





**IMAGEN™ Parainfluenza virus
Types 1, 2 and 3**

REF K6103, K6104 

 50  

A direct immunofluorescence test for the detection of
Parainfluenza 1, 2 and 3.

Test pour la détection des Virus **Parainfluenza 1, 2
et 3** par immunofluorescence directe.

Direkter Immunfloreszenztest zum Nachweis von
Parainfluenzavirus 1, 2 und 3.

(105925-003)

1 INTENDED USE

IMAGEN™ Parainfluenza virus test kits are qualitative direct immunofluorescence tests for the detection and differentiation of Parainfluenza virus types 1, 2 and 3 directly in nasopharyngeal aspirates or in cell cultures. The kits are available in two formats:

IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Types 1, 2 and 3) (Code No. K6103) for the detection and confirmation of the presence of Parainfluenza virus antigens directly in nasopharyngeal aspirates and in cell culture preparations.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3 (Code No. K6104) for the detection and differentiation of Parainfluenza virus types 1, 2 and 3 antigens respectively directly in nasopharyngeal aspirates and in cell culture preparations.

A negative result obtained following direct staining of nasopharyngeal aspirates should be considered presumptive until confirmed by culture.

2 SUMMARY

Parainfluenza viruses are members of the genus Paramyxovirus classified within the family Paramyxoviridae.¹ There are 6 species of Paramyxovirus known to infect man which include Parainfluenza viruses 1, 2, 3 and 4 (subtypes 4a and 4b), Mumps virus and Newcastle Disease virus. Of the 4 Parainfluenza viruses, types 1, 2 and 3 are now recognised as a major cause of acute respiratory disease in infants and children.^{2,3}

Parainfluenza viruses are spread by direct contact or inhalation of virus-containing droplets shed from the respiratory tract of symptomatic individuals. Nasal secretions can contain high concentrations of virus. The virus multiplies in the ciliated columnar epithelial cells of the upper and lower respiratory tract causing cell necrosis and sloughing. Viral shedding occurs from 1 day before, up to 7 days after the onset of symptoms. Shedding may persist in immunocompromised patients.^{4,5}

Parainfluenza virus types 1, 2 and 3 can infect and cause disease throughout the upper and lower respiratory tract. Most Parainfluenza virus infections manifest clinically as acute laryngotracheobronchitis (croup) in infants and children.

However, Parainfluenza virus infections are also associated with tracheobronchitis, bronchitis, pneumonia and a range of symptoms associated with the upper respiratory tract.

Occasionally Parainfluenza virus infections can be severe in infants, causing obstruction of airways and respiratory distress which may lead to increased morbidity and mortality in patients with underlying disease such as cystic fibrosis or in immunocompromised patients.

Parainfluenza viruses have been associated with outbreaks of respiratory tract infections in paediatric wards and geriatric wards resulting in prolonged hospitalisation and increased morbidity and mortality.⁶ Rapid diagnosis is important in the management of patients and the control of outbreaks.

At present the main diagnostic methods employed for the diagnosis of Parainfluenza virus infections are either isolation and identification in cell culture monolayers or direct detection of the virus in clinical samples.

Following virus isolation by cell culture, in order to identify the virus it is necessary to perform additional testing, neutralisation, haemagglutination inhibition or electron microscopy. These tests are laborious and time consuming and require a degree of technical expertise which may not be available in many laboratories.

More recently, indirect immunofluorescence tests using polyclonal or monoclonal antibodies for the identification and confirmation of Parainfluenza viruses in cell culture monolayers or directly in clinical specimens, have been described.^{7,8,9} Direct immunofluorescence tests utilising fluorescein labelled monoclonal antibodies offer a more rapid and specific method for the detection of viruses in clinical specimens or cell cultures.

The IMAGEN™ Parainfluenza virus kits are direct immunofluorescence tests for the detection and identification of Parainfluenza virus types 1, 2 and 3 directly in nasopharyngeal aspirates or in cell culture. The tests utilise type-specific monoclonal antibodies to detect and identify Parainfluenza virus types 1, 2 and 3.

3 PRINCIPLE OF TEST

The IMAGEN™ Parainfluenza virus test kits contain fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated monoclonal antibodies which bind specifically to either Parainfluenza virus types 1, 2 or 3. These are used in a one step direct immunofluorescence technique. Specimens are incubated with the FITC conjugated reagents for 15 minutes. Excess reagent is then removed by washing with phosphate buffered saline (PBS). The stained areas are mounted and viewed using epifluorescence illumination.





If Parainfluenza virus types 1, 2 or 3 are present then characteristic apple-green intracellular fluorescence is seen within infected cells, which contrasts with the red background staining of uninfected cells.

Acknowledgement


The monoclonal antibodies used in these tests originated in the Department of Respiratory and Enteric Viruses, Public Health Services, Centre for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA.

4 DEFINITIONS


The following symbols and definitions are in accordance with ISO 15223 and EN 980 and have been used in the product information.

	Product code and catalogue number.
	Consult the instructions for use.
	Contains sufficient for <N> tests.
	Manufactured by.



IVD *In vitro* diagnostic medical device.

 Use by.


LOT 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™ PARAINFLUENZA VIRUS REAGENTS PROVIDED

 One Instructions For Use Booklet.

POSITIVE CONTROL SLIDE 2 x 3 well positive control slides containing acetone-fixed African Green monkey kidney cells (Veros) infected with either Parainfluenza virus type 1, 2 or 3 (strain CDC V6-004, CDC V7-003 and CDC V5-003 respectively).

MOUNTING FLUID 3mL of mounting fluid. The mounting fluid contains a photobleaching inhibitor in a glycerol solution (pH 10.0).

One bottle of each of the following:

IMAGEN™ PARAINFLUENZA VIRUS GROUP REAGENTS – K6103

REAGENT G

1.4mL of IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3 reagent. This reagent consists of a mixture of 3 purified murine monoclonal antibodies specific to Parainfluenza virus types 1, 2 and 3, conjugated to FITC, diluted in a protein stabilised phosphate buffered saline solution containing evans blue dye as a counterstain.

The monoclonal antibodies are targeted against Parainfluenza 1 F protein, Parainfluenza 2 haemagglutinin protein and Parainfluenza 3 haemagglutinin protein respectively.

OR

IMAGEN™ PARAINFLUENZA VIRUS TYPES 1, 2 AND 3 REAGENTS – K6104

REAGENT 1

1.4mL of IMAGEN™ Parainfluenza virus 1 reagent. This reagent consists of a purified murine monoclonal antibody specific to Parainfluenza virus type 1 (targeted against Parainfluenza 1 F protein), conjugated to FITC, diluted in a protein stabilised phosphate buffered saline solution containing evans blue dye as a counterstain.

REAGENT 2

1.4mL of IMAGEN™ Parainfluenza virus 2 reagent. This reagent consists of a purified murine monoclonal antibody specific to Parainfluenza virus type 2 (targeted against Parainfluenza 2 haemagglutinin protein), conjugated to FITC diluted in a protein stabilised phosphate buffered saline solution containing evans blue dye as a counterstain.

REAGENT 3

1.4mL of IMAGEN™ Parainfluenza virus 3 reagent. This reagent consists of a purified murine monoclonal antibody specific to Parainfluenza virus type 3 (targeted against Parainfluenza 3 haemagglutinin protein), conjugated to FITC, diluted in a protein stabilised phosphate buffered saline solution containing Evans blue dye as a counterstain.

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 sealed in 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 unused mounting fluid at 2-8 °C. The mounting fluid should be left at room temperature (15-30 °C) for 5 minutes before use.

5.5 REAGENTS, GROUP, 1, 2 AND 3 –
REAGENT G | REAGENT 1 | REAGENT 2 | REAGENT 3

Ready to use. Store unused reagents in the dark at 2-8 °C. The reagents should be left at room temperature (15-30 °C) for 5 minutes before use.

6 ADDITIONAL REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED

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 K6103 and K6104. Contact your local DakoCytomation subsidiary or distributor for further information.

Teflon coated glass microscope slides with single 6mm diameter wells (100 slides per box) available from your local DakoCytomation subsidiary or distributor, (Code No. S6114).

Positive Control Slides (Code No. S6111).

7 EQUIPMENT

The following equipment is required:

Precision pipette and disposable tips to deliver 25 μ L.

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.

For Culture Confirmation

Sterile swabs, viral transport medium (VTM) and container suitable for collection, transportation and culture of Parainfluenza viruses. For information on use of suitable VTM please refer to reference 13 in Section 13 (available from your local DakoCytomation subsidiary).

Cell culture lines recommended for culture and isolation of Parainfluenza viruses.

A negative control slide prepared from uninfected intact cells of the type in use for the culture and isolation of Parainfluenza viruses. Cells should be prepared and fixed as described in Section 9.1 and stained as described in Section 10.

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™ Parainfluenza virus test 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 Parainfluenza viruses on the control slide has been shown to be non-infectious in cell culture, however, slides should be handled and disposed of as though potentially infectious.

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

8.1.4 Care should be taken when using the mounting fluid as it may cause skin irritation. Skin should be flushed with water if contact occurs.

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

8.1.6 Do not pipette materials by mouth.

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

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

8.1.9 Safety data sheet available for professional user on request.

8.2 TECHNICAL PRECAUTIONS

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

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

8.2.3 Typing reagents should not be pooled, or used together on one slide well, as the performance of the test may be adversely affected.

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

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

8.2.6 Avoid microbial contamination of reagents.

8.2.7 The reagents must not be frozen.

9 COLLECTION AND PREPARATION OF SPECIMENS

The collection and preparation of specimens is of fundamental importance in the diagnosis of Parainfluenza virus by cell culture. 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. The recommended respiratory specimen is a nasopharyngeal aspirate (NPA) which should provide large numbers of respiratory epithelial cells.

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 is released. Avoid vigorous pipetting/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 stage.

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 onto 6mm diameter well areas on slide.

One well is required for the IMAGEN™ Parainfluenza virus Group test (Code No. K6103). Three wells are required for the IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3 test (Code No. K6104).

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 then 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 CONFIRMATION AND TYPING

Inoculation of cell cultures

Specimens collected for the diagnosis of parainfluenza 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 a cytopathic effect (CPE) and haemadsorption tests carried out at regular intervals.

Any haemadsorption positive cultures, or cell cultures showing any CPE, can be harvested and tested for the presence of Parainfluenza viruses.

Preparation of slides

Scrape the cell sheet into the culture medium using a sterile pipette. Deposit the cells by centrifugation the cells 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 (75-100µL per culture tube) of fresh PBS to maintain a high cell density.

Place 25µL aliquots of the cell suspension on to individual wells on the slides.

One well is required for the IMAGEN™ Parainfluenza virus Group test (Code No. K6103).

Three wells are required for the IMAGEN™ Parainfluenza virus test (Code No. K6104).

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 freeze at -20 °C for longer storage periods. 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.

For the IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Code No. K6103) test procedure refer to Section 10.1 and for the IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3 (Code No. K6104) test procedure refer to Section 10.2

10.1 IMAGEN™ PARAINFLUENZA VIRUS GROUP (K6103)

10.1.1 Addition of Reagent

Add 25µL of Reagent G to the fixed cell preparation (see Section 9.1), positive control slide and negative control slide. Ensure that the reagent covers the entire well area.

10.1.2 First Incubation

Incubate slides with reagent 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.

10.1.3 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).

10.1.4 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.

10.1.5 Reading the Slide

Examine the entire well area containing the stained specimen using an epifluorescence microscope. Fluorescence, as described in Section 11, should be visible at x200-x500 magnification. (For best results slides should be examined immediately after staining, but may be stored at 2-8 °C, in the dark, for up to 72 hours.)

10.2 IMAGEN™ PARAINFLUENZA VIRUS TYPES 1, 2 AND 3 - K6104

10.2.1 Addition of Reagent

Add 25µL of Reagent 1 to the first well, 25µL Reagent 2 to the second well and 25µL Reagent 3 to the third well of the fixed cell preparation (see Section 9.1), positive and negative control slides. Ensure that the reagent covers the entire well area.

10.2.2 First Incubation

Incubate slides with reagent 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.

10.2.3 Washing the Slide

Wash off excess reagent with phosphate buffered saline (PBS) and 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).

10.2.4 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.

10.2.5 Reading the Slide

Examine the entire well area containing the stained specimen using an epifluorescence microscope. Fluorescence as described in Section 11 should be visible at x200-x500 magnification. (For best results slides should be examined immediately after staining, but may be stored at 2-8 °C in the dark for up to 72 hours).

11 INTERPRETATION OF TEST RESULTS

11.1 CONTROLS

11.1.1 Positive Control Slide

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 red counterstained material. Positive control slides should be used to check that the staining procedure has been satisfactorily performed.

These slides are prepared from Parainfluenza 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 positive clinical material.

11.1.2 Negative Control

Negative control slides must be prepared from uninfected intact cells of the type in use for the culture and isolation of Parainfluenza viruses. These cells should be prepared and fixed as described in Section 9.2 and stained as described in Section 10. The cells on the negative control slide stain red with Evans blue counterstain.

Slides prepared in this way will only provide adequate control for the test procedure and not the sample processing steps. Sample processing steps should be controlled using negative clinical material.

11.2 CLINICAL SPECIMENS

11.2.1 Appearance of Parainfluenza virus infected cells

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

Uninfected cells stain red with the Evans blue counterstain.

11.2.2 Interpretation of Results

A positive diagnosis is made when one or more cells in the fixed stained specimen shows the specific fluorescence described in Section 11.2.1 with the IMAGEN™ Parainfluenza virus Group reagent or one of the individual IMAGEN™ Parainfluenza virus type 1, 2 and 3 reagents. The result should be interpreted as positive for Parainfluenza virus antigen.

A negative diagnosis is made when fixed, stained specimens do not exhibit fluorescence with either the IMAGEN™ Parainfluenza virus Group reagent or any of the individual IMAGEN™ Parainfluenza virus types 1, 2 and 3 reagents. The result should be interpreted as negative for Parainfluenza virus antigen, culture result to follow.

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.

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 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 AND TYPING

11.3.1 Appearance of Parainfluenza Virus Infected Cells

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

Uninfected cells stain red with Evans blue counterstain and should be recorded as negative for Parainfluenza.

11.3.2 Interpretation of Results

A positive diagnosis is made when one or more of the cells in the fixed, stained specimen show the typical fluorescence pattern described in Section 11.3.1 with the IMAGEN™ Parainfluenza virus Group reagent or with one of the individual IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 1, 2 and 3 reagents. At least 50 uninfected cells of the cell culture being tested must be observed on each slide well before a negative result is reported. See Section 11.2.3 if insufficient cells are present.

11.3.3 Quality Control

Positive and Negative controls should be stained and examined on each occasion that IMAGEN™ Parainfluenza reagents are used for determining the presence of Parainfluenza in infected cell cultures.

The positive control slides provided serve as a suitable control to determine correct performance of staining technique and reactivity of the reagent with Parainfluenza virus infected cells. Additional positive control slides are available from DakoCytomation, (Code No S6111).

Reagents and technique should also be controlled by use of a negative control smear of cells made from uninoculated (non-infected) cell culture of the type in use for the isolation of Parainfluenza viruses

If insufficient cells are observed (less than 50) on the test or negative control slide well preparation then the remainder of the cell culture sample should be centrifuged at 200g for 10 minutes at room temperature (15-30 °C) and resuspended in a smaller volume (approx. 50µL) of PBS. Place 25µL of cell suspension onto individual wells and process as described in sections 9 and 10.

If both IMAGEN™ Parainfluenza virus Group and Typing reagents are used and negative results are obtained with the three individual reagents after a positive result is obtained with the group reagent, additional cell smears should be prepared and the test repeated. Alternatively, the culture should be passaged to amplify the amount of virus and the number of infected cells present before repeating immunofluorescence testing.

12 PERFORMANCE LIMITATIONS

12.1 Use only the mounting fluid provided.

12.2 Non-specific staining is sometimes observed as an artefact in immuno-chemical tests due to binding between antibody Fc regions and protein A antigen found in the cell wall of some strains of *Staphylococcus aureus*. The IMAGEN™ Parainfluenza virus test reagents have been modified to reduce binding to the protein A of *Staphylococcus aureus* Cowan 1 strain. However, the antibody used in the Parainfluenza virus type 1 reagent may show very weak cross-reaction with Protein A of *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* may be present in clinical specimens and therefore be inoculated into cell culture where its replication should be inhibited by antimicrobials.

Staphylococcus aureus invariably appears as tetrads or grape-like clusters of cocci (each approximately 1µM in diameter) and is likely to be extra cellular unlike the characteristic intra-cellular, fine granular staining seen in cell culture infected with Parainfluenza virus.

12.3 The type and condition of the instrumentation used will influence the visual appearance of the image obtained. The end-point reaction may vary due to the type of microscope employed, the light source, age of the bulb, filter assembly and filter thickness, differences in sensitivity of the antigen substrate, or the assay procedure used. Each laboratory should establish its own criteria for reading of end-points using appropriate controls.

12.4 Failure to detect a Parainfluenza virus in cell culture may be a result of factors such as inappropriate collection, improper sampling and/or handling of specimen, failure of cell culture etc. A negative result does not exclude the possibility of a Parainfluenza virus infection.

12.5 Both the IMAGEN™ Parainfluenza Group and Typing reagents react with Parainfluenza virus antigens present in infected cells. A positive result, however, is not an indicator of the viability of the Parainfluenza virus present.

12.6 The monoclonal antibodies used in the IMAGEN™ Parainfluenza Group and Typing reagents have been raised against prototype Parainfluenza strains. The antibodies may not detect all antigenic variants or new strains of Parainfluenza virus.

12.7 Antigenic variation in the epitopes targeted by the monoclonal antibodies present in the IMAGEN™ Parainfluenza Group and Typing tests may give rise to new antigenic variants which may no longer be recognised by the antibodies.

12.8 The prevalence of the analyte will affect the predictive value of the assay.

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

12.10 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.

12.11 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.

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

The isolation rate for Parainfluenza viruses may vary depending on the type of test used, the method, the time and site of specimen collection, the handling, storage and transportation of samples. It is also dependent upon the population prevalence rates, as well as the age, geographic location and socio-economic status of the population tested.

