utilisant les réactifs individuels IMAGEN (voir Section 11.4).

### Remerciements

Les anticorps monoclonaux utilisés dans ce test ont pour origine: Le Département de Virus Respiratoires et Entériques, Services de Santé Publique, Centre Epidémiologique, Atlanta, Géorgie, Etats-Unis

L’Institut de Recherche sur les Maladies Animales, Compton, Berkshire, Royaume-Uni

Le Département des services Santé et Humain, Service de la Santé Publique, Centre Epidémiologique, Atlanta, Géorgie, Etats-Unis

La division des Réactifs Microbiologiques et de Contrôle Qualité, Laboratoire Central de la Santé Publique, Colindale, Londres, Royaume-Uni

La Fondation Washington pour la Recherche, Washington, Etats-Unis

Bien que certains anticorps monoclonaux utilisés dans le dispositif de test soient issus des Centres Epidémiologiques (CDC), le test ne doit en aucun cas être interprété comme étant approuvé par les CDC ou le Département des Services Santé et Humain des Etats-Unis.

### 4. DEFINITIONS

Les symboles suivants sont utilisés dans l’ensemble des informations relatives au produit.

<b>[REF]</b>	Numéro de référence
<b>[IVD]</b>	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Consulter le mode d’emploi
	Limite de température (température de conservation)
<span>▽</span> <span>∑</span> <span>N</span>	Contenu suffisant pour "n" tests
<b>[LOT]</b>	Code de lot (numéro de lot)
	A utiliser avant le (date de péremption)
	Fabriqué par

### 5. REACTIFS FOURNIS


▽∑100 – Chaque trousse contient le matériel nécessaire pour tester 100 échantillons directs ou préparations de cultures cellulaires. La date de péremption de la trousse est indiquée sur l’étiquette apposée à l’extérieur de la boîte.

#### 5.1. REACTIF DE DEPISTAGE RESPIRATOIRE IMAGEN

	Instructions d’utilisation.
	Lames de contrôle de 5 x 14 puits, combinant des contrôles positif et négatif. Chaque lame comporte 7 puits de contrôle positif contenant des cellules fixées à l’acétone, infectées par, soit le VRS (souche issue d’un échantillon clinique), soit le virus influenza A (souche CDC V7-002) ou B (souche CDC V4-004), le virus parainfluenza 1, 2 ou 3 (souches CDC V6-004, CDC V7-003, et CDC V5- 003 respectivement), soit un adénovirus (souche CDC V5-002), un puits spécifique à chaque virus. Les puits de contrôle négatif contiennent des cellules fixées à l’acétone non-infectées.

Un flacon de chacun des réactifs suivants, sauf mention contraire:

<b>[MOUNTING FLUID]</b>	3 x 3mL de liquide de montage. Le liquide de montage contient un inhibiteur de la photodécoloration en solution dans le glycérol (pH 10,0).
-------------------------	---

<b>[SCREENING REAGENT]</b>	4,4mL de réactif de dépistage. Le réactif est constitué d’un pool d’anticorps monoclonaux purifiés de souris, spécifiques du VSR des virus influenza A et B, des virus parainfluenza 1, 2 et 3 et adénovirus.
----------------------------	---

Le réactif est préparé dans une solution tampon stabilisée par des protéines, contenant 15mmol/L d’azide de II a été montré que les anticorps monoclonaux utilisés dans la trousse IMAGEN Dépistage des virus respiratoires, réagissent avec les épitopes conservés des protéines virales présentes dans leurs virus respectifs, détaillés dans le tableau ci-dessous:

Virus	Spécificité des anticorps monoclonaux
Virus syncytial respiratoire	Nucléoprotéine et protéine de fusion
Virus influenza A	Nucléoprotéine et matrice protéique
Virus influenza B	Nucléoprotéine et hémagglutinine protéique
Virus parainfluenza 1	Protéine de fusion
Virus parainfluenza 2	Hémagglutinine protéique
Virus parainfluenza 3	Hémagglutinine protéique
Adénovirus	Protéine Hexon*

\* Il a été démontré que cet anticorps monoclonal détecte toutes les souches d’adénovirus communément associées aux infections des voies respiratoires. Les souches testées comprenaient les adénovirus 1 - 41 (inclus).

<b>[CONTROL -]</b>	2,6mL de réactif de contrôle négatif. Le réactif est constitué d’un pool d’anticorps monoclonaux de souris sans activité anti-virale. Le réactif est préparé dans une solution tampon stabilisée par des protéines, contenant 15mmol/L d’azide de sodium comme conservateur.
--------------------	--

<b>[FITC CONJUGATE]</b>	2 x 3,5mL d’anticorps anti-souris conjugué FITC. Le réactif est constitué de fragments F(ab’)2 conjugués FITC d’immunoglobulines de lapin anti-souris, dilués dans, PBS stabilisée par des protéines, contenant du bleu Evans
-------------------------	---

comme colorant de contraste et 15mmol/L d’azide de sodium comme conservateur.

#### 5.2. PRÉPARATION, CONSERVATION ET REUTILISATION DES ELEMETS DE LA TROUSSE

Afin de garantir les performances optimales de la trousse, il est important de conserver tous les éléments reconstitués et inutilisés conformément aux instructions suivantes:

#### 5.3. LAMES DE CONTROLE POSITIF ET NEGATIF – POSITIVE AND NEGATIVE CONTROL SLIDE

Les lames sont fournies dans des poches individuelles scellées, sous azote. Conserver les lames non utilisées à 2-8°C. Les lames doivent être laissées pendant 5 minutes à température ambiante (15-30°C) avant ouverture.

**Colorez la lame immédiatement après ouverture.**

#### 5.4. LIQUIDE DE MONTAGE – MOUNTING FLUID

Prêt à l’emploi. Conserver le liquide non utilisé à 2-8°C. Le liquide de montage doit être laissé pendant 5 minutes à température ambiante (15-30°C) avant utilisation.

#### 5.5. RÉACTIF DE DÉPISTAGE – SCREENING REAGENT

Prêt à l’emploi. Conserver le réactif de dépistage non utilisé à 2-8°C. Le réactif doit être laissé être laissé pendant 5 minutes à température ambiante (15-30°C) avant utilisation.

#### 5.6. REACTIF DE CONTROLE NEGATIF – CONTROL -

Prêt à l’emploi. Conserver le réactif de contrôle négatif non utilisé à 2-8°C. Le réactif doit être laissé être laissé pendant 5 minutes à température ambiante (15-30°C) avant utilisation.

#### 5.7. REACTIF ANTI-SOURIS CONJUGUE FITC – FITC CONJUGATE

Prêt à l’emploi. Conserver le réactif de conjugué FITC anti-souris non utilisé dans l’obscurité, à 2-8°C. Le réactif doit être laissé être laissé pendant 5 minutes à température ambiante (15-30°C) avant utilisation.

### 6. REACTIFS SUPPLEMENTAIRES ET EQUIPEMENT NECESSAIRES

#### 6.1. REACTIFS

Acétone fraîche (pour la fixation).

PBS, pH 7,5, pour la préparation des échantillons et le lavage des échantillons marqués.

