

IMAGEN™ Influenza virus A and B

REF K610511-2 

 50  

A direct immunofluorescence test for the detection of Influenza virus A and B.

Test pour la détection des virus Influenza A et B par immunofluorescence directe.

Direkter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Influenza A und B.

IMAGEN™

1 INTENDED USE

The IMAGEN™ Influenza virus A and B test is a qualitative direct immunofluorescence test for the detection and differentiation of Influenza A virus and Influenza B virus in clinical specimens or for the confirmation and differentiation of Influenza virus A and B in cell cultures.

2 SUMMARY

Influenza A and B viruses are members of the genus *Influenza virus* classified within the family *Orthomyxoviridae*¹. Influenza A virus strains infect a variety of animals including humans, horses, pigs, sea mammals and birds whereas Influenza B virus strains appear to infect humans only².

In humans Influenza A and B virus infections can cause acute and occasionally severe respiratory disease in immunocompetent and immunocompromised individuals. Influenza A and B viral infections occur in annual epidemics often with rapid onset and spread of infection. These epidemics may occur as small localised outbreaks or as worldwide epidemics depending on the type of strain prevalent³. Periodically, as a result of the ongoing evolution of Influenza A viruses, epidemics of disease occur which can have a significant impact on world health^{2,4}.

Transmission of Influenza virus infection occurs through inhalation of virus-laden droplets from respiratory secretions of symptomatic or asymptomatic carriers. Environmental conditions such as crowding enhance transmission of infection. Virus replication occurs in the ciliated columnar epithelial cells of the upper and lower respiratory tract resulting in necrosis and sloughing of cells. The period of peak viral shedding occurs from 1 day before, to 3-4 days after the onset of illness.

During the course of an influenza epidemic the prevalent virus strain may be associated with 15-50% of respiratory infections occurring in adults and children. The spectrum of respiratory disease may vary from mild upper respiratory disease to a severe pneumonia³. Acute pneumonia due to Influenza A or B viruses can be fatal particularly when associated with concomitant or secondary microbial infections in elderly or immunocompromised patients.

Influenza viruses have been associated with nosocomial outbreaks of respiratory tract infections in paediatric and geriatric wards resulting in prolonged hospitalisation and increased morbidity and mortality.

The rapid laboratory diagnosis of Influenza A or B virus infections plays an important role in patient management, influencing the use of antiviral therapy and enabling effective management and control of outbreaks^{4,5}. Diagnostic methods include direct detection of virus or viral proteins in clinical specimens (eg nasopharyngeal aspirates), isolation of viable virus in cell culture monolayers inoculated with respiratory secretions and detection of Influenza virus specific immunoglobulins. Isolation of Influenza viruses from respiratory specimens can be accomplished in cell lines such as primary rhesus monkey kidney cells or Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) using techniques such as haemadsorption or haemagglutination to identify the presence of the virus strain. A range of techniques have been used to confirm the identification of the Influenza virus isolates including haemadsorption inhibition, haemagglutination inhibition, neutralisation tests, electron microscopy or indirect immunofluorescence. These techniques are laborious, time consuming and require a degree of technical expertise which may not be available in all laboratories.

Direct immunofluorescence tests utilising specific monoclonal antibodies offer a rapid sensitive and specific method for the direct detection of Influenza viruses A and B in clinical specimens such as nasopharyngeal aspirates or for the confirmation of Influenza virus isolated in cell culture monolayers⁹. IMAGEN™ Influenza virus A and B is a direct immunofluorescence test for the detection and identification of Influenza virus strains A and B in clinical specimens or cell cultures. The test utilises species-specific monoclonal antibodies to detect epitopes of Influenza virus glycoproteins and fusion proteins specific to either Influenza virus type A or Influenza virus type B.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The IMAGEN™ Influenza virus A and B test contains monoclonal antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) specific to either Influenza A virus or Influenza B virus. These are used in a one-step direct immunofluorescence technique. Specimens are incubated with the FITC conjugated antibody reagents for 15 minutes and excess reagent is washed off with phosphate buffered saline (PBS). The stained areas are mounted and viewed microscopically using epifluorescence illumination. If either Influenza A virus or Influenza B virus is present, characteristic bright apple-green fluorescence is seen with the corresponding reagent, within the cytoplasm and nucleus of the cells, which contrasts with the red background staining of uninfected cells.

The monoclonal antibodies used in this test originated in the Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, U.S.A.

The immunogen used to raise the influenza A antibodies included strains A / Puerto Rico / 8 / 34 (H1N1) and A / Bangkok / 1 / 79 (H3N2). The immunogen used to raise the Influenza B antibodies included strains B / Lee / 40 and B / Singapore / -222 / 79.

4 DEFINITIONS

The following symbols have been used throughout the product information.

	Product code and catalogue number
	Consult the instructions for use
	Contains sufficient for <N> tests
	Manufactured by
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Use by
	Batch Code
	Storage temperature limitations

5 REAGENTS PROVIDED

 50 - Each kit contains sufficient materials for testing 50 cell culture preparations.  - The shelf-life of the kit is as indicated on the outer box label.

5.1 IMAGEN™ INFLUENZA VIRUS A AND B REAGENTS

	One Instructions For Use booklet.
	2 x 2 well positive control slides containing acetone-fixed African green monkey kidney cells (Vero) infected with either Influenza A virus or Influenza B virus on separate well areas.

One bottle of each of the following:

MOUNTING FLUID	3mL of Mounting Fluid. The Mounting Fluid contains a photobleaching inhibitor in glycerol solution (pH 10.0).
REAGENT A	1.4mL of IMAGEN™ Influenza A virus test reagent. The reagent contains purified murine monoclonal antibodies specific to Influenza A virus, conjugated to FITC. The monoclonal antibodies are targeted against the matrix protein and nucleoprotein of Influenza A.
REAGENT B	1.4mL of IMAGEN™ Influenza B virus test reagent. The reagent contains purified murine monoclonal antibodies specific to Influenza B virus conjugated to FITC. The monoclonal antibodies are targeted against the nucleoprotein and haemagglutinin protein of Influenza B.

5.2 PREPARATION, STORAGE AND RE-USE OF KIT COMPONENTS

In order to ensure optimal kit performance, it is important that all unused kit components are stored according to the following instructions.

5.3 POSITIVE CONTROL SLIDES - **POSITIVE CONTROL SLIDE**

Positive control slides are provided individually in sealed foil pouches filled with nitrogen. Store unused slides at 2-8°C. The slide should be left in its pouch for 5 minutes at room temperature (15-30°C) before opening.

Stain the slide immediately after opening.

5.4 MOUNTING FLUID - MOUNTING FLUID

Ready to use. Store at 2-8°C. The Mounting Fluid should be left at room temperature (15-30°C) for 5 minutes before use.

5.5 IMAGEN™ INFLUENZA A AND B REAGENTS - REAGENT AREAGENT B

Ready to use. Store unused Reagent A and B at 2-8°C. Reagents should be stored in the dark at 2-8 °C and left at room temperature (15-30°C) for 5 minutes before use.

6 ADDITIONAL REAGENTS

6.1 REAGENTS

Fresh acetone (for fixation).

Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.5 for washing stained specimens and for specimen preparation.

6.2 ACCESSORIES

The following products are intended for use in conjunction with IMAGEN™ Influenza Virus A and B. Contact your local Oxoid subsidiary or distributor for further information.

General

Teflon coated glass microscope slides with single 6mm diameter well (100 slides per box) available from your local Oxoid subsidiary or distributor, (Code No. S611430-6).

IMAGEN™ Influenza Positive Control Slide (Code No. S611230-2).

7 EQUIPMENT

The following equipment is required:

Precision pipette and disposable tips to deliver 25µL

Wash bath

Coverslips suitable to cover 6mm diameter well

Non-fluorescing immersion oil

Epifluorescence microscope with filter system for FITC (maximum excitation wavelength 490nm, mean emission wavelength 520nm) and x200-x500 magnification

Incubator at 37°C

Low speed centrifuge

For Direct Specimens

Mucus extractor (nasopharyngeal specimens only)

For Culture Confirmation

Sterile swabs, viral transport medium (VTM) and container suitable for collection, transportation and culture of Influenza viruses

Cell lines recommended for culture and isolation of Influenza viruses

8 PRECAUTIONS

IVD - For *in vitro* diagnostic use. Anyone performing an assay with this product must be trained in its use and must be experienced in laboratory procedures.

8.1 SAFETY PRECAUTIONS

8.1.1 The IMAGEN™ Influenza A and B reagents contain 15mmol/L sodium azide, which is a poison. Sodium azide may react with copper and lead plumbing systems to form explosive metal azides. Always dispose of materials containing azide by flushing with large quantities of water.

8.1.2 Influenza viruses A and B on the Positive Control Slide have been processed by fixation methods such that they contain no detectable live micro organisms, however, the slide should be handled and disposed of as though potentially infectious.

8.1.3 If infection with a novel influenza A virus is suspected based on current clinical and epidemiological screening criteria recommended by public health authorities, specimens should be collected with appropriate infection control precautions for novel virulent influenza viruses and sent to central reference laboratories for testing. Viral culture should not be attempted in these cases unless a biological safety level 3 facility or above is available to receive and culture specimens.

8.1.4 Evans blue dye is present in the reagent. This may be carcinogenic and contact with the skin should be avoided.

8.1.5 Care should be taken when using the Mounting Fluid as it may cause skin irritation. Skin should be flushed with water if contact occurs.

8.1.6 Do not eat, drink, smoke, store or prepare foods, or apply cosmetics within the designated work area.

8.1.7 Do not pipette materials by mouth.

8.1.8 Wear disposable gloves while handling clinical specimens and infected cells, always wash hands after working with infectious materials.

8.1.9 Dispose of all clinical specimens in accordance with local legislation.

8.10 Safety data sheet available for professional user on request.

8.2 TECHNICAL PRECAUTIONS

8.2.1 Components must not be used after the expiry date printed on the labels. Do not mix or interchange different batches/lots of reagent.

8.2.2 The reagents are provided at fixed working concentrations. Test performance will be adversely affected if the reagents are stored under conditions other than those detailed in Section 5.

8.2.3 Prepare fresh Phosphate Buffered Saline (PBS) as required on the day of use.

8.2.4 Washing in PBS is necessary. Use of other wash solutions such as tap water or distilled water will compromise test results.

8.2.5 Avoid microbial contamination of reagents.

8.2.6 The reagents must not be frozen.

9 COLLECTION AND PREPARATION OF SPECIMENS^{7,8}

The collection and preparation of specimens is of fundamental importance in the diagnosis of respiratory virus infection by direct immunofluorescence and cell culture methods. Specimens must be collected from the site of infection during the time of peak viral shedding so that they contain as much infected material as possible and prepared in such a way as to preserve either intact cells which are free from adherent mucus etc for direct microscopy of specimens or the viability of viruses in specimens to be cultured.

9.1 CLINICAL SPECIMENS

9.1.1 Nasopharyngeal aspirates/secretions

Collection

Collect specimens from the nasopharyngeal region into a mucus extractor through a size 8 feeding tube. The mucus extractor and tubing should be maintained at 2-8°C and sent to the laboratory as soon as possible for processing.

Cell Separation

If necessary add 2mL phosphate buffered saline (PBS) to the specimen prior to centrifugation to reduce the viscosity and dilute the mucus. Centrifuge the mucus extractor at room temperature (15-30°C) for 10 minutes at 380g. Remove the supernatant which can be used for cell culture. Resuspend the cell deposit in 2mL PBS and gently pipette the cells up and down with a wide bore pipette, or vortex gently, until the mucus is broken up and cellular material released. Avoid vigorous pipetting or vortexing to prevent damage to the cells. When a smooth suspension has been obtained add further PBS as required, pipetting or vortexing after addition of the extra PBS to wash the cells further. Remove and discard any visible flecks of mucus remaining at this point. Excess mucus must be removed as it will prevent adequate penetration of the Reagent and may result in non-specific fluorescence.

If all secretions remain in the feeding tube and none reach the mucus extractor, wash all secretions out of the tube into PBS. This is best achieved by inserting a pasteur pipette into the end of the tube which was attached to the mucus extractor. Suck up the appropriate fluid into the tube and expel it repeatedly until the secretions adhering to the wall of the tube have been dislodged. Pipette the suspension up and down until the mucus has been adequately broken up.

Preparation of Slides

After completing the cell separation process, centrifuge the resultant cell suspension at room temperature (15-30°C) for 10 minutes at 380g and discard the supernatant. Resuspend the cell deposit in sufficient PBS to dilute any remaining mucus, while at the same time maintaining a high cell density. Place 25µL of the resuspended cell deposit into the well areas on slide.

Allow the specimen to air dry thoroughly at room temperature (15-30°C) and fix in fresh acetone at room temperature (15-30°C) for 10 minutes. If the specimen is not stained immediately store at -70°C until needed. Stored slides should be tested within two weeks of preparation as deterioration may occur on long-term storage.

9.2 CELL CULTURE

Inoculation of Cell Cultures

Specimens collected for the diagnosis of Influenza virus infections should be inoculated into the cell lines routinely used in the laboratory according to established laboratory methods. Cell cultures should be examined regularly for the appearance of cytopathic effect (CPE) and haemadsorption tests performed at regular intervals. Any haemadsorption positive cultures, or cell cultures showing CPE, can be harvested and tested for the presence of Influenza A or Influenza B viruses

Preparation of Slides

Scrape the cell sheet into the culture medium using a sterile pipette. Deposit the cells by centrifugation at 200g for 10 minutes at room temperature (15-30°C) and remove the supernatant.

Wash the cells by resuspending the cell deposit in (PBS) and repeat the centrifugation. Remove the supernatant and resuspend the cell deposit in a small volume of fresh PBS to maintain a high cell density.