Parainfluenza virus types 1, 2 and 3 are prevalent throughout the world and are associated with respiratory tract infections in temperate, tropical and arctic climates.¹⁰ Most infections occur in infants under 5 years old in whom Parainfluenza viruses account for 20% of respiratory tract infections and 30-40% of cases of croup.^{11,12}

Over 90% of infants will experience a primary infection with a Parainfluenza virus and up to 50% may experience symptomatic reinfections.²

Parainfluenza viruses show high prevalence rates during seasonal outbreaks of respiratory tract infections. In temperate zones Parainfluenza viruses are most commonly associated with outbreaks in the autumn and winter months.^{13,14} In some countries outbreaks of Parainfluenza virus type 3 infections may also occur in the spring and summer months.³

Highest attack rates occur in children between the ages of 1 to 5 years. Infections or reinfections in older children and adults are usually associated with milder respiratory symptoms.

Parainfluenza viruses have been implicated in outbreaks of respiratory tract infections in hospitals, particularly paediatric wards and in geriatric institutions, where they have been associated with increased morbidity and mortality.⁶

During the winter of 1994-1995 the overall incidence of Parainfluenza virus at one trial centre based on viral isolation results was 12.5% (21/168) for Parainfluenza virus type 1, 1.8% (3/168) for Parainfluenza virus type 2 and 14.3% (24/168) for Parainfluenza virus type 3 virus. These figures do not accurately represent the prevalence of Parainfluenza virus in the overall population as specimens were taken from a selected population under investigation for respiratory tract infections.

14 SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 CLINICAL STUDIES

14.1.1 Direct specimens

The IMAGEN™ Parainfluenza virus Group test and the IMAGEN™ Parainfluenza virus 1, 2 and 3 Typing test were evaluated for direct use on nasopharyngeal secretions at three centres, one in the US and two in the UK. Direct specimens were collected during the winter of 1994-1995.

The clinical trial was carried out using nasopharyngeal aspirate specimens from patients with suspected respiratory virus infections, which were collected and processed as outlined in section 9.1.1. Acetone fixed slides were tested either fresh (stored at 2-8 °C and tested within 3 days) or frozen and tested at a later date. The standard (reference) methods used were a commercially available indirect immunofluorescence test and viral isolation and identification.

A specimen was scored positive with the IMAGEN™ Parainfluenza virus Group reagent or IMAGEN™ Parainfluenza virus types 1, 2 and 3 reagents if one or more respiratory epithelial cells showed the typical pattern of fluorescence described in Section 11.2.1.

14.1.2 Culture confirmation

The IMAGEN™ Parainfluenza virus Group test and the IMAGEN™ Parainfluenza virus 1, 2 and 3 Typing test were tested in clinical trials at 4 centres within the UK.

Clinical trials were undertaken during July-October 1991. During this time the overall incidence of Parainfluenza virus at one trial centre was 14.4% (15/104) for Parainfluenza 1 virus and 8.7% (9/104) for Parainfluenza 3 virus. These figures do not accurately represent the prevalence of Parainfluenza virus in the overall population as specimens were taken from a selected population under investigation for respiratory tract infections. Studies were performed on samples prepared from cell culture monolayers inoculated with clinical samples collected from patients with suspected Parainfluenza virus infection. The standard methods for identification of Parainfluenza virus in cell cultures were either neutralisation tests or indirect immunofluorescence. The IMAGEN™ Parainfluenza virus reagents were also tested for cross-reactivity against a range of micro-organisms likely to be present in routine clinical samples (see Section 14.3).

14.2 CLINICAL PERFORMANCE

14.2.1 Direct specimens

A total of 222 samples from patients with suspected respiratory virus infections were tested in the IMAGEN™ Parainfluenza virus Group test and the IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3 test. At a centre in the Northeast US during the winter of 1994-1995, a total of 184 samples were collected from a paediatric population and assessed in order to determine the sensitivity and specificity of the test. The majority of these were tested in comparison with viral isolation, and a smaller number were tested in comparison with the reference indirect immunofluorescence test. Tables 14.1 and 14.2 show results from the US Centre. At the two UK centres, a selection of samples known to contain Parainfluenza virus were assessed in order to increase the number of positive samples obtained. These results can be seen in Tables 14.3 and 14.4. Results comparing the positivity rates for Parainfluenza viruses at all centres are shown in Tables 14.5 and 14.6.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Types 1, 2 and 3)

At the US centre the IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Types 1, 2 and 3) test showed a correlation of 97.6% against viral culture, and 98.4% against the reference indirect immunofluorescence test. The relative sensitivity and specificity of the IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Types 1, 2 and 3) test were 97.9% and 97.5% respectively when compared with viral isolation. In comparison with the reference indirect immunofluorescence test, the relative sensitivity and specificity were 96.2% and 99.0% respectively.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 1

At the US Centre the IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 1 reagent showed a correlation, sensitivity and specificity of 100% when compared with viral isolation and the reference immunofluorescence test.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 2

At the US centre, the IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 2 reagent showed a correlation, sensitivity and specificity of 100% when compared with viral isolation and the reference immunofluorescence test.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 3

At the US Centre the IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 3 reagent showed a correlation of 97.6%, and sensitivity and specificity of 91.6% and 98.6% respectively when compared with viral isolation. When compared with the reference immunofluorescence test, the correlation, sensitivity and specificity were 98.4%, 75% and 99.1% respectively.

Table 14.1 Comparison of performance of IMAGEN™ Parainfluenza virus reagents with viral isolation on nasopharyngeal aspirates at the U.S. Centre

IMAGEN™ Parainfluenza virus reagents				
IMAGEN™ Parainfluenza virus reagent	No. of samples tested	No. of samples positive by viral isolation	Sensitivity	Specificity
Parainfluenza 1 (95% Confidence intervals)	168	21	100% (21/21) (84.0%-100%)	100% (147/147) (97.51%-100%)
Parainfluenza 2 (95% Confidence intervals)	168	3	100% (3/3) (29.3%-100%)	100% (165/165) (97.79%-100%)
Parainfluenza 3 (95% Confidence intervals)	168	24	92% (22/24) (73.0%-98.97%)	98.6% (142/144) (95.08%-99.83%)
Parainfluenza Group (95% Confidence intervals)	168	48	97.9 (47/48) (89.0% - 99.95%)	97.5% (117/120) (92.89% - 99.48%)

Table 14.2 Comparison of IMAGEN™ Parainfluenza virus reagents with reference immunofluorescence on nasopharyngeal aspirates at the U.S. Centre

IMAGEN™ Parainfluenza virus reagent	No. of samples tested	No. of samples positive by reference immuno-fluorescence	IMAGEN™ Parainfluenza virus reagents	
			Relative sensitivity	Relative specificity
Parainfluenza 1 (95% Confidence intervals)	127	21	100% (21/21) (84.0%-100%)	100% (127/127) (96.59%-100%)
Parainfluenza 2 (95% Confidence intervals)	127	1	100% (1/1) (2.5%-100%)	100% (127/127) (97.12%-100%)
Parainfluenza 3 (95% Confidence intervals)	127	4	75% (3/4) (19.4%-99.37%)	99.1% (122/123) (95.55%-99.98%)
Parainfluenza Group (95% Confidence intervals)	127	26	96.2% (25/26) (80.4% - 99.9%)	99.0% (100/101) (94.61% - 99.98%)

Note: Please be advised that 'relative' refers to the comparison of this assay's results with that of a similar assay. There was not an attempt to correlate the assay's results with disease presence or absence. No judgement can be made on the comparison assay's accuracy to predict disease.

Table 14.3 Comparison of performance of IMAGEN™ Parainfluenza reagents with viral isolation on nasopharyngeal aspirates at 2 UK Centres

Viral isolation		Pos	Neg	Pos	Neg
IMAGEN™ reagent		Pos	Neg	Neg	Pos
Parainfluenza 1	n = 35	3	31	0	1**
Parainfluenza 2	n = 35	2	32	1*	0
Parainfluenza 3	n = 35	27	7	1*	0
Parainfluenza Group	n = 35	30	0	4***	1**

* Both specimens negative also by reference immunofluorescence

** This specimen was also positive by reference immunofluorescence

*** Two of these specimens negative also by reference immunofluorescence.

Table 14.4 Comparison of performance of IMAGEN™ Parainfluenza reagents with reference immunofluorescence on nasopharyngeal aspirates at 2 UK Centres

Reference immunofluorescence		Pos	Neg	Pos	Neg
IMAGEN™ reagent		Pos	Neg	Neg	Pos
Parainfluenza 1	n = 38	3	35	0	0
Parainfluenza 2	n = 38	3	35	0	0
Parainfluenza 3	n = 38	30	8	0	0
Parainfluenza Group	n = 38	34	2	2*	0

* One specimen was reported to contain few cells.

Table 14.5 Comparison of Parainfluenza positivity rates with IMAGEN™ Parainfluenza reagents and viral isolation on nasopharyngeal aspirates from all centres

IMAGEN™ reagent	Number detected by viral isolation	Number detected by IMAGEN™	% Agreement
Parainfluenza 1	24	24	100%
Parainfluenza 2	6	5	83.3%
Parainfluenza 3	52	49	94.2%
Parainfluenza Group	82	77	93.9%

Table 14.6 Comparison of Parainfluenza positivity rates with IMAGEN™ Parainfluenza reagents and reference immunofluorescence on nasopharyngeal aspirates from all centres

IMAGEN™ reagent	Number detected by reference immunofluorescence	Number detected by IMAGEN™	% Agreement
Parainfluenza 1	24	24	100%
Parainfluenza 2	4	4	100%
Parainfluenza 3	34	33	97.0%
Parainfluenza Group	62	59	95.2%

14.2.2 Culture confirmation

IMAGEN™ Parainfluenza virus Group

The IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Types 1, 2 and 3) test showed a correlation of 98.3% with the standard methods (Table 14.7). The relative sensitivity and relative specificity of the test were 98.3% and 98.5% respectively.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3

The relative sensitivities for the individual Parainfluenza virus types 1, 2 and 3 reagents were 96.1%, 100% and 97.4% respectively. The relative specificities for the individual Parainfluenza virus types 1, 2 and 3 reagents were 99.3%, 99.7% and 98.4% respectively.

Table 14.7 Comparison of IMAGEN™ Parainfluenza virus reagents with standard methods for culture confirmation

IMAGEN™ Parainfluenza virus reagent	No. of Samples tested	No. of Samples positive by Standard methods	IMAGEN™ Parainfluenza virus reagents ^a	
			Relative Sensitivity	Relative Specificity ^b
Parainfluenza 1 (95% Confidence Intervals)	322	51	96.1% (49/51) (86.5% - 99.5%)	99.3% (269/271) (97.4% - 99.9%)
Parainfluenza 2 (95% Confidence Intervals)	315	24	100% (24/24) (85.8% - 100%)	99.7% (290/291) (98.1% - 100%)
Parainfluenza 3 (95% Confidence Intervals)	345	155	97.4% (151/155) (93.5% - 99.3%)	98.4% (187/190) (95.5% - 99.7%)
Parainfluenza Group (95% Confidence Intervals)	363	229	98.3% (225/229) (95.6% - 99.5%)	98.5% (132/134) (94.7% - 99.8%)

^a Results from one of the four trial centres include a proportion of frozen samples.

^b IMAGEN™ Parainfluenza virus reagents detected two type 1 strains and one type 3 strain which were not detected using the standard methods.

14.3 CROSS-REACTIVITY

The micro-organisms listed in Table 14.8 were tested in the IMAGEN™ Parainfluenza virus Group and the IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3 tests and showed no cross-reactivity. Cross-reactivity studies were performed on slide preparations of stock cultures or recent microbial isolates.

Table 14.8 Organisms tested with all IMAGEN™ Parainfluenza virus reagents and found to be non-reactive

Micro-organism	Source	No. of Samples tested
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	NCTC 10116 broth culture deposit	1
Adenovirus type 1	Cell Culture	9
Adenovirus type 2	Cell Culture	5
Adenovirus type 3	Cell Culture	8
Adenovirus type 4	Cell Culture	3
Adenovirus type 5	Cell Culture	4
Adenovirus type 7	Cell Culture	3
Adenovirus type 10	Cell Culture	1
Adenovirus type 41	Cell Culture	1
<i>Bordetella parapertussis</i>	Cell Culture	1
<i>Bordetella pertussis</i>	Culture Medium	1
<i>Branhamella catarrhalis</i>	Culture Medium	1
<i>Candida albicans</i>	Culture Medium	1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Cell Culture & Culture Medium	1 of each
<i>Chlamydia psittaci</i>	Cell Culture	2
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Cell Culture	2
Cowpox virus	Cell Culture	1
Coxsackie virus type A7	Cell Culture	1
Coxsackie virus type A9	Cell Culture	1
Coxsackie virus type B3	Cell Culture	3
Coxsackie virus type B4	Cell Culture	1
Coxsackie virus type B5	Cell Culture	2
Cytomegalovirus	Cell Culture	2
Echovirus type 5	Cell Culture	1
Echovirus type 11	Cell Culture	1
Echovirus type 19	Cell Culture	2
Echovirus type 30	Cell Culture	4
Epstein-Barr virus	Continuous cell culture line	1
<i>Escherichia coli</i>	Culture Medium	1
Foamy virus	Cell Culture	1

<i>Haemophilus influenzae</i>	Culture Media & Sputum deposit	1 of each
<i>Herpes simplex virus type 1</i>	Cell Culture	3
<i>Herpes simplex virus type 2</i>	Cell Culture	2
<i>Influenza virus A</i>	Cell Culture	2
<i>Influenza virus B</i>	Cell Culture	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Culture Medium	1
<i>Legionella pneumophila</i>	Culture Medium	1
<i>Measles virus</i>	Cell Culture	3
<i>Mumps virus</i>	Cell Culture	8
<i>Mycobacterium avium</i>	Culture Medium	1
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Culture Medium	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Culture Medium	1
<i>Mycoplasma arginini</i>	NCTC 10129 broth culture deposit	1
<i>Mycoplasma hominis</i>	NCTC 10111 broth culture deposit	1
<i>Mycoplasma hyorhinus</i>	NCTC 10130 broth culture deposit	1
<i>Mycoplasma orale</i>	NCTC 10112 broth culture deposit	1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NCTC 10119 broth culture deposit	1
<i>Mycoplasma salivarium</i>	NCTC 10113 broth culture deposit	1
<i>Neisseria cinerea</i>	Culture Medium	1
<i>Neisseria flavescens</i>	Culture Medium	1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Culture Medium	1
<i>Neisseria lactamica</i>	Culture Medium	1
<i>Neisseria meningitidis</i> A, B, C & D	Culture Medium	1 of each
<i>Neisseria mucosa</i>	Culture Medium	1
<i>Neisseria perflava</i>	Culture Medium	1
<i>Neisseria pharyngis</i>	Culture Medium	1
<i>Parainfluenza virus 4a</i>	Cell Culture	2
<i>Pneumocystis carinii</i>	Clinical Specimen	1
<i>Polio virus type 1</i>	Cell Culture	1
<i>Polio virus type 2</i>	Cell Culture	2
<i>Polio virus type 3</i>	Cell Culture	3
<i>Respiratory syncytial virus</i>	Cell Culture	8
<i>Rhinovirus</i>	Cell Culture	6
<i>Sendai virus</i>	Cell Culture	1
<i>Streptococcus</i> groups A, B, C, D, F and G	Culture Medium	1 of each
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sputum Deposit	1
<i>Varicella zoster virus</i>	Cell Culture	2

1 UTILISATION PREVUE

Les kits **IMAGEN™ Parainfluenza** sont des tests d'immunofluorescence directe qualitative pour la détection et la différenciation des virus Parainfluenza de type 1, 2 et 3 dans les aspirations nasopharyngées ou en cultures cellulaires. Les kits sont disponibles sous deux formes :

IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Code K6103) pour la détection et la confirmation de la présence d'antigènes du virus Parainfluenza dans les aspirations nasopharyngées et en cultures cellulaires.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3 (Code K6104) pour la détection et la différenciation sélective des types 1, 2 et 3 du virus Parainfluenza dans les aspirations nasopharyngées et en cultures cellulaires.

Il est recommandé de confirmer la négativité d'un résultat en recherche directe sur aspirations nasopharyngées par une mise en culture du prélèvement.

2 RESUME

Les virus Parainfluenza appartiennent au genre Paramyxovirus classé dans la famille des Paramyxoviridae.¹ Il y a 6 types de virus Paramyxovirus connus qui infectent l'homme, dont les virus Parainfluenza 1, 2, 3 et 4 (sous-types 4a et 4b), le Myxovirus parotidis et le virus de la maladie de Newcastle. Parmi les 4 virus Parainfluenza, les types 1, 2, et 3 sont reconnus aujourd'hui comme étant l'une des causes majeures de l'apparition de maladies respiratoires aiguës chez les nourrissons et les enfants.^{2,3}

Les virus Parainfluenza se propagent par contact direct ou par inhalation de gouttelettes infectées provenant de l'appareil respiratoire d'individus symptomatiques. Les sécrétions nasales peuvent contenir une concentration élevée de virus. Le virus se multiplie dans les cellules épithéliales prismatiques ciliées de l'appareil respiratoire supérieur et inférieur causant la nécrose et la mue des cellules. La charge virale s'effectue de 1 jour avant à 7 jours après l'apparition des symptômes. Cette réplication peut persister chez les patients immunodéprimés.^{4,5}

Les virus Parainfluenza de types 1, 2 et 3 peuvent infecter et provoquer une pathologie de la totalité de l'appareil respiratoire supérieur et inférieur. La plupart des infections virales à virus Parainfluenza se manifestent cliniquement sous forme de laryngo-trachéo-bronchites aiguës (croup) chez les nourrissons et les enfants. Cependant, les infections à virus Parainfluenza sont aussi associées aux trachéo-bronchites, aux bronchites, aux pneumonies et à une série de symptômes affectant l'appareil respiratoire supérieur.