Réactifs IMAGEN pour confirmer les résultats de dépistage positifs, disponibles auprès de votre distributeur local ou filiale Oxoid:

IMAGEN Adenovirus	Code N° K610011-2
IMAGEN Respiratory Syncytial Virus (RSV)	Code N° K610211-2
IMAGEN Parainfluenza Virus Types 1,2,3 (Typing)	Code N° K610411-2
IMAGEN Influenza A and B Virus	Code N° K610511-2

### 6.2. ACCESSOIRES ET EQUIPEMENT

Les produits suivants sont destinés à être utilisés conjointement avec le test IMAGEN Respiratory Screen. Pour toute information, veuillez contacter votre distributeur local(e).

Lames de microscope en verre recouvertes de téflon, avec un puits unique de 6mm de diamètre (100 lames par boîte) disponibles auprès de votre distributeur local, (Code S611430-6).

IMAGEN Respiratory Screen Positive and Negative Control Slides (Code S612130-2).

### 7. EQUIPEMENT

Le matériel suivant est nécessaire:

Pipettes de précision et embouts jetables permettant de distribuer 20µL et 25µL

Bain de lavage

Lamelles adaptées à la couverture des lames à puits uniques de 6mm de diamètre ou à 14 puits

Huile à immersion non fluorescente

Microscope à épifluorescence avec système de filtre pour FITC (longueur d’onde d’excitation maximum 490nm, longueur d’onde d’émission moyenne 520nm) et grossissement x200 - x500

Incubateur à 37°C

Centrifugeuse à vitesse réduite

#### Echantillons directs

Extracteur de mucosités (échantillons nasopharyngés uniquement)

#### Confirmation par culture

Ecouvillons stériles et milieu de transport viral (VTM) et récipients adéquats pour le prélèvement, le transport et la culture du VSR des virus influenza A et B, des virus parainfluenza 1, 2, 3 et des adénovirus.

Lignées cellulaires recommandées pour la culture et l’isolement du VSR des virus influenza A et B, des virus parainfluenza 1, 2, 3 et des adénovirus.

### 8. PRECAUTIONS

**[IVD]** - Pour diagnostic *in vitro*. Toute personne qui procède à un dosage avec ce produit doit avoir été formée à son utilisation et posséder des compétences dans le domaine des procédures biologiques.

#### 8.1. PRECAUTIONS D’UTILISATION

8.1.1 Les réactifs de la trousse IMAGEN Dépistage des virus respiratoires contiennent de l’azide de sodium <0.1% qui est un poison. L’azide de sodium peut réagir avec les canalisations en cuivre ou en plomb, pour former des azides métalliques explosifs. Se débarrasser des matières contenant des azides en procédant à un rinçage avec de grandes quantités d’eau.

8.1.2 Les virus présents sur les lames de contrôle ne sont pas infectieux en culture cellulaire, cependant, il convient de manipuler et de jeter les lames comme s’il s’agissait de matériel potentiellement infectieux.

8.1.3 Présence du colorant bleu Evans dans le réactif. Bien que le produit soit en concentrations inférieures à celles qui requièrent qu’on le classe comme cancérogène, éviter tout contact avec la peau.

8.1.4 Des précautions sont à prendre lors de la manipulation du liquide de montage qui peut irriter la peau. En cas de contact avec la peau, rincez abondamment à l’eau.

8.1.5 Ne pas manger, boire, fumer, conserver ou préparer des aliments, ou utiliser des cosmétiques dans les laboratoires.

8.1.6 Ne pas pipeter avec la bouche.

8.1.7 Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons cliniques et des cultures virales, et toujours se laver les mains après avoir utilisé du matériel infectieux.

8.1.8 Se débarrasser de tous les échantillons cliniques conformément à la législation en vigueur.

8.1.9 Une fiche toxicologique peut être mise à la disposition des utilisateurs professionnels, sur simple demande.

#### 8.2. PRECAUTIONS TECHNIQUES

8.2.1 Les réactifs ne doivent pas être utilisés après la date limite indiquée sur les étiquettes. Ne pas mélanger ou intervertir divers lots de réactifs.

8.2.2 Les réactifs sont fournis à des concentrations de travail fixes. Les performances des tests peuvent

être influencées par une dilution incorrecte, une modification des réactifs, ou par une conservation s’opérant dans des conditions différentes de celles qui sont détaillées dans la Section 5.

8.2.3 Préparer une solution fraîche PBS le jour même de son utilisation.

8.2.4 Le lavage dans du PBS est nécessaire. L’utilisation d’autres solutions de lavage, comme l’eau du robinet ou l’eau distillée, compromettrait les résultats du test.

8.2.5 Eviter la contamination microbienne des réactifs.

8.2.6 Les réactifs ne doivent pas être congelés.

### 9. PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DES ECHANTILLONS

Le prélèvement et la préparation des échantillons jouent un rôle essentiel dans le diagnostic des infections virales respiratoires par les méthodes d’immunofluorescence directe et de culture cellulaire. Les échantillons doivent être prélevés au niveau du site d’infection au moment du pic d’élimination virale de façon qu’ils fermentent autant de matières infectieuses que possible et ils doivent être préparés de façon à préserver, soit des cellules intactes exemptes de mucus pour l’examen microscopique direct des échantillons, soit la viabilité des virus dans les échantillons destinés à être mis en culture.

#### 9.1. ASPIRATIONS/SECRETIONS RHINO-PHARYNGEES

#### Prélèvement

Prélever les échantillons rhino-pharyngés dans un extracteur de mucosités par l’intermédiaire d’une sonde de taille 8. L’extracteur de mucosités et la sonde doivent être transportés dès que possible, conservés à 2-8°C et envoyés au laboratoire pour être traités le plus rapidement possible. La mise en œuvre de techniques de séparation des cellules est nécessaire pour l’immunofluorescence directe. Les échantillons ou les surnageants issus des techniques de séparation des cellules peuvent être utilisés pour l’inoculation des cultures virales.

#### Séparation des cellules

Si nécessaire, ajouter 2mL de PBS à l’échantillon avant centrifugation pour réduire la viscosité et diluer le mucus. Centrifuger l’extracteur de mucus à température ambiante (15-30°C) pendant 10 minutes à 380g. Eliminer le surnageant qui peut être utilisé pour la culture cellulaire. Remettre en suspension le culot dans 2mL de PBS et mélanger en pipetant doucement les cellules de haut en bas avec une pipette de fort diamètre, ou agiter doucement à l’aide d’un vortex, jusqu’à ce que le mucus soit dispersé et qu’il libère le matériel cellulaire. Eviter de pipeter/agiter au vortex trop vigoureusement afin de ne pas endommager les cellules. Lorsqu’une suspension uniforme est obtenue, ajouter du PBS si nécessaire, pipeter ou agiter au vortex après avoir ajouté le PBS supplémentaire afin de laver à nouveau les cellules. Eliminer toutes les particules de mucus visibles à ce stade. Le mucus en excès doit être éliminé, car il empêcherait une pénétration adéquate du réactif et pourrait se conduire à une fluorescence non spécifique.

Si les sécrétions restent dans la sonde et n’atteignent pas l’extracteur de mucosités, les extraire par lavage de la sonde avec du PBS. Un meilleur résultat sera obtenu en insérant une pipette pasteur dans l’extrémité de la sonde fixée à l’extracteur de mucosité. Aspirer le liquide adéquat dans la sonde et le faire sortir plusieurs fois jusqu’à ce que les sécrétions adhérant aux parois de la sonde se décollent. Pipeter la suspension de haut en bas jusqu’à ce que le mucus soit dispersé.