Place 25µL aliquots of the cell suspension on to individual wells on the slides. Allow to air dry thoroughly and fix in fresh acetone at room temperature (15-30°C) for 10 minutes. If the specimen is not stained immediately, store at 4°C overnight or at -70°C until needed. Stored slides should be tested within 2 weeks of preparation as deterioration may occur on long-term storage.

10 TEST PROCEDURE

PLEASE REFER TO SECTION 8.2 TECHNICAL PRECAUTIONS BEFORE PERFORMING TEST PROCEDURE.

10.1 ADDITION OF REAGENT

Add 25µL of Reagent A to one area of the fixed cell preparation on a 6mm well and 25µL of Reagent B to another area of fixed cell preparation on another 6mm well on the slide (see Section 6) or to appropriate wells on a Positive Control Slide. Ensure that the reagents cover the entire well areas.

10.2 FIRST INCUBATION

Incubate the slides with reagents in a **moist chamber** for **15 minutes** at **37°C**. **Do not** allow the reagent to dry on the specimen as this will cause the appearance of non-specific staining.

10.3 WASHING THE SLIDE

Wash off excess reagent with phosphate buffered saline (PBS) then gently wash the slide in an agitating bath containing PBS for 5 minutes. Drain off PBS and allow the slide to air dry at room temperature (15-30°C).

10.4 ADDITION OF MOUNTING FLUID

Add one drop of Mounting Fluid to the centre of each well and place a coverslip over the Mounting Fluid and specimen ensuring that no air bubbles are trapped.

10.5 READING THE SLIDE

Examine the entire well areas containing the stained specimen using an epifluorescence microscope. Fluorescence, as described in Section 11, should be visible at x200-x500 magnification. (For best results specimens should be examined immediately after staining, but may be stored at 2-8°C, in the dark, for up to 24 hours).

11 INTERPRETATION OF TEST RESULTS

11.1 CONTROLS

11.1.1 Positive Control Slides

When stained and viewed as described in Section 10, the Positive Control Slide should show cells with intracellular nuclear and/or cytoplasmic apple-green fluorescence contrasting against a background of counterstained material. These cells are slightly larger than respiratory epithelial cells but show similar nuclear and/or cytoplasmic fluorescence when infected with Influenza virus. Positive Control Slides should be used to check that the staining procedure has been satisfactorily performed.

These slides are prepared from Influenza virus strains in cell culture monolayers and will only provide adequate control for the test procedure and not the specimen processing steps. Specimen processing procedures should be controlled using clinical material.

11.1.2 Negative Control

If a negative control slide is required, uninfected intact cells of the type used for the culture and isolation of Influenza virus are recommended. The cells should be prepared and fixed as described in Section 9.2 and stained as described in Section 10.

11.2 CLINICAL SPECIMENS

11.2.1 Appearance of Influenza virus infected cells

Intracellular, nuclear and/or cytoplasmic granular apple-green fluorescence is seen in respiratory epithelial cells with Influenza virus.

Uninfected cells stain red with the evans blue counterstain.

11.2.2 Interpretation

A positive diagnosis is made when one or more cells in the fixed stained specimen show specific fluorescence, described in Section 11.2.1 with either Influenza A or Influenza B virus reagent.

A negative diagnosis is made when fixed, stained specimens do not exhibit fluorescence with either reagent.

For directly stained nasopharyngeal aspirate specimens, at least 20 uninfected respiratory epithelial cells must be observed before a negative result is reported. See Section 11.2.3 if insufficient cells are present.

For specimens collected from other sites (eg sputa) at least 50 uninfected respiratory epithelial cells are observed before a negative result is reported.

11.2.3 Insufficient cells

If insufficient cells are present in the slide, the remainder of the clinical specimen should be centrifuged at 380g for 10 minutes at room temperature (15-30°C). Resuspend the cells in a smaller volume of PBS before re-distribution (25µL) on the well areas. Alternatively, a repeat clinical specimen should be requested.

11.3 CELL CULTURE CONFIRMATION

11.3.1 Appearance of Influenza virus infected cells

Infected cells will demonstrate intracellular, nuclear and/or cytoplasmic apple-green fluorescence and should be recorded positive for Influenza.

Uninfected cells will be counterstained red with evans blue counterstain and should be recorded as negative for Influenza.

11.3.2 Interpretation of Results

A positive diagnosis is made when one or more cells in the fixed, stained specimen show the typical fluorescence pattern described in Section 11.3.1 with either IMAGEN™ Influenza A or Influenza B reagents.

At least 50 uninfected cells of the cell culture being tested must be present in the slide well before a negative result is reported. See Section 11.2.3 if insufficient cells are present.

11.3.3 Insufficient Cells

If insufficient cells are present on the slide, the remainder of the clinical specimen should be centrifuged at 200g for 10 minutes at room temperature (15-30°C). Re-suspend the cells in a smaller volume of PBS before re-distribution (25µL) on the well area. Alternatively, a repeat clinical specimen should be requested.

12 PERFORMANCE LIMITATIONS

12.1 Use only the Mounting Fluid provided.

12.2 The visual appearance of the fluorescence image obtained may vary due to the type of microscope and light source used.

12.3 It is recommended that 25µL of reagent is used to cover a 6mm diameter well area. A reduction in this volume may lead to difficulties in covering the specimen area and may reduce sensitivity.

12.4 All reagents are provided at fixed working concentrations. Test performance may be affected if the reagents are modified in any way or not stored under recommended conditions.

12.5 Failure to detect Influenza viruses may be a result of factors such as collection of specimen at an inappropriate time of the disease, improper sampling and/or handling of specimen, failure of cell culture etc. A negative result does not exclude the possibility of Influenza virus infection.

12.6 The IMAGEN™ Influenza virus A and B test detects type specific Influenza A and B antigens. It cannot be used for identification of subtypes of Influenza A and B.

12.7 The presence of Influenza virus in nasopharyngeal secretions does not necessarily exclude the possibility of concomitant infection with other pathogens. Test results should be interpreted in conjunction with information available from epidemiological studies, clinical diagnosis of the patient and other diagnostic procedures.

12.8 Non-specific staining is sometimes observed as an artifact in immuno-chemical test due to binding between antibody Fc regions and protein A antigen found in the cell wall of some strains of *Staphylococcus aureus*⁹. The IMAGEN™ Influenza virus A and B test reagent has been modified so that it does not bind to the protein A of Cowan 1 strain of *Staphylococcus aureus*.

12.9 Test results should be interpreted in conjunction with information available from epidemiological studies, clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.

12.10 Individuals who have received nasally administered influenza A vaccine may have positive test results for up to three days after vaccination.

13 EXPECTED VALUES

In temperate zones Influenza outbreaks caused by either type A or type B take place mainly in late Autumn to early Spring, but in tropical areas the season of prevalence is less well defined.

In general, the infection rates for Influenza A virus in non-immunised children and adults are similar, with the clinical manifestations of infection showing an inverse correlation with age^{10,11,12}. During Influenza B virus epidemics the highest attack rates are usually reported amongst school age children^{13,14}. During the course of a winter when the prevalent Influenza virus is one which has been in circulation for some years and therefore when a large proportion of the population are immune, Influenza viruses can be found to account for approximately 15% of all respiratory infections. When a new antigenic strain of Influenza virus has been introduced into the community, and a large proportion of those exposed have no immunity, that strain of Influenza virus may cause up to 50% of all respiratory infections. In a recognised defined outbreak the detection rate can approach 100% if both serology and antigen detection methods are used for diagnostic purposes¹⁵.

14 SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 REACTIVITY OF THE MONOCLONAL ANTIBODIES

The monoclonal antibodies utilised in this test have been shown to be type specific by immunoassay. The Influenza A virus antibodies will detect H₁N₁, H₂N₂, H₃N₂ Influenza A virus strains, and the Influenza B virus antibodies will detect various Influenza B viruses collected between 1940 and 1984^{5,16,17}.

14.2 CLINICAL STUDIES

The IMAGEN™ Influenza virus A and B test was evaluated for direct use at 2 clinical trial centres on nasopharyngeal secretions and sputa collected from children and adults hospitalised with symptoms of respiratory infection. The test was also evaluated at 5 trial centres on cell culture of stock strains of virus to confirm the presence of Influenza viruses. These studies were carried out in the USA, Europe and the Far East.

The trial centres performed direct tests on 213 clinical specimens and on 227 specimens for confirmation of cell culture. Strains detected by the monoclonal antibodies in the IMAGEN™ Influenza virus A and B test included 22 different strains of Influenza virus A and 20 different strains of Influenza virus B. The standard (reference) methods used were an indirect immunofluorescence test performed directly on specimens and virus culture in baboon kidney cells, MDCK cells or embryonated hens' eggs. Positive virus cultures were confirmed by indirect immunofluorescence using either monoclonal or polyclonal antibodies, or haemagglutination inhibition (HAI).

14.3.1 Direct specimens

Clinical specimens were collected mainly during the winters of 1984-1987 and the trial centres compared the IMAGEN™ Influenza virus A and B test with standard methods. Both fresh clinical specimens and previously frozen specimens were used for these evaluations.

A result by the reference method was considered positive if either the cell culture or indirect immunofluorescence on direct specimen was positive. This allowed for the presence of non-viable virus to be detected by fluorescence or for cell-free virus to be detected by cell culture.

Table 14.3.1 shows the results obtained with the IMAGEN™ Influenza virus A reagent. The overall incidence of Influenza in these populations was 24.9%. The IMAGEN™ Influenza A results correlated with the standard tests in 211 cases (99.1%). Test sensitivity was 96.2% (51/53) and specificity 100% (160/160), assuming that the standard tests were 100% sensitive and specific. The predictive values for positive and negative results were 100% (51/51) and 98.8% (160/162) respectively.

Sensitivity, specificity and predictive values were calculated as previously described¹⁸.

Table 14.3.2 shows the results with the IMAGEN™ Influenza virus B reagent. The overall incidence of Influenza B in these populations was 7.0%. This reflects the low prevalence of Influenza B in Europe during the clinical trials. The IMAGEN™ Influenza B results correlated with the standard tests in 210 cases (98.6%). Test sensitivity was 86.7% (13/15) and specificity 99.5% (197/198). The predictive values for positive and negative results were 92.9% (13/14) and 98.9% (197/199) respectively.

There was no evidence that the IMAGEN™ Influenza virus A reagent cross-reacted with Influenza virus B, or that the Influenza virus B reagent cross-reacted with Influenza virus A. No specimen was positive by both reagents.

Table 14.3.1 Comparison of test results of the IMAGEN™ Influenza virus A reagent used directly on clinical specimens with the standard tests

TEST RESULTS				
Standard Method IMAGEN™ Influenza virus A	Neg	Pos	Pos	Neg
	Neg	Pos	Neg	Pos
Centre 1	59	35	1	0
Centre 2	101	16	1	0
TOTAL No. of Specimens (213)	160	51	2	0

Table 14.3.2 Comparison of test results of the IMAGEN™ Influenza virus B reagent used directly on clinical specimens with the standard tests

TEST RESULTS

Standard Method IMAGEN™ Influenza virus B	Neg	Pos	Pos	Neg
	Neg	Pos	Neg	Pos
Centre 1	81	12	1	1
Centre 2	116	1	1	0
TOTAL No. of Specimens (213)	197	13	2	1

14.3.2 Culture confirmation

Five trial centres tested the IMAGEN™ Influenza virus A and B test on clinical isolates and stock strains isolated in cell culture. Virus isolation was performed using either primary or secondary baboon monkey kidney cells, or in Madin-Darby canine kidney cells (MDCK). Cell cultures were washed in PBS prior to being spotted on to slides (see Section 9.2). The slides were fixed in acetone and then tested by the IMAGEN™ Influenza virus A and B reagents. Both fresh clinical isolates and previously frozen specimens were used for this evaluation.

A total of 227 cultures were evaluated which included 54 cultures positive for Influenza virus A and 30 cultures positive for Influenza virus B. Cell culture isolates were confirmed by either immunofluorescence or haemagglutination inhibition (HAI).

The results (Tables 14.3.3 and 14.3.4) indicate that the Influenza virus A reagent detected all Influenza A viruses isolated (sensitivity 100%) and the Influenza virus B reagent detected all Influenza B viruses isolated (sensitivity 100%).

The specificity of both reagents was 100%.

Table 14.3.3 Comparison of test results of the IMAGEN™ Influenza virus A reagent for culture confirmation with the standard tests

TEST RESULTS				
Standard Method IMAGEN™ Influenza virus A	Neg	Pos	Pos	Neg
	Neg	Pos	Neg	Pos
Centre 1	59	13	0	0
Centre 2	27	1	0	0
Centre 3	43	13	0	0
Centre 4	23	22	0	0
Centre 5	21	5	0	0
TOTAL No. of Specimens (227)	173	54	0	0

**Table 14.3.4 Comparison of test results of the IMAGEN™
Influenza virus B reagent for culture
confirmation with the standard tests**

TEST RESULTS

Standard Method IMAGEN™ Influenza virus B	Neg	Pos	Pos	Neg
	Neg	Pos	Neg	Pos
Centre 1	69	3	0	0
Centre 2	25	3	0	0
Centre 3	54	2	0	0
Centre 4	27	18	0	0
Centre 5	22	4	0	0
TOTAL No. of Specimens (227)	197	30	0	0

14.4 CROSS REACTIVITY

The IMAGEN™ Influenza virus A and B test was performed against preparations of other viruses and organisms likely to be present in respiratory secretions or cell cultures. All organisms tested (Table 14.4) were negative with both IMAGEN™ Influenza virus A and B reagents.