Les infections à virus Parainfluenza peuvent être occasionnellement graves chez les nourrissons, provoquant l'obstruction des voies aériennes et une détresse respiratoire, lesquelles peuvent mener à un accroissement de la morbidité et de la mortalité chez des patients souffrant d'une maladie sous-jacente comme la mucoviscidose, ou chez des patients immunodéprimés.

Les virus Parainfluenza ont été associés à l'écllosion d'infections de l'appareil respiratoire dans les services de pédiatrie et de gériatrie, provoquant une hospitalisation prolongée et une augmentation du taux de morbidité et de mortalité.⁶ Un diagnostic rapide est important dans le traitement des patients et le contrôle des premières manifestations de la maladie.

Actuellement, les principales méthodes de diagnostic des infections dues aux virus Parainfluenza sont soit l'isolement et l'identification en monocouches de cultures cellulaires, soit la détection directe du virus dans des échantillons cliniques.

Après isolement du virus par culture cellulaire, il est nécessaire, pour identifier le virus, de procéder à une analyse supplémentaire, à une neutralisation, à une réaction d'inhibition de l'hémoagglutination ou à un examen au microscope électronique. Ces tests sont difficiles et longs et exigent un degré de compétence technique élevé. Ils peuvent donc ne pas être à la portée de beaucoup de laboratoires.

Plus récemment, on a décrit des tests d'immunofluorescence indirecte qui utilisent des anticorps polyclonaux ou monoclonaux pour identifier et confirmer la présence des virus Parainfluenza en monocouches de cultures cellulaires ou directement sur des spécimens cliniques.^{7,8,9} Les tests par immunofluorescence directe utilisant des anticorps monoclonaux marqués à la fluorescéine offrent une méthode plus rapide et plus spécifique pour la détection des virus dans les spécimens cliniques ou les cultures cellulaires.

Les kits IMAGEN™ Parainfluenza sont des tests d'immunofluorescence directe destinés à la détection et à l'identification des virus Parainfluenza de type 1, 2 et 3 directement dans les aspirations nasopharyngées ou les cultures cellulaires. Ces tests utilisent des anticorps monoclonaux spécifiques pour détecter et identifier les virus Parainfluenza de type 1, 2 et 3.

3 PRINCIPE DU TEST









Les kits IMAGEN™ Parainfluenza virus contiennent de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) conjugué à des anticorps monoclonaux qui se lient spécifiquement à l'un des types 1, 2, ou 3 du virus Parainfluenza. Ceux-ci sont utilisés en technique d'immunofluorescence directe. Les spécimens sont incubés avec les réactifs conjugués au FITC pendant 15 minutes. L'excès de réactif est ensuite éliminé par lavage à l'aide d'un tampon phosphate en solution saline (PBS). L'observation s'effectue après montage des spécimens colorés au moyen d'un éclairage par épifluorescence. Si les types 1, 2 ou 3 du virus Parainfluenza sont présents, ils sont signalés par une fluorescence intracellulaire vert pomme caractéristique des cellules infectées, et qui contraste avec la contre-coloration rouge des cellules non-infectées.

Remerciements



Les anticorps monoclonaux utilisés dans ces tests ont été produits par le Department of Respiratory and Enteric Viruses, Public Health Services, Centre for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA.

4 DEFINITIONS


Les symboles et définitions suivants, utilisés dans les documents d'information sur les produits, sont conformes à la norme ISO 15223 et à la directive EN 980.

	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.
	Limites de température.

5 REACTIFS FOURNIS

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

5.1 REACTIFS IMAGEN™ PARAINFLUENZA FOURNIS

 Un livret d'instructions d'utilisation.

POSITIVE CONTROL SLIDE 2 x 3 lames clairement positives contenant des cellules rénales (Veros) de singe vert fixées dans l'acétone et infectées par le virus Parainfluenza de type 1, 2 ou 3 (souches CDC V6-004, CDC V7-003 et CDC V5-003 respectivement).

MOUNTING FLUID 3 mL de liquide de montage. Le liquide de montage contient un inhibiteur de blanchissage optique dans une solution de glycérol (pH 10,0).

Un flacon de chacun des produits suivants :

IMAGEN™ PARAINFLUENZA VIRUS GROUP REAGENTS – K6103

REAGENT G 1,4 mL de réactif IMAGEN™ Parainfluenza pour les virus des types 1, 2 et 3. Ce réactif consiste en un mélange de 3 anticorps monoclonaux murins purifiés, spécifiques des types 1, 2 et 3 du virus Parainfluenza, conjugué au FITC et dilué dans une solution de protéines stabilisée par un tampon phosphate en solution saline contenant du bleu Evans comme contre-colorant. Les anticorps monoclonaux sont dirigés contre la protéine F du Parainfluenza de type 1, la protéine de l'hémoagglutinine du Parainfluenza de type 2 et la protéine de l'hémoagglutinine du Parainfluenza de type 3, respectivement

OU

**IMAGEN™ PARAINFLUENZA VIRUS TYPES 1, 2 AND 3
REAGENTS – K6104**

REAGENT 1 1,4 mL de réactif IMAGEN™ Parainfluenza pour la détection du virus du type 1. Ce réactif consiste en un anticorps monoclonal murin purifié, spécifique du virus Parainfluenza du type 1 (dirigé contre la protéine F du Parainfluenza de type 1), conjugué au FITC et dilué dans une solution de protéines stabilisée par un tampon phosphate en solution saline contenant du bleu Evans comme contre-colorant.

REAGENT 2 1,4 mL de réactif IMAGEN™ Parainfluenza pour la détection du virus du type 2. Ce réactif consiste en un anticorps monoclonal murin purifié spécifique du virus Parainfluenza du type 2 (dirigé contre la protéine de l'hémoagglutinine du Parainfluenza de type 2), conjugué au FITC et dilué dans une solution de protéines stabilisée par un tampon phosphate en solution saline contenant du bleu Evans comme contre-colorant.

REAGENT 3 1,4 mL de réactif IMAGEN™ Parainfluenza pour la détection du virus du type 3. Ce réactif consiste en un anticorps monoclonal murin purifié spécifique du virus Parainfluenza du type 3 (dirigé contre la protéine de l'hémoagglutinine du Parainfluenza de type 3), conjugué au FITC et dilué dans une solution de protéines stabilisée par un tampon phosphate en solution saline contenant du bleu Evans comme contre-colorant.

**5.2 PREPARATION, STOCKAGE ET REUTILISATION DES
COMPOSANTS DU KIT**

Pour des performances optimales, il convient de stocker tous les composants du kit inutilisés en respectant les consignes données.

5.3 LAMES DE CONTROLE POSITIF - POSITIVE CONTROL SLIDE

Les lames de contrôle positif sont fournies dans un emballage individuel sous atmosphère d'azote. Conserver les lames inutilisées à une température comprise entre 2 et 8°C. Avant d'ouvrir l'emballage, laisser les lames emballées séjourner 5 minutes à température ambiante (15 à 30°C).

Procéder à la coloration des lames immédiatement après les avoir sorties de leur emballage.

5.4 LIQUIDE DE MONTAGE - MOUNTING FLUID

Prêt à l'emploi. Conserver le liquide de montage inutilisé à une température comprise entre 2 et 8°C. Laisser le liquide de montage séjourner 5 minutes à température ambiante (15 à 30°C) avant de l'utiliser.

5.5 REACTIFS, GROUPES 1, 2 ET 3 – REAGENT G|REAGENT 1|REAGENT 2|REAGENT 3

Prêts à l'emploi. Conserver les réactifs inutilisés à l'abri de la lumière à une température comprise entre 2 et 8°C. Laisser ces réactifs séjourner 5 minutes à température ambiante (15 à 30°C) avant de les utiliser.

6 REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

6.1 REACTIFS

Acétone frais (pour la fixation).

Tampon phosphate en solution saline (PBS), pH 7,5, pour le lavage des échantillons marqués et la préparation des échantillons.

6.2 ACCESSOIRES

Les produits suivants doivent être utilisés avec les réactifs K6103 et K6104. Pour toute information complémentaire, veuillez contacter votre filiale ou votre distributeur local(e) Dakocytomation.

Lames pour microscope en verre recouvertes de téflon avec un seul puits de 6mm de diamètre (100 lames par boîte) disponibles auprès de votre représentant ou distributeur régional DakoCytomation, (Code S6114).

Lames de contrôle positif (Code S6111).

7 MATERIEL

Le matériel suivant est nécessaire :

Pipette de précision et embouts jetables de 25 µL.

Bain de lavage.

Lamelles couvre objet pour puits de 6 mm de diamètre.

Huile d'immersion non fluorescente.

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

Incubateur à 37°C.

Centrifugeuse de paillasse.

Pour les spécimens directs

Extracteur de mucus.

Pour la confirmation en culture

Ecouvillons stériles, milieu de transport viral (VTM) et récipient approprié pour le prélèvement, le transport et la culture des virus Parainfluenza.

Pour de plus amples informations sur l'utilisation d'un milieu de transport viral, veuillez consulter la référence 13 de la Section 13 (disponible auprès de votre filiale DakoCytomation).

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

Une lame de contrôle négatif préparée à partir de cellules intactes non contaminées du même type que celles utilisées pour la culture et l'isolement des virus Parainfluenza. Les cellules doivent être préparées et fixées comme indiqué à la Section 7.1 et marquées comme indiqué à la Section 8.

8 PRECAUTIONS D'EMPLOI

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

8.1 MESURES DE SECURITE

8.1.1 Les réactifs du test IMAGEN™ Parainfluenza contiennent 15 mmol/l d'azide de sodium, un toxique. L'azide de sodium est susceptible de réagir avec le plomb et le cuivre pour former des azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter l'accumulation d'azides métalliques dans les vidanges.

8.1.2 Les virus Parainfluenza des lames de contrôle se sont révélés non infectieux lors de la culture cellulaire. Toutefois, il convient de les manipuler et de les éliminer comme des lames susceptibles d'être infectieuses.

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

8.1.4 Etre très prudent lors de l'utilisation du liquide de montage, dans la mesure où il peut provoquer des irritations cutanées. En cas de contact avec la peau, rincer abondamment à l'eau.

8.1.5 Ne pas manger, boire, fumer, conserver ou préparer de la nourriture, ni utiliser des cosmétiques dans les lieux d'utilisation.

8.1.6 Ne pas pipeter avec la bouche.

8.1.7 Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons cliniques et des cellules infectées, et toujours se laver les mains après avoir utilisé des substances infectieuses.

8.1.8 Eliminer tous les spécimens cliniques conformément aux réglementations locales en vigueur.

8.1.9 Fiche toxicologique disponible pour les utilisateurs professionnels, sur demande.

8.2 PRECAUTIONS TECHNIQUES

8.2.1 Ne pas utiliser les composants après la date d'expiration imprimée sur les étiquettes. Ne pas mélanger ni intervertir différents lots de réactifs.

8.2.2 Les réactifs sont fournis à des concentrations dosées fixes. Les performances du test seront altérées si les réactifs sont modifiés ou stockés dans des conditions autres que celles décrites dans la Section 5.

8.2.3 Les réactifs de typage ne doivent pas être mélangés, ni utilisés ensemble dans un même puits. La sensibilité du test risquerait d'en être affectée négativement.

8.2.4 Préparer uniquement la quantité de tampon phosphate en solution saline (PBS) nécessaire pour un jour.

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

8.2.6 Éviter toute contamination microbienne des réactifs.

8.2.7 Ne pas congeler les réactifs.

9 PRÉLÈVEMENT ET LA PRÉPARATION

Le prélèvement et la préparation des spécimens revêtent une importance primordiale dans le diagnostic du virus Parainfluenza par culture cellulaire. Il convient de prélever les spécimens sur le site de l'infection au plus fort de la réplication virale afin qu'ils contiennent autant de substances infectées que possible. Il est conseillé d'utiliser, comme échantillon respiratoire, un spécimen nasopharyngien prélevé par aspiration (NPA) qui devrait comporter un grand nombre de cellules épithéliales respiratoires.

9.1 Echantillons Cliniques

9.1.1 Aspirations nasopharyngées

Prélèvement

Prélever des spécimens dans le nasopharynx en utilisant une sonde nasale numéro 8 connectée à un extracteur à mucus. L'extracteur à mucus et la sonde devront être maintenus à une température comprise entre 2 et 8°C, et être envoyés au laboratoire le plus rapidement possible pour procéder à l'analyse.

Séparation des cellules

Ajouter, le cas échéant, 2 mL de tampon phosphate en solution saline (PBS) à l'échantillon avant la centrifugation pour réduire la viscosité et diluer le mucus. Centrifuger l'extracteur à mucus à température ambiante (15 à 30°C) pendant 10 minutes à 380g. Retirer le surageant qui peut être utilisé pour la culture cellulaire. Remettre en suspension le culot de centrifugation dans 2 mL de PBS.

Aspirer doucement avec une pipette large et rejeter plusieurs fois, ou bien agiter doucement au vortex jusqu'à dissolution du mucus et libération des éléments cellulaires. Il conviendra d'utiliser la pipette/le vortex avec précaution pour éviter d'endommager les cellules. Lorsque vous aurez obtenu une suspension lisse, ajoutez du PBS si nécessaire, et utilisez la pipette ou le vortex de la même manière pour mieux laver les cellules. Retirer et jeter les traces de mucus visibles restantes. L'excédent de mucus doit être retiré car il peut empêcher la bonne pénétration du réactif et entraîner une fluorescence non spécifique.

Si toutes les sécrétions restent dans la sonde et qu'aucune ne parvient dans l'extracteur à mucus, laver la sonde pour en retirer toutes les sécrétions avec du PBS. Vous pouvez utiliser une pipette pasteur placée au bout de la sonde qui était reliée à l'extracteur de mucus.

Aspirer le fluide voulu dans la sonde et l'éjecter plusieurs fois jusqu'à ce que les sécrétions collées aux parois de la sonde se détachent. Servez-vous encore une fois de la pipette de la même manière pour aspirer et rejeter la suspension épaisse obtenue jusqu'à ce que le mucus soit dissous.

Préparation des lames

Centrifuger la suspension de cellules obtenue à température ambiante (15 à 30°C) pendant 10 minutes à 380g, et jeter le surnageant. Remettre en suspension le culot de centrifugation dans suffisamment de PBS pour diluer le mucus restant tout en maintenant en même temps une haute densité cellulaire. Placer 25 µL du culot de centrifugation remis en suspension dans le puits d'une lame.

Un puits sera nécessaire pour le test IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Code K6103). Trois puits seront nécessaires pour le test IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3 (Code K6104).

Laisser sécher l'échantillon à l'air libre à température ambiante (15 à 30°C) et fixer à l'acétone frais à température ambiante (15 à 30°C) pendant 10 minutes. Si l'échantillon n'est pas testé immédiatement, congeler la lame à -70°C. Les lames ainsi conservées devront être testées dans un délai de deux semaines après la préparation pour éviter toute détérioration.

9.2 CONFIRMATION ET TYPAGE PAR CULTURE CELLULAIRE

Inoculation des cultures cellulaires

Les échantillons prélevés en vue du diagnostic d'infections dues aux virus Parainfluenza doivent être inoculés dans les lignées cellulaires habituellement utilisées par le laboratoire selon les méthodes établies du laboratoire. Les cultures cellulaires doivent être examinées régulièrement pour détecter l'apparition d'un effet cytopathogène (CPE), et les tests d'hémadsorption doivent être effectués à intervalles réguliers. Toute culture cellulaire dont l'hémadsorption est positive, ou faisant apparaître un effet cythopathogène, peut être recueillie et analysée pour détecter la présence des virus Parainfluenza.

Préparation des lames

Gratter la couche de cellules dans le milieu de culture en utilisant une pipette stérile.

Déposer les cellules par centrifugation à 200g pendant 10 minutes à température ambiante (15 à 30°C), et enlever le surnageant.

Laver les cellules par remise en suspension du précipité de cellules dans un tampon phosphate en solution saline (PBS) et répéter la centrifugation. Enlever le surnageant et remettre en suspension le précipité de cellules dans un petit volume (75 à 100 µL par tube de culture) de PBS frais pour maintenir une haute densité de cellules.

Déposer 25 µL d'aliquote de suspension de cellules dans les puits des lames.

Un puits est nécessaire pour le test IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Code K6103).

Trois puits sont nécessaires pour le test IMAGEN™ Parainfluenza virus (Code K6104).

Laisser sécher complètement à l'air libre et à température ambiante (15 à 30°C) et fixer dans de l'acétone frais à température ambiante (15 à 30°C) pendant 10 minutes. Si le marquage de l'échantillon n'est pas réalisé immédiatement, il est possible de conserver l'échantillon une nuit à 4°C ou de le congeler à -20°C si la période de conservation risque d'être plus longue. Les lames stockées doivent être testées dans les 2 semaines suivant leur préparation car une détérioration surviendrait en cas de conservation prolongée.

10 MODE OPERATOIRE

VEUILLEZ CONSULTER LA SECTION 8.2, PRECAUTIONS TECHNIQUES, AVANT DE REALISER LE TEST.

Pour connaître la procédure du test IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Code K6103), consulter la section 10.1. Pour connaître la procédure du test IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3 (Code K6104), consulter la section 10.2.

10.1 IMAGEN™ PARAINFLUENZA VIRUS GROUP - K6103

10.1.1 Ajout du réactif

Ajouter 25 µL de Réactif G sur la préparation de cellules fixées (voir section 9.1), sur les lames de contrôles positif et négatif en prenant soin que le réactif recouvre toute la surface du puits.

10.1.2 Première incubation

Incuber les lames contenant le réactif pendant **15 minutes à 37°C dans une chambre humide. Ne pas** laisser sécher le réactif sur l'échantillon (cela provoque l'apparition d'une coloration non spécifique).

10.1.3 Lavage de la lame

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

10.1.4 Ajout de liquide de montage

Ajouter une goutte de liquide de montage au centre de chaque puits et recouvrir d'une lamelle couvre objet pour éviter la formation de bulles d'air.

10.1.5 Lecture de la lame

Examiner dans son ensemble la surface du puits contenant l'échantillon marqué, au moyen d'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 lames doivent en principe être examinées immédiatement après le marquage, mais elles peuvent être conservées entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière, pendant 72 heures au maximum.