#### Préparation des lames

Après séparation des cellules, centrifuger la suspension de cellules résultante à température ambiante (15-30°C) pendant 10 minutes à 380g et éliminer le surnageant. Remettre en suspension le culot cellulaire dans suffisamment de PBS pour diluer le mucus restant, tout en conservant une haute densité cellulaire. Placer 25µl de culot cellulaire remis en suspension, dans la zone des puits sur la lame.

**REMARQUE: Il est important de préparer 2 lames pour chaque échantillon testé avec la trousse IMAGEN Respiratory Screen, une lame pour le réactif de dépistage, et une lame pour le réactif de contrôle négatif** (voir Section 10.8).

Laisser sécher l’échantillon à l’air à température ambiante (15-30°C) et fixer à l’acétone fraîche à température ambiante (15-30°C) pendant 10 minutes. Si l’échantillon n’est pas coloré immédiatement, conserver les lames à 4°C pendant une nuit, ou les congeler à –20°C pour des périodes de conservations plus longues.

**REMARQUE: Pour procéder à l’identification spécifique d’un virus, une lame supplémentaire contenant un minimum de 8 puits par échantillon est nécessaire** (voir Section 11.4).

#### 9.2. INOCULATION DES CULTURES CELLULAIRES

#### Inoculation des cultures cellulaires

Les échantillons prélevés en vue du diagnostic d’infections par le VSR les virus influenza A et B, les virus parainfluenza 1, 2 ou 3 et les adénovirus doivent être inoculés dans les lignées cellulaires utilisées en routine par le laboratoire conformément aux méthodes en vigueur dans le laboratoire. Les cultures cellulaires doivent être examinées régulièrement à la recherche de l’apparition d’un effet cytopathique (CPE) et des tests d’hémadsorption mis en œuvre à intervalle régulier.

Toute culture présentant une hémadsorption ou un CPE positifs peut être prélevée et faire l’objet d’une recherche de la présence du VSR des virus influenza A et B, des virus parainfluenza 1, 2 ou 3 et des adénovirus.

#### Préparation des Lames

A l’aide d’une pipette stérile, décoller les cellules dans le milieu de culture liquide. Faire sédimenter les cellules par centrifugation à 200g pendant 10 minutes à température ambiante (15-30°C), et éliminer le surnageant.

Laver les cellules en remettant en suspension le culot cellulaire dans du PBS (voir Section 6.1) et répéter la centrifugation. Eliminer le surnageant et remettre en suspension le culot dans un faible volume (250µL par tube de culture) de PBS pur pour maintenir une densité cellulaire élevée.

Placer des aliquotes de 25µL de suspension cellulaire dans le nombre approprié de puits sur les lames. Laisser sécher à l’air et fixer dans l’acétone fraîche pendant 10 minutes à température ambiante (15-30°C). Si l’échantillon n’est pas coloré immédiatement, conserver les lames à 4°C pendant une nuit, ou les congeler à –20°C pour des périodes de conservations plus longues.

**REMARQUE: Il est important de préparer 2 lames pour chaque échantillon testé avec la trousse IMAGEN Respiratory Screen, une lame pour le réactif de dépistage, et une lame pour le réactif de contrôle négatif** (voir Section 10.8).

**REMARQUE: Pour procéder à l’identification spécifique d’un virus, une lame supplémentaire contenant un minimum de 8 puits par échantillon est nécessaire** (voir Section 11.4).

### 10. PROCEDURE DE TEST

**SE REPORTER A LA SECTION 8.2 PRECAUTIONS TECHNIQUES, AVANT DE REALISER LE TEST.**

#### 10.1. ADDITION DU REACTIF DE DEPISTAGE ET DU REACTIF DE CONTROLE NEGATIF

Pour chaque échantillon, deux puits de préparations cellulaires

fixés sont nécessaires. Ajouter à un puits de la lame de test 25µL de réactif de dépistage, et à l’autre puits 25µL de réactif de contrôle négatif.

Sur les lames de contrôle, déposer 20µL de réactif de dépistage dans chaque puits. S’assurer que les réactifs couvrent la totalité des puits.

#### 10.2. PREMIERE INCUBATION

Incuber les lames en **chambre humide** pendant **15 minutes à 37°C. Ne pas laisser** le réactif sécher sur l’échantillon, car cela peut provoquer l’apparition d’un marquage non spécifique.

#### 10.3. LAVAGE DES LAMES

Rincez délicatement avec le PBS à l’aide d’une pissette. Ne dirigez pas le PBS directement dans les puits. Inclinez la lame vers le bas et faites couler le PBS sur l’ensemble de la lame au-dessus des puits de façon à ce que le PBS s’écoule le long du bord inférieur de la lame. Rincez délicatement la lame dans un bain-marie à agitation contenant du PBS pendant 5 minutes. Évacuez le PBS et laissez la lame sécher à l’air libre à température ambiante (15-30 °C).

#### 10.4. ADDITION DU CONJUGUE FITC ANTI-SOURIS

Ajouter 25µl de réactif FITC à chaque puits d’échantillon, et 20µL de réactif FITC au puits de chaque lame de contrôle. S’assurer que le réactif couvre la totalité du puits. Lors de l’utilisation de lames de contrôle avec des puits de diamètre inférieur à 6mm, l’emploi de 20µL de réactif est recommandé.

#### 10.5. DEUXIEME INCUBATION

Incuber les lames avec le réactif FITC en **chambre humide** pendant **15 minutes à 37°C. Ne pas laissez** le réactif sécher sur l’échantillon, car cela peut provoquer l’apparition d’un marquage non spécifique.

#### 10.6. LAVAGE DES LAMES

Rincez délicatement avec le PBS à l’aide d’une pissette. Ne dirigez pas le PBS directement dans les puits. Inclinez la lame vers le bas et faites couler le PBS sur l’ensemble de la lame au-dessus des puits de façon à ce que le PBS s’écoule le long du bord inférieur de la lame. Rincez délicatement la lame dans un bain-marie à agitation contenant du PBS pendant 5 minutes. Évacuez le PBS et laissez la lame sécher à l’air libre à température ambiante (15-30 °C).

#### 10.7. ADDITION DU LIQUIDE DE MONTAGE

Ajouter une goutte du liquide de montage au centre de chaque puits, et placer une lamelle sur le liquide de montage et l’échantillon, en évitant l’apparition de bulles d’air.

#### 10.8. LECTURE DES LAMES

Examiner au microscope par épifluorescence la totalité de la zone des puits contenant l’échantillon marqué. La fluorescence, telle qu’elle est décrite Section 11, devrait être visible à un grossissement de x200-x500. (Pour de meilleurs résultats, les lames doivent être examinées immédiatement après le marquage, mais il est possible de les conserver à 2-8°C, dans l’obscurité, pendant 24 heures maximum).

Si un résultat de dépistage positif est obtenu (voir Section 11.2), une identification spécifique du virus présent peut être effectuée sur une préparation de lame à 8 puits (voir Section 11), avec les réactifs d’immunofluorescence directe IMAGEN qui figurent dans la Section 6.1.