Table 14.4 Organisms tested in the IMAGEN™ Influenza virus A and B Test and found to be non-reactive

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Adenovirus types 1-5 & 7</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Mycoplasma orale</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma hyorhinus</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Neisseria meningitidis A</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria meningitidis B</i>
<i>Coxsackie virus types A9 & B4</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Echovirus types 3, 6, 9, 11 & 22</i>	<i>Neisseria cinerea</i>
<i>Epstein-Barr virus</i>	<i>Parainfluenza virus types 1, 2 & 3</i>
<i>Foamy virus</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>
<i>Herpes simplex virus types 1 & 2</i>	<i>Polio virus types 1 and 2</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Respiratory syncytial virus</i>
<i>Measles virus</i>	<i>Rhinovirus</i>
<i>Mumps virus</i>	<i>Simian virus types 5 and 40</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Streptococcus gps A,B,C,D F G</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Varicella zoster virus</i>

1 INTERET

Le test IMAGEN™ Influenza virus A et B est un test qualitatif d'immunofluorescence directe pour la détection et la différenciation du virus influenza A et du virus influenza B dans des échantillons cliniques, ainsi que la confirmation et la différenciation des virus Influenza A et B dans les cultures cellulaires.

2 RESUME

Les virus influenza A et B appartiennent au genre *Influenza virus* classés au sein de la famille des *Orthomyxoviridae*¹. Les souches de virus influenza A infectent un grand nombre d'espèces animales dont les êtres humains, les chevaux, les cochons, les mammifères marins et les oiseaux alors que les souches de virus influenza B semblent n'infecter que les êtres humains².

Chez les êtres humains, les infections à virus influenza A et B peuvent entraîner des maladies respiratoires aiguës et occasionnellement graves chez les sujets immunocompétents et immunodéfectifs. Les infections virales de l'influenza A et B se manifestent sous forme d'épidémies annuelles souvent accompagnées d'une installation et d'une diffusion rapides de l'infection. Ces épidémies peuvent être très localisées ou, au contraire, être répandues à l'ensemble de la planète, selon le type de souche prévalente³. L'évolution continue des virus influenza A aboutit, périodiquement, à des épidémies qui peuvent avoir un impact considérable sur la santé mondiale^{2,4}.

La transmission des infections à virus Influenza se fait par inhalation de gouttelettes chargées de virus provenant de sécrétions respiratoires de sujets porteurs symptomatiques ou asymptomatiques. Certaines conditions environnementales, telle qu'une concentration de population, facilitent la transmission de l'infection. La réplication du virus se produit dans les cellules épithéliales prismatiques vibratiles de l'appareil respiratoire supérieur et inférieur, et entraîne des nécroses et des mues cellulaires. La période d'excrétion virale maximale se situe du premier jour avant jusqu'à 3-4 jours après l'installation de la maladie.

Au cours d'une épidémie à influenza, la souche prévalente du virus peut être aller de pair avec 15-50% des infections respiratoires observées chez les adultes et les enfants. Le spectre des maladies respiratoires peut varier de la maladie respiratoire supérieure bénigne à la pneumonie grave². La pneumonie aiguë due aux virus influenza A et B peut être mortelle, particulièrement lorsqu'elle survient en même temps que des infections microbiennes concomitantes ou secondaires chez des patients âgés ou immunodéficients.

Les virus influenza ont été associés à des épidémies nosocomiales d'infections de l'appareil respiratoire dans les services pédiatriques et gériatriques, entraînant une hospitalisation prolongée et une augmentation de la morbidité et de la mortalité.

Le diagnostic rapide en laboratoire des infections dues aux virus influenza A et B joue un rôle important dans le traitement du patient, influençant l'emploi de thérapie antivirale et permettant de combattre et de contrôler efficacement les épidémies^{3,5}. Parmi les méthodes de diagnostic, on compte la détection directe du virus ou des protéines virales dans des échantillons cliniques (par exemple, des aspirations nasopharyngiennes), l'isolement du virus viable dans des monocouches de culture cellulaire inoculées au moyen de sécrétions respiratoires ainsi que la détection des immunoglobulines spécifiques du virus influenza.

L'isolement des virus influenza dans des échantillons respiratoires peut se réaliser dans des lignées de cellules telles que les cellules primaires de rein de singe rhésus ou des cellules de rein de chien Madin-Darby (MDCK), avec des techniques telles que l'hémadsorption ou l'hémagglutination. De nombreuses techniques sont utilisées pour confirmer l'identification des isolats de virus influenza parmi lesquelles l'inhibition de l'hémadsorption, l'inhibition de l'hémagglutination, des tests de neutralisation, la microscopie électronique ou l'immunofluorescence indirecte. Ces techniques laborieuses demandent beaucoup de temps et exigent un degré de compétence technique élevé qui ne se trouve pas forcément dans tous les laboratoires.

Les tests d'immunofluorescence directe utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques constituent une méthode sensible, spécifique et rapide pour détecter les virus influenza A et B dans des échantillons cliniques tels que les aspirations nasopharyngiennes, ou pour confirmer la présence de virus influenza isolé dans des monocouches de culture cellulaire⁶. Le test IMAGENTM Influenza virus A et B est un test d'immunofluorescence direct conçu pour détecter et identifier les souches de virus influenza A et B dans des échantillons cliniques ou des cultures cellulaires. Ce test utilise des anticorps monoclonaux spécifiques d'espèce pour détecter des épitopes de glycoprotéines du virus influenza et des protéines de fusion spécifiques au virus influenza de type A ou B.

3 PRINCIPE DU TEST

Le test IMAGENTM Influenza virus A et B contient des anticorps monoclonaux spécifiques des virus influenza de type A ou B conjugués à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), utilisés dans le cadre d'une technique d'immunofluorescence directe en une étape. Les échantillons sont incubés avec les réactifs contenant les anticorps conjugués au FITC pendant 15 minutes, puis l'excès de réactif est ensuite éliminé par lavage à l'aide d'une solution saline tamponnée (PBS). L'observation des zones colorées s'effectue après montage entre lame et lamelle, au microscope, sous un éclairage épifluorescent.

Si l'un des virus influenza, de type A ou de type B, est présent, on distingue une fluorescence caractéristique vert-pomme vif qui apparaît avec le réactif correspondant, à l'intérieur du cytoplasme et du noyau des cellules contaminées, et qui contraste avec la coloration rouge des cellules non infectées.

Les anticorps monoclonaux utilisés dans ce test ont été produits par le Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Géorgie, Etats-Unis.

L'immunogène utilisé pour accroître le taux des anticorps anti-influenza A comporte les souches A / Puerto Rico / 8 / 34 (H1N1) et A / Bangkok / 1 / 79 (H3N2). L'immunogène utilisé pour accroître le taux des anticorps anti-influenza B comporte les souches B / Lee / 40 et B / Singapore / -222 / 79.

4 DEFINITIONS

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

	Code du produit et référence du catalogue
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour <N> tests
	Fabricant
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Limite de température de stockage

 50 - Chaque kit comprend suffisamment de réactifs pour tester 50 ou préparations de cultures cellulaires.  - La date de péremption du kit est indiquée sur l'étiquette extérieure de la boîte.

5.1 REACTIFS DU TEST IMAGEN™ INFLUENZA VIRUS A ET B



Un fascicule d'Instructions.

POSITIVE CONTROL SLIDE

2 lames de contrôle positif à 2 puits contenant, à la fois, des cellules de rein de singe vert d'Afrique (Véro), fixées à l'acétone, infectées par le virus influenza de type A ou par le virus influenza de type B séparément dans un puits chacun.

Un flacon de:

MOUNTING FLUID

3mL de liquide de montage. Le liquide de montage contient un agent inhibant photodécolorant dans une solution de glycérol (pH 10.0).

REAGENT A

1,4mL de réactif pour le test IMAGEN™ du virus influenza de type A. Le réactif est composé d'anticorps murins monoclonaux purifiés, spécifiques du virus influenza de type A, conjugués au FITC. Les anticorps monoclonaux sont dirigés contre la protéine matricielle et la nucléoprotéine du virus Influenza A.

REAGENT B	1,4mL du réactif pour le test IMAGEN™ du virus influenza de type B. Le réactif est composé d'anticorps murins monoclonaux purifiés, spécifiques du virus influenza de type B, conjugués au FITC. Les anticorps monoclonaux sont dirigés contre la nucléoprotéine et la protéine d'hémagglutinine du virus Influenza B.
------------------	--

5.2 PREPARATION, STOCKAGE ET REUTILISATION DES COMPOSANTS DU KIT

Pour assurer des performances optimales du kit, il est important de stocker les composants non utilisés conformément aux instructions suivantes:

5.3 LAMES DE CONTROLE POSITIF	-
--------------------------------------	---

Les lames sont fournies séparément enveloppées dans des pochettes aluminium scellées et remplies d'azote. Les lames non utilisées doivent être stockées entre 2-8°C. La pochette contenant la lame à utiliser doit rester à température ambiante (15-30°C) pendant 5 minutes avant de l'ouvrir.

Colorez la lame immédiatement après ouverture.

5.4 LIQUIDE DE MONTAGE	MOUNTING FLUID
-------------------------------	-----------------------

Prêt à l'usage. Conserver le liquide de montage non utilisé entre 2-8°C. Le flacon de liquide de montage doit rester à température ambiante (15-30°C) pendant 5 minutes avant utilisation.

5.5 REACTIFS IMAGEN™ INFLUENZA A ET B -

Prêt à l'usage. Conserver les réactifs A et B non utilisés entre 2-8°C. Les réactifs doivent être conservés à l'abri de la lumière entre 2-8°C et rester à température ambiante (15-30°C) pendant 5 minutes avant utilisation.

6 REACTIFS NON FOURNIS

6.1 REACTIFS

Acétone frais (pour la fixation)

Solution saline tamponnée (PBS), pH 7,5, pour le lavage des échantillons marqués et la préparation des lames.

6.2 ACCESSOIRES

Les produits suivants sont destinés à être utilisés conjointement au test IMAGEN™ Influenza virus A et B. Pour tous renseignements supplémentaires, veuillez vous adresser à votre filiale Oxoid ou distributeur locaux.

Généralités

Lames pour microscope en verre recouvertes de téflon avec un seul puits de 6mm de diamètre (100 lames par boîte), disponibles auprès de votre filiale ou distributeur Oxoid, (Code S611430-6)

IMAGEN™ Influenza Positive Control Slide (Code. S611230-2).

7 MATERIEL

Le matériel suivant est nécessaire:

Pipette de précision et embouts jetables pour des quantités de 25µL

Bain de lavage

Lamelles adaptées à un puits de 6mm de diamètre

Huile d'immersion non fluorescente

Microscope épifluorescent avec filtre pour FITC (longueur d'onde d'excitation maximale 490nm, longueur d'onde d'émission moyenne 520nm) et lentilles pour amplification x200-x500

Incubateur à 37°C

Centrifugeuse à vitesse réduite

Pour échantillons directs

Extracteur de mucosités (échantillons nasopharyngiens uniquement)

Pour confirmation de culture

Ecouvillons stériles et milieu de transport viral (VTM) et récipient adapté au prélèvement, au transport et à la culture des virus Influenza

Lignées de cultures cellulaires recommandées pour la culture et l'isolement des virus Influenza

8 PRECAUTIONS

IVD - Pour diagnostic *in vitro*. L'utilisateur doit maîtriser les procédures générales de laboratoire et être spécifiquement formé à l'emploi de ce test.

8.1 MESURES DE SECURITE

8.1.1 Le réactif IMAGEN™ Influenza virus A et B contient 15mmol/L d'azide de sodium, un agent chimique extrêmement toxique susceptible de réagir avec les parties en cuivre ou en plomb des tuyauteries pour former des azides métalliques extrêmement explosifs. Au moment de jeter les solutions contenant de l'azide de sodium, rincer abondamment à l'eau.

8.1.2 Bien que les lames témoins positifs pour l'influenza A et B aient été fixées et ne contiennent donc plus de micro organismes vivants, elles doivent être manipulées et considérées comme échantillons potentiellement infectés.

8.1.3 Si une infection par un nouveau virus influenza A est suspectée sur la base des critères de dépistage clinique et épidémiologique actuels recommandés par les autorités sanitaires, des spécimens doivent être recueillis en prenant les précautions relatives au contrôle des infections adaptées à un nouveau virus influenza virulent, et envoyés aux laboratoires centraux de référence pour analyse. Dans de tels cas, la culture virale ne doit pas être entreprise à moins qu'une installation bénéficiant d'un niveau de sécurité biologique 3 ou supérieur soit disponible pour recevoir les spécimens et procéder à la culture.

8.1.4 Le réactif contient du bleu d'Evans. Cette substance pouvant être cancérogène, éviter tout contact avec la peau.

8.1.5 Le liquide de montage doit être utilisé avec précaution car il peut provoquer des irritations cutanées. En cas de contact avec la peau, rincer abondamment à l'eau.

8.1.6 Ne pas manger, boire, fumer, conserver ni préparer de la nourriture, ni se maquiller sur les lieux d'utilisation.

8.1.7 Ne pas pipéter les substances à la bouche.

8.1.8 Porter des gants jetables pour manipuler les échantillons cliniques et les cellules infectées, et toujours se laver les mains après avoir travaillé avec des substances infectieuses.

8.1.9 L'élimination de tous les échantillons cliniques doit avoir lieu conformément à la législation en vigueur.

8.10 ne fiche de sécurité destinée aux professionnels est disponible sur demande.

8.2 PRECAUTIONS TECHNIQUES

8.2.1 Ne pas utiliser les composants après la date de péremption indiquée sur les étiquettes. Ne pas mélanger ou échanger différents lots de réactifs.

8.2.2 Les réactifs sont fournis prêts à l'emploi, à des concentrations prédéterminées. Les performances pourraient être affectées en cas de non respect des conditions de conservation décrites dans la Section 5.

8.2.3 Préparer le volume de PBS nécessaire le jour le l'utilisation.

8.2.4 Le lavage doit être obligatoirement effectué dans la PBS. L'utilisation de toute autre solution de lavage telle que de l'eau du robinet ou distillée compromet 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 PREPARATION DES ECHANTILLONS ^{7,8}

Le prélèvement et la préparation des échantillons sont prépondérants dans le cadre du diagnostic d'une infection respiratoire virale par immunofluorescence directe, ainsi que par les méthodes de culture cellulaire.