10.2 IMAGEN™ PARAINFLUENZA VIRUS TYPES 1, 2 AND 3 - K6104

10.2.1 Ajout du réactif

Déposer 25 µL de Réactif 1 sur le premier puits, 25 µL de Réactif 2 sur le deuxième puits et 25 µL de Réactif 3 sur le troisième puits contenant les cellules fixées (voir Section 9.1) et sur les lames de contrôles positif et négatif. Vérifier que le réactif recouvre toute la surface du puits.

Il est recommandé d'utiliser 25 µL de réactif pour recouvrir un puits. Toute réduction de volume pourra diminuer la sensibilité du test.

10.2.2 Première incubation

Incuber les lames contenant le réactif **pendant 15 minutes à 37°C** dans une **chambre humide**. **Ne pas** laisser sécher le réactif sur l'échantillon (cela provoque l'apparition d'une coloration non spécifique).

10.2.3 Lavage de la lame

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

10.2.4 Ajout de liquide de montage

Ajouter une goutte de liquide de montage au centre de chaque puits et recouvrir d'une lamelle couvre objet pour éviter la formation de bulles d'air.

10.2.5 Lecture de la lame

Examiner dans son ensemble le puits contenant l'échantillon marqué, au moyen d'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 lames doivent en principe être examinées immédiatement après le marquage, mais elles peuvent être conservées entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière, pendant 72 heures au maximum.

11 INTERPRETATION DES RESULTATS DES TESTS

11.1 CONTROLES

11.1.1 Lame de contrôle positif

Une fois traitée et examinée conformément aux instructions de la Section 10, la lame de contrôle positive doit présenter des cellules rouges avec une fluorescence intracellulaire, nucléaire et/ou cytoplasmique vert pomme, contrastant avec la couleur du contre-colorant. Les lames de contrôle positif doivent servir à vérifier que la procédure de marquage a été réalisée correctement.

Ces lames sont préparées à partir de souches de virus Parainfluenza en culture cellulaire. Elles permettent de contrôler si la procédure du test est bien respectée mais ne donnent aucune indication quant à la qualité de la préparation des échantillons cliniques. Seule l'utilisation d'échantillons positifs permet de contrôler l'étape de la préparation des cellules.

11.1.2 Contrôle négatif

Les lames de contrôle négatif doivent être préparées à partir de cellules intactes non contaminées du même type que celles utilisées pour la culture et l'isolement des virus Parainfluenza. Ces cellules doivent être préparées et fixées comme indiqué à la Section 9.2, et marquées comme indiqué à la Section 10. Les cellules qui se trouvent sur la lame de contrôle négatif présentent une coloration rouge au contact du contre-colorant, le bleu Evans.

Des échantillons cliniques négatifs devront être utilisés pour contrôler la qualité de la préparation des échantillons.

11.2 ECHANTILLONS CLINIQUES

11.2.1 Aspect des cellules contaminées par les virus Parainfluenza

On constate une fluorescence granulaire vert pomme intracellulaire, nucléaire et/ou cytoplasmique dans les cellules épithéliales infectées par le virus Parainfluenza.

Les cellules non infectées sont colorées en rouge avec le colorant bleu Evans.

11.2.2 Interprétation des résultats

On établit un diagnostic positif lorsqu'une ou plusieurs cellules du spécimen marqué fixé présentent la fluorescence spécifique décrite dans le paragraphe 11.2.1 en présence du réactif IMAGEN™ Parainfluenza virus Group ou de l'un des réactifs individuels IMAGEN™ Parainfluenza virus type 1, 2 and 3. Le résultat devra être interprété positivement pour l'antigène du virus Parainfluenza.

Un diagnostic négatif est obtenu lorsque des spécimens marqués fixés ne présentent pas de fluorescence que ce soit avec le réactif IMAGEN™ Parainfluenza virus Group ou avec l'un des réactifs individuels IMAGEN™ Parainfluenza virus types 1, 2 and 3. Le résultat devra être interprété négativement pour l'antigène du virus Parainfluenza, en attendant les résultats de la culture.

Pour les aspirations nasopharyngées, il convient d'observer au moins 20 cellules épithéliales respiratoires non infectées avant de prononcer un résultat négatif. Voir la Section 11.2.3 si un nombre insuffisant de cellules est présent.

11.2.3 Nombre de cellules insuffisant

Si un nombre insuffisant de cellules est présent sur la lame, le restant du spécimen clinique devra être centrifugé à 380g pendant 10 minutes à température ambiante (15 à 30°C).

Remettre en suspension les cellules dans un plus petit volume de PBS avant de redistribuer 25 µL sur l'un des puits d'une lame. Le cas échéant, il faudra demander un nouvel échantillon clinique.

11.3 CONFIRMATION PAR LA MISE EN CULTURE ET LE TYPAGE

11.3.1 Aspect des cellules infectées par le virus Parainfluenza

Les cellules infectées présenteront une fluorescence intracellulaire, nucléaire et/ou cytoplasmique vert pomme et devront être considérées comme positives pour la présence du virus Parainfluenza.

Les cellules non infectées sont colorées en rouge avec le colorant bleu Evans et devront être considérées comme négatives pour la présence du virus Parainfluenza.

11.3.2 Interpretation des résultats

Un diagnostic est établi en tant que positif lorsqu'une ou plusieurs cellules de l'échantillon analysé développent la fluorescence spécifique décrite dans le paragraphe 11.3.1 en présence du réactif IMAGEN™ Parainfluenza virus Group ou de l'un des réactifs IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 1, 2 and 3. Pour qu'un échantillon de culture cellulaire soit considéré comme négatif, au moins 50 cellules non infectées doivent être observées par lame. Voir la Section 11.2.3 si une quantité insuffisante de cellules est présente.

11.3.3 Contrôle de qualité

Des contrôles positifs et négatifs doivent être utilisés à chaque fois que les réactifs IMAGEN™ Parainfluenza sont utilisés pour déterminer la présence de Parainfluenza dans les cultures de cellules contaminées.

Les lames de contrôle positif fournies permettent de contrôler la procédure de marquage et de vérifier la réactivité du réactif avec les cellules contaminées par le virus Parainfluenza. Des lames de contrôle positif supplémentaires sont disponibles auprès de DakoCytomation (Code S6111).

Les réactifs et la technique doivent également être contrôlés en utilisant un prélèvement négatif provenant d'une culture cellulaire non inoculée (non contaminée) du type utilisé pour la détection des virus Parainfluenza.

S'il n'y a pas suffisamment de cellules sur la lame (moins de 50) ou sur la préparation du puits de la lame de contrôle négatif, il convient alors de centrifuger le reste de l'échantillon de culture cellulaire à 200g pendant 10 minutes, à température ambiante (15 à 30°C), et de resuspendre les cellules dans un plus petit volume de PBS (approx. 50 µL). Déposer 25 µL de suspension cellulaire dans les puits, et suivre la procédure décrite aux paragraphes 9 et 10.

Si les deux réactifs IMAGEN™ Parainfluenza pour le groupage et pour le typage des virus sont utilisés et que des résultats négatifs sont obtenus avec les 3 réactifs individuels, après qu'un résultat positif ait été obtenu avec le réactif de groupage, il convient de préparer des échantillons de cellules supplémentaires et de refaire le test. Alternativement, la culture devrait être traitée pour amplifier la quantité de virus et le nombre de cellules infectées présentes avant de répéter le test d'immunofluorescence.

12 LIMITES DU TEST

12.1 N'utiliser que le liquide de montage fourni.

12.2 Une coloration non spécifique apparaît parfois dans les tests immunochimiques, en raison d'une liaison entre les fragments Fc de l'anticorps et la protéine A produite par la paroi cellulaire de certaines souches de *Staphylococcus aureus*. Les réactifs du test IMAGEN™ Parainfluenza virus ont été modifiés pour diminuer la liaison avec la protéine A de la souche Cowan 1 du *Staphylococcus aureus*. Cependant, il se pourrait que l'anticorps utilisé dans le réactif du virus Parainfluenza de type 1 montre une très faible réaction croisée avec la protéine A du *Staphylococcus aureus*. Le *Staphylococcus aureus* peut être présent dans les échantillons cliniques et être alors inoculé dans une structure cellulaire où sa reproduction devrait être inhibée par des antimicrobiens.

Le *Staphylococcus aureus* présente invariablement un groupement caractéristique en tétrade ou en grappes de raisins, constitué de cocci (d'un diamètre d'environ 1 µm chacun), généralement extracellulaire, contrairement au marquage intracellulaire et finement granuleux qui caractérise la structure cellulaire contaminée par le virus Parainfluenza.

12.3 Le type et l'état du matériel utilisé influenceront l'aspect visuel de l'image obtenue. La réaction finale pourra varier en fonction du type de microscope employé, de la source de lumière, de l'âge de l'ampoule, du filtre et de l'épaisseur du filtre, des différences de sensibilité du substrat ou des méthodes de dosage utilisées. Chaque laboratoire devra établir individuellement ses propres critères de lecture des résultats au moyen de contrôles appropriés.

12.4 L'absence de détection du virus dans ce cas peut provenir d'un mauvais prélèvement, d'une mauvaise manipulation de l'échantillon, de l'échec d'une culture cellulaire, etc. Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection par le virus Parainfluenza.

12.5 Les réactifs IMAGEN™ réagissent avec les antigènes du virus Parainfluenza présents dans les cellules infectées. Cependant, un résultat positif n'est pas un indicateur de la viabilité du virus Parainfluenza présent.

12.6 Les anticorps monoclonaux utilisés dans les réactifs IMAGEN™ ont été produits avec des souches typiques du virus Parainfluenza. Les anticorps ne détecteront pas nécessairement toutes les variations antigéniques ou les nouvelles souches du virus Parainfluenza.

12.7 Les épitopes visés par les anticorps monoclonaux présents dans les réactifs IMAGEN™ pourront donner lieu à de nouvelles variations antigéniques qui ne seront éventuellement pas reconnues par les anticorps.

12.8 La prévalence du virus affectera la valeur prédictive de l'essai.

12.9 La fluorescence obtenue peut varier en fonction du type de microscope et de la source lumineuse utilisés.

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

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

12.12 Les résultats des tests doivent être interprétés en se basant également sur les études épidémiologiques et les évaluations cliniques du patient, et sur d'autres procédures diagnostiques.

Le taux de détection des virus Parainfluenza peut varier en fonction du type de test utilisé, de la méthode, du moment et du site de prélèvement, de la manipulation, de la conservation et du transport des échantillons. Il dépend également des taux de prévalence dans la population, ainsi que de l'âge, de la situation géographique et du statut socio-économique de la population étudiée. Les types 1, 2 et 3 du virus Parainfluenza sont répandus partout dans le monde et sont associés aux infections de l'appareil respiratoire en climats tempérés, tropicaux et arctiques.¹⁰ La plupart des infections se produisent chez les enfants de moins de 5 ans ; les virus Parainfluenza y sont responsables de jusqu'à 20 % des infections de l'appareil respiratoire et de 30 à 40 % des cas de croup.^{11,12}

Plus de 90 % des enfants connaîtront une primo-infection au virus Parainfluenza, et 50 % d'entre eux présenteront des réinfections symptomatiques.²

Les virus Parainfluenza présentent des taux élevés de prévalence pendant les apparitions saisonnières d'infections de l'appareil respiratoire. Dans les zones tempérées, les virus Parainfluenza sont plus communément associés aux épidémies des mois d'automne et d'hiver.^{13,14} Dans certaines régions, les apparitions d'infections du virus Parainfluenza du type 3 peuvent aussi se produire durant le printemps et l'été.³

Les taux les plus élevés de poussées d'infections s'observent chez les enfants âgés de 1 à 5 ans. Les infections ou réinfections chez les enfants plus âgés et chez les adultes sont habituellement associées à des symptômes respiratoires plus bénins.

Des virus Parainfluenza ont été impliqués dans l'apparition d'infections de l'appareil respiratoire dans les hôpitaux, particulièrement dans les services pédiatriques et dans les institutions gériatriques, où ils ont été associés à une augmentation de la morbidité et de la mortalité.⁶

Pendant l'hiver 1994-1995, l'incidence générale du virus Parainfluenza dans un centre d'essai était de 12,5 % (21/168) pour le virus Parainfluenza de type 1, de 1,8 % (3/168) pour le virus Parainfluenza de type 2 et de 14,3 % (24/168) pour le virus Parainfluenza de type 3.

Ces chiffres ne reflètent pas avec précision la prévalence du virus Parainfluenza dans la population globale car les échantillons ont été prélevés dans une population sélectionnée et faisant l'objet d'une étude sur les infections des voies respiratoires.

14 PERFORMANCES

14.1 ETUDES CLINIQUES

14.1.1 Echantillons cliniques

Le test IMAGEN™ Parainfluenza virus Group et le test IMAGEN™ Parainfluenza pour virus 1, 2 and 3 Typing ont été directement évalués sur sécrétions nasopharyngées dans trois centres, un aux Etats-Unis et deux au Royaume-Uni. Les échantillons directs ont été prélevés pendant l'hiver 1994-1995.

L'essai clinique a été effectué sur des aspirations nasopharyngées de patients susceptibles d'être atteints d'infections virales respiratoires, prélevées et traitées de la manière décrite dans la Section 9.1.1. Des lames fixées à l'acétone ont été testées soit directement (stockées à une température comprise entre 2-8°C et testées dans les 3 jours qui suivent), soit congelées et testées à une date ultérieure.

Les méthodes de référence standard utilisées consistaient en un test d'immunofluorescence indirect disponible dans le commerce, et en un isolement en culture suivi d'une identification.

Un échantillon était reconnu positif avec le réactif IMAGEN™ Parainfluenza virus Group si une ou plusieurs cellules épithéliales respiratoires présentaient la fluorescence typique décrite dans la Section 11.2.1.

14.1.2 Confirmation de culture

Le test IMAGEN™ Parainfluenza virus Group et le test IMAGEN™ Parainfluenza virus 1, 2 and 3 Typing ont été analysés dans 4 centres d'évaluation au Royaume-Uni. Les essais cliniques ont été effectués de juillet à octobre 1991.

Pendant cette période, l'incidence générale du virus Parainfluenza dans un centre d'essai était de 14,4 % (15/104) pour le virus Parainfluenza 1, et de 8,7 % (9/104) pour le virus Parainfluenza 3.

Ces chiffres ne reflètent pas avec précision la prévalence du virus Parainfluenza dans la population générale car les échantillons ont été prélevés sur une population sélectionnée faisant l'objet d'études sur les infections des voies respiratoires. Les études ont été effectuées sur des échantillons préparés à partir de monocouches de cultures cellulaires inoculées avec des échantillons cliniques prélevés sur des patients susceptibles d'être infectés par le virus Parainfluenza. Les méthodes standard utilisées pour identifier le virus Parainfluenza dans les cultures cellulaires IMAGEN™ ont été composées de tests de neutralisation ou d'immunofluorescence indirecte. Les réactifs IMAGEN™ Parainfluenza virus ont aussi été testés pour vérifier leur réactivité croisée par rapport à une série de micro-organismes susceptibles d'être présents dans des échantillons cliniques de routine (voir la Section 14.3).

14.2 PERFORMANCES CLINIQUES

14.2.1 Echantillons directs

Un total de 222 échantillons provenant de patients susceptibles d'être atteints d'infections virales respiratoires ont été testés au moyen du test IMAGEN™ Parainfluenza virus Group et du test IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3.

Dans un centre au nord-est des Etats-Unis, pendant l'hiver 1994-1995, 184 échantillons au total ont été prélevés sur une population pédiatrique et évalués pour déterminer la sensibilité et la spécificité du test. La majorité de ces échantillons ont été testés par rapport à l'isolement viral, et un plus petit nombre d'entre eux ont été testés par rapport au test d'immunofluorescence indirect de référence. Les Tableaux 14.1 et 14.2 indiquent les résultats du centre américain. Dans les deux centres britanniques, une sélection des échantillons dans lesquels le virus Parainfluenza avait été reconnu a été évaluée pour augmenter le nombre des échantillons positifs obtenus. On peut voir ces résultats sur les Tableaux 14.3 et 14.4. Les résultats comparant les taux de positivité des virus Parainfluenza dans tous les centres sont indiqués dans les Tableaux 14.5 et 14.6.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Types 1, 2 and 3)

Dans le centre américain, le test IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Types 1, 2 and 3) a fait apparaître une corrélation de 97,6 % par rapport à la culture virale, et de 98,4 % par rapport au test d'immunofluorescence indirect de référence. La sensibilité relative et la spécificité du test IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Types 1, 2 and 3) ont été respectivement de 97,9 % et 97,5 % par rapport à l'isolement viral. Par rapport au test d'immunofluorescence indirect de référence, la sensibilité relative et la spécificité étaient de 96,2 % et de 99,0 % respectivement.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 1

Dans le centre américain, le réactif IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 1 a présenté une corrélation, une sensibilité et une spécificité de 100 % par rapport à l'isolement viral et au test d'immunofluorescence de référence.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 2

Dans le centre américain, le réactif du IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 2 a présenté une corrélation, une sensibilité et une spécificité de 100 % par rapport à l'isolement viral et au test d'immunofluorescence de référence.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 3

Dans le centre américain, le réactif IMAGEN™ Parainfluenza virus Type 3 a présenté une corrélation de 97,6 %, et une sensibilité et spécificité de 91,6 % et 98,6 % respectivement par rapport à l'isolement viral. Comparé au test d'immunofluorescence de référence, la corrélation, la sensibilité et la spécificité étaient de 98,4 %, 75 % et 99,1 % respectivement.