#### 11. INTERPRETATION DES RESULTATS

##### 11.1. CONTRÔLES

##### 11.1.1 Puits positifs de la lame de contrôle

Une fois colorés et examinés selon la procédure décrite dans la Section 10, les puits positifs de la lame de contrôle doivent présenter des cellules avec une fluorescence intracellulaire vert pomme, cytoplasmique et/ou nucléaire, qui contrastent avec le fond rouge de la coloration de contraste. Les lames de contrôle positives sont utilisées pour vérifier que la procédure de coloration a été effectuée correctement.

##### 11.1.2 Puits négatifs de la lame de contrôle

Une fois colorés et examinés selon la procédure décrite dans la Section 10, les puits négatifs positifs de la lame de contrôle doivent présenter des cellules exemptes de fluorescence intracellulaire vert pomme. Seul le fond rouge de la coloration de contraste est visible.

##### 11.2. ECHANTILLONS CLINIQUES

##### 11.2.1 Aspect des cellules infectées par le virus

Les cellules infectées marquées doivent présenter une fluorescence cytoplasmique et/ou nucléaire vert pomme. Les cellules non infectées sont colorées en rouge par la coloration de contraste au bleu Evans.

##### 11.2.2 Interprétation

Un diagnostic positif peut être posé quand une ou plusieurs cellules de l’échantillon fixé, marqué, présente le profil de fluorescence typique décrit dans la Section 11.2.1.

Un diagnostic négatif peut être posé quand les échantillons ne présentent pas de fluorescence avec le réactif de dépistage.

Pour des échantillons rhino-pharyngés, prélevés par aspiration, et marqués directement, au moins 20 cellules épithéliales (prismatiques) respiratoires non infectées doivent avoir été observés dans la zone des puits de la lame avant de pouvoir conclure à un résultat négatif. Voir Section 11.2.3 en cas de nombre insuffisant de cellules présentes.

##### 11.2.3 Nombre de cellules insuffisant

Si le nombre de cellules présentes sur la lame est insuffisant, l’échantillon clinique restant doit être centrifugé à 380g pendant 10 minutes à température ambiante (15-30°C). Remettre en suspension dans un volume plus faible (environ 50µL) de PBS avant de redistribuer (25µL) dans toute la zone des puits. Si cela n’est pas possible, demander le prélèvement d’un nouvel échantillon clinique.

##### 11.2.4 Contrôle de qualité

Une lame de contrôle positif et négatif doit être marquée et examinée à chaque utilisation des réactifs de la trousse IMAGEN Dépistage des virus respiratoires.

Les lames de contrôle fournies avec la trousse permettent de s’assurer de la performance correcte de la technique de marquage, et de la réactivité du réactif vis-à-vis du VSR, des virus influenza A et B, des virus parainfluenza 1, 2 ou 3 et des adénovirus dans les cellules infectées.

##### 11.2.5 Compte-rendu des résultats

Les lignes directrices suivantes sont recommandées pour le compte-rendu des résultats:

Résultats positifs définis dans 11.2.2:

Positif selon toute présomption pour un ou plusieurs VSR, virus influenza A et B, virus parainfluenza 1, 2 ou 3 et adénovirus. Isolement et identification spécifique à venir. Pour une identification spécifique, se référer à la Section 11.4.

Résultats négatifs définis dans 11.2.2:

Négatif selon toute présomption pour le VSR, les virus influenza A et B, les virus parainfluenza 1, 2 ou 3 et les adénovirus. Confirmation de culture à venir.

##### 11.3. CONFIRMATION PAR CULTURE CELLULAIRE

##### 11.3.1 Aspect des cellules infectées par le virus

Les cellules infectées présentent une fluorescence intracellulaire,

nucléaire et/ou cytoplasmique vert pomme et doivent être notées comme étant positives. Les cellules non infectées présentent une coloration de contraste rouge due au bleu Evans.

##### 11.3.2 Interprétation des résultats

Un diagnostic positif peut être posé quand une ou plusieurs cellules de l’échantillon fixé, marqué, présente le profil de fluorescence typique décrit dans la Section 11.3.1 après marquage.

Un diagnostic négatif peut être posé quand les échantillons fixés, colorés, ne présentent pas de fluorescence après marquage avec les réactifs.

Au moins 50 cellules non infectées de la culture cellulaire testée doivent avoir été observées dans chaque zone des puits de la lame avant de pouvoir conclure à un résultat négatif. Voir Section 11.3.4 en cas de nombre insuffisant de cellules présentes.

##### 11.3.3 Compte-rendu des résultats

Les lignes directrices suivantes sont recommandées pour le compte- rendu des résultats.

Résultats positifs définis dans 11.3.2:

Positif selon toute présomption pour un ou plusieurs VSR, virus influenza A et B, virus parainfluenza 1, 2 ou 3 et adénovirus. Identification spécifique à venir. Pour une identification spécifique, se référer à la Section 11.4.

Négatif défini dans 11.3.2:

Négatif pour le virus syncytial respiratoire, les virus influenza A et B, les virus parainfluenza 1, 2 ou 3 et les adénovirus.

##### 11.3.4 Nombre de cellules insuffisant

Si le nombre de cellules présentes sur la lame est insuffisant, l’échantillon clinique restant doit être centrifugé à 200g pendant 10 minutes à température ambiante (15-30°C). Remettre en suspension dans un volume plus faible (environ 50µL) de PBS avant de redistribuer (25µL) dans toute la zone des puits.

Si cela n’est pas possible, demander le prélèvement d’un nouvel échantillon clinique qui sera inoculé à nouveau dans des monocouches cellulaires fraîches et qui fera l’objet d’une nouvelle culture virale.

##### 11.4. IDENTIFICATION SPÉCIFIQUE DU VIRUS RESPIRATOIRE

L’identification spécifique du virus respiratoire présent peut être obtenue par confirmation des résultats positifs à l’aide des réactifs d’immunofluorescence directe IMAGEN (voir Section 6.1, pour la préparation des lames voir Section 9).

##### 12. LIMITES DE PERFORMANCE

12.1. N’utiliser que le liquide de montage fourni.

12.2. Bien que les anticorps monoclonaux utilisés dans ce test aient été produits contre les souches prototypes et sélectionnés selon leur réactivité vis-à-vis d’un épitope conservé, ils risquent de ne pas détecter les souches du virus ayant subi une variation antigénique dans la structure de l’épitope cible ou des souches nouvelles du virus.

12.3. Le réactif de dépistage et le réactif de contrôle négatif peuvent marquer de façon non spécifique des souches de *Staphylococcus aureus* contenant la protéine A. Cela est dû à l’interaction non immunologique de la protéine A avec la région Fc des anticorps monoclonaux, cette observation a déjà été rapportée pour d’autres dosages par fluorescence basés sur des anticorps monoclonaux et polyclonaux<sup>20</sup>.

12.4. L’aspect visuel de l’image fluorescente obtenue peut varier selon le microscope et la source lumineuse utilisés. Il est recommandé d’utiliser 25µL de réactif pour couvrir la surface d’un puits de 6mm de diamètre. Une réduction de ce volume peut rendre difficile le recouvrement de la surface de l’échantillon, et de ce fait conduire à une diminution de la sensibilité du test.

12.6. Les réactifs sont fournis à des concentrations de travail fixes. Les performances des tests peuvent être influencées par une dilution incorrecte, une modification des réactifs, ou par une conservation s’opérant dans des conditions différentes de celles qui sont détaillées dans la Section 5.