Les échantillons doivent être collectés sur le site de l'infection, en période d'excrétion virale maximale, de façon à contenir le plus de matériel infecté possible, et être préparés de manière à garder intactes les cellules qui sont débarrassées de mucosités adhérentes etc pour observer les échantillons directement au microscope, ou la viabilité des virus dans les échantillons destinés à une culture cellulaire.

9.1 ECHANTILLONS CLINIQUES

9.1.1 Aspiration/sécrétions nasopharyngiennes

Prélèvement

Prélever les sécrétions dans la zone nasopharyngienne, dans un extracteur de mucosités, à l'aide d'un tube d'alimentation de dimension 8. L'extracteur de mucosités et le tube doivent être maintenus entre 2-8°C et envoyés au laboratoire aussitôt que possible pour traitement.

Séparation des cellules

Le cas échéant, ajouter à l'échantillon 2mL de solution saline tamponnée (PBS) avant la centrifugation, de manière à réduire la viscosité et à diluer les mucosités. Centrifuger l'extracteur de mucus à température ambiante (15-30°C) pendant 10 minutes à 380g. Éliminer le liquide surnageant, qui peut servir pour la culture cellulaire. Remettre le dépôt cellulaire en suspension dans 2mL de PBS et pipéter doucement les cellules de haut en bas, à l'aide d'une pipette de large diamètre, ou agiter légèrement à l'aide du vortex, jusqu'à ce que le mucus se dissolve et libère la substance cellulaire. Éviter de pipéter ou d'agiter au vortex vigoureusement, afin de ne pas endommager les cellules. Dès qu'une suspension uniforme apparaît, ajouter, si nécessaire, un peu de PBS, et pipéter ou agiter au vortex après addition éventuelle de PBS, afin de laver les cellules. Éliminer et jeter toutes les particules de mucus restantes à ce stade. L'excès de mucus doit être éliminé car il risque d'empêcher la pénétration adéquate du réactif, produisant ainsi une fluorescence non spécifique.

Si toutes les sécrétions restent dans le tube d'alimentation et n'atteignent pas l'extracteur de mucosités, évacuer les sécrétions du tube par lavage et les verser dans du PBS. Pour ce faire, insérer une pipette pasteur dans l'extrémité du tube attachée à l'extracteur de mucus. Aspirer le liquide adéquat dans le tube et l'expulser plusieurs fois jusqu'à ce que les sécrétions adhérant aux parois du tube soient délogées. Pipéter la suspension de haut en bas jusqu'à dissolution adéquate du mucus.

Préparation des lames

Une fois le processus de séparation des cellules terminé, centrifuger la suspension cellulaire ainsi obtenue à température ambiante (15-30°C) pendant 10 minutes à 380g et éliminer le liquide surnageant. Remettre le dépôt de cellules en suspension dans une quantité suffisante de PBS, afin de diluer le mucus restant, tout en maintenant une importante densité cellulaire. Mettre 25µL de dépôt cellulaire remis en suspension dans le puits sur la lame.

Laisser sécher complètement l'échantillon à l'air libre et le fixer à l'acétone frais, à température ambiante (15-30°C) pendant 10 minutes. S'il l'échantillon n'est pas marqué immédiatement, le conserver à 4°C pendant la nuit ou le congeler à -70°C, jusqu'à utilisation. Les lames conservées doivent être testées dans les deux semaines à dater de la préparation car une conservation prolongée peut engendrer des détériorations.

9.2 CULTURE CELLULAIRE

Inoculation des cultures cellulaires

Les échantillons prélevés en vue du diagnostic d'infections dues au virus Influenza doivent être inoculés dans les lignées cellulaires habituellement utilisées par le laboratoire en fonction des méthodes établies. Les cultures cellulaires doivent être examinées régulièrement pour vérifier l'aspect du CPE et des tests d'hémadsorption doivent être effectués à intervalles réguliers. Toute culture positive à l'hémadsorption ou culture cellulaire indiquant un CPE, peut être collectée et testée pour la présence des virus Influenza A ou B.

Préparation des lames

Décoller la lignée cellulaire et la placer dans le milieu de culture liquide à l'aide d'une pipette stérile. Former un culot de cellules par centrifugation à 200g, pendant 10 minutes, à température ambiante (15-30°C) et éliminer le surnageant. Laver les cellules en remettant le dépôt cellulaire en suspension dans la solution saline tamponnée (PBS) et répéter la centrifugation. Éliminer le surnageant et remettre le dépôt cellulaire en suspension dans un petit volume de PBS frais afin de maintenir une densité cellulaire élevée.

Mettre des aliquotes de 25µL de suspension cellulaire dans chaque puits des lames. Laisser sécher complètement à l'air libre et fixer dans de l'acétone frais à température ambiante (15-30°C), pendant 10 minutes. S'il l'échantillon n'est pas marqué immédiatement, le conserver à 4°C pendant la nuit, ou le congeler à -70°C jusqu'à utilisation. Les lames conservées doivent être testées dans les deux semaines qui suivent sa préparation car une conservation prolongée peut engendrer des détériorations.

10 MODE OPERATOIRE

VEUILLEZ CONSULTER LA SECTION 8.2, PRÉCAUTIONS D'EMPLOI, AVANT DE RÉALISER LE TEST.

10.1 ADDITION DE REACTIF

Déposer 25µL de réactif A sur une zone de la préparation de cellules fixées dans un puits de 6mm et 25µL de réactif B sur une autre zone de la préparation de cellules fixées et dans un autre puits de 6mm (voir Section 6). Vérifier si le réactif couvre toute la surface du puits.

10.2 PREMIERE INCUBATION

Incuber les lames contenant les réactifs pendant **15 minutes à 37°C**, dans une **chambre humide**. **Ne pas** laisser sécher le réactif sur l'échantillon, car cela provoquerait l'apparition d'un marquage non spécifique.

10.3 LAVAGE DE LA LAME

Éliminer l'excès de réactif par lavage en utilisant la solution saline tamponnée (PBS), puis laver la lame avec précaution dans un bain sous agitation contenant du PBS, pendant 5 minutes. Laisser égoutter le PBS et laisser sécher la lame à l'air libre et à température ambiante (15-30°C).

10.4 AJOUT DE LIQUIDE DE MONTAGE

Ajouter une goutte de liquide de montage au centre de chaque puits et placer une lamelle, en évitant la formation de bulles d'air sous la lamelle.

10.5 LECTURE DE LA LAME

Examiner les puits contenant l'échantillon coloré dans son ensemble, en utilisant un microscope à épifluorescence. Comme indiqué à la Section 11, une amplification de x200-x500 permet de visualiser la fluorescence. (Pour obtenir des résultats optimaux, les échantillons doivent en principe être examinés immédiatement après le marquage, mais peuvent être conservés entre 2-8°C, à l'abri de la lumière, jusqu'à 24 heures).

11 INTERPRETATION DES RESULTATS

11.1 CONTROLES

11.1.1 Lames de contrôle positif

Une fois colorée et examinée conformément aux instructions de la Section 10, la lame de contrôle positif doit présenter des cellules avec une fluorescence nucléaire et/ou cytoplasmique intracellulaire vert-pomme, contrastant avec la couleur rouge du contre-colorant. Ces cellules sont légèrement plus grandes que les cellules épithéliales respiratoires, mais présentent une fluorescence cytoplasmique et/ou nucléaire similaire lorsqu'elles sont contaminées par le virus Influenza. Les lames de contrôle positif doivent servir à vérifier si la procédure de marquage a été réalisée correctement.

Ces lames sont préparées à partir des souches du virus Influenza présentes dans les monocouches de culture cellulaire et elles ne constituent un contrôle adéquat que pour la procédure de test et non pour les étapes de traitement des échantillons. Les procédures de traitement des échantillons doivent être contrôlées à l'aide du matériel clinique.

11.1.2 Contrôle négatif

Si un contrôle négatif s'avère nécessaire, il est recommandé d'utiliser des cellules intactes non contaminées du même type que celles utilisées pour la culture et l'isolement du virus Influenza. Les cellules doivent être préparées et fixées conformément aux indications de la Section 9.2 et colorées comme indiqué à la Section 10.

11.2 ECHANTILLONS CLINIQUES

11.2.1 Aspect des cellules contaminées par le virus Influenza

Une fluorescence granulaire intracellulaire, nucléaire et/ou cytoplasmique vert-pomme apparaît dans les cellules épithéliales respiratoires contaminées par le virus Influenza.

Les cellules non contaminées se colorent en rouge au contact du bleu d'Evans, le contre-colorant.

11.2.2 Interprétation des résultats

Le diagnostic est positif lorsqu'une ou plusieurs cellule(s) dans l'échantillon coloré et fixé, présente(nt) une fluorescence caractéristique (voir Section 11.2.1) avec le réactif du virus Influenza de type A ou de type B.

Le diagnostic est négatif lorsque les échantillons fixés colorés ne présentent de fluorescence avec aucun des réactifs.

En ce qui concerne les échantillons d'aspirations nasopharyngiennes colorés directement, un minimum de 20 cellules épithéliales respiratoires non infectées doit être visible pour permettre de conclure à un résultat négatif. Voir Section 11.2.3 s'il n'y a pas suffisamment de cellules.

Pour les échantillons collectés sur d'autres sites (par ex. des expectorations), un minimum de 50 cellules épithéliales respiratoires non infectées doit être visible pour permettre de conclure à un résultat négatif.

11.2.3 Quantité de cellules insuffisante

S'il n'y a pas suffisamment de cellules sur la lame, centrifuger le reste de l'échantillon clinique à 380g, pendant 10 minutes à température ambiante (15-30°C). Remettre les cellules en suspension dans un plus petit volume de PBS avant répartition (25µL) sur la lame. Le cas échéant, il est conseillé de prélever un nouvel échantillon.

11.3 CONFIRMATION DE LA CULTURE CELLULAIRE

11.3.1 Aspect des cellules contaminées par le virus Influenza

Une fluorescence intracellulaire, nucléaire et/ou cytoplasmique, vert-pomme apparaît dans les cellules infectées qui doivent être notées comme étant contaminées par le virus Influenza.

Les cellules non contaminées se colorent en rouge au contact du, bleu d'Evans, le contre-colorant.

11.3.2 Interprétation des résultats

Le diagnostic est positif lorsqu'au moins une cellule dans l'échantillon fixé et coloré affiche le type de fluorescence décrit à la Section 11.3.1. après marquage à l'aide du réactif IMAGEN™ Influenza A ou B.

Pour pouvoir conclure à un résultat négatif, il est nécessaire de relever un minimum de 50 cellules non infectées dans le puits de la lame contenant la culture cellulaire testée. Voir Section 11.3.3 s'il n'y a pas suffisamment de cellules.

11.3.3 Quantité de cellules insuffisante

S'il n'y a pas suffisamment de cellules sur la lame, centrifuger le reste de l'échantillon clinique à 200g, pendant 10 minutes, à température ambiante (15-30°C). Remettre les cellules en suspension dans un plus petit volume de PBS avant répartition (25µL) sur la lame. Le cas échéant, il est conseillé de prélever un nouvel échantillon.

12 LIMITES DU TEST

12.1 Utiliser exclusivement le liquide de montage fourni.

12.2 L'apparence de l'image de fluorescence obtenue peut varier en fonction du type de microscope et de la source lumineuse utilisés.

12.3 Il est recommandé d'utiliser 25µL de réactif pour couvrir la surface d'un puits de 6mm de diamètre. Si ce volume est réduit, il peut s'avérer difficile de couvrir la surface de l'échantillon, au risque de diminuer la sensibilité.

12.4 Tous les réactifs sont fournis prêts à l'emploi. Les performances pourraient être affectées en cas de modification des réactifs par l'utilisateur ou de non respect des conditions de conservation.

12.5 Le prélèvement d'échantillons à un moment inapproprié de la maladie, l'échantillonnage et/ou la manipulation incorrects des échantillons, l'échec de la culture cellulaire, etc. sont autant de facteurs qui peuvent empêcher la détection des virus Influenza. Un résultat négatif n'exclut pas pour autant la possibilité d'une contamination par les virus Influenza.

12.6 Le test IMAGEN™ Influenza virus A et B détecte les antigènes spécifiques du type influenza A et B. Il ne peut pas être utilisé pour l'identification des sous-types de virus influenza A et B.

12.7 La présence du virus influenza dans les sécrétions nasopharyngiennes n'exclut pas nécessairement la possibilité d'une infection concomitante avec d'autres pathogènes. Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations fournies par les études épidémiologiques, l'évaluation clinique du patient et autres procédures de diagnostic.

12.8 Dans les tests immunochimiques, une coloration non spécifique est parfois observée; il s'agit d'un artefact attribuable à la liaison entre des régions Fc de l'anticorps et l'antigène de la protéine A qui se trouve dans la paroi cellulaire de certaines souches de *Staphylococcus aureus*². Le test IMAGEN™ Influenza virus A et B a été modifié de sorte qu'il ne se lie pas à la protéine A de la souche Cowan 1 du *Staphylococcus aureus*.

12.9 Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations fournies par les études épidémiologiques, l'évaluation clinique du patient et autres procédures de diagnostic.

12.10 Les individus qui ont reçu un vaccin anti-influenza A administré par voie nasale sont susceptibles de présenter des tests positifs pendant trois jours après la vaccination.

13 VALEURS NORMALES

Dans les zones tempérées, les épidémies d'Influenza, provoquées soit par le virus de type A soit par celui de type B, ont lieu principalement en fin d'automne et au début du printemps alors que dans les zones tropicales, les saisons de prévalence sont moins bien définies.