Tableau 14.1 Comparaison des réactifs IMAGEN™ Parainfluenza virus et de l'isolement sur des aspirations nasopharyngées au centre américain

Réactif IMAGEN™ Parainfluenza virus	Nbre. d'échantillons testés	Nbre. d'échantillons positifs par isolement viral	Réactifs IMAGEN™ Parainfluenza virus	
			Sensibilité	Spécificité
Parainfluenza 1	168	21	100 % (21/21)	100 % (147/147)
(95 % Intervalles de confiance)			(84,0 %-100 %)	(97,51 %-100 %)
Parainfluenza 2	168	3	100 % (3/3)	100 % (165/165)
(95 % Intervalles de confiance)			(29,3 %-100 %)	(97,79 %-100 %)
Parainfluenza 3	168	24	92 % (22/24)	98,6 % (142/144)
(95 % Intervalles de confiance)			(73,0 %-98,97 %)	(95,08 %-99,83%)
Parainfluenza Group	168	48	97,9 (47/48)	97,5 % (117/120)
(95 % Intervalle de confiance)			(89,0 % - 99,95 %)	(92,89 % - 99,48 %)

Tableau 14.2 Comparaison des réactifs IMAGEN™ Parainfluenza virus et de l'immunofluorescence de référence sur les prélèvements aspirés nasopharyngés au centre américain

Réactif IMAGEN™ Parainfluenza virus	Nbre. d'échantillons testés	Nbre. d'échantillons positifs par l'immunofluorescence de référence	Réactifs IMAGEN™ Parainfluenza virus	
			Sensibilité relative	Spécificité relative
Parainfluenza 1 (95 % Intervalles de confiance)	127	21	100 % (21/21) (84,0 %-100 %)	100 % (127/127) (96,59 %-100 %)
Parainfluenza 2 (95 % Intervalles de confiance)	127	1	100 % (1/1) (2,5 %-100 %)	100 % (127/127) (97,12 %-100 %)
Parainfluenza 3 (95 % Intervalles de confiance)	127	4	75 % (3/4) (19,4 %-99,37 %)	99,1 % (122/123) (95,55 %-99,98 %)
Parainfluenza Group (95 % Intervalles de confiance)	127	26	96,2 % (25/26) (80,4 % - 99,9 %)	99,0 % (100/101) (94,61 % - 99,98 %)

Remarque: le terme 'Relative' désigne la comparaison des résultats de cet essai avec ceux d'un essai similaire. La corrélation des résultats de l'essai avec la présence ou l'absence de maladie n'a pas été tentée. Aucun jugement ne peut être prononcé sur l'exactitude de l'essai de comparaison relativement à l'existence de la maladie.

Tableau 14.3 Comparaison des performances des réactifs IMAGEN™ Parainfluenza et de l'isolement viral sur aspirations nasopharyngées dans 2 centres

Isolement viral Réactif IMAGEN™		Pos	Nég	Pos	Nég
		Pos	Nég	Nég	Pos
Parainfluenza 1	n = 35	3	31	0	1**
Parainfluenza 2	n = 35	2	32	1*	0
Parainfluenza 3	n = 35	27	7	1*	0
Parainfluenza Group	n = 35	30	0	4***	1**

* Les deux spécimens étaient aussi reconnus comme négatifs par l'immunofluorescence de référence.

** Ce spécimen était aussi reconnu comme positif par l'immunofluorescence de référence

*** Deux de ces spécimens étaient aussi reconnus comme négatifs par l'immunofluorescence de référence.

Tableau 14.4 Comparaison des performances des réactifs IMAGEN™ Parainfluenza et de l'immunofluorescence de référence sur des aspirations nasopharyngées dans 2 centres britanniques.

Immunofluorescence de référence Réactif IMAGEN™		Pos	Nég	Pos	Nég
		Pos	Nég	Nég	Pos
Parainfluenza 1	n = 38	3	35	0	0
Parainfluenza 2	n = 38	3	35	0	0
Parainfluenza 3	n = 38	30	8	0	0
Parainfluenza Group	n = 38	34	2	2*	0

* Un spécimen ne contenait que quelques cellules.

Tableau 14.5 Comparaison des taux de positivité du virus Parainfluenza avec les réactifs IMAGEN™ Parainfluenza et l'isolement viral sur les aspirations nasopharyngées de tous les centres

Réactif IMAGEN™	Nombre détecté par isolement viral	Nombre détecté avec les réactifs IMAGEN™	% de corrélation
Parainfluenza 1	24	24	100 %
Parainfluenza 2	6	5	83,3 %
Parainfluenza 3	52	49	94,2 %
Parainfluenza Group	82	77	93,9 %

Tableau 14.6 Comparaison des taux de positivité du virus Parainfluenza avec les réactifs IMAGEN™ Parainfluenza et avec l'immunofluorescence de référence sur aspirations nasopharyngées de tous les centres

Réactif IMAGEN™	Nombre détecté par immunofluorescence de référence	Nombre détecté avec les réactifs IMAGEN™	% de corrélation
Parainfluenza 1	24	24	100 %
Parainfluenza 2	4	4	100 %
Parainfluenza 3	34	33	97,0 %
Parainfluenza Group	62	59	95,2 %

14.2.2 Confirmation par mise en culture

IMAGEN™ Parainfluenza virus Group

Le test IMAGEN™ Parainfluenza virus Group (Types 1, 2 and 3) a fait apparaître une corrélation de 98,3 % avec les méthodes standards (voir le Tableau 14.7). La sensibilité et la spécificité relatives du test étaient respectivement de 98,3 % et 98,5 %.

IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3

La sensibilité relative des réactifs spécifiques aux types 1, 2 et 3 du virus Parainfluenza étaient respectivement de 96,1 %, 100 % et 97,4 %. La spécificité relative des réactifs spécifiques aux types 1, 2 et 3 du virus Parainfluenza étaient respectivement de 99,3 %, 99,7 % et 98,4 %.

Tableau 14.7 Comparaison entre les réactifs IMAGEN™ et les méthodes standard de confirmation de culture

Réactifs IMAGEN™ Parainfluenza	Nbre d'échantillons testés	Nbre d'échantillons positifs par les méthodes standard	Résultats obtenus avec les réactifs IMAGEN™ Parainfluenza virus ^a	
			Sensibilité relative	Spécificité relative ^b
Parainfluenza 1 (95 % Intervalles de confiance)	322	51	96,1 % (49/51) (86,5 % - 99,5 %)	99,3 % (269/271) (97,4 % - 99,9 %)
Parainfluenza 2 (95 % Intervalles de confiance)	315	24	100,0 % (24/24) (85,8 % - 100%)	99,7 % (290/291) (98,1 % - 100%)
Parainfluenza 3 (95 % Intervalles de confiance)	345	155	97,4 % (151/155) (93,5 % - 99,3 %)	98,4 % (187/190) (95,5 % - 99,7 %)
Parainfluenza Group (95 % Intervalles de confiance)	363	229	98,3 % (225/229) (95,6 % - 99,5 %)	98,5 % (132/134) (94,7 % - 99,8 %)

^a Les résultats d'un des quatre centres d'essai incluent un pourcentage d'échantillons congelés.

^b Les réactifs IMAGEN™ Parainfluenza virus ont détecté 2 souches de type 1 et une souche de type 3 non détectées par les techniques standard.

14.3 REACTIVITE CROISEE

Les micro-organismes répertoriés dans le Tableau 14.8 ont été testés avec les tests IMAGEN™ Parainfluenza virus Group et IMAGEN™ Parainfluenza virus Types 1, 2 and 3 et n'ont mis aucune réactivité croisée en évidence. Des études de réactivité croisée ont été effectuées sur des lames portant des échantillons de cultures sur bouillon ou d'isolats microbiens récents.

Tableau 14.8 Micro-organismes testés avec les réactifs IMAGEN™ Parainfluenza et ne présentant aucune réactivité croisée

Micro-organisme	Source	Nbre d'échantillons testés
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Bouillon de culture de la souche NCTC 10116 1	1
Adénovirus type 1	Culture cellulaire	9
Adénovirus type 2	Culture cellulaire	5
Adénovirus type 3	Culture cellulaire	8
Adénovirus type 4	Culture cellulaire	3
Adénovirus type 5	Culture cellulaire	4
Adénovirus type 7	Culture cellulaire	3
Adénovirus type 10	Culture cellulaire	1
Adénovirus type 41	Culture cellulaire	1
<i>Bordetella parapertussis</i>	Culture cellulaire	1
<i>Bordetella pertussis</i>	Milieu de culture	1
<i>Branhamella catarrhalis</i>	Milieu de culture	1
<i>Candida albicans</i>	Milieu de culture	1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Culture cellulaire et milieu de culture	1 de chaque
<i>Chlamydia psittaci</i>	Culture cellulaire	2
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Culture cellulaire	2
Virus du cow-pox	Culture cellulaire	1
Coxsackie virus type A7	Culture cellulaire	1
Coxsackie virus type A9	Culture cellulaire	1
Coxsackie virus type B3	Culture cellulaire	3
Coxsackie virus type B4	Culture cellulaire	1
Coxsackie virus type B5	Culture cellulaire	2
Cytomégalo virus	Culture cellulaire	2
Echovirus type 5	Culture cellulaire	1
Echovirus type 11	Culture cellulaire	1
Echovirus type 19	Culture cellulaire	2
Echovirus type 30	Culture cellulaire	4
Virus Epstein-Barr	Culture de lignée cellulaire continue	1
<i>Escherichia coli</i>	Milieu de culture	1

<i>Virus spumeux</i>	Culture cellulaire	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	Milieu de culture et crachat	1 de chaque
<i>Herpès simplex virus type 1</i>	Culture cellulaire	3
<i>Herpès simplex virus type 2</i>	Culture cellulaire	2
<i>Influenza virus A</i>	Culture cellulaire	2
<i>Influenza virus B</i>	Culture cellulaire	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Milieu de culture	1
<i>Legionella pneumophila</i>	Milieu de culture	1
<i>Virus de la rougeole</i>	Culture cellulaire	3
<i>Virus des oreillons</i>	Culture cellulaire	8
<i>Mycobacterium avium</i>	Milieu de culture	1
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Milieu de culture	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Milieu de culture	1
<i>Mycoplasma arginini</i>	Milieu de culture de la souche NCTC 10129	1
<i>Mycoplasma hominis</i>	Milieu de culture de la souche NCTC 10111	1
<i>Mycoplasma hyorhinus</i>	Milieu de culture de la souche NCTC 10130	1
<i>Mycoplasma orale</i>	Milieu de culture de la souche NCTC 10112	1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Milieu de culture de la souche NCTC 10119	1
<i>Mycoplasma salivarium</i>	Milieu de culture de la souche NCTC 10113	1
<i>Neisseria cinerea</i>	Milieu de culture	1
<i>Neisseria flavescens</i>	Milieu de culture	1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Milieu de culture	1
<i>Neisseria lactamica</i>	Milieu de culture	1
<i>Neisseria meningitidis A, B, C & D</i>	Milieu de culture	1 de chaque
<i>Neisseria mucosa</i>	Milieu de culture	1
<i>Neisseria perflava</i>	Milieu de culture	1
<i>Neisseria pharyngis</i>	Milieu de culture	1
<i>Parainfluenza virus 4a</i>	Culture cellulaire	2
<i>Pneumocystis carinii</i>	Echantillon clinique	1
<i>Polio virus type 1</i>	Culture cellulaire	1
<i>Polio virus type 2</i>	Culture cellulaire	2
<i>Polio virus type 3</i>	Culture cellulaire	3
<i>Virus syncytial respiratoire</i>	Culture cellulaire	8
<i>Rhinovirus</i>	Culture cellulaire	6
<i>Sendai virus</i>	Culture cellulaire	1
<i>Streptococcus groupes A, B, C, D, F et G</i>	Milieu de culture	1 de chaque
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Crachat	1
<i>Herpesvirus varicellae</i>	Culture cellulaire	2

1 ZWECKBESTIMMUNG

IMAGEN™ Parainfluenza-Virus-Testkits sind qualitative, direkte Immunfluoreszenztests zum Nachweis und zur Differenzierung von Parainfluenza-Viren der Typen 1, 2 und 3 direkt in nasopharyngealen Absaugpräparaten oder in Zellkulturen. Die Kits sind in zwei Zusammenstellungen lieferbar.

IMAGEN™ **Parainfluenza-Virusgruppe (Typ 1, 2 und 3)** Code-Nr. K6103 zum Nachweis und zur Bestätigung des Vorliegens von Parainfluenza-Virus-Antigenen direkt in nasopharyngealen Absaugpräparaten und in Zellkulturpräparationen.

IMAGEN™ **Parainfluenza-Virustypen 1, 2 und 3** Code-Nr. K6104 zum Nachweis und zur Differenzierung von Antigenen der Parainfluenza-Viren Typ 1, 2 bzw. 3 direkt in nasopharyngealen Absaugpräparaten und in Zellkulturpräparationen.

Ein nach direkter Färbung nasopharyngealer Aspirate erzieltes negatives Ergebnis sollte als vorläufig betrachtet werden, bis es durch eine Kultur bestätigt wurde.

2 ZUSAMMENFASSUNG

Parainfluenza-Viren gehören zur Gattung Paramyxovirus und werden zur Familie der Paramyxoviridae gezählt.¹ Zu den 6 bekannten Human-Paramyxovirus-Spezies gehören Parainfluenza-Viren Typ 1, 2, 3 und 4 (Subtypen 4a und 4b), Mumps-Virus und Newcastle disease (ND)-Virus. Von den 4 Parainfluenza-Virustypen wurden die Typen 1, 2 und 3 inzwischen als Hauptursachen akuter Atemwegserkrankungen bei Kleinkindern und Kindern nachgewiesen.^{2,3}

Parainfluenza-Viren werden durch direkten Kontakt oder Einatmung der virushaltigen Tröpfchen aus den Atemwegen symptomatischer Patienten übertragen. Nasensekrete können hohe Viruskonzentrationen enthalten. Das Virus vermehrt sich in den Zylinderzellen des Flimmerepithels der oberen und unteren Atemwege und verursacht Zellnekrosen und Nekrosenabstoßung. Die Freisetzung der Viren („Virus-Shedding“) erfolgt im Zeitraum von einem Tag vor bis zu 7 Tage nach Auftreten der Symptome. Bei immungeschwächten Patienten kann sie auch anhalten.^{4,5}

Parainfluenza-Viren Typ 1, 2 und 3 können zu Infektionen und Erkrankungen im gesamten Bereich der oberen und unteren Atemwege führen. Die meisten Parainfluenza-Virusinfektionen bei Kleinkindern und Kindern manifestieren sich klinisch als akute Laryngotracheobronchitis (Krupp). Parainfluenza-Virusinfektionen werden aber auch mit Tracheobronchitis, Bronchitis, Pneumonie und einer Reihe von Symptomen der oberen Atemwege assoziiert.

In Einzelfällen können Parainfluenza-Virusinfektionen bei Kleinkindern sehr gravierend sein und Obstruktion der Atemwege und Atembeschwerden verursachen, was bei Patienten mit vorhandenen Erkrankungen wie zystischer Fibrose oder bei immungeschwächten Patienten zu erhöhten Erkrankungs- und Sterblichkeitsraten führen kann.

In Kinderkrankenstationen und geriatrischen Abteilungen wurden Parainfluenza-Viren mit Ausbrüchen von Infektionen der Atemwege assoziiert, die längere Krankenhausaufenthalte und erhöhte Erkrankungs- und Sterblichkeitsraten zur Folge hatten.⁶ Eine unverzügliche Diagnose ist für die Behandlung der Patienten und die Überwachung der Krankheitsausbrüche wichtig.

Die gegenwärtig bei der Labordiagnose von Parainfluenza-Virusinfektionen hauptsächlich angewandten Methoden sind Isolierung und Identifikation in Einschicht-Zellkulturen sowie der direkte Nachweis der Viren in klinischen Proben.

Anschließend an die Virusisolierung mittels Zellkulturverfahren müssen zur Virusidentifikation weitere Verfahren wie Neutralisationstests, Hämagglutinationshemmtests oder Elektronenmikroskopie angewandt werden. Diese Verfahren sind arbeits- und zeitaufwendig und erfordern ein gewisses Maß an technischer Erfahrung, das in vielen Laboratorien möglicherweise nicht vorhanden ist.

In jüngster Zeit wurden indirekte Immunfluoreszenztests beschrieben, bei denen zur Identifikation und Bestätigung von Parainfluenza-Viren in Einschicht-Zellkulturen oder direkt in klinischen Proben polyklonale oder monoklonale Antikörper eingesetzt werden.^{7,8,9} Direkte Immunfluoreszenztests, bei denen Fluorescein-markierte monoklonale Antikörper zur Anwendung gelangen, bieten eine schnellere und spezifische Methode zum Nachweis von Viren in klinischen Proben oder Zellkulturen.

Die IMAGEN™ Parainfluenza-Virus-Testkits sind direkte Immunfluoreszenztests zum Nachweis und zur Identifikation von Parainfluenza-Viren der Typen 1, 2 und 3 direkt in nasopharyngealen Absaugpräparaten oder Zellkulturen. In den Tests gelangen typspezifische monoklonale Antikörper zur Anwendung, um Parainfluenza-Viren der Typen 1, 2 und 3 nachweisen und identifizieren zu können.

3 TESTPRINZIP

Der IMAGEN™ Parainfluenza-Virus-Testkit enthält mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierte monoklonale Antikörper, die spezifisch an Parainfluenza-Virus Typ 1, 2 oder 3 binden. Diese Reagenzien werden in einem direkten Einschritt-Immunfluoreszenztest eingesetzt. Die Proben werden mit den FITC-konjugierten Reagenzien 15 Minuten inkubiert. Anschließend wird überflüssiges Reagenz mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) abgewaschen. Die gefärbten Flächen werden eingedeckt und mit einem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet.









Falls Parainfluenza-Viren des Typs 1, 2 oder 3 vorliegen, ist bei infizierten Zellen eine charakteristische, apfelgrüne, intrazelluläre Fluoreszenz zu beobachten, die im Kontrast zur roten Hintergrundfärbung nichtinfizierter Zellen steht.

Bestätigung



Die Herstellung der in diesen Tests verwendeten monoklonalen Antikörper erfolgte im Department of Respiratory and Enteric Viruses, Public Health Services, Centre for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA.

4 DEFINITIONEN

Die folgenden Symbole und Definitionen in Übereinstimmung mit ISO 15223 und EN 980 wurden in der Produktinformation verwendet.