12.7. La trousse IMAGEN Dépistage des virus respiratoires ne peut pas être utilisée pour identifier spécifiquement les virus respiratoires. Pour être spécifiquement identifiés, les échantillons positifs doivent être testés à nouveau avec les réactifs individuels par immunofluorescence directe IMAGEN (voir Section 6).

12.8. La non-détection d’un virus par des analyses directes ou par culture cellulaire de confirmation peut provenir de divers facteurs comme un prélèvement de l’échantillon à un moment inapproprié de la maladie, un échantillonnage et/ou une manipulation incorrects, un échec de la culture cellulaire etc. Un résultat négatif ne permet d’exclure la possibilité d’une infection virale.

12.9. Les résultats des analyses doivent être interprétés en prenant en compte les informations provenant des études épidémiologiques, de l’évaluation clinique du patient et d’autres analyses diagnostiques.

12.10. De façon inhérente à la fabrication d’une lame de contrôle, il arrive parfois qu’un mélange de matériaux se produise (par ex. quelques cellules positives se retrouvent dans un puits négatif). La lame servira quand même de contrôle adapté pour déterminer la bonne exécution de la technique de coloration et la réactivité du réactif avec le VRS, les virus des grippes A et B, les virus parainfluenza 1, 2 ou 3 et l’adénovirus dans les cellules infectées.

##### 13. VALEURS ATTENDUES

Le taux de détection des virus respiratoires dépend de facteurs géographiques, climatiques et saisonniers, ainsi que par des facteurs démographiques tels que la surpopulation, les conditions socio-économiques et nutritionnelles.

De plus, des facteurs de qualité de l’échantillon, tels que le type d’échantillon testé, le moment du prélèvement de l’échantillon pendant l’infection, la manipulation et la conservation des échantillons, ainsi que les procédures utilisées pour la préparation des frottis, peuvent tous influencer le succès de l’analyse diagnostique par les techniques de détection directe.

Les virus respiratoires sont répandus dans le monde entier et peuvent causer des infections sporadiques, des épidémies ou, occasionnellement, des pandémies avec émergence de nouveaux variants antigéniques du virus. En dépit du caractère saisonnier des infections virales respiratoires, il est possible qu’au cours d’une saison, des virus tels que le virus parainfluenza 1 et 2, et influenza B, ne soient pas isolés ou détectés en raison de leur faible taux de prévalence.

**Le virus syncytial respiratoire** est associé de façon saisonnière à des infections des voies respiratoires hautes et basses. Les nouveau-nés au cours des six premiers mois de leur vie et tous les groupes de personnes immunodéprimées courent des risques particuliers. Environ 50% de tous les nouveau-nés sont atteints d’infection par le VRS au cours de la première année de leur vie<sup>21</sup>. Le VRS peut être rendu responsable de près de 20% de

toutes les infections des voies respiratoires, pendant une saison d’infections respiratoires<sup>21</sup>.

**Les virus influenza A ou B** sont à l’origine de flambées d’infections. Les taux d’infection par le virus influenza A sont influencés principalement par l’état immunitaire d’une population vis à vis des souches en circulation. Lorsqu’une proportion importante d’immunité est obtenue, le virus influenza est responsable de près de 15% des infections des voies respiratoires, mais avec l’émergence de nouvelles souches, pour lesquelles il n’existe aucune immunité ou une immunité très faible, le virus influenza peut être responsable de près de 50% de toutes les infections des voies respiratoires<sup>22</sup>.

Avec le virus influenza B, les taux les plus élevés d’atteinte sont généralement rapportés parmi les enfants en âge scolaire<sup>23</sup>.

**Les adénovirus** sont responsables de près de 5% des infections respiratoires aiguës chez les enfants de moins de 4 ans, et de près de 10% de toutes les infections respiratoires chez les enfants hospitalisés<sup>12</sup>. Les adénovirus sont parfois responsables de petites épidémies de maladies respiratoires aiguës locales chez les jeunes adultes, en particulier chez ceux qui vivent dans des conditions confinées.

**Les virus parainfluenza** sont responsables de près de 20% des infections respiratoires, chez les jeunes enfants de 2 à 4 ans, qui peuvent présenter des symptômes sévères tels qu’une laryngo-trachéo-bronchite (croup)<sup>24</sup>. Des épidémies, en particulier avec le virus parainfluenza 3, peuvent survenir chez des enfants plus âgés et chez les adultes.

Plus de 90% des nouveau-nés sont infectés par le virus parainfluenza tôt dans leur vie et des réinfections symptomatiques sont fréquentes.<sup>8</sup> Les flambées d’infections dues au virus parainfluenza 3 ont lieu durant les mois de printemps et d’été.

La détection directe des virus respiratoires dans les cellules épithéliales respiratoires permet un diagnostic rapide et pertinent sur le plan clinique, lorsque la viabilité du virus ou l’absence d’installations de cultures virales viennent limiter les possibilités de diagnostic.

Au cours de l’hiver 1994-95, les taux de prévalence ci-dessous ont été enregistrés par les trois laboratoires hospitaliers effectuant l’évaluation clinique.

Dans un Hôpital Pédiatrique de Western New York State, USA, le VRS a été identifié par immunofluorescence directe des échantillons dans 43,6% (478/1096) des échantillons respiratoires, le virus influenza de type A a été identifié par immunofluorescence directe des échantillons et par isolement en culture cellulaire dans 3,1% (34/1096) des échantillons respiratoires, et le virus influenza B a été identifié par immunofluorescence directe et isolement en culture cellulaire dans 1,1% (12/1096) des cas. Les adénovirus ont été identifiés par isolement en culture cellulaire dans 4,4% (39/883) des cas, et le virus parainfluenza a été identifié par isolement en culture cellulaire dans 2,9% (26/883) des cas (dont 2 échantillons avec le virus parainfluenza 1, 3 échantillons avec le virus parainfluenza 2 et 21 avec le virus parainfluenza 3).

Dans un hôpital du nord-ouest du Royaume Uni avec une population de patients diverse, le VRS a été identifié par immunofluorescence directe des échantillons dans 49,68% (467/940) des échantillons respiratoires. Le virus Influenza de type B a été identifié par immunofluorescence directe des échantillons, ou par isolement en culture cellulaire dans 1,7% (16/940) des échantillons respiratoires. Les adénovirus ont été identifiés par immunofluorescence directe des échantillons ou par isolement en culture cellulaire dans 1,17% (11/940) des cas. Le virus parainfluenza 1 a été identifié par immunofluorescence directe des échantillons ou par isolement en culture cellulaire dans 0,1% (1/940) des cas.

Dans un hôpital du sud-ouest du Royaume-Uni avec une population de patients diverse, le VRS a été identifié par immunofluorescence directe des échantillons dans 10,6% (195/1840) des échantillons respiratoires. Le virus influenza de type B a été identifié par immunofluorescence directe des échantillons ou par isolement en culture cellulaire dans 3,04% (56/1840) des échantillons respiratoires.