En général, les taux d'infection par le virus Influenza de type A chez des enfants non immunisés et des adultes, sont similaires avec les manifestations cliniques d'infection inversement proportionnelles à l'âge^{10,11,12}. Durant les épidémies dues au virus influenza de type B, on observe le nombre de cas le plus élevé parmi les enfants d'âge scolaire^{13,14}. Durant l'hiver, lorsque le virus Influenza répandu correspond à un virus en circulation depuis quelques années, et, par conséquent, lorsqu'une large part de la population est immune, les virus Influenza peuvent être responsables d'environ 15% de toutes les infections respiratoires.

Lorsqu'une nouvelle souche antigénique de virus Influenza est introduite dans la communauté, et qu'une large part exposée de celle-ci n'a pas d'immunité, cette souche de virus Influenza peut être responsable de jusqu'à 50% de la totalité des infections respiratoires. Dans le cas d'une épidémie précise reconnue, le taux de détection peut approcher les 100% si les méthodes de sérologie et de détection d'antigènes sont toutes deux utilisées à des fins diagnostiques¹⁵.

14 PERFORMANCES SPECIFIQUES CARACTERISTIQUES

14.1 REACTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

On a constaté, par test immunologique, que les anticorps monoclonaux utilisés dans ce test étaient de type spécifique. Les anticorps du virus Influenza de type A détectent les souches H₁N₁, H₂N₂, H₃N₂ du virus Influenza de type A, et les anticorps du virus Influenza de type B détectent différents virus Influenza de type B prélevés entre 1940 et 1984^{6,16,17}.

14.2 ETUDES CLINIQUES

Le test IMAGEN™ Influenza virus A et B a été évalué par utilisation directe dans 2 centres d'études cliniques, sur des sécrétions nasopharyngiennes et sur des expectorations prélevées sur des enfants et des adultes hospitalisés et présentant des symptômes d'infections respiratoires. Ce test a également été évalué dans 5 centres d'études en cultures cellulaires de souches mères de virus par confirmation de la présence des virus Influenza. Ces études ont été menées aux USA, en Europe et en Extrême-Orient.

Les centres d'étude ont effectué des tests directs sur 213 échantillons cliniques et sur 227 échantillons par confirmation de culture. Les souches détectées par les anticorps monoclonaux dans le test IMAGEN™ Influenza virus A et B comprenaient 22 souches différentes de virus Influenza de type A et 20 souches différentes de virus Influenza de type B. Les méthodes standard (référence) utilisées consistaient en un test d'immunofluorescence indirecte effectué directement sur des échantillons et une culture de virus dans des cellules de rein de babouin, des cellules MDCK ou des oeufs de poules fécondés. Les cultures de virus positives ont été confirmées par immunofluorescence indirecte en utilisant soit des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, soit l'inhibition d'hémagglutination (HAI).

14.3.1 Echantillons directs

Les échantillons cliniques ont été prélevés principalement au cours des hivers de 1984-1987 et les centres d'études ont comparé le test IMAGEN™ Influenza virus A et B avec les méthodes standard. Des échantillons cliniques frais ainsi que des échantillons précédemment congelés ont été utilisés pour ces évaluations.

Un résultat était considéré comme positif selon la méthode de référence lorsque la culture cellulaire ou l'immunofluorescence indirecte sur échantillon direct était positive. Cela permit de détecter la présence de virus non viables par fluorescence ou de détecter un virus débarrassé de cellules par culture cellulaire.

Le tableau 14.3.1 présente les résultats du test IMAGEN™ Influenza virus A. Le taux de prévalence de l'Influenza au sein de ces populations atteint 24,9%.

Les résultats du test IMAGEN™ Influenza A correspondent à ceux qui ont été obtenus dans le cadre des tests standard pour 211 cas (soit 99,1%). La sensibilité du test atteint 96,2% (51/53) et sa spécificité 100% (160/160), en supposant que les tests standard ont une sensibilité et une spécificité de 100%. Les valeurs prospectives pour les résultats positifs et négatifs atteignent respectivement 100% (51/51) et 98,8% (160/162).

La sensibilité, la spécificité et les valeurs prospectives ont été calculées comme décrit précédemment¹⁸.

Le tableau 14.3.2 présente les résultats obtenus par le test IMAGEN™ Influenza virus B. Le taux de prévalence de l'influenza B au sein de ces populations atteint 7,0%. Ceci reflète la faible prévalence de l'influenza B en Europe lors des études cliniques. Les résultats du test IMAGEN™ Influenza B correspondent à ceux qui ont été obtenus dans le cadre des tests standard pour 210 cas (98,6%).

La sensibilité du test atteint 86,7% (13/15) et sa spécificité 99,5% (197/198). Les valeurs prospectives pour les résultats positifs et négatifs atteignent respectivement 92,9% (13/14) et 98, 9% (197/199).

Il n'apparaît pas que le réactif IMAGEN™ Influenza virus A ait une réaction croisée avec le virus Influenza de type B, ou que le réactif du virus Influenza de type B ait une réaction croisée avec le virus Influenza de type A. Aucun échantillon n'a été révélé positif par les deux réactifs.

Tableau 14.3.1 Comparaison des résultats obtenus avec le test IMAGEN™ Influenza virus A utilisé directement sur échantillons cliniques et ceux des tests standard

TEST RESULTATS				
Méthode standard IMAGEN™ Influenza virus A	Nég	Pos	Pos	Neg
	Nég	Pos	Nég	Pos
Centre 1	59	35	1	0
Centre 2	101	16	1	0
N° TOTAL d'échantillons (213)	160	51	2	0

Tableau 14.3.2 Comparaison des résultats obtenus avec le test IMAGEN™ Influenza virus B utilisé directement sur échantillons cliniques et ceux des tests standard

TEST RESULTATS				
Méthode standard IMAGEN™ Influenza virus B	Nég	Pos	Pos	Nég
	Nég	Pos	Nég	Pos
Centre 1	81	12	1	1
Centre 2	116	1	1	0
N° TOTAL d'échantillons (213)	197	13	2	1

14.3.2 Confirmation de la culture cellulaire

Cinq centres d'études ont testé le test IMAGEN™ Influenza virus A et B sur des isolats cliniques et des souches mères isolées en culture cellulaire. L'isolement du virus a été effectué en utilisant soit des cellules primaires ou secondaires de rein de babouin, soit des cellules de rein de chien Madin-Darby (MDCK). Les cultures cellulaires ont été lavées dans du PBS avant d'être transférées sur les lames (voir Section 9.2). Les lames ont été fixées dans l'acétone puis testées à l'aide des réactifs du test IMAGEN™ Influenza virus A et B. Des isolats cliniques frais ainsi que les échantillons précédemment congelés ont tous deux été utilisés pour cette évaluation.

Un total de 227 cultures a été évalué dont 54 cultures positives pour le virus Influenza de type A et 30 cultures positives pour le virus Influenza de type B. Les isolats de cultures cellulaires ont été confirmés soit par immunofluorescence soit par inhibition d'hémagglutination (HAI).

Les résultats de ces études (Tableaux 14.3.3 et 14.3.4) indiquent que le réactif du virus Influenza de type A a détecté tous les virus Influenza de type A isolés (sensibilité de 100%) et que le réactif du virus Influenza de type B a détecté tous les virus Influenza B isolés (sensibilité de 100%).

La spécificité des deux réactifs a été de 100%.

Tableau 14.3.3 Comparaison des résultats obtenus par le test IMAGEN™ Influenza virus A et par les tests standard pour la confirmation de culture

TEST RESULTATS				
Méthode standard IMAGEN™ Influenza virus A	Nég	Pos	Pos	Nég
	Nég	Pos	Nég	Pos
Centre 1	59	13	0	0
Centre 2	27	1	0	0
Centre 3	43	13	0	0
Centre 4	23	22	0	0
Centre 5	21	5	0	0
N° TOTAL d'échantillons(227)	173	54	0	0

Tableau 14.3.4 Comparaison des résultats obtenus par le test IMAGEN™ Influenza virus B et par les tests standard pour la confirmation de culture

Méthode standard IMAGEN™ Influenza virus B	Nég	Pos	Pos	Nég
	Nég	Pos	Nég	Pos
Centre 1	69	3	0	0
Centre 2	25	3	0	0
Centre 3	54	2	0	0
Centre 4	27	18	0	0
Centre 5	22	4	0	0
N° TOTAL d'échantillons(227)	197	30	0	0

14.4 REACTIONS CROISEES

Le test IMAGEN™ Influenza virus A et B a été réalisé sur des préparations composées d'autres virus et organismes susceptibles d'être présents dans les sécrétions respiratoires ou cultures cellulaires. Tous les organismes testés (Tableau 14.4) se sont révélés négatifs avec le test IMAGEN™ Influenza virus A et B.

**Tableau 14.4 Organismes testés par le test IMAGEN™
Influenza virus A et B et s'étant révélés non
réactifs**

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Adenovirus</i> types 1-5 et 7	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Mycoplasma orale</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma hyorhinus</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Neisseria meningitidis A</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria meningitidis B</i>
<i>Coxsackie virus</i> types A9 et B4	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Echovirus</i> types 3, 6, 9, 11 et 22	<i>Neisseria cinerea</i>
<i>Virus d'Epstein-Barr</i>	<i>Virus parainfluenza</i> types 1, 2et 3
<i>Rétrovirus humain spumeux (HFV)</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>
<i>Virus de l'Herpes simplex</i> types 1 et 2	<i>Virus de la polio</i> types 1 et 2
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Virus respiratoire syncytial</i>
<i>Virus de la rougeole</i>	<i>Rhinovirus</i>
<i>Virus des oreillons</i>	<i>Virus simien</i> types 5 et 40
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Streptococcus</i> gps A,B,C,D F G
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Virus Varicella zona</i>

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der IMAGEN™ Influenzavirus A und B-Test ist ein qualitativer, direkter Immunfluoreszenztest zum Nachweis und zur Differenzierung von Influenza A- und Influenza B-Viren in klinischen Proben oder zur Bestätigung und Differenzierung von Influenzavirus A und B in Zellkulturen.

2 EINFÜHRUNG

Influenza A- und B-Viren gehören zur Gattung der Influenzaviren innerhalb der Familie der Orthomyxoviridae¹. Influenza A-Virusstämme infizieren Menschen und eine Vielzahl von Tieren, wie Pferde, Schweine, Meeressäuger und Vögel, während Influenza B-Virusstämme nur Menschen zu infizieren scheinen².

Beim Menschen können Influenza A- und B-Virusinfektionen sowohl bei immunkompetenten als auch bei abwehrgeschwächten Patienten akute und teilweise ernsthafte Atemwegserkrankungen verursachen. Influenza A- und B-Virusinfektionen treten jährlich in Epidemien auf, wobei die Infektionen oft schnell ausbrechen und sich rasant ausbreiten. Die Epidemien können, abhängig vom Typ des prävalenten Virusstamms, als örtlich begrenzte Ausbrüche oder als weltweite Epidemien auftreten³. Als Folge andauernder Evolution der Influenza A-Viren kommt es regelmäßig zu Krankheitsepidemien, die eine signifikante Auswirkung auf die Weltgesundheit haben können^{2,4}.

Die Übertragung der Influenza-Virusinfektionen erfolgt durch Einatmung virushaltiger Tröpfchen aus Atemwegssekreten symptomatischer oder asymptomatischer Virusträger. Umweltbedingungen, etwa größere Menschenansammlungen, können die Übertragung von Infektionen fördern. Die Virusreplikation findet im Flimmerepithel der oberen und unteren Atemwege statt und verursacht Zellnekrosen und Schorfbildung. Die Freisetzung der Viren (viral shedding) ist im Zeitraum von 1 Tag vor bis zu 3-4 Tage nach Auftreten der Erkrankung am höchsten.

Während einer Influenza-Epidemie kann der prävalente Virusstamm mit 15-50% der Atemwegsinfektionen bei Erwachsenen und Kindern assoziiert werden. Das Spektrum der Atemwegserkrankungen reicht von leichten Erkrankungen der oberen Atemwege bis zu schweren Pneumonien³. Akute Pneumonien aufgrund von Influenza A- oder B-Viren können besonders dann fatal sein, wenn sie bei älteren oder abwehrgeschwächten Patienten mit begleitenden oder sekundären mikrobiellen Infektionen einhergehen.

Besonders auf Kinderstationen und in geriatrischen Abteilungen werden Influenzaviren mit nosokomialen Ausbrüchen von Atemwegsinfektionen assoziiert, die lange Krankenhausaufenthalte und erhöhte Erkrankungs- und Sterblichkeitsraten zur Folge haben.

Die unverzügliche Labordiagnose von Influenza A- oder B-Virusinfektionen ist für die Behandlung der Patienten wichtig, weil sie die antivirale Therapie beeinflusst und eine wirksame Kontrolle der Krankheitsausbrüche ermöglicht^{4,5}. Zu den diagnostischen Methoden gehört der direkte Nachweis der Viren oder der Virusproteine in klinischen Proben (z. B. nasopharyngealen Absaugsekreten), die Isolierung lebensfähiger Viren auf Einschicht-Zellkulturen, die mit Atemwegssekreten inokuliert wurden und der Nachweis Influenzavirus-spezifischer Immunglobuline. Die Isolierung von Influenzaviren aus Atemwegssekreten erfolgt auf Zelllinien, wie primären Nierenzellen vom Rhesusaffen oder Madin-Darby-Nierenzellen vom Hund (MDCK); zum Nachweis des Virusstammes werden Techniken wie Hämadsorption oder Hämagglutination eingesetzt. Zur Bestätigung der Identifikation der isolierten Influenza-Viren eignen sich Techniken wie Hämadsorptionshemmtests, Hämagglutinationshemmtests, Neutralisationstests, die Elektronenmikroskopie oder die indirekte Immunfluoreszenz. Diese Verfahren sind arbeits- und zeitaufwendig und erfordern ein gewisses Maß technischer Erfahrung, das möglicherweise nicht in allen Laboratorien vorhanden ist.