	Code- und Bestellnummer des Produkts.
	Gebrauchsanweisung beachten
	Inhalt ausreichend für "n" Ansätze
	Hersteller
	In-Vitro-Diagnostikum
	Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung
	Zulässiger Temperaturbereich

5 GELIEFERTE REAGENZIEN

 50 - Jeder Testkit enthält ausreichend Reagenzien, um den Test an 50 Zellkulturpräparationen durchführen zu können.  - Die Haltbarkeit des Testkits ist auf dem äußeren Verpackungsetikett vermerkt.

5.1 LIEFERUMFANG DER IMAGEN™ PARAINFLUENZA-VIRUS-REAGENZEN



Eine Gebrauchsanweisungsbroschüre

POSITIVE CONTROL SLIDE

2 x 3 positive Kontrollobjektträger mit Testarealen, die azetonfixierte Nierenzellen des afrikanischen grünen Affens (Vero-Zellen) infiziert mit Parainfluenza-Virus Typ 1, 2, bzw. 3 (vom CDC V6-004-Stamm, CDC V7-003-Stamm bzw. CDCV5-003 Stamm) enthalten.

MOUNTING FLUID

3 mL Eindeckmedium. Das Eindeckmedium enthält einen Ausbleich-Hemmer in einer Glycerinlösung (pH 10,0).

Jeweils eine Flasche folgender Reagenzien:

IMAGEN™ PARAINFLUENZA-VIRUSGRUPPEN-REAGENZEN-K6103

REAGENT G

1.4 mL IMAGEN™ Parainfluenza- Virusgruppenreagenz (Typ 1, 2 und 3). Das Reagenz enthält eine Mischung aus 3 gereinigten, murinen, monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für Parainfluenza-Viren der Typen 1, 2 und 3, mit FITC konjugiert und in einer proteinstabilisierten phosphatgepufferten Kochsalzlösung verdünnt sind, die Evans-Blau als Gegenfärbemittel enthält. Die monoklonalen Antikörper reagieren mit dem Parainfluenza-1-F-Protein, Parainfluenza-2-Hämagglutinin-Protein bzw. Parainfluenza-3-Hämagglutinin-Protein.

ODER

IMAGEN™ PARAINFLUENZA-VIRUSTYPEN-REAGENZIEN FÜR DIE TYPEN 1, 2 UND 3 – K6104

REAGENT 1 1,4 mL IMAGEN™ Parainfluenza-Virus Typ 1-Reagenz. Das Reagenz besteht aus einem gereinigten, murinen, monoklonalen Antikörper, der spezifisch für Parainfluenza-Virus Typ 1 (reagiert mit dem Parainfluenza-1-F-Protein), mit FITC konjugiert und in einer proteinstabilisierten phosphatgepufferten Kochsalzlösung verdünnt ist, die Evans-Blau als Gegenfärbemittel enthält.

REAGENT 2 1,4 mL IMAGEN™ Parainfluenza-Virus Typ 2-Reagenz. Das Reagenz besteht aus einem gereinigten, murinen, monoklonalen Antikörper, der spezifisch für Parainfluenza-Virus Typ 2 (reagiert mit dem Parainfluenza-2-Hämagglutinin-Protein), mit FITC konjugiert und in einer proteinstabilisierten phosphatgepufferten Kochsalzlösung verdünnt ist, die Evans-Blau als Gegenfärbemittel enthält.

REAGENT 3 1,4 mL IMAGEN™ Parainfluenza Virus Typ 3-Reagenz. Das Reagenz besteht aus einem gereinigten, murinen, monoklonalen Antikörper, der spezifisch für Parainfluenza Virus Typ 3 (reagiert mit dem Parainfluenza-3-Hämagglutinin-Protein), mit FITC konjugiert und in einer proteinstabilisierten phosphatgepufferten Kochsalzlösung verdünnt ist, die Evans-Blau als Gegenfärbemittel enthält.

5.2 VORBEREITUNG, LAGERUNG UND WIEDERVERWENDUNG DER TESTKIT-KOMPONENTEN

Um eine optimale Leistungsfähigkeit der Testkits sicherzustellen, sollte für die Lagerung aller unverwendeten Testkit-Komponenten folgende Hinweise beachtet werden.

5.3 POSITIVE KONTROLLOBJEKTRÄGER - [POSITIVE CONTROL SLIDE]

Die positiven Kontrollobjekträger werden einzeln versiegelt in mit Stickstoff gefüllten Folienhüllen geliefert. Unbenutzte Objekträger bei 2-8 °C aufbewahren. Die Objekträger sollten vor dem Öffnen 5 Minuten bei Raumtemperatur (15-30 °C) in ihrer Folienhülle belassen werden.

Den Objekträger unmittelbar nach dem Öffnen anfärben.

5.4 EINDECKMEDIUM - [MOUNTING FLUID]

Gebrauchsfertig. Unbenutztes Eindeckmedium bei 2-8 °C aufbewahren. Das Eindeckmedium sollte vor Gebrauch 5 Minuten bei Raumtemperatur (15-30 °C) belassen werden.

5.5 GRUPPENREAGENZEN UND VIRUSTYPENREAGENZEN FÜR DIE TYPEN 1, 2 und 3 –

[REAGENT G] [REAGENT 1] [REAGENT 2] [REAGENT 3]

Gebrauchsfertig. Unbenutzte Reagenzien bei 2-8 °C aufbewahren. Die Reagenzien sollten vor Gebrauch 5 Minuten bei Raumtemperatur (15-30 °C) belassen werden.

6 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZEN UND ERFORDERLICHES ZUBEHÖR

6.1 REAGENZEN

Frisches Azeton (zur Fixierung).

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

6.2 ZUBEHÖR

Die folgenden Produkte sind für den Einsatz in Verbindung mit K6103 und K6104 bestimmt. Nähere Information dazu erhalten Sie von Ihrer zuständigen DakoCytomation-Niederlassung oder von Ihrem Händler.

Teflonbeschichtete Mikroskop-Objekträger aus Glas mit jeweils einem Testareal von 6 mm Durchmesser (100 Objekträger pro Behälter) sind bei der zuständigen DakoCytomation-Filiale oder dem Händler erhältlich (Code-Nr. S6114).

Positive Kontrollobjekträger (Code Nr. S6111).

7 GERÄTE

Folgende Geräte sind erforderlich:

Präzisionspipette und Einweg-Pipettenspitzen, 25 µL.

Waschtrog.

Deckgläser zum Eindecken eines Testareals mit 6 mm Durchmesser.

Nicht-fluoreszierendes Immersionsöl.

Epifluoreszenzmikroskop mit einem Filtersystem für FITC (maximale Erregerwellenlänge 490 nm, mittlere Emissionswellenlänge 520 nm) und 200-500fache Vergrößerung.

Inkubator für 37 °C.

Niedertourige Zentrifuge.

Für direkte Absaugproben

Schleimabsauger.

Zum Zellkulturnachweis

Sterile Tupfer, Virus-Transportmedium (VTM), einen geeigneten Sammel-, Transport- und Kulturbehälter für Parainfluenza-Viren.

Nähere Hinweise über den Einsatz eines geeigneten VTM finden Sie unter Abschnitt 13 in Referenz 13 (erhältlich bei Ihrer zuständigen DakoCytomation-Niederlassung)

Zur Kultur und Isolierung von Parainfluenza-Viren geeignete Zellkulturlinien.

Ein negativer Kontrollobjektträger, vorbereitet aus nicht infizierten, intakten Zellen des Typs, der für die Kultur und Isolierung von Parainfluenza-Viren verwendet wird. Die Zellen sollten wie in Abschnitt 9.1 beschrieben vorbereitet und fixiert und wie in Abschnitt 8 beschrieben gefärbt werden.

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™ Parainfluenza-Virus-Testreagenzien enthalten 15 mmol/L Natriumazid. Natriumazid ist ein Gift, das mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallaziden führen kann. Nach der Entsorgung der azidhaltigen Materialien immer mit reichlich Wasser nachspülen.

8.1.2 Parainfluenza-Viren auf den Kontrollobjektträgern haben sich in Zellkulturen nachweislich als nicht infektiös erwiesen; trotzdem sind sie als potentiell infektiös zu handhaben und zu entsorgen.

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

8.1.4 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.

8.1.5 Essen, Trinken, Rauchen, Aufbewahren und Zubereiten von Speisen sowie Schminken sind im bezeichneten Arbeitsbereich (Labor) verboten.

8.1.6 Reagenzien dürfen nicht mit dem Mund pipettiert werden.

8.1.7 Beim Hantieren mit klinischen Proben und infizierten Zellen immer Einweghandschuhe tragen und nach dem Umgang mit infektiösen Stoffen immer die Hände waschen.

8.1.8 Alle klinischen Proben entsprechend den örtlich geltenden Vorschriften entsorgen.

8.1.9 Das Sicherheitsdatenblatt kann auf Anfrage professionellen Benutzern zur Verfügung gestellt werden.

8.2 TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

8.2.1 Die Testkit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf den Etiketten vermerkten Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Keine Reagenzien von verschiedenen Chargen mischen oder austauschen.

8.2.2 Die Reagenzien werden in festgelegten Arbeitskonzentrationen geliefert. Der Testserfolg kann beeinträchtigt werden, wenn die Reagenzien verändert oder unter anderen Bedingungen als den in Abschnitt 5 genannten aufbewahrt werden.

8.2.3 Typisierung-Reagenzien dürfen nicht gepoolt oder zusammen auf demselben Testareal eines Objektträgers verwendet werden, da sonst die Leistungsfähigkeit des Tests nachteilig beeinflusst werden könnte.

8.2.4 Frische phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) am Tag der Verwendung der Reagenzien nach Bedarf zubereiten.

8.2.5 Für den Waschvorgang muß PBS verwendet werden. Andere Waschlösungen wie etwa Leitungs- oder destilliertes Wasser gefährden die Testergebnisse.

8.2.6 Mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden.

8.2.7 Die Reagenzien dürfen nicht eingefroren werden.

9 GEWINNUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Gewinnung und Vorbereitung der Proben sind bei der Diagnose von Parainfluenza-Viren mittels Zellkultur-Methoden von grundlegender Bedeutung. Die Proben müssen vom Infektionsgebiet und während des Höhepunkts des Virus-Shedding gewonnen werden, so dass sie möglichst viel infiziertes Material enthalten. Die geeignetste Testprobe ist nasopharyngeales Absaugsekret (NPA), in dem sich möglichst viele Atemwegs-Epithelzellen befinden.

9.1 KLINISCHE PROBEN

9.1.1 Nasopharyngeale Aspirate und Sekrete

Sammlung

Sammeln Sie die Proben aus der nasopharyngealen Region in einem Schleimabsauger - durch eine Absaugsonde der Größe 8. Der Schleimabsauger- und die Sonde sollten auf einer Temperatur von 2-8 °C gehalten werden und so schnell wie möglich zur Weiterverarbeitung in ein Labor gebracht werden.

Zell-Separation

Falls nötig fügen Sie vor der Zentrifugation 2 mL phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) zur Probe hinzu, um die Viskosität zu reduzieren und den Schleim zu verdünnen. Zentrifugieren Sie den Schleimabsauger bei Raumtemperatur (15-30 °C) 10 min bei 380g. Nehmen Sie den Überstand ab, dieser kann für Zellkultur verwendet werden. Resuspendieren Sie die pelletierten Zellen in 2 mL PBS, und pipettieren Sie die Zellen vorsichtig mit einer weiten Pipette auf und ab oder vortexen sie sehr vorsichtig, bis der Schleim zerfällt und zelluläres Material freigesetzt wird.

Vermeiden Sie heftiges Pipettieren, damit die Zellen nicht beschädigt werden. Sobald eine glatte Zellsuspension vorliegt, fügen Sie nach Bedarf mehr PBS hinzu, und pipettieren oder vortexen Sie anschließend, um die Zellen weiter zu waschen. Entfernen und entsorgen Sie sichtbare noch vorhandene Mucus-Reste. Überschüssiger Mucus muß entfernt werden, da er eine angemessene Durchdringung durch das Reagens behindert und unspezifische Fluoreszenz-Signale verursachen kann.

Wenn alles Sekret in der Absaugsonde verblieben ist und den Schleimabsauger nicht mehr erreicht, spülen Sie das Sekret mit PBS aus der Sonde. Dazu setzen Sie am besten eine Pasteurpipette auf das Ende der Sonde, das mit dem Schleimabsauger verbunden ist.

Vorbereitung der Objektträger

Sobald die Zellen als Einzelzellen vorliegen, zentrifugieren Sie die Zellsuspension bei Raumtemperatur (15-30 °C) 10 min. bei 380g und entsorgen den Überstand. Resuspendieren Sie das Zellsediment gerade in soviel PBS, um evtl. verbliebenen Mucus zu verdünnen und gleichzeitig eine hohe Zelldichte aufrechtzuerhalten. Pipettieren Sie 25 µl des resuspendierten Zellsediments auf ein Testareal von 6 mm Durchmesser eines Teflon-beschichteten Mikroskop-Objektträgers aus Glas.

Ein Testareal wird für den IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppentest (Typ 1, 2 und 3) (Code-Nr. K6103) benötigt. Drei weitere Testareale dienen der Differenzierung von Parainfluenza-Viren mit dem IMAGEN™ Parainfluenza-Virustypen-Testkit (für Typ 1, 2 und 3) (Code-Nr. K6104).

Lassen Sie die Probe langsam bei Raumtemperatur (15-30 °C) lufttrocknen, und fixieren Sie sie dann in frischem Azeton bei Raumtemperatur (15-30 °C) 10 min. lang. Wird die Probe nicht sofort gefärbt, sollte sie bis zum Gebrauch bei -70 °C aufbewahrt werden. Gelagerte Objektträger sollten innerhalb von zwei Wochen nach der Präparation getestet werden, da sich der Zustand des Objektes mit der Zeit verschlechtern kann.

9.2 NACHWEIS IN DER ZELLKULTUR TYPISIERUNG

Inokulation von Zellkulturen

Zur Diagnose von Parainfluenza Virus-Infektionen gewonnene Proben müssen in Zelllinien inokuliert werden, die in Laboratorien routinemäßig zur Anwendung gelangen. Die Zellkulturen müssen regelmäßig auf die Entwicklung eines zytopathischen Effekts (CPE) untersucht und in regelmäßigen Zeitabständen Hämadsorptionstests unterzogen werden. Alle im Hämadsorptionstest positiven Kulturen oder alle Zellkulturen, die einen CPE aufweisen, können abgeerntet und auf das Vorliegen von Parainfluenza-Viren getestet werden.

Vorbereitung der Objektträger

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

Die Zellen durch Resuspension des Zellsediments in PBS waschen und die Zentrifugation wiederholen. Den Überstand entsorgen und das Zellsediment in einer kleinen Menge (75-100 µL pro Kulturröhrchen) frischer PBS resuspendieren, um eine hohe Zelldichte beizubehalten.

Je 25 µL der Zellsuspension auf die einzelnen Testareale der Objektträger geben.

Für den IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppentest (Typ 1, 2 und 3) (Code-Nr. K6103) wird ein Testareal benötigt.

Für den IMAGEN™ Parainfluenza-Virustypentest (Typ1, 2 und 3) (Code-Nr. K6014) werden drei Testareale benötigt.

Bei Raumtemperatur (15-30 °C) 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 -20°C einzufrieren. Gelagerte Objektträger sollten innerhalb von zwei Wochen nach der Präparation getestet werden, da sich der Zustand des Objektes mit der Zeit verschlechtern kann.

10 TESTVERFAHREN

VOR DURCHFÜHRUNG DES TESTVERFAHRENS SIND DIE IN ABSCHNITT 8.2 AUFGEFÜHRTEN TECHNISCHEN VORSICHTSMASSNAHMEN ZU BEACHTEN.

Das Testverfahren für den IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppentest (Code-Nr. K6103) ist in Abschnitt 10.1 beschrieben und das für den IMAGEN™ Parainfluenza-Virustypentest (Typ 1, 2 und 3) (Code-Nr. K6104) in Abschnitt 10.2.

10.1 IMAGEN™ PARAINFLUENZA-VIRUSGRUPPENTEST - K6103

10.1.1 Zugabe des Reagenz

25 µL Reagenz G zu der fixierten Zellpräparation (siehe Abschnitt 9.1), einem positiven Kontrollobjektträger und einem negativen Kontrollobjektträger geben und sicherstellen, dass das Reagenz die gesamte Testfläche bedeckt.

10.1.2 Erste Inkubation

Die Objektträger **15 Minuten bei 37°C** in einer **feuchten Kammer inkubieren**. Das Reagenz **darf nicht** auf der Probe eintrocknen, da dies eine unspezifische Färbung verursachen kann.

10.1.3 Waschen des Objektträgers

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

10.1.4 Zugabe von Eindeckmedium

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

10.1.5 Ablesen des Objektträgers

Die gesamte Testfläche, auf der sich die gefärbte Probe befindet, mit einem Epifluoreszenzmikroskop untersuchen. Wie in Abschnitt 11 beschrieben, sollte die Fluoreszenz bei 200-500facher Vergrößerung sichtbar sein. (Die besten Ergebnisse erzielt man, wenn die Proben unmittelbar nach dem Anfärben abgelesen werden; Proben können aber auch bis zu 72 Stunden bei 2-8 °C im Dunkeln aufbewahrt werden.)

10.2 IMAGEN™ PARAINFLUENZA-VIRUSTYPEN 1, 2 UND 3 - K6104

10.2.1 Zugabe der Reagenzien

25 µL Reagenz 1 auf das erste Testareal, 25 µL Reagenz 2 auf das zweite Testareal und 25 µL -Reagenz 3 auf das dritte Testareal zu den fixierten Zellpräparationen (siehe Abschnitt 9.1) und auf den positiven und einen negativen Kontrollobjektträger geben. Sicherstellen, dass die Reagenzien die gesamte Testfläche bedecken.

10.2.2 Erste Inkubation

Die Objektträger **15 Minuten bei 37°C** in einer **feuchten Kammer** inkubieren. Das Reagenz **darf nicht** auf der Probe eintrocknen, da dies eine unspezifische Färbung verursachen kann.