Les adénovirus ont été identifiés par isolement de la culture cellulaire dans 1,2% (22/1840) des échantillons respiratoires, et un virus parainfluenza a été identifié par immunofluorescence directe des échantillons ou par isolement en culture cellulaire dans 1,14% (21/1840) des échantillons respiratoires. D’autre part, d’autres virus ont été isolés parmi les échantillons respiratoires: Les picornavirus 1% (18/1840), les cytomégalovirus 0,38% (7/1840), les rhinovirus 1,7% (32/1840) le virus Herpès simplex de type 1 1,03% (19/1840) et le virus Herpès simplex de type 2 0,5% (1/1840).

##### 14. PERFORMANCES SPECIFIQUES

##### 14.1. ETUDES CLINIQUES

La trousse IMAGEN Dépistage des virus respiratoires a été évaluée dans le cadre de tests directs dans deux centres d’études cliniques au Royaume-Uni, l’un situé au nord-est du pays et l’autre au sud-ouest, et un centre est situé dans l’Etat de New York aux Etats-Unis. Les tests ont été faits sur des échantillons respiratoires prélevés chez des enfants et des adultes hospitalisés et présentant des symptômes d’infections respiratoires. Le test a aussi été évalué pour la détection des antigènes viraux dans les cultures cellulaires inoculées avec des échantillons respiratoires.

Les échantillons cliniques ont été prélevés au cours de l’hiver 1994 au printemps 1996, et les centres d’études ont comparé la trousse IMAGEN Dépistage des virus respiratoires avec les méthodes de référence et un test par immunofluorescence indirecte du commerce qui comportait un réactif de dépistage et des réactifs de typage individuels. Des échantillons cliniques frais et des échantillons congelés ont été utilisés au cours de ces évaluations, ainsi que des échantillons congelés datant de 1993-1994.

Les centres d’études ont réalisé ces évaluations sur 343 échantillons cliniques et sur 87 cultures cellulaires en monocouche pour confirmation de la présence de virus. Pour les échantillons directs, la trousse IMAGEN Respiratory Screen a été évaluée par rapport à un test de dépistage par immunofluorescence indirecte et culture virale du commerce.

Pour les cultures cellulaires, la trousse IMAGEN Respiratory Screen a été évaluée par rapport à un test de dépistage par immunofluorescence indirecte du commerce, et soit des tests d’inhibition de l’hémadsorption, de neutralisation virale ou par immunofluorescence directe.

##### 14.2. PERFORMANCES CLINIQUES

##### 14.2.1 Echantillons directs

Un total de 343 aspirations rhino-pharyngées (ARPs) a été évalué par les trois centres d’études. Echantillons constitués de:

144	échantillons positifs pour le VRS
11	échantillons positifs pour le virus influenza A
5	échantillons positifs pour le virus influenza B
19	échantillons positifs pour le virus parainfluenza 1
4	échantillons positifs pour le virus parainfluenza 2

26	échantillons positifs pour le virus parainfluenza 3
8	échantillons positifs pour les adénovirus
141	échantillons négatifs
5	échantillons avec des co-infections:
2	co-infections de VRS et parainfluenza 1
1	co-infection de VRS et d’adénovirus
1	co-infection d’adénovirus et de virus influenza B
1	co-infection d’adénovirus et de virus parainfluenza 3

Le Tableau 14.2.1 présente les résultats de la comparaison entre la trousse IMAGEN Respiratory Screen et un test de dépistage par immunofluorescence indirecte du commerce, par rapport à un isolement viral sur des échantillons respiratoires directs. Une corrélation de 94,1% (317/337) est obtenue pour la trousse IMAGEN Respiratory Screen par rapport à la méthode classique. La sensibilité du test est de 96,7% (205/212) par rapport à l’isolement viral.

##### Tableau 14.2.1 Comparaison de la trousse IMAGEN Respiratory Screen et d’un test de dépistage par immunofluorescence indirecte du commerce par rapport à l’isolement viral sur des échantillons respiratoires directs

	IMAGEN Respiratory Screen		Test IIF du commerce	
	+	-	+	-
<b> Isolement viral<sup>a</sup></b>	<b>205</b>	<b>7</b>	<b>207</b>	<b>5<sup>b</sup></b>
	<b>13<sup>a</sup></b>	<b>112</b>	<b>15<sup>a</sup></b>	<b>110</b>
Sensibilité relative (%)	96,7 (205/212)		97,6 (207/212)	
Intervalle de confiance à 95%	(94-99%)		(95-100%)	
Sensibilité relative (%)	89,6 (112/125)		88,0 (110/125)	
Intervalle de confiance à 95%	(83-94%)		(81-93%)	
Corrélation (%)	94,1 (317/337)		94,1 (317/337)	
Intervalle de confiance à 95%	(91-97%)		(91-97%)	

a L’isolement viral a été effectué sur les lignées cellulaires Hep-2, A549, Rein primaire de singe Rhésus, MK, HEL, RK13 ou G293, et a été confirmé par immunofluorescence indirecte spécifique et par test d’inhibition de l’hémadsorption, de neutralisation virale ou test d’immunofluorescence directe.

b Treize échantillons positifs par tests directs avec la trousse IMAGEN et par tests de typage du commerce, (Voir Tableau 14.2.4) dont:

RSV	7
Influenza A	3
Parainfluenza de type1	1
Adénovirus	2

c Deux échantillons positifs pour les adénovirus; deux échantillons positifs pour le parainfluenza de type 2; trois échantillons positifs pour le parainfluenza 3 (Voir Tableau 14.2.4).

d Quinze échantillons, parmi lesquels treize sont détaillés dans la note en bas de pageb et deux autres échantillons, positifs uniquement par IIF du commerce (Voir Tableau 14.2.4).

e Cinq échantillons négatifs par IIF du commerce, dont un virus influenza A, deux virus parainfluenza de type 2, un virus parainfluenza de type 3 et un adénovirus (Voir Tableau 14.2.4).

Le tableau 14.2.2 présente une comparaison entre la trousse IMAGEN Respiratory Screen et un test de dépistage par immunofluorescence indirecte sur des aspirations rhino-pharyngées prélevées dans chaque Centre d’études. Pour les Centres 1 et 2, tous les échantillons testés (à l’exception de 7 échantillons du Centre 2) avaient été conservés congelés. Pour le Centre 3, 121 échantillons frais ont été testés dans les 24 heures suivant le prélèvement et 68 échantillons ont été testés après avoir été conservés congelés.

##### Tableau 14.2.2 Comparaison de la trousse IMAGEN Respiratory Screen et d’un test de dépistage par immunofluorescence indirecte du commerce (Bartels VRK) sur des échantillons respiratoires

	Test IIF du commerce	
	+	-
<b>Centre d’études 1 (sud-ouest du RU) n=74</b>	<b>IMAGEN Respiratory + Screen</b>	49 0
	-	0 25
<b>Centre d’études 2 (nord-est du RU) n=80</b>	<b>IMAGEN Respiratory + Screen</b>	46 0
	-	4 <sup>a</sup> 30
<b>Centre d’études 3 (Etat de New York, Etats-Unis) n=189</b>	<b>IMAGEN Respiratory + Screen</b>	126 1 <sup>b</sup>
	-	1 <sup>a</sup> 61

f Un échantillon de culture positif pour le virus influenza A, qui a été également typé avec le test direct et par culture avec la trousse IMAGEN Influenza A.

g Comprend un échantillon du Centre 2 et un échantillon du Centre 3 enregistrés comme étant positifs uniquement avec le test de dépistage IIF du commerce.