Direkte Immunfluoreszenztests, bei denen spezifische monoklonale Antikörper zur Anwendung gelangen, bieten eine schnelle, empfindliche und spezifische Methode zum direkten Nachweis von Influenzaviren A und B in klinischen Proben wie nasopharyngealen Absaugsekreten oder zur Bestätigung isolierter Influenzaviren auf Einschicht-Zellkulturen⁶. IMAGEN™ Influenzavirus A und B ist ein direkter Immunfluoreszenztest zum Nachweis und zur Identifikation von Influenzaviren der Stämme A und B in klinischen Proben oder Zellkulturen. Im Test gelangen speziesspezifische monoklonale Antikörper zur Anwendung, die Epitope von Influenzavirus-Glykoproteinen und Fusionsproteinen, spezifisch für Influenzavirus Typ A bzw. Influenzavirus Typ B, nachweisen.

3 TESTPRINZIP

Der IMAGEN™ Influenzavirus A und B-Test enthält mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierte monoklonale Antikörper, die für Influenzavirus Typ A bzw. Typ B spezifisch sind. Diese Antikörper werden in einem direkten Einschnitt-Immunfluoreszenztest eingesetzt. Die Proben werden mit den FITC-konjugierten Antikörpern 15 Minuten inkubiert und überflüssiges Reagenz wird durch Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) entfernt. Die angefärbten Flächen werden eingedeckt und mikroskopisch mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Falls Influenzaviren des Typs A bzw. des Typs B vorliegen, ist mit dem entsprechenden Reagenz in Zytoplasma und Nukleus der Zellen eine charakteristische, helle apfelgrüne Fluoreszenz zu beobachten, die im Kontrast zur roten Hintergrundfärbung nicht infizierter Zellen steht.

Die in diesem Test verwendeten monoklonalen Antikörper stammen aus dem Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, U.S.A.

Das zum Heranzüchten der Influenza-A-Antikörper verwendete Immunogen enthielt die Stämme A / Puerto Rico / 8 / 34 (H1N1) und A / Bangkok / 1 / 79 (H3N2). Das zum Heranzüchten der Influenza-B-Antikörper verwendete Immunogen enthielt die Stämme B / Lee / 40 und B / Singapur / 222 / 79.

4 DEFINITIONEN

Die nachfolgenden Symbole wurden überall in der Produktbeschreibung angewandt:

-  REF Produktcode und Bestellnummer
-  i Gebrauchsanweisung beachten
-  N Inhalt ausreichend für „N“ Ansätze
-  Hersteller
-  IVD *In-Vitro*-Diagnostikum
-  Verwendbar bis
-  LOT Chargenbezeichnung
-  2°C – 8°C Zulässiger Temperaturbereich

5 GELIEFERTE REAGENZIEN

 50 - Jeder Testkit enthält ausreichend Reagenzien für die Durchführung des Tests an 50 Patientenproben oder an 50 Zellkulturpräparationen.  - Die Haltbarkeit des Testkits ist auf dem äußeren Verpackungsetikett vermerkt.

5.1 IMAGEN™ INFLUENZA A- UND INFLUENZA B-REAGENZIEN

 Eine Gebrauchsanleitung.

POSITIVE CONTROL SLIDE	2 x als Positivkontrolle vorgesehene Objektträger mit 2 Vertiefungen und Azeton-fixierten Nierenzellen von afrikanischen grünen Affen (Vero), die in den separaten Testarealen mit Influenza A-Virus bzw. Influenza B-Virus infiziert sind.
-------------------------------	---

Jeweils ein Fläschchen der folgenden Reagenzien:

MOUNTING FLUID	3mL Eindeckmedium. Das Eindeckmedium enthält eine Hemmsubstanz gegen lichtbedingtes Ausbleichen in einer Glycerinlösung (pH 10,0).
-----------------------	--

REAGENT A	1,4mL IMAGEN™ Influenza A Virus-Testreagenz. Das Reagenz enthält für Influenza A-Viren spezifischen, FITC konjugierten, gereinigten, murinen monoklonalen Antikörper. Die monoklonalen Antikörper sind gegen das Matrixprotein und Nukleoprotein des Influenza A-Virus gerichtet.
------------------	---

REAGENT B	1,4mL IMAGEN™ Influenza B Virus-Testreagenz. Das Reagenz enthält für Influenza B-Viren spezifischen, FITC konjugierten, gereinigten, murinen monoklonalen Antikörper. Die monoklonalen Antikörper sind gegen das Nukleoprotein und Hämagglutininprotein des Influenza B-Virus gerichtet.
------------------	--

5.2 ANSETZEN, LAGERUNG UND ERNEUTE VERWENDUNG DER KIT-KOMPONENTEN

Um optimale Leistung der Kit-Komponenten sicherzustellen, müssen alle nicht genutzten Komponenten in Übereinstimmung mit den folgenden Anleitungen gelagert werden:

5.3 POSITIVE KONTROL OBJEKTTRÄGER - **POSITIVE CONTROL SLIDE**

Als Positivkontrolle dienende Objektträger werden einzeln in versiegelten und mit Stickstoff gefüllten Kunststoffbeuteln geliefert. Nicht verwendete Objektträger bei 2-8°C lagern. Vor dem Öffnen den Objektträger 5 Minuten lang Raumtemperatur (15-30°C) annehmen lassen.

Die Objektträger müssen unmittelbar nach dem Öffnen der Folienhüllen angefärbt werden.

5.4 EINDECKMEDIUM - MOUNTING FLUID

Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C lagern. Das Eindeckmedium vor Gebrauch 5 Minuten auf Raumtemperatur (15-30°C) bringen.

5.5 IMAGEN™ INFLUENZA A UND B REAGENZIEN - **REAGENT A | REAGENT B**

Gebrauchsfertig. Reagenz A und B bei 2-8°C im Dunkeln aufbewahren und vor Gebrauch 5 Minuten auf Raumtemperatur (15-30°C) bringen.

6 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND ERFORDERLICHES ZUBEHÖR

6.1 REAGENZIEN

Frisches Azeton (zur Fixierung).

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,5, zum Waschen der gefärbten Proben und zur Probenvorbereitung.

6.2 ZUBEHÖR UND GERÄTE

Die folgenden Produkte sind für die Anwendung zusammen mit IMAGEN™ Influenza Virus A und B bestimmt. Weitere Informationen können von der zuständigen Oxoid-Niederlassung oder vom zuständigen Händler angefordert werden.

Allgemeines

Teflonbeschichtete Mikroskop-Objektträger mit jeweils einer Vertiefung von 6mm Durchmesser (100 Objektträger pro Gebinde) sind bei der zuständigen Oxoid-Niederlassung oder vom Händler erhältlich (Code-Nr. S611430-6).

IMAGEN™ Influenza Positive Control Slide (Code-Nr. S611230-2).

7 AUSSTATTUNGEN

Es werden folgende Ausstattungen benötigt:

Präzisionspipette und Einmal-Pipettenspitzen, 25µL

Waschtrog

Deckgläser zum Eindecken einer Vertiefung mit 6mm Durchmesser

Nicht fluoreszierendes Immersionsöl

Epifluoreszenz-Mikroskop mit einem Filtersystem für FITC (maximale Anregungswellenlänge 490nm, mittlere Emissionswellenlänge 520nm) und 200-500facher Vergrößerung

Inkubator für 37°C

Niedertourige Zentrifuge

Für direkte Proben

Schleim-Extraktor (nur für nasopharyngeale Proben)

Zur Zellkultur-Bestätigung

Sterile Tupfer und Virus-Transportmedium (VTM) und Behälter, geeignet für Gewinnung, Transport und Kultur von Influenzaviren

Für das Anlegen einer Kultur und für die Isolierung von Influenzaviren geeignete Zelllinien

8 VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD - *In-Vitro*-Diagnostikum. Personen, die Tests mit diesem Produkt durchführen, müssen in die Durchführung eingewiesen sein und über entsprechende Laborerfahrung verfügen.

8.1 SICHERHEITSMASSNAHMEN

8.1.1 IMAGEN™ Influenza A- und Influenza B-Reagenzien enthalten 15mmol/L Natriumazid. Natriumazid ist ein Gift, das mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden kann. Beim Entsorgen der azidhaltigen Materialien immer mit reichlich Wasser spülen.

8.1.2 Die Influenza Viren A und B des positiven Kontrollobjektträgers wurden durch Fixierungsmethoden sterilisiert, so dass sie nachweisbar keine lebenden Mikroorganismen enthalten. Die Objektträger sollten jedoch als potentiell infektiös behandelt und entsorgt werden.

8.1.3 Falls auf der Basis aktueller, von den Gesundheitsbehörden empfohlener klinischer und epidemiologischer Screening-Kriterien eine Infektion mit einem neuartigen Influenza-A-Virus vermutet wird, müssen unter Einhaltung angemessener, zur Infektionskontrolle gegen neuartige virulente Influenzaviren geeigneter Vorsichtsmaßnahmen Proben gewonnen und an zentrale Referenzlabors zur Untersuchung übersandt werden. Die Anlegung einer Virenkultur sollte in diesen Fällen nur versucht werden, wenn eine Einrichtung der Sicherheitsklasse 3 (BSL 3) oder darüber für die Entgegennahme und Kultivierung von Proben verfügbar ist.

8.1.4 Die Reagenzien enthalten Evans-Blau. Evans-Blau ist möglicherweise karzinogen; Hautkontakt ist deshalb zu vermeiden.

8.1.5 Bei Verwendung des Eindeckmediums muss vorsichtig vorgegangen werden, da es Hautirritationen verursachen kann. Falls es zu einem Kontakt kommt, muss die Haut mit Wasser abgewaschen werden.

8.1.6 Essen, Trinken, Rauchen, Aufbewahren und Zubereiten von Speisen sowie Schminken sind im Arbeiten vorgesehenen Bereich (Labor) verboten.

8.1.7 Reagenzien dürfen nicht mit dem Mund pipettiert werden.

8.1.8 Bei der Handhabung klinischer Proben und infizierter Zellen immer Einweghandschuhe tragen und nach dem Umgang mit infektiösen Stoffen immer die Hände waschen.

8.1.9 Alle klinischen Proben entsprechend den geltenden gesetzlichen Vorschriften entsorgen.

8.10 Von fachlich qualifizierten Anwendern kann ein Sicherheitsdatenblatt angefordert werden.

8.2 TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

8.2.1 Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf den Etiketten vermerkten Verfalldatums nicht mehr verwendet werden. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt oder gegeneinander ausgetauscht werden.

8.2.2 Die Reagenzien werden in festgelegten Arbeitskonzentrationen geliefert. Die Testleistung wird beeinträchtigt, falls Reagenzien modifiziert oder unter anderen als den in Abschnitt 5 spezifizierten Bedingungen gelagert werden.

8.2.3 Die erforderliche Menge phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) ist am Tag der Anwendung frisch anzusetzen.

8.2.4 Waschschritte müssen mit PBS durchgeführt werden. Die Verwendung anderer Waschlösungen, wie z. B.: Leitungswasser oder destilliertes Wasser, beeinträchtigt die Testergebnisse.

8.2.5 Mikrobielle Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden.

8.2.6 Die Reagenzien dürfen nicht tiefgekühlt werden.

Gewinnung und Vorbereitung der Proben sind bei der Diagnose viraler Infektionen des Respirationstraktes mittels direkter Immunfluoreszenz und Zellkultur-Methoden von grundlegender Bedeutung. Proben müssen vom Infektionsort zum Zeitpunkt der maximalen Freisetzung von Viren („viral shedding“) gewonnen werden, damit sie so viel infiziertes Material als möglich enthalten. Außerdem müssen Proben so vorbereitet werden, dass entweder intakte Zellen erhalten bleiben, die von anhaftendem Mukus usw. frei sind und eine direkte mikroskopische Untersuchung ermöglichen oder dass die Lebensfähigkeit der Viren in Proben erhalten bleibt, anhand derer eine Kultur angelegt werden soll.

9.1 KLINISCHE PROBEN

9.1.1 Nasopharyngeale Absaugsekrete/Sekrete

Gewinnung

Proben aus dem nasopharyngealen Bereich durch eine Sonde (Größe 8) in einen Mukusextraktor gewinnen. Mukusextraktor und Schlauchmaterial müssen bei Temperaturen 2-8°C gehalten und so schnell als möglich zur Verarbeitung ans Labor weitergeleitet werden.

Zellseparation

Falls notwendig, der Probe vor Zentrifugation 2mL phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) zugeben, um die Viskosität zu verringern und den Schleim zu verdünnen. Den Schleim-Extraktor bei Raumtemperatur (15-30°C) 10 Minuten bei 380g zentrifugieren. Den Überstand, der für Zellkulturen verwendet werden kann, entfernen. Das Zellsediment in 2mL PBS resuspendieren und die Zellen mit einer Weitschaft-Pipette vorsichtig auf und ab pipettieren oder in einem Vortex-Gerät vorsichtig mischen, bis der Schleim separiert und das Zellmaterial freigegeben wird.

Heftiges Pipettieren/Mischen ist zu vermeiden, um eine Beschädigung der Zellen zu verhindern. Sobald sich eine gleichmäßige Suspension gebildet hat, je nach Bedarf weitere PBS zugeben und nach Zugabe der zusätzlichen PBS wieder pipettieren oder in einem Vortex-Gerät mischen, um die Zellen weiter zu waschen. Jegliche sichtbaren, bis zu diesem Stadium noch verbliebenen Schleimteilchen entfernen und entsorgen. Überschüssiger Schleim muss entfernt werden, weil sonst eine adäquate Penetration des Reagenzes verhindert wird, was zu einer unspezifischen Fluoreszenz führen kann.