10.2.3 Waschen des Objektträgers

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

10.2.4 Zugabe von Eindeckmedium

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

10.2.5 Ablesen des Objektträgers

Die gesamte Testfläche, auf der sich die gefärbte Probe befindet, mit einem Epifluoreszenzmikroskop untersuchen. Wie in Abschnitt 11 beschrieben, sollte die Fluoreszenz bei 200-500facher Vergrößerung sichtbar sein. (Die besten Ergebnisse erzielt man, wenn die Proben unmittelbar nach dem Anfärben abgelesen werden; Proben können aber auch bis zu 72 Stunden bei 2-8 °C im Dunkeln aufbewahrt werden.)

11 INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

11.1 KONTROLLEN

11.1.1 Positiver Kontrollobjektträger

Beim positiven Kontrollobjektträger, der gemäß Abschnitt 10 angefärbt wurde, sollten Zellen mit intrazellulärer, nukleärer und/oder zytoplasmatischer apfelgrüner Fluoreszenz sichtbar werden, die im Kontrast zum Hintergrund rot gegengefärbten Materials stehen. Die positiven Kontrollobjektträger müssen verwendet werden, um zu überprüfen, ob das Färbeverfahren ordnungsgemäß durchgeführt wurde.

Diese Objektträger wurden mit Parainfluenzavirus-infizierten Einschicht-Zellkulturen präpariert und dienen ausschließlich der Kontrolle des Testverfahrens, nicht der Probenverarbeitung. Die Aufarbeitung der Proben sollte anhand von bekannt positivem klinischem Material überprüft werden.

11.1.2 Negative Kontrolle

Negative Kontrollobjektträger müssen aus nicht infizierten, intakten Zellen des Typs, der zur Kultur und Isolierung von Parainfluenza-Viren verwendet wird, vorbereitet werden. Wenn die Zellen wie in Abschnitt 9.2 beschrieben präpariert und fixiert und gemäß Abschnitt 10 angefärbt und untersucht wurden, sind die Zellen auf dem negativen Kontrollobjektträger bei Gegenfärbung mit Evans-Blau rot gefärbt.

Auf diese Weise hergestellte Objektträger dienen ausschließlich der Kontrolle des Testverfahrens, nicht der Probenverarbeitung. Die Aufarbeitung der Proben sollte anhand von bekannt negativem klinischem Material überprüft werden.

11.2 KLINISCHE PROBEN

11.2.1 Erscheinungsbild Parainfluenza-Virus-infizierter Zellen

Bei Parainfluenza-Virus-infizierten Respirationsepithelzellen wird eine apfelgrüne intrazelluläre, nukleäre und/oder zytoplasmatische granuläre Fluoreszenz sichtbar.

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

11.2.2 Interpretation der Ergebnisse

Eine positive Diagnose liegt dann vor, wenn eine oder mehrere Zellen der fixierten angefärbten Probe mit dem IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppenreagenz oder mit einem der einzelnen IMAGEN™ Parainfluenza-Virustypenreagenzien (Typ 1, 2 oder 3) die in Abschnitt 11.2.1 beschriebene typische Fluoreszenz aufweisen.

Hingegen liegt eine negative Diagnose vor, wenn die fixierte, angefärbte Probe weder mit dem IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppenreagenz noch mit einem der einzelnen IMAGEN™ Parainfluenza-Virustypenreagenzien (Typ 1, 2 oder 3) eine positive Fluoreszenz aufweist.

Für Proben direkt gefärbter nasopharyngealer Aspirate gilt, dass mindestens 20 nicht infizierte Respirationsepithelzellen sichtbar sein müssen, bevor ein Ergebnis als negativ dokumentiert wird (Siehe Abschnitt 11.2.3, Unzureichende Zelldichte).

11.2.3 Unzureichende Zelldichte

Sind auf dem Objektträger nicht genügend Zellen vorhanden, muss der Rest der klinischen Probe bei 380g 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (15-30 °C) noch einmal zentrifugiert werden. Resuspendieren Sie die Zellen anschließend in wengiger PBS und verteilen Sie dann erneut je 25 µL Lösung auf den Testarealen. Alternativ kann eine neue klinische Probe angefordert werden.

11.3 NACHWEIS IN DER ZELLKULTUR UND TYPISIERUNG

11.3.1 Erscheinungsbild Parainfluenza Virus-infizierter Zellen

Bei infizierten Zellen wird eine intrazelluläre, nukleäre und/oder zytoplasmatische apfelgrüne Fluoreszenz sichtbar. Diese Zellen sollten als positive Parainfluenzadiagnose gewertet werden.

Nicht infizierte Zellen sind bei Gegenfärbung mit Evans-Blau rot gefärbt und sollten als negativ diagnostiziert werden.

11.3.2 Interpretation der Ergebnisse

Eine positive Diagnose liegt dann vor, wenn eine oder mehrere Zellen der fixierten, angefärbten Probe mit dem IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppenreagenz oder mit einem der einzelnen IMAGEN™ Parainfluenza-Virustypenreagenzien (Typ 1, 2 oder 3) die in Abschnitt 11.3.1 beschriebene typische Fluoreszenz aufweisen. Mindestens 50 nicht infizierte Zellen der getesteten Zellkultur müssen auf jedem Objektträger sichtbar sein, bevor ein negatives Ergebnis diagnostiziert werden kann. Siehe Abschnitt 11.2.3, Unzureichende Zelldichte.

11.3.3 Qualitätskontrolle

Positive und negativen Kontrollen sollten jedes Mal gefärbt und untersucht werden, wenn IMAGEN™ Parainfluenza-Reagenzien verwendet werden, um infizierte Zellkulturen auf Parainfluenza zu untersuchen.

Die gelieferten positiven Kontrollobjektträger dienen als geeignete Kontrollen, um die korrekte Funktion der Färbeverfahren und die Reaktivität der Reagenzien mit Parainfluenza-Virus-infizierten Zellen zu ermitteln. Zusätzliche positive Kontrollobjektträger sind bei DakoCytomation (Code-Nr. S6111) erhältlich.

Reagenzien und Verfahren sollten außerdem anhand eines negativen Kontrollzellausstrichs aus einer nicht inokulierten (nicht infizierten) Zellkultur des Typs kontrolliert werden, der zur Isolierung von Parainfluenza-Viren verwendet wird.

Falls die auf dem Testareal des Objektträgers oder des negativen Kontrollobjektträgers befindliche Präparation zu wenig Zellen aufweist (weniger als 50), wird der Rest der Zellkulturprobe 10 Minuten bei 200g und Raumtemperatur (15-30 °C) zentrifugiert und in einer kleineren Menge (ca. 50 µL) PBS resuspendiert. 25 µL der Zellsuspension wie in den Abschnitten 9 und 10 beschrieben auf die einzelnen Testareale geben und verarbeiten.

Wenn sowohl die IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppen- und -Virustypenreagenzien verwendet werden und mit den drei einzelnen Typenreagenzien ein negatives Ergebnis entsteht, während das Ergebnis mit dem Gruppenreagenz positiv war, sollten zusätzliche Zellabstriche vorbereitet und der Test wiederholt werden.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, eine Kulturpassage durchzuführen, um die Virusmenge und die Anzahl der infizierten Zellen zu vergrößern, bevor der Immunofluoreszenztest wiederholt wird.

12 GRENZEN DER METHODE

12.1 Verwenden Sie ausschließlich das gelieferte Eindeckmedium.

12.2 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™ Parainfluenza-Virus-Testreagenzien wurden modifiziert, um die Bindung an das Protein A des Cowan 1-Stammes von *Staphylococcus aureus* zu reduzieren. Der im Parainfluenza-Virustyp 1-Reagenz verwendete Antikörper kann allerdings eine sehr schwache Kreuzreaktion mit Protein A von *Staphylococcus aureus* zeigen.

Staphylococcus aureus kann in klinischen Proben vorhanden sein und somit in eine Zellkultur inokuliert werden, wo seine Replikation durch antimikrobielle Mittel gehemmt werden muss. *Staphylococcus aureus* tritt stets in Form von Tetraden oder traubenartigen Kokkengruppen (mit einem Einzeldurchmesser von ca. 1 µm) und eher extrazellulär auf, im Gegensatz zu der charakteristischen intrazellulären, feingranulären Färbung, die bei einer mit Parainfluenza-Viren infizierten Zellkultur zu beobachten ist.

12.3 Art und Zustand der benutzten Instrumente beeinflussen das optische Erscheinungsbild des Ergebnisses. Die Intensität der Fluoreszenz kann, abhängig vom Typ des Mikroskops, der benutzten Lichtquelle, Alter der Glühlampe sowie Filterzusammenstellung und -dicke, Unterschiede in der Sensitivität des Antigenstrats oder des verwendeten Testverfahrens unterschiedlich sein. Jedes Labor muss daher seine eigenen Kriterien für die Auswertung der Testergebnisse unter Einsatz geeigneter Kontrollen festlegen.

12.4 Falls in der Zellkultur keine Parainfluenza-Viren nachgewiesen werden können, kann das die Folge verschiedener Faktoren wie unsachgemäßer Probengewinnung und/oder Handhabung der Proben oder Versagen der Zellkultur etc. sein. Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Parainfluenza-Virusinfektion nicht aus.

12.5 Sowohl die IMAGEN™ Parainfluenza-Gruppenreagenzien als auch die und IMAGEN™ Parainfluenza-Typisierungsreagenzien erkennen in infizierten Zellen vorhandene Parainfluenza-Virus-Antigene. Ein positives Ergebnis erlaubt jedoch keine Aussage über die "Lebensfähigkeit" der vorhandenen Parainfluenza-Viren.

12.6 Die in den IMAGEN™ Parainfluenza-Gruppen- und Typisierungsreagenzien enthaltenen monoklonalen Antikörper wurden gegen Prototypen von Parainfluenza-Virusstämmen entwickelt. Möglicherweise werden jedoch nicht alle antigenen Varianten oder neue Stämme von Parainfluenza-Viren erkannt.

12.7 Antigene Variationen der Epitope, die von den im Kit enthaltenen monoklonalen Antikörpern erkannt werden, können zu neuen antigenen Varianten führen, die nicht mehr von den Antikörpern erkannt werden.

12.8 Die Vorhersagewerte der Testergebnisse werden durch die Prävalenz der zu analysierenden Proben beeinflusst.

12.9 Das Erscheinungsbild der Fluoreszenz kann je nach Mikroskoptyp und verwendeter Lichtquelle variieren.

12.10 Es wird empfohlen, zum Bedecken eines 6 mm-Durchmessers des Testareals 25 µL Reagenz zu verwenden. Eine Reduzierung dieser Menge kann zu Schwierigkeiten beim Bedecken der Probenfläche und damit zu einer verringerten Sensitivität führen.

12.11 Alle Reagenzien werden in festgelegten Arbeitskonzentrationen geliefert. Der Testerfolg kann beeinträchtigt werden, wenn die Reagenzien verändert oder unter anderen Bedingungen als den empfohlenen aufbewahrt werden.

12.12 Die Testergebnisse sollten in Verbindung mit den verfügbaren Informationen aus epidemiologischen Studien, der klinischen Bewertung des Patienten und anderen diagnostischen Verfahren interpretiert werden.

13 SOLLWERTE

Die Isolationsrate von Parainfluenza-Viren kann, abhängig vom Typ des verwendeten Tests, von Methode, Zeitpunkt und Ort der Probengewinnung, Handhabung, Aufbewahrung und Transport der Proben, variieren. Außerdem ist sie von Prävalenzraten in den Populationen sowie von Alter, geographischer Lage und sozioökonomischem Status der getesteten Population abhängig.

Parainfluenza-Viren der Typen 1, 2 und 3 herrschen in der ganzen Welt vor und werden in gemäßigten, tropischen und arktischen Klimazonen mit Atemwegsinfektionen assoziiert.¹⁰ Die meisten Infektionen treten bei Kleinkindern unter 5 Jahren auf, bei denen die Parainfluenza-Viren für 20% der Atemwegsinfektionen und für 30-40% der Fälle von Krupp verantwortlich sind.^{11,12}

Mehr als 90% der Kleinkinder machen eine Primärinfektion mit einem Parainfluenza-Virus durch, und bei bis zu 50% können symptomatische Reinfektionen auftreten.²

Parainfluenza-Viren weisen während saisonal bedingten Ausbrüchen von Atemwegsinfektionen hohe Prävalenzraten auf. In gemäßigten Klimazonen werden Parainfluenza-Viren meist mit Ausbrüchen in den Herbst- und Wintermonaten assoziiert.^{13,14} In einigen Ländern können Ausbrüche von Parainfluenza-Virus Typ 3-Infektionen auch in den Frühlings- und Sommermonaten erfolgen.³

Die höchsten Erkrankungsraten treten bei Kindern im Alter zwischen 1 und 5 Jahren auf. Infektionen oder Reinfektionen bei älteren Kindern und Erwachsenen gehen im allgemeinen mit schwächeren Atemwegs-Symptomen einher.

Parainfluenza-Viren sind für Ausbrüche von Atemwegsinfektionen in Krankenhäusern, insbesondere in Kinderstationen und in Altersheimen verantwortlich, wo sie mit erhöhten Krankheits- und Sterblichkeitsraten einhergehen.⁶

Während des Winters 1994-1995 lag die Gesamtinzidenz des Parainfluenza-Virus auf der Grundlage von Virus-Isolationsergebnisse in einem Untersuchungszentrum für den Parainfluenza-Virus Typ 1 bei 12,5% (21/168), Typ 2 bei 1,8% (3/168) und Typ 3 bei 14,3% (24/168).

Diese Werte geben jedoch kein genaues Bild von der Prävalenz des Parainfluenzavirus in der Gesamtbevölkerung ab, da die Proben von einer ausgewählten Population stammen, die sich wegen Atemwegsinfektionen in Untersuchung befand.

14.1 KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN

14.1.1 Direkte Proben

Der IMAGEN™ Parainfluenza-Virus-Gruppentest und der IMAGEN™ Parainfluenza-Virus 1, 2 und 3-Typisierungstest wurden für die direkte Anwendung an nasopharyngealen Absaugsekreten an drei Zentren, eins in den USA und zwei in England, getestet. Die Gewinnung der Proben erfolgte während des Winters 1994-1995.

Die klinischen Untersuchungen erfolgten an Proben nasopharyngealer Sekrete von Patienten mit vermuteter Parainfluenza-Virusinfektion. Die Proben wurden wie in Abschnitt 9.1.1. beschrieben gesammelt und untersucht. Azeton-fixierte Proben wurden entweder frisch (Lagerung bei 2-8 °C und innerhalb von 3 Tagen getestet) oder eingefroren (und zu einem späteren Zeitpunkt getestet) für die Auswertung herangezogen. Bei den Standard-(Referenz-) Methoden handelte es sich um einen kommerziell erhältlichen indirekten Immunfluoreszenztest und um Virus-Isolation und -Identifikation.

Eine Probe wurde als positiv gewertet, wenn eine oder mehrere der Respirationsepithelzellen mit dem IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppenreagenz oder mit einem der einzelnen IMAGEN™ Parainfluenza-Virustypenreagenzien (Typ 1, 2 oder 3) die in Abschnitt 11.2.1. beschriebene typische Fluoreszenz aufwies.

14.1.2 Nachweis in der Zellkultur

Der IMAGEN™ Parainfluenza-Virus-Gruppentest (und der IMAGEN™ Parainfluenza-Virus 1, 2 und 3-Typisierungstest) wurden in klinischen Untersuchungen an 4 Zentren in England getestet. Die Untersuchungen wurden zwischen Juli und Oktober 1991 durchgeführt.

Während dieses Zeitraums lag die Gesamtinzidenz des Parainfluenza-Virus in einem der Testzentren bei 14,4% (15 von 104) für das Parainfluenza-Virus Typ 1 und bei 8,7% (9 von 104) für das Parainfluenza-Virus Typ 3. Diese Werte geben jedoch kein genaues Bild von der Prävalenz des Parainfluenzavirus in der Gesamtbevölkerung ab, da die Proben von einer ausgewählten Population stammen, die sich wegen Atemwegsinfektionen in Untersuchung befand. Die Untersuchungen erfolgten an Proben aus Einschicht-Zellkulturen, die zuvor mit klinischen Proben von Patienten mit vermuteter Parainfluenza-Virusinfektion beimpft worden waren. Standardmethoden zur Identifikation von Parainfluenza-Viren auf Zellkulturen waren entweder Neutralisationstests oder die indirekte Immunfluoreszenz. Die IMAGEN™ Parainfluenza-Virusreagenzien wurden auch gegen eine Reihe von Mikroorganismen auf Kreuzreaktivität getestet, die in routinemäßig gewonnenen klinischen Proben mit hoher Wahrscheinlichkeit vorliegen (siehe Abschnitt 14.3).

14.2 KLINISCHE LEISTUNGSFÄHIGKEIT

14.2.1 Direkte Proben

Insgesamt wurden Proben von 222 Patienten mit vermuteter respiratorischer Virusinfektion mit dem IMAGEN™ Parainfluenza-Virus-Gruppentest und dem IMAGEN™ Parainfluenza-Virus 1, 2 und 3-Typisierungstest untersucht. An einem Zentrum im Nordosten der USA wurden 184 Proben von Kindern gewonnen und untersucht, um die Sensitivität und Spezifität des Tests zu bestimmen. Die Mehrzahl der Untersuchungen wurde mit Ergebnissen der Virusisolation verglichen, ein kleinerer Anteil mit der Referenz-Methode des indirekten Immunfluoreszenztests.

Die Ergebnisse dieses US-Zentrums sind in den Tabellen 14.1 und 14.2 dargestellt. An den beiden Testzentren in England wurden Proben zur Untersuchung ausgewählt, von denen bekannt war, dass sie Parainfluenza-Virus enthielten, um die Anzahl positiver Proben zu erhöhen. Diese Ergebnisse sind in den Tabellen 14.3 und 14.4 dargestellt. Die Vergleichsergebnisse zur Positivitätsrate für Parainfluenza-Virus sind in den Tabellen 14.5 und 14.6 dargestellt.

IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppentest (Typ 1, 2 und 3)

Am US-Zentrum korrelierten die Ergebnisse mit dem IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppentest (Typ 1, 2 und 3) zu 97,6% mit den Methoden der viralen Kultur und zu 98,4% mit dem indirekten Immunfluoreszenztest.