Le Tableau 14.2.3 présente un résumé des données des trois centres d’études comparant la trousse IMAGEN Respiratory Screen avec le test de dépistage par immunofluorescence indirecte du commerce sur des aspirations rhino-pharyngées.

##### Tableau 14.2.3 Résumé de la comparaison entre la trousse IMAGEN Respiratory Screen et un test commercialisé de dépistage par immunofluorescence indirecte (Bartels VRK) sur des échantillons respiratoires

	Test IIF du commerce	
	+	-
<b>IMAGEN Respiratory Screen</b>	<b>+</b>	<b>1<sup>b</sup></b>
	<b>221</b>	<b>116</b>
Sensibilité relative	97,8% (221/226)	
Intervalle de confiance à 95%	(95-99%)	
Sensibilité relative	99,1% (116/117)	
Intervalle de confiance à 95%	(95-100%)	
Corrélation (%)	98,3% (337/343)	
Intervalle de confiance à 95%	(96-99%)	

f En prøvekultur, positiv for influenza A, som også blev typebestemt i både den direkte prøvetest og i en kultur af IMAGEN Influenza A-reagens

g Inkluderer én prøve fra Center 2 og én prøve fra Center 3, kun registreret positive i den kommercielle IIF-screeningtest

##### Tableau 14.2.4 Résultats détaillés des échantillons cités dans les notes de bas de page des Tableaux 14.2.1, 14.2.2 et 14.2.3

Note de bas de page rap- portée	Echantillon n°	Résultat Culture	Résultat Dépis-tage IMAGEN	Résultat Typage IMAGEN
---------------------------------	----------------	------------------	----------------------------	------------------------

B	8	Négatif	Positif	VRS	Positif	VRS
B	9	Négatif	Positif	VRS	Positif	VRS
B	10	Négatif	Positif	VRS	Positif	VRS
B	11	Négatif	Positif	VRS	Positif	VRS
B	12	Négatif	Positif	VRS	Equivoque	VRS
B	13	Négatif	Positif	Parainfluenza 1	Positif	Parainfluenza 1
C et E	14	Parainfluenza 3	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
C et E	15	Adénovirus 2	Négatif	Non testé	Négatif	Non testé
C et E	16	Parainfluenza 2	Négatif	D i a g n o s t i c Impossible	Négatif	?Parainfluenza 2
C et E	17	Parainfluenza 2	Négatif	Négatif	Négatif	D i a g n o s t i c Impossible
C	18	Parainfluenza 3	Négatif	?Parainfluenza 3	Positif	?Parainfluenza 3
C	19	Parainfluenza 3	Négatif	Parainfluenza 3	Positif	Parainfluenza 3
C	20	Adénovirus 4	Négatif	Négatif	Positif	Adénovirus
D et G	21	Négatif	Négatif	?Influenza A	Positif	?Influenza A
D et G	22	Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
E et F	23	Influenza A	Positif	Influenza A	Négatif	Influenza A

#### 14.2.2 Confirmation en cultures

Les centres d’études ont testé la trousse IMAGEN Dépistage des virus respiratoires sur des isolats viraux provenant d’échantillons cliniques et de souches de virus conservées.

Les échantillons cliniques ont été prélevés principalement pendant l’hiver 1994-95 et la trousse IMAGEN Dépistage des virus respiratoires a été comparée aux méthodes standard. L’isolement viral a été effectué à l’aide de cellules HEp-2, MRC-5 ou RMK et les isolats viraux ont été identifiés et confirmés par inhibition de l’hémadsorption, neutralisation virale ou immunofluorescence directe.

Un total de 87 cultures a été testé, dont 7 cultures positives pour le VRS, 10 positives pour le virus influenza A, 15 positives pour le virus influenza B, 6 positives pour le virus parainfluenza 1, 8 positives pour le virus parainfluenza 2, 5 positives pour le virus parainfluenza 3, 9 positives pour les adénovirus et 27 cultures négatives.

**Tableau 14.2.5 Comparaison de la trousse IMAGEN Respiratory Screen avec l’isolement viral et un Test IIF du commerce (Bartels VRK) pour la confirmation en culture cellulaire**

		Test IIF du commerce		Neutralisation virale	
		+	-	+	-
<b>Centre d’études 1 (sud-ouest RU) n = 32</b>	<b>I M A G E N + Respiratory - Screen</b>	17	1 <sup>a</sup> 0	18	0 14
<b>Centre d’études 3 (Etat de New York, Etats Unis) n = 52</b>	<b>I M A G E N + Respiratory - Screen</b>	39	0 0	39	0 13
<b>Oxoid (Ely) Ltd n = 3</b>	<b>I M A G E N + Respiratory - Screen</b>	3	0 0	3	0 0

a Echantillon pour lequel le VRS a été isolé et typé par culture

**Tableau 14.2.6 Résumé de la comparaison de la trousse IMAGEN Respiratory Screen avec l’isolement viral et le Test IIF du commerce (Bartels VRK) pour la confirmation en culture cellulaire**

		Test IIF du commerce		Neutralisation virale	
		+	-	+	-
<b>IMAGEN Respiratory Screen</b>	<b>+ -</b>	59	1 <sup>a</sup> 27	60	0 27
Sensibilité relative (%)		100(59/59)		100 (60/60)	
Intervalle de confiance à 95%		(94-100%)		(94-100%)	
Sensibilité relative (%)		96,4(27/28)		100 (27/27)	
Intervalle de confiance à 95%		(82-100%)		(87-100%)	
Corrélation (%)		98,9 (86/87)		100 (87/87)	
Intervalle de confiance à 95%		(94-100%)		(96-100%)	

a Echantillon pour lequel le VRS a été isolé et typé par culture

#### 14.3. RÉACTIVITE CROISÉE

Les micro-organismes détaillés dans le Tableau 14.3.1 ont été testés avec la trousse IMAGEN Respiratory Screen et n’ont présenté aucune réactivité croisée. Les études de réactivité croisée ont été effectuées à l’aide de préparations sur lames de cultures mères ou d’isolats microbiens récents.