Falls das ganze Sekret in der Ernährungssonde verbleibt und nichts davon den Schleim-Extraktor erreicht, das gesamte Sekret aus der Sonde in PBS herauswaschen. Das wird am besten erreicht, indem eine Pasteur-Pipette in das Sondenende eingeführt wird, das sich am Schleim-Extraktor befand. Die entsprechende Flüssigkeit in die Sonde saugen und wiederholt hinausdrücken, bis sich das an der Sondenwand befindliche Sekret gelöst hat. Die so erhaltene Suspension wird solange auf und ab pipettiert, bis der Schleim adäquat aufgebrochen ist.

Vorbereitung der Objektträger

Nach der Separation wird die Zellsuspension bei Raumtemperatur (15-30°C) 10 Minuten bei 380 g zentrifugiert und der Überstand entsorgt. Das Zellsediment in ausreichend PBS resuspendieren, um jegliche verbliebene Schleimreste zu verdünnen und gleichzeitig eine hohe Zelldichte beizubehalten. 25µL des resuspendierten Zellsediments in die Objektträger-Vertiefungen geben.

Die Probe bei Raumtemperatur (15-30°C) gründlich trocknen lassen und in frischem Azeton 10 min bei Raumtemperatur (15-30°C) fixieren. Wird die Probe nicht sofort angefärbt, ist sie bei -70°C einzufrieren, bis sie wieder benötigt wird. Aufbewahrte Objektträger sind innerhalb von zwei Wochen nach Präparation zu testen, da es bei längerer Aufbewahrung zu Qualitätseinbußen kommen kann.

Beimpfung von Zellkulturen

Zur Diagnose von Influenzavirus-Infektionen gewonnene Proben werden auf Zelllinien inokuliert, die in Laboratorien routinemäßig und nach etablierten Labormethoden zur Anwendung gelangen.

Zellkulturen sind regelmäßig auf das Auftreten zytopathischer Effekte (cytopathic effect, CPE) zu untersuchen und es sind regelmäßige Hämadsorptionstests durchzuführen. Im Hämadsorptionstest positive Kulturen oder CPE aufweisende Zellkulturen können geerntet und auf das Vorliegen des Influenza A- oder Influenza B-Virus getestet werden.

Vorbereitung der Objektträger

Die Zellschicht mit einer sterilen Pipette in das flüssige Kulturmedium schaben. Die Zellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 200g und Raumtemperatur (15-30°C) sedimentieren und den Überstand entsorgen.

Die Zellen durch Resuspension des Zellsediments in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) waschen und die Zentrifugation wiederholen. Den Überstand entsorgen und das Zellsediment in einer kleinen Menge frischer PBS resuspendieren, um eine hohe Zelldichte beizubehalten.

Je 25µL der Suspension in die Vertiefungen der Objektträger geben. Gründlich an der Luft trocknen lassen und in frischem Azeton 10 Minuten bei Raumtemperatur (15-30°C) fixieren. Wird die Probe nicht sofort angefärbt, ist sie über Nacht bei 4°C aufzubewahren oder, falls eine längere Aufbewahrung vorgesehen ist, bei -70°C einzufrieren. Aufbewahrte Objektträger sind innerhalb von zwei Wochen nach Präparation zu testen, da es bei längerer Aufbewahrung zu Qualitätseinbußen kommen kann.

VOR DURCHFÜHRUNG DES TESTVERFAHRENS SIND DIE IN ABSCHNITT 8.2 AUFGEFÜHRTE TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN ZU BEACHTEN.

10.1 ZUSETZEN DES REAGENZES

25µL Reagenz A auf die fixierte Zellpräparation der einen 6mm großen Vertiefung und 25µL Reagenz B auf die fixierte Zellpräparation einer anderen 6mm großen Vertiefung auf dem Objektträger (siehe Abschnitt 6) oder die entsprechenden Vertiefungen eines positiven Kontrollobjektträgers geben. Sicherstellen, dass die Reagenzien die gesamten Testareale bedecken.

10.2 ERSTE INKUBATION

Die Objektträger **15 Minuten** bei **37°C** in einer **feuchten Kammer inkubieren**. Das Reagenz **darf nicht** auf der Probe eintrocknen, da es sonst zu einer unspezifischen Färbung kommt.

10.3 WASCHEN DES OBJEKTTRÄGERS

Überschüssiges Reagenz mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) abspülen und den Objektträger anschließend in einem Schüttelbad, das PBS enthält, 5 Minuten vorsichtig waschen. PBS vom Objektträger abfließen lassen und bei Raumtemperatur (15-30°C) lufttrocknen.

10.4 ZUSETZEN VON EINDECKMEDIUM

Einen Tropfen Eindeckmedium in die Mitte jeder Vertiefung geben und mit einem Deckglas eindecken; sicherstellen, dass dabei keine Luftblasen entstehen.

10.5 ABLESEN DES OBJEKTTRÄGERS

Die gesamte Vertiefung, in der sich die gefärbte Probe befindet, mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop untersuchen. Wie in Abschnitt 11 beschrieben, sollte die Fluoreszenz bei 200-500facher Vergrößerung sichtbar sein. (Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Proben unmittelbar nach dem Anfärben abgelesen werden; Proben können aber auch bis zu 24 Stunden bei 2-8°C im Dunkeln aufbewahrt werden).

11 INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

11.1 KONTROLLEN

11.1.1 Positive Kontrollobjektträger

Beim positiven Kontrollobjektträger, der gemäß Abschnitt 10 angefärbt und abgelesen wurde, sollten Zellen mit intrazellulärer nukleärer und/oder zytoplasmatischer apfelgrüner Fluoreszenz sichtbar werden, die mit einem Hintergrund gegengefärbten Materials kontrastiert. Diese Zellen sind etwas größer als Epithelzellen der Atemwege, weisen aber bei Influenzavirus-Infektion nukleäre und/oder zytoplasmatische Fluoreszenz auf. Positive Kontrollobjektträger müssen verwendet werden, um überprüfen zu können, dass das Anfärbungsverfahren ordnungsgemäß durchgeführt wurde.

Diese Objektträger werden anhand von Influenzavirus-Stämmen in Zellkultur-Monolayern vorbereitet und sie stellen nur eine angemessene Kontrolle für das Testverfahren, nicht aber für die einzelnen Schritte der Probenverarbeitung bereit. Die Kontrolle der für die Probenverarbeitung genutzten Verfahren ist mit klinischem Probenmaterial vorzunehmen.

11.1.2 Negative Kontrolle

Falls eine negative Kontrolle erwünscht ist, empfiehlt sich die Verwendung von nicht infizierten, intakten Zellen des Typs, der zur Kultur und Isolierung von Influenzaviren verwendet wird. Die Zellen sind wie in Abschnitt 9.2 beschrieben zu präparieren und zu fixieren und anschließend gemäß Abschnitt 10 anzufärben.

11.2 KLINISCHE PROBEN

11.2.1 Erscheinungsbild Influenzavirus-infizierter Zellen

Intrazelluläre, nukleäre und/oder zytoplasmatische, granuläre, apfelgrüne Fluoreszenz wird bei mit Influenzavirus befallenen Epithelzellen der Atemwege sichtbar.

Nicht infizierte Zellen sind bei Gegenfärbung mit Evans-Blau rot gefärbt.

11.2.2 Interpretation

Eine positive Diagnose wird gestellt, wenn eine oder mehrere Zellen der fixierten, angefärbten Probe mit dem Influenza A- bzw. dem Influenza B-Virusreagenz die spezifische, in Abschnitt 11.2.1 beschriebene Fluoreszenz aufweisen.

Eine negative Diagnose wird gestellt, wenn die fixierten, angefärbten Proben mit beiden Reagenzien keine Fluoreszenz aufweisen.

Bei direkt angefärbten nasopharyngealen Absaugsekretproben müssen mindestens 20 nicht infizierte Epithelzellen der Atemwege sichtbar sein, bevor ein negatives Ergebnis registriert wird. (Siehe Abschnitt 11.2.3 bei unzureichender Zelldichte).

Bei von anderen Körperarealen gewonnenen Proben (z. B. Sputum), sollten mindestens 50 nicht infizierte Epithelzellen der Atemwege sichtbar sein, bevor ein negatives Ergebnis registriert wird.

11.2.3 Zu wenig Zellen

Falls die in den Vertiefungen des Objektträgers befindliche Präparation zu wenig Zellen aufweist, wird der Rest der klinischen Probe 10 Minuten bei 380g und Raumtemperatur (15-30°C) zentrifugiert. Die Zellen werden in einer kleineren Menge PBS resuspendiert (25µL), bevor sie wieder in der Vertiefung des Objektträgers aufgebracht werden. Alternativ hierzu sollte eine neue klinische Probe angefordert werden.

11.3 BESTÄTIGUNG IN DER ZELLKULTUR

11.3.1 Erscheinungsbild Influenzavirus-infizierter Zellen

Infizierte Zellen weisen eine intrazelluläre, nukleäre und/oder zytoplasmatische apfelgrüne Fluoreszenz auf und werden als Influenzavirus-positiv registriert.

Nicht infizierte Zellen werden durch Evans-Blau rot gegengefärbt und werden als Influenzavirus-negativ registriert.

11.3.2 Interpretation der Ergebnisse

Eine positive Diagnose wird gestellt, wenn eine oder mehr Zellen der fixierten und angefärbten Probe mit dem IMAGEN™ Influenza A- oder Influenza B-Reagenz das typische, in Abschnitt 11.3.1 beschriebene Fluoreszenzmuster aufweist.

Ein negatives Ergebnis sollte erst dann registriert werden, wenn in der untersuchten Zellkultur mindestens 50 nicht infizierte Zellen vorliegen. Sollten zu wenig Zellen vorhanden sein, siehe Abschnitt 11.2.3.

11.3.3 Zu wenig Zellen

Falls auf dem Objektträger zu wenig Zellen vorhanden sind, wird der Rest der klinischen Probe 10 Minuten bei 200g und Raumtemperatur (15-30°C) zentrifugiert. Die Zellen werden in einer kleineren Menge PBS resuspendiert (25µL), bevor sie wieder in der Vertiefung des Objektträgers aufgebracht werden. Alternativ hierzu sollte eine neue klinische Probe angefordert werden.

12 BEGRENZUNGEN DER METHODE

12.1 Es darf nur das mit dem Kit gelieferte Eindeckmedium verwendet werden.

12.2 Das Erscheinungsbild der erzielten Fluoreszenz kann, abhängig vom Typ des Mikroskops und der benutzten Lichtquelle, unterschiedlich sein.

12.3 Es empfiehlt sich, zum Abdecken der gesamten jeweils 6mm großen Testareale je 25µL Reagenz zu verwenden. Eine Reduzierung dieses Volumens kann zu Schwierigkeiten beim Abdecken der von der Probe eingenommenen Fläche führen und die Testempfindlichkeit herabsetzen.

12.4 Die Reagenzien werden in festgelegten Arbeitskonzentrationen geliefert. Die Testleistung kann beeinträchtigt werden, falls Reagenzien modifiziert oder unter anderen als den spezifizierten Bedingungen gelagert werden.

12.5 Werden Influenzaviren nicht nachgewiesen, kann das verschiedene Ursachen haben: Probengewinnung zu einem ungeeigneten Zeitpunkt der Krankheit, unkorrekte Probengewinnung und/oder Handhabung der Proben sowie eine mangelhafte Zellkultur usw. Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Influenzavirus-Infektion nicht aus.

12.6 Mit dem IMAGEN™ Influenzavirus A und B-Test werden typspezifische Influenza A- und Influenza B-Antigene nachgewiesen. Der Test eignet sich nicht zur Identifikation von Subtypen der Influenza A- und B-Viren.

12.7 Das Vorliegen von Influenzaviren in nasopharyngealen Sekreten schließt nicht notwendigerweise die Möglichkeit einer begleitenden Infektion mit anderen Pathogenen aus. Die Testergebnisse sind zusammen mit verfügbaren Informationen aus epidemiologischen Untersuchungen, der klinischen Diagnose des Patienten und anderen diagnostischen Verfahren zu interpretieren.

12.8 Bei immunchemischen Tests kommt es aufgrund von Bindungen zwischen den Fc-Regionen der Antikörper und Protein A-Antigen, das in den Zellwänden einiger Stämme von *Staphylococcus aureus* vorliegt, manchmal zu unspezifischen Färbungen. Die IMAGEN™ Influenzavirus A und B-Testreagenzien wurden modifiziert, um die Bindung an das Protein A des Cowan 1-Stammes von *Staphylococcus aureus* zu eliminieren.

12.9 Die Ergebnisse sollten im Zusammenhang mit epidemiologischen Informationen, dem klinischen Erscheinungsbild und anderen diagnostischen Verfahren interpretiert werden.

12.10 Personen, denen ein Influenza-A-Impfstoff nasal verabreicht wurde, können bis zu drei Tage nach der Impfung noch positive Testergebnisse aufweisen.

13 ERWARTETE WERTE

In gemäßigten Klimazonen finden Ausbrüche von Influenza-Infektionen des Typs A bzw. B überwiegend zwischen Spätherbst und Frühlingsanfang statt; in tropischen Klimazonen sind saisonale Prävalenzen weniger deutlich voneinander abgegrenzt.

Im Allgemeinen sind die Influenzavirus A-Infektionsraten bei nicht immunisierten Kindern und Erwachsenen ähnlich, wobei die klinischen Manifestationen der Infektion im umgekehrten Verhältnis zum Alter der Patienten stehen^{10,11,12}. Während Influenzavirus B-Epidemien finden sich die höchsten Erkrankungsraten allgemein bei Kindern im schulpflichtigen Alter^{13,14}. Im Laufe eines Winters, in dem das prävalente Influenzavirus ein seit mehreren Jahren zirkulierendes Virus ist, und deshalb große Teile der Bevölkerung immun sind, lassen sich ca. 15% aller Atemwegsinfektionen auf Influenzaviren zurückführen. Sobald ein neuer Antigenstamm eines Influenzavirus auftritt, gegen den große Teile der Bevölkerung noch nicht immun sind, kann dieser für bis zu 50% aller Atemwegsinfektionen verantwortlich sein. Bei einem Ausbruch, der als solcher erkannt und definiert wurde, kann die Nachweisrate an 100% heranreichen, wenn serologische und Antigennachweis-Methoden zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden⁵.