Die relative Sensitivität und Spezifität des IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppentest (Typ 1, 2 und 3) betrug 97,9% bzw. 97,5% verglichen mit der Methode der Virusisolierung. Im Vergleich zur Referenz-Methode der indirekten Immunfluoreszenz betrug die relative Sensitivität und Spezifität 96,2% bzw. 99,0%.

IMAGEN™ Parainfluenza-Virustypentest (Typ 1)

Am US-Zentrum korrelierten die Ergebnisse des IMAGEN™ Parainfluenza-Virus Typ 1-Tests zu 100% mit den Referenz-Methoden der Virusisolierung und dem Immunfluoreszenztest.

IMAGEN™ Parainfluenza-Virustypentest (Typ 2)

Am US-Zentrum korrelierten die Ergebnisse des IMAGEN™ Parainfluenza-Virus Typ 2-Tests zu 100% mit den Referenz-Methoden der Virusisolierung und dem Immunfluoreszenztest. Die Sensitivität und Spezifität des Tests betrug ebenfalls 100% im Vergleich zu diesen Referenz-Methoden.

IMAGEN™ Parainfluenza-Virustypentest (Typ 3)

Am US-Zentrum korrelierten die Ergebnisse des IMAGEN™ Parainfluenza-Virus Typ 3-Tests zu 97,6% mit der Referenz-Methode der Virusisolierung. Die Sensitivität und Spezifität des Tests betrug 91,6% bzw. 98,6% im Vergleich zur Virusisolierung. Die Korrelation zur direkten Immunfluoreszenz betrug 98,4%, Sensitivität und Spezifität lagen bei 75% bzw. 99,1%.

Tabelle 14.1 Vergleich der Testergebnisse von direkt an nasopharyngealen Sekreten angewendeten IMAGEN™ Parainfluenza-Virusreagenzien mit der Standardmethode der direkten Virusisolierung am US-Zentrum

IMAGEN™ Parainfluenza-Virus-Reagenz	Anzahl getesteter Proben	Anzahl positiver Proben (Virus- Isolation)	IMAGEN™ Parainfluenza-Virus-Reagenz	
			Sensitivität	Spezifität
Parainfluenza-Virustypenreagenz (Typ 1) (95% Vertrauensintervall)	168	21	100% (21/21) (84,0%-100%)	100% (147/147) (97, 51%-100%)
Parainfluenza-Virustypenreagenz (Typ 2) (95% Vertrauensintervall)	168	3	100% (3/3) (29,3%-100%)	100% (165/165) (97, 79%-100%)
Parainfluenza-Virustypenreagenz (Typ 3) (95% Vertrauensintervall)	168	24	92% (22/24) (73, 0%-98,97%)	98,6% (142/144) (95,08%-99, 83%)
Parainfluenza- Virusgruppenreagenz (95% Vertrauensintervall)	168	48	97, 9 (47/48) (89,0% - 99,95%)	97, 5% (117/120) (92, 89% - 99, 48%)

Tabelle 14.2 Vergleich der Testergebnisse von direkt an nasopharyngealen Sekreten angewendeten IMAGEN™ Parainfluenza-Virusreagenzien mit der Standardmethode der indirekten Immunfluoreszenz am US-Zenter

IMAGEN™ Parainfluenza- Virusreagenz	Anzahl getesteter Proben	Anzahl positiver Proben (Referenz- Methode Immun- fluoreszenz)	IMAGEN™ Parainfluenza-Virus-Reagenzien	
			Relative Sensitivität	Relative Spezifität
Parainfluenza-Virustypenreagenz (Typ 1) (95% Vertrauensintervall)	127	21	100% (21/21) (84, 0%-100%)	100% (127/127) (96, 59%-100%)
Parainfluenza-Virustypenreagenz (Typ 2) (95% Vertrauensintervall)	127	1	100% (1/1) (2,5%-100%)	100% (127/127) (97, 12%-100%)
Parainfluenza- Virustypenreagenz (Typ 3) (95% Vertrauensintervall)	127	4	75% (3/4) (19, 4%-99, 37%)	99,1% (122/123) (95,55%-99, 98%)
Parainfluenza- Virusgruppenreagenz (95% Vertrauensintervall)	127	26	96,2% (25/26) (80,4% - 99, 9%)	99, 0% (100/101) (94,61% - 99, 98%)

Anmerkung: "Relativ" bezieht sich auf den Vergleich der Ergebnisse dieses Tests mit denen einer ähnlichen Untersuchung. Es wurde kein Versuch unternommen, eine Korrelation zwischen den Versuchsergebnissen und dem Vorliegen oder Nichtvorliegen einer Krankheit herzustellen. Über die Genauigkeit des Vergleichstests in Bezug auf die Vorhersagbarkeit einer Krankheit kann keine Aussage gemacht werden.

Tabelle 14.3 Vergleich der Testergebnisse von direkt an nasopharyngealen Sekreten angewendeten IMAGEN™ Parainfluenza-Virusreagenzien mit der Standardmethode der direkten Virusisolation an den zwei Zentren in England

Virusisolation		Pos	Neg	Pos	Neg
IMAGEN™ Reagenz		Pos	Neg	Neg	Pos
Parainfluenza-Virusartenreagenz (Typ 1)	n = 35	3	31	0	1**
Parainfluenza-Virusartenreagenz (Typ 2)	n = 35	2	32	1*	0
Parainfluenza-Virusartenreagenz (Typ 3)	n = 35	27	7	1*	0
Parainfluenza-Virusgruppenreagenz	n = 35	30	0	4***	1**

* Beide Proben waren ebenfalls im indirekten Immunfluoreszenztest negativ.

** Die Probe war ebenfalls im indirekten Immunfluoreszenztest positiv.

***Zwei dieser Proben waren ebenfalls im indirekten Immunfluoreszenztest negativ.

Tabelle 14.4 Vergleich der Testergebnisse von direkt an nasopharyngealen Sekreten angewendeten IMAGEN™ Parainfluenza-Virusreagenzien mit der Standardmethode der indirekten Immunfluoreszenz an den zwei Zentren in England

Referenz- Immunofluoreszenztest IMAGEN™ Reagenz		Pos	Neg	Pos	Neg
		Pos	Neg	Neg	Pos
Parainfluenza- Virusgruppenreagenz (Typ 1)	n = 38	3	35	0	0
Parainfluenza- Virusgruppenreagenz (Typ 2)	n = 38	3	35	0	0
Parainfluenza- Virusgruppenreagenz (Typ 3)	n = 38	30	8	0	0
Parainfluenza- Virusgruppenreagenz	n = 38	34	2	2*	0

* Eine Probe enthielt wenig Zellen.

Tabelle 14.5 Vergleich der positiven Testergebnisse von direkt an nasopharyngealen Sekreten angewendeten IMAGEN™ Parainfluenza-Virusreagenzien mit der Standardmethode der direkten Virusisolation an allen Zentren

IMAGEN™ Reagenz	Nachgewiesene Anzahl durch Virusisolation	Nachgewiesene Anzahl durch IMAGEN™- Reagenz	% Übereinstimmung
Parainfluenza-Virusartenreagenz (Typ 1)	24	24	100%
Parainfluenza-Virusartenreagenz (Typ 2)	6	5	83,3%
Parainfluenza-Virusartenreagenz (Typ 3)	52	49	94,2%
Parainfluenza-Virusgruppenreagenz	82	77	93,9%

Tabelle 14.6 Vergleich der positiven Testergebnisse von direkt an nasopharyngealen Sekreten angewendeten IMAGEN™ Parainfluenza-Virusreagenzien mit der Standardmethode der indirekten Immunfluoreszenz an allen Zentren

IMAGEN™ Reagenz	Nachgewiesene Anzahl durch Referenz-Immunfluoreszenz	Nachgewiesene Anzahl durch IMAGEN™ - Reagenz	% Übereinstimmung
Parainfluenza-Virusstypenreagenz (Typ 1)	24	24	100%
Parainfluenza-Virusstypenreagenz (Typ 2)	4	4	100%
Parainfluenza-Virusstypenreagenz (Typ 3)	34	33	97,0%
Parainfluenza-Virusgruppenreagenz	62	59	95,2%

14.2.2 Bestätigung der Zellkultur

IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppe (Typ1, 2 und 3)

Der IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppentest (Typ 1, 2 und 3) wies mit den Standardmethoden eine Korrelation von 98,3% auf (Tabelle 14.7). Die relative Sensitivität und Spezifität des Tests betrug 98,3% bzw. 98,5%.

IMAGEN™ Parainfluenza-Virusstypen 1, 2 und 3

Die relative Sensitivität betrug für die einzelnen Parainfluenza-Virusgruppenreagenzien 1, 2 und 3 96,1%, 100% bzw. 97,4%. Die relative Spezifität für die einzelnen Parainfluenza-Virusstypenreagenzien 1, 2 und 3 betrug 99,3%, 99,7% bzw. 98,4%.

Tabelle 14.7 Vergleich der Testergebnisse mit IMAGEN™ Parainfluenza-Virusreagenzien mit Standardmethoden zur Zellkulturbestätigung

IMAGEN™ Parainfluenza-Virus Test	Anzahl der getesteten Proben	Anzahl der positiven Proben mit Standardmethoden	IMAGEN™ Parainfluenza-Virusreagenzien ^a	
			Relative Sensitivität	Relative Spezifität ^b
Parainfluenza-Virusreagenz (Typ 1) (95% Vertrauensintervall)	322	51	96,1% (49/51) (86,5% - 99,%)	99,3% (269/271) (97,4% - 99,9%)
Parainfluenza-Virusreagenz (Typ 2) (95% Vertrauensintervall)	315	24	100% (24/24) (85,8% - 100%)	99,7% (290/291) (98,1% - 100%)
Parainfluenza-Virusreagenz (Typ 3) (95% Vertrauensintervall)	345	155	97,4% (151/155) (93,5% - 99,3%)	98,4% (187/190) (95,5% - 99,7%)
Parainfluenza-Virusgruppenreagenz (95% Vertrauensintervall)	363	229	98,3% (225/229) (95,6% - 99,5%)	98,5% (132/134) (94,7% - 99,8%)

^a Die Ergebnisse von einem der vier Testzentren beinhalten einen Teil gefrorener Proben.

^b Mit den IMAGEN™ Parainfluenza-Virusreagenzien wurden zwei Stämme vom Typ 1 und einen Stamm vom Typ 3 nachgewiesen, die mit den Standardmethoden nicht nachgewiesen wurden.

14.3 KREUZREAKTIVITÄT

Die in Tabelle 14.8 aufgeführten Mikroorganismen wurden mit dem IMAGEN™ Parainfluenza-Virusgruppentest (Typ 1, 2 und 3) und den IMAGEN™ Parainfluenza-Virusstypentests (Typ1, 2 und 3) getestet und zeigten keinerlei Kreuzreaktivität. Die Untersuchungen auf Kreuzreaktivität erfolgten an Objektträgerpräparationen aus Stammkulturen oder neueren Erregerisolierungen.

Tabelle 14.8 Organismen, die mit allen IMAGEN™ Parainfluenza-Virusreagenzien untersucht und für nicht reaktiv befunden wurden

Mikroorganismus	Herkunft	Anzahl der untersuchten Proben
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	NCTC 10116 Kulturbouillonablagerung	1
Adenovirus Typ 1	Zellkultur	9
Adenovirus Typ 2	Zellkultur	5
Adenovirus Typ 3	Zellkultur	8
Adenovirus Typ 4	Zellkultur	3
Adenovirus Typ 5	Zellkultur	4
Adenovirus Typ 7	Zellkultur	3
Adenovirus Typ 10	Zellkultur	1
Adenovirus Typ 41	Zellkultur	1
<i>Bordetella pertussis</i>	Zellkultur	1
<i>Bordetella pertussis</i>	Kultumedium	1
<i>Branhamella catarrhalis</i>	Kultumedium	1
<i>Candida albicans</i>	Kultumedium	1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Zellkultur & Kultumedium	je 1
<i>Chlamydia psittaci</i>	Zellkultur	2
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Zellkultur	2
Kuhpockenvirus	Zellkultur	1
Coxsackie-Virus Typ A7	Zellkultur	1
Coxsackie-Virus Typ A9	Zellkultur	1
Coxsackie-Virus Typ B3	Zellkultur	3
Coxsackie-Virus Typ B4	Zellkultur	1
Coxsackie-Virus Typ B5	Zellkultur	2
Zytomegalie-Virus	Zellkultur	2
ECHO-Virus Typ 5	Zellkultur	1
ECHO-Virus Typ 11	Zellkultur	1
ECHO-Virus Typ 19	Zellkultur	2
ECHO-Virus Typ 30	Zellkultur	4

<i>Epstein-Barr-Virus</i>	Kontinuierliche Zellkultur	1
<i>Escherichia coli</i>	Kulturmedium	1
<i>Humanes Foamy Virus</i>	Zellkultur	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	Kulturmedium & Sputum	je 1
<i>Herpes-simplex-Virus Typ 1</i>	Zellkultur	3
<i>Herpes-simplex-Virus Typ 2</i>	Zellkultur	2
<i>Influenzavirus Typ A</i>	Zellkultur	2
<i>Influenzavirus Typ B</i>	Zellkultur	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kulturmedium	1
<i>Legionella pneumophila</i>	Zellkultur	1
<i>Masernvirus</i>	Zellkultur	3
<i>Mumps-Virus</i>	Zellkultur	8
<i>Mycobacterium avium</i>	Kulturmedium	1
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Kulturmedium	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Kulturmedium	1
<i>Mycoplasma arginini</i>	NCTC 10129	1
<i>Mycoplasma hominis</i>	Kulturbouillonablagerung NCTC 10111	1
<i>Mycoplasma hyorhinus</i>	Kulturbouillonablagerung NCTC 10130	1
<i>Mycoplasma orale</i>	Kulturbouillonablagerung NCTC 10112	1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Kulturbouillonablagerung NCTC 10119	1
<i>Mycoplasma salivarium</i>	Kulturbouillonablagerung NCTC 10113	1
<i>Neisseria cinerea</i>	Kulturmedium	1
<i>Neisseria flavescens</i>	Kulturmedium	1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Kulturmedium	1
<i>Neisseria lactamica</i>	Kulturmedium	1
<i>Neisseria meningitidis A, B, C & D</i>	Kulturmedium	je 1
<i>Neisseria mucosa</i>	Kulturmedium	1
<i>Neisseria perflava</i>	Kulturmedium	1
<i>Neisseria pharyngis</i>	Zellkultur	1
<i>Parainfluenza-Virus Typ 4a</i>	Klinische Probe	2
<i>Pneumocystis carinii</i>	Zellkultur	1
<i>Polio-Virus Typ 1</i>	Zellkultur	1
<i>Polio-Virus Typ 2</i>	Zellkultur	2
<i>Polio-Virus Typ 3</i>	Zellkultur	3
<i>RS-Virus</i>	Zellkultur	8
<i>Rhinovirus</i>	Zellkultur	6
<i>Sendai-Virus</i>	Zellkultur	1
<i>Streptococcus Gruppe A,</i>	Kulturmedium	je 1

B, C, D, F und G		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sputum	1
Varicella-Zoster-Virus	Zellkultur	2

1. **Matthew, R.E.F. (1982)**
Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
Intervirology **14**: 1-199.
2. **Welliver, R. (1982)**
Natural history of parainfluenza virus infection in childhood.
Journal of Paediatrics **101**: 180-187
3. **Martin, A.J., Gardener, P.S., and McQuillin, J. (1978)**
Epidemiology of respiratory viral infection among paediatric outpatients over a six year period in North East England.
The Lancet **ii**: 1035-1038
4. **Cullen, S.J., Baublis, J.V. (1980)**
Parainfluenza type 3 parotitis in two immunodeficient children.
Journal of Paediatrics **96**: 437-438
5. **Jarvis, W.R., Middleton, A.J., Gelford, E.W. (1979)**
Parainfluenza pneumonia in severe combined immunodeficiency.
Journal of Paediatrics **94**: 423-429
6. **Purkiss, D. (1983)**
Parainfluenza infections in the elderly.
PHLS Communicable Disease Report **83/19**: 3
7. **McClean, D.M. and Wong, K.K. (1984)**
Same day diagnosis of human virus infections.
CRS Press, Boca Raton, Florida.
8. **Gardener, P.S. and McQuillen, J. (1980)**
Rapid virus diagnostics: Applications of immunofluorescence.
2nd edn. Butterworths, London.

9. **Ray, C.G. and Minnich, L.C. (1987)**
Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses.
Journal of Clinical Microbiology **25**:355-357
10. **McClean, D.M. (1988)**
Virological infections.
Thomas Springfield, Illinois.
11. **McClean, D.M., Bannatyre, R.M. and Givan, K.F. (1967)**
Myxovirus dissemination by air.
Canadian Medical Association Journal **89**: 1257-59
12. **Gardener, P.S., McQuillin, J., McGuckin, R. and Ditchburn, R.K. (1971)**
Observations on clinical and immunofluorescent diagnosis of parainfluenza virus infections.
BMJ **2**: 571-575
13. **McClean, D.M. (1991)**
Parainfluenza viruses.
Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E., Pattison, J.R. eds.
Principle and Practice of Clinical Virology
2nd Edition, J. Wiley & Sons: 239-251
14. **Anestad, G. (1987)**
Surveillance of respiratory viral infection by rapid immunofluorescence with emphasis on viral interference.
Epidemiology and Infection **99**: 523-531

TECHNICAL ADVICE AND CUSTOMER
SERVICE

CONSEIL TECHNIQUE ET SERVICE
CLIENTELE

TECHNISCHE BERATUNG UND
KUNDENDIENST

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

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

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

 Manufactured by/Fabriqué par/Hersteller:

DakoCytomation Ltd.,
Denmark House,
Angel Drove, Ely,
Cambridgeshire, CB7 4ET
United Kingdom/Royaume Uni/Großbritannien

Telephone: +44 1353 669911
Fax: +44 1353 668989

IMAGEN™ Parainfluenza 1, 2, 3
January 2006 9607047EFG