**Tableau 14.3.1 Micro-organismes testés avec la trousse IMAGEN Respiratory Screen et trouvés non- réactifs**

Micro-organisme	Source
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	NCTC 10116 Dépôt de bouillon de culture <sup>2</sup>
<i>Bordetella pertussis</i> <sup>1</sup>	Gélose (au sang) chocolat <sup>3</sup>
<i>Branhamella catarrhalis</i> <sup>1</sup>	Gélose (au sang) chocolat <sup>3</sup>
<i>Candida albicans</i> <sup>1</sup>	Milieu fongique <sup>3</sup>
<i>Chlamydia pneumoniae</i> <sup>1</sup>	Préparation commerciale <sup>4</sup>
<i>Chlamydia psittaci</i> <sup>1</sup>	Préparation commerciale <sup>4</sup>
<i>Chlamydia trachomatis A-K, LGV1-LGV3</i> <sup>1</sup>	Préparation commerciale <sup>4</sup>
<i>Virus coxsackie A9</i>	Préparation commerciale <sup>5</sup>
<i>Virus coxsackie B1, B2, B3, B4, B5</i>	Souches mères <sup>5</sup>
<i>Cytomégalo<span>­</span>virus</i>	Cellules isolées cliniques humains <sup>5</sup>
<i>Echovirus 9, 11, 19, 22</i>	Cellules isolées cliniques humains <sup>5</sup>
<i>Virus d’Epstein-Barr</i>	Préparation commerciale utilisée dans tests sérologiques de routine <sup>4a</sup>
<i>Herpès de type 1 et 2</i>	Préparation commerciale <sup>5</sup>
<i>Legionella pneumophila</i>	Groupe sérologique1. Sac vitellin formolé. Préparation commerciale utilisé dans tests sérologiques de routine <sup>4</sup>
<i>Mycoplasma arginini</i>	NCTC 10129 Dépôt de bouillon de culture <sup>2</sup>
<i>Mycoplasma hominis</i>	NCTC 10111 Dépôt de bouillon de culture <sup>2</sup>
<i>Mycoplasma hyorhinus</i>	NCTC 10130 Dépôt de bouillon de culture <sup>2</sup>
<i>Mycoplasma orale</i>	NCTC 10112 Dépôt de bouillon de culture <sup>2</sup>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NCTC 10119 Dépôt de bouillon de culture <sup>2</sup>
<i>Mycoplasma salivarium</i>	NCTC 10113 Dépôt de bouillon de culture <sup>2</sup>
<i>Neisseria cinerea</i> <sup>1</sup>	Gélose au sang <sup>3</sup>
<i>Neisseria lactamica</i> <sup>1</sup>	Gélose au sang <sup>3</sup>
<i>Neisseria meningitidis A, B, C</i> <sup>1</sup>	Gélose au sang <sup>3</sup>
<i>Neisseria perflava</i> <sup>1</sup>	Gélose au sang <sup>3</sup>
<i>Poliovirus de type 1,2 et 3</i>	Cellules isolées cliniques humains <sup>5</sup>
<i>Pneumonie à Pneumocystis carinii</i>	Préparation commerciale utilisée dans tests sérologiques de routine <sup>4</sup>
<i>Rhinovirus</i>	Cellules isolées cliniques humains <sup>5</sup>
<i>Groupes Streptococcus A, B, C, D, F et G</i> <sup>1</sup>	Agar de Colombie <sup>3</sup>

1 Données obtenues auprès de Oxoid (Ely) Ltd.

2 Frottis préparés à partir de bouillons de culture de trois jours, centrifugés à 3000g pendant 30 minutes, lavés dans du PBS, remis en suspension dans 100µL de PBS et addition de 15µL suspension dans les puits des lames pour examen au microscope.

3 Suspensions laiteuses préparées dans du PBS à partir de milieu de culture, centrifugées, lavées, remises en suspension dans 1ml de PBS et addition de 20µL suspension dans les puits des lames pour examen au microscope.

4 Préparation des lames du commerce.

5 Frottis préparés à partir de cultures virales en tube

présentant 50% de CPE, lavées, remises en suspension dans 0,2mL de PBS et addition de 15µL suspension dans les puits des lames pour examen au microscope.

#### 15. REFERENCES

- Palumbo P.E. and Douglas Jr R.G. (1986)** Respiratory Tract Infections in S. Spector and G.J. Lancz (ed). Clinical Virology Manual. Elsevier Science Publishing Inc, New York, p 263-282.
- Ray C.G. and Minnich L.L. (1987)** Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 355-357.
- Stansfield S.K. (1987)** Acute respiratory infections in the developing world: strategies for preventing treatment and control. *Pediatric Infectious Disease* **6**: 622-629.
- Gardner P.S., Turk D.C., Aherne W.A., Bird T., Holdaway M.D., Court S.D.M.(1967)** Deaths associated with respiratory tract infection in childhood. *British Medical Journal* **4**: 316-320.
- Mathur U., Bentley D.W., Hall C.B. (1980)** Concurrent respiratory syncytial virus and influenza A infections in the institutionalised elderly and chronically ill. *Ann Intern Med* **1**: 430-431.
- Purkiss D. (1983)** Parainfluenza infections in the elderly 1976-82. *PHLS Communicable Disease Report* **83/19**: 3.
- Zaroukian M.H., Leader I. (1988)** Community-acquired pneumonia and infection with respiratory syncytial virus. *American Journal Medical Science* **295**: 218-222.
- Welliver R. (1982)** Natural history of parainfluenza virus infection in childhood. *Journal of Pediatrics* **101**: 180-187.
- Martin A.J., Gardner P.S., and McQuillin J. (1978)** Epidemiology of respiratory viral infection among paediatric inpatients over a six year period in North East England. *The Lancet* ii: 1035-1038.
- Potter C.W. (1990)** Influenza. In Principles and Practice for Clinical Virology (eds A.J. Zuckerman et al). John Wiley and Sons Ltd, Chichester, pp 213-238.
- Murphy B.R. and Webster R.G. (1990)** Orthomyxoviruses in Virology (eds B.N. Fields and D.M. Kripe) Raven Press, New York, pp 1091-11523.
- Wadell G. (1990)** Adenoviruses. In Principles and Practice of Clinical Virology (eds A.J. Zuckerman et al). John Wiley and Sons Ltd. Chapter 4 iv, pp 267-287.
- Horwitz M.S. (1985)** Adenoviral diseases: In Virology (eds B.N. Fields et al). Raven Press, New York, Chapter 24, pp 477-495.
- Shaw M.W., Arden N.H. and Maassab H. (1992)** New aspects of Influenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews* **5**: 74-92.
- Galbraith A.W. (1980)** Influenza – Recent developments in prophylaxis and treatment. *British Medical Bulletin* **41**: 381-385.
- Hall C.B., McBride J.T., Gala C.L., Hildreth S.W., Schnabel K.C. (1985)** Ribavirin treatment of respiratory syncytial viral infection in infants with underlying cardiopulmonary disease. *JAMA* **254**: 3047-3051.
- Gardner P.S. and McQuillin J. (1980)** Rapid virus diagnosis: Application of immunofluorescence (2nd Ed) Butterworth, London, pp 92-123.
- Hughes J.H., Mann D.R. and Hamparian V.V. (1988)** Detection of respiratory syncytial virus in clinical specimens by viral culture, direct and indirect immunofluorescence, and enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 588-591.
- Bartholoma N.Y. and Forbes B.A. (1989)** Successful use of shell vial centrifugation and 16 to 18 hour immunofluorescent staining for the detection of Influenza A and B in clinical specimens. *Am J Clin Pathol* **92**: 487-490.
- 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.
- Tyeryar F.J. (1983)** Report of a workshop on Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Viruses *Journal of Infectious Diseases* **148**: 588-598.
- Caul E.O. (1986)** Personal communication (on file at Oxoid (Ely) Ltd).
- Chin D.Y., Mosley W.H., Poland J.D., Rush D., Belden E.A., Johnson O. (1963)** Epidemiologic Studies of Type B influenza in 1961-1962. *American journal of Public Health* **53**: 1068-1074
- McLean, D.M., Bannatyre, R.M. and Givan, K.F. (1967)** Myxovirus dissemination by air. *Canadian medical Association Journal* **89**: 1257-59

**CE**

X7852A Mars 2017 révisé



OXOID Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, UK

Pour tout support technique, contacter le distributeur local.

Le mode d'emploi de remplacement ainsi que ses versions dans d'autres langues sont disponibles sur le site www.oxid.com/IFU