14 SPEZIFISCHE LEISTUNGSKRITERIEN

14.1 REAKTIVITÄT DER MONOKLONALEN ANTIKÖRPER

Die in diesem Test verwendeten monoklonalen Antikörper sind, wie durch einen Immunoassay nachgewiesen, typspezifisch. Influenzavirus A-Antikörper weisen H₁N₁-, H₂N₂- und H₃N₂-Influenza A-Virusstämme nach; Influenzavirus B-Antikörper weisen verschiedene, zwischen 1940 und 1984 gewonnene, Influenza B-Viren nach^{6,16,17}.

14.2 KLINISCHE STUDIEN

Der IMAGEN™ Influenzavirus A und B-Test wurde in 2 klinischen Prüfszentren an nasopharyngealen Sekreten und Sputum-Proben von Kindern und Erwachsenen, die mit Symptomen einer Atemwegsinfektion stationär behandelt wurden, im direkten Test ausgewertet. Der Test wurde außerdem in 5 Prüfszentren an Zellkulturen von Stammvirus-Stämmen ausgewertet, um das Vorliegen von Influenzaviren zu bestätigen. Diese Untersuchungen wurden in den USA, in Europa und im Fernen Osten durchgeführt.

An den Prüfszentren wurden direkte Tests an 213 klinischen Proben durchgeführt und 227 Proben wurden zur Bestätigung in der Zellkultur getestet. Mit den monoklonalen Antikörpern des IMAGEN™ Influenza Virus A und B-Tests wurden 22 verschiedene Stämme von Influenzavirus A und 20 verschiedene Stämme von Influenzavirus B nachgewiesen. Bei den Standardmethoden (Referenzmethoden) handelte es sich um einen indirekten Immunfluoreszenztest, der direkt an Proben und Viruskulturen auf Paviannierenzellen, MDCK-Zellen oder bebrüteten Hühnereiern durchgeführt wurde. Positive Viruskulturen wurden durch indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper oder mit dem Hämagglutinationshemmtest (HAH) bestätigt.

14.3 KLINISCHE LEISTUNGSFÄHIGKEIT

14.3.1 Direkte Proben

Die Gewinnung der klinischen Proben erfolgte überwiegend in den Wintermonaten der Jahre 1984-1987 und der IMAGEN™ Influenzavirus A und B-Test wurden in den Prüfszentren mit Standardmethoden verglichen. Zu diesen Auswertungen wurden frische klinische Proben und eingefrorene Proben herangezogen.

Ein mit der Referenzmethode erhaltenes Ergebnis wurden als positiv bewertet, wenn entweder Zellkultur oder indirekte Immunfluoreszenz an direkten Proben positiv ausfielen. Auf diese Weise war es möglich, nicht lebensfähige Viren durch Fluoreszenz oder zellfreie Viren durch die Zellkultur nachzuweisen.

Tabelle 14.3.1 zeigt die Ergebnisse, die mit dem IMAGEN™ Influenzavirus A-Reagenz erzielt wurden. Die Gesamtzahl der Influenza-Fälle in diesen Populationen betrug 24,9%. Die IMAGEN™ Influenzavirus A-Ergebnisse korrelierten in 211 Fällen mit den Standardmethoden (99,1%). Die Testempfindlichkeit betrug 96,2% (51/53) und die Spezifität lag bei 100% (160/160), wenn eine 100%igen Spezifität und Empfindlichkeit der Standardmethoden angenommen wird. Die Vorhersagewerte für positive und negative Ergebnisse betrugen 100% (51/51) bzw. 98,8% (160/162).

Empfindlichkeit, Spezifität und Vorhersagewerte wurden nach der bereits beschriebenen Methode berechnet¹⁸.

Tabelle 14.3.2 zeigt die Ergebnisse, die mit dem IMAGEN™ Influenzavirus B-Reagenz erzielt wurden. Die Gesamtzahl der Influenza-Fälle in diesen Populationen betrug 7,0%. Das reflektiert die niedrige Prävalenz von Influenzaviren des Typs B in Europa während der klinischen Prüfungen. Die IMAGEN™ Influenzavirus B-Ergebnisse korrelierten in 210 Fällen mit den Standardmethoden (98,6%). Die Testempfindlichkeit betrug 86,7% (13/15) und die Spezifität lag bei 99,5% (197/198). Die Vorhersagewerte für positive und negative Ergebnisse betrugen 92,9% (13/14) bzw. 98,9% (197/199).

In keinem Fall kam es zu einer Kreuzreaktion zwischen dem IMAGEN™ Influenzavirus A-Reagenz und dem Influenzavirus B-Reagenz bzw. umgekehrt. Keine Probe war mit beiden Reagenzien positiv.

Tabelle 14.3.1 Vergleich der Testergebnisse von
direkt an klinischen Proben
angewendetem IMAGEN™
Influenzavirus A-Reagenz mit
Standardmethoden

TEST ERGEBNIS				
Standardmethode	Neg	Pos	Pos	Neg
IMAGEN™	Neg	Pos	Neg	Pos
Influenzavirus A				
Prüfzentrum 1	59	35	1	0
Prüfzentrum2	101	16	1	0
ANZAHL DER GETESTETEN PROBEN (213)	160	51	2	0

Tabelle 14.3.2 Vergleich der Testergebnisse von
direkt an klinischen Proben
angewendetem IMAGEN™
Influenzavirus B-Reagenz mit
Standardmethoden

TEST ERGEBNIS				
Standardmethode	Neg	Pos	Pos	Neg
IMAGEN™	Neg	Pos	Neg	Pos
Influenzavirus B				
Prüfzentrum 1	81	12	1	1
Prüfzentrum 2	116	1	1	0
ANZAHL DER GETESTETEN PROBEN (213)	197	13	2	1

14.3.2 Bestätigung der Zellkultur

Der IMAGEN™ Influenzavirus A und B-Test wurde in 5 Prüfzentren an klinischen Proben und an auf Zellkulturen isolierten Stammvirus-Stämmen getestet. Die Virusisolierung erfolgte entweder auf primären oder sekundären Pavian-Nierenzellen oder auf Madin-Darby-Nierenzellen vom Hund (MDCK). Die Zellkulturen wurden in PBS gewaschen bevor sie auf die Objektträger aufgebracht wurden (siehe Abschnitt 9.2). Die Objektträger wurden in Azeton fixiert und anschließend mit den Reagenzien des IMAGEN™ Influenzavirus A und B-Tests getestet. Für diese Auswertungen wurden frische klinische Proben und tiefgekühlte Proben herangezogen.

Insgesamt wurden 227 Kulturen ausgewertet, von denen 54 Kulturen Influenzavirus A-positiv und 30 Kulturen Influenzavirus B-positiv waren. Zellkulturisolierungen wurden entweder durch die Immunfluoreszenz oder den Hämagglutinationshemmtest (HAH) bestätigt.

Die Ergebnisse (Tabellen 14.3.3 und 14.3.4) zeigen, dass mit dem Influenzavirus A-Testreagenz alle isolierten Influenza A-Viren (Empfindlichkeit 100%) und mit dem Influenzavirus B-Reagenz alle isolierten Influenza B-Viren nachgewiesen wurden (Empfindlichkeit 100%).

Die Spezifität beider Reagenzien betrug 100%.

Tabelle 14.3.3 Vergleich der Testergebnisse von IMAGEN™ Influenzavirus A-Testreagenz zur Zellkulturbestätigung mit Standardmethoden

TEST ERGEBNISSE				
Standardmethode IMAGEN™ Influenzavirus A	Neg	Pos	Pos	Neg
	Neg	Pos	Neg	Pos
Prüfzentrum 1	59	13	0	0
Prüfzentrum 2	27	1	0	0
Prüfzentrum 3	43	13	0	0
Prüfzentrum 4	23	22	0	0
Prüfzentrum 5	21	5	0	0
ANZAHL DER GETESTETEN PROBEN (227)	173	54	0	0

Tabelle 14.3.4 Vergleich der Testergebnisse von IMAGEN™ Influenzavirus B-Reagenz zur Zellkulturbestätigung mit Standardmethoden

TEST ERGEBNISSE				
Standardmethode IMAGEN™ Influenzavirus B	Neg	Pos	Pos	Neg
	Neg	Pos	Neg	Pos
Prüfzentrum 1	69	3	0	0
Prüfzentrum 2	25	3	0	0
Prüfzentrum 3	54	2	0	0
Prüfzentrum 4	27	18	0	0
Prüfzentrum 5	22	4	0	0
ANZAHL DER GETESTETEN PROBEN (227)	197	30	0	0

14.4 KREUZREAKTIVITÄT

Der IMAGEN™ Influenzavirus A und B-Test wurde an Präparationen aus anderen Viren und Organismen durchgeführt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in Atemwegssekreten oder Zellkulturen vorhanden sind. Alle getesteten Organismen (Tabelle 14.4) fielen mit den IMAGEN™ Influenzavirus A- und B-Reagenzien negativ aus.

Tabelle 14.4 Mit dem IMAGEN™ Influenzavirus A und B-Test getestete und für nicht reaktiv befundene Organismen

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Adenovirus, Typ 1-5 und 7</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Mycoplasma orale</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma hyorhinus</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Neisseria meningitidis A</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria meningitidis B</i>
<i>Coxsackie-Virus, Typ A9 und B4</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Cytomegalie-Virus</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Echovirus, Typ 3, 6, 9, 11 und 22</i>	<i>Neisseria cinerea</i>
<i>Epstein-Barr-Virus</i>	<i>Parainfluenza-Virus, Typ 1, 2 & 3</i>
<i>Humanes Spumavirus (Human Foamy Virus)</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>
<i>Herpes-simplex-Virus, Typ 1 und 2</i>	<i>Polio-Virus, Typ 1 und 2</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>
<i>Masernvirus</i>	<i>Rhinovirus</i>
<i>Mumps-Virus</i>	<i>Simian-Virus, Typ 5 und 40</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Streptococcus der Gruppen A, B, C, D, F, G</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Varicella-Zoster-Virus</i>

1. **Frankl, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., and 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 263-270.
2. **Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y. (1992)**
Evolution and Ecology of Influenza A viruses. *Microbiological Reviews*. **56**: No 1, 152-179.
3. **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.
4. **Murphy, B.R., and Webster, R.G. (1990)**
Orthomyxoviruses in Virology (eds B.N. Fields and D.M. Kribe) Raven Press, New York, pp 1091-1152.
5. **Galbraith, A.W. (1980)**
Influenza - Recent developments in prophylaxis and treatment. *British Medical Bulletin*. **41**: 381-385.
6. **McQuillan, J., Madeley, C.R., and Kendal (1985)**
Monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of Influenza A and B virus infections by immunofluorescence. *Lancet*. **11**: 911-914
7. **Gardner, P.S., and McQuillan, J. (1980)**
Rapid virus diagnosis: Application of immunofluorescence (2nd Ed) Butterworth, London, pp 92-123.

8. **McIntosh, K., Masters, H.B., Orr, I., Chao, R.K., and Barkin, R.M. (1978)**
The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants.
Journal of Infectious Diseases **138**: 24-32.
9. **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 **1**: 1161-1162.
10. **Hall C.E., Cooney M.K., Fox J.P. (1973)**
The Seattle virus watch. IV. Comparative epidemiologic observations of infections with influenza A and B viruses. 1965-1969, in families with young children.
American Journal of Epidemiology **98**: 365-380.
11. **Monto A.S., Kioumeh F. (1975)**
The Tecumseh study of respiratory illness IX. Occurrence of influenza in the community, 1966-1971
American Journal of Epidemiology **102**: 553-563.
12. **Foy H.M., Cooney M.K., Allan I. (1976)**
Longitudinal studies of types A and B influenza among Seattle schoolchildren and families, 1968-1974.
Journal of Infectious Diseases **134**: 362-369.
13. **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.

14. **Retailliau H.F., Storch G.A., Curtis A.C., Horne T.J., Scally M.J., Mettewick M.A.W. (1979)**
The epidemiology of influenza B in a rural setting in 1977.
American Journal of Epidemiology **109**: 639-649.
15. **Caul E.O. (1986)**
Persönliche Mitteilung (Bestandteil der Archivdaten der Oxoid (Ely) Ltd).
16. **Walls H.H., Harmon M.W., Slagle J.J., Stocksdales C., Kendal A.P. (1986)**
Characterisation and evaluation of monoclonal antibodies developed for typing influenza A and influenza B viruses.
Journal of Clinical Microbiology **23**: 240-245.
17. **Espy M.J., Smith T.F., Harmon M.W., Kendal A.P. (1986)**
Rapid detection of influenza virus by shell vial assay with monoclonal antibodies.
Journal of Clinical Microbiology **24**: 677-679.
18. **Galen R.S. (1982)**
Application of the predictive value model in the analysis of test effectiveness in Clinics in Laboratory Medicine Symposium on Test Selection Strategies. Volume 2. WB Saunders Company: 685-699.

TECHNICAL ADVICE AND CUSTOMER SERVICE
CONSEIL TECHNIQUE ET SERVICE CLIENTELE
TECHNISCHE BERATUNG UND KUNDENDIENST

For all enquiries please contact your local Oxoid subsidiary or distributor.

Pour toute information, veuillez contacter votre filiale ou votre distributeur local(e) Oxoid.

Anfragen jeder Art richten Sie bitte an die für Sie zuständige Oxoid-Niederlassung oder an Ihren Händler.

IMAGEN™ Influenza virus A and B
January 2007 9807065EFG