

D³ Ultra 8™

DFA Respiratory Virus
SCREENING AND IDENTIFICATION KIT

Kit de dépistage et d'identification de virus respiratoires

Pour exportation seulement – Pas à vendre aux Etats-Unis

UTILISATION POUR LE DIAGNOSTIC *IN VITRO*



USAGE PRÉVU

Le D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening & Identification Kit de Diagnostic Hybrids, Inc. est destiné à être utilisé dans le cadre de la détection et de l'identification qualitatives de l'influenza A, de l'influenza B, du virus respiratoire syncytial (VRS), du métapneumovirus, de l'adénovirus, ainsi que des virus parainfluenza 1, 2 et 3 dans des échantillons respiratoires par détection directe ou après culture cellulaire par immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux conjugués à la fluorescéine (MAb).

Après examen du résultat de l'échantillon direct, il est recommandé de confirmer que les échantillons sont négatifs par culture cellulaire. Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par virus respiratoire et ne doivent pas être utilisés comme une base exclusive pour établir un diagnostic, un traitement ou pour prendre toute autre décision de gestion.

- Les caractéristiques des performances pour l'influenza A ont été établies lorsque les influenza A/H3 et A/H1 étaient les sous-types prédominants de l'influenza A en circulation. Les caractéristiques de performance peuvent varier avec l'émergence de nouveaux virus de l'influenza A.
- En cas de suspicion d'infection par un nouveau virus influenza A basée sur des critères de dépistage clinique et épidémiologique actuellement recommandés par les autorités sanitaires publiques, les échantillons doivent être prélevés en prenant des précautions de contrôle des infections adaptées aux nouveaux virus influenza virulents, puis transmis aux départements sanitaires nationaux ou locaux pour y être testés. Dans ce cas, la culture virale ne doit pas être mise en œuvre, sauf si un établissement BSL3+ peut recevoir les échantillons et les mettre en culture.¹

RESUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

En raison de l'existence de nouveaux médicaments antiviraux permettant de traiter l'influenza², de l'apparition de tests de détection des virus plus rapides et plus sensibles^{3,4} et du besoin croissant d'un plus grand discernement dans l'utilisation d'antibiotiques⁵, la détection et l'identification précoces de l'agent viral infectieux ont pris une importance substantielle. L'identification virale est de plus en plus importante pour éradiquer les bactéries à l'origine d'infections respiratoires. L'identification des virus, soit par détection directe d'antigènes, soit par culture cellulaire à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents continue d'être la méthode standard dans les laboratoires de virologie.

Les Virus Influenza

Les virus influenza (famille des *Orthomyxoviridae*) contiennent un génome d'ARN simple brin, présent dans 8 segments distincts de la ribonucléoprotéine. Cette segmentation du génome est rare parmi les virus et contribue probablement au développement rapide de nouvelles souches d'influenza par l'échange de segments de gènes lorsque deux virus distincts infectent la même cellule. Il existe 3 types d'influenza: A, B et C. Le type A

infecte les oiseaux, les chevaux, les mammifères marins, les porcs, ainsi que les humains, tandis que les types B et C ne sont connus que chez l'homme.

En raison du risque de l'apparition d'une pandémie d'influenza A, comme cela s'est produit en 1918, responsable de 25 à 35 millions de décès dans le monde, les CDC (centres de contrôle des maladies) et l'OMS (Organisation mondiale de la Santé) maintiennent la surveillance de souches émergentes d'influenza et émettent des recommandations quant aux souches adaptées à la production de vaccins.

On estime que l'influenza infecte chaque année 120 millions de personnes aux États-Unis, en Europe et au Japon et que 75 000 décès par an aux États-Unis sont dus à une pneumonie causée par l'influenza. La pneumonie virale primaire ou la pneumonie due à des infections bactériennes secondaires sont les principales causes de la morbidité associée aux infections par virus influenza.⁶ Les complications ont tendance à toucher les plus jeunes, les personnes âgées et les personnes souffrant de maladies cardio-pulmonaires chroniques.

Des pandémies d'influenza A surviennent tous les 10 à 30 ans tandis que les épidémies d'influenza A et B se déclarent chaque année; Cependant, les 2 types peuvent co-circuler. Les infections sont saisonnières, elles s'étendent typiquement de novembre à avril dans l'hémisphère Nord. Le temps d'incubation est de 1 à 3 jours, avec propagation rapide par inhalation de gouttelettes dans l'air et de matières contaminées. La maladie se caractérise par une survenue rapide de fièvre, myalgie, céphalées et pharyngite.

Les influenza A et B sont le plus communément isolés dans les lignées mixtes A549/Mv1Lu (R-Mix™), A549/MDCK (R-Mix Too™), et les lignées cellulaires singe rhésus MK, MDCK, MRC-5 et A549.⁷

Virus Respiratoire Syncytial (VRS)

Le VRS (famille des *Paramyxoviridae*) est un virus enveloppé à génome d'ARN à simple brin négatif. Les infections à VRS causent une bronchiolite et une pneumonie virale chez les nourrissons, et un rhume chez l'adulte.⁸ Le VRS est la principale cause virale d'atteinte des voies respiratoires inférieures chez les nourrissons et les jeunes enfants avec un pic de mortalité due au VRS chez les enfants âgés de 3 à 4 mois. Le VRS est généralement une infection saisonnière (hiver et début du printemps) dont les épidémies durent jusqu'à 5 mois. Il existe deux principaux sous-types: A et B; le sous-type B se caractérise par une souche asymptomatique qui touche la majorité de la population. Les maladies cliniques plus graves impliquent les souches du sous-type A qui ont tendance à prédominer dans la plupart des épidémies.⁹ Des réinfections se produisent, mais elles sont généralement limitées à des infections mineures des voies aériennes supérieures.¹⁰ Le VRS est également reconnu comme un problème important au sein de certaines populations adultes, dont les personnes âgées, les personnes souffrant de maladies cardio-pulmonaires et les hôtes immunodéprimés.¹¹

Le VRS est généralement détecté directement dans les cellules de l'épithélium nasopharyngé par coloration à l'aide de réactifs immunofluorescents,⁹ bien qu'il puisse être isolé dans des cultures de lignées cellulaires mixtes A549/Mv1Lu (R-Mix), A549/MDCK (R-Mix Too), et les lignées cellulaires HEp2, Vero, LLC-MK2 et MRC-5.⁷

Métapneumovirus

Le métapneumovirus humain (hMPV) est un pathogène respiratoire viral qui provoque une gamme de pathologies allant d'une infection asymptomatique à une bronchiolite sévère. En 2001, van den Hoogen et al.¹² ont décrit l'identification de ce nouvel agent pathogène viral humain dans des échantillons respiratoires après culture cellulaire pendant la saison hivernale. La moitié des 28 isolats initiaux de hMPV provenaient de patients âgés de moins de 1 an, 96% provenant d'enfants âgés de moins de 6 ans. Des études de séroprévalence ont révélé que 25% des nourrissons âgés de 6 à 12 mois testés aux Pays-Bas avaient des niveaux détectables d'anticorps anti-hMPV. Vers l'âge de 5 ans, 100% des patients ont montré des preuves d'infections passées. Un rapport distinct d'Australie¹³ décrivant 3 cas additionnels d'infection à hMPV supporte l'assertion selon laquelle

ce virus nouvellement découvert est ubiquitaire et des informations supplémentaires relatives à la pathogenèse et à l'épidémiologie du virus vont probablement apparaître dans les années à venir.¹⁴

Le métapneumovirus peut être isolé dans des cultures de lignées cellulaires mixtes A549/Mv1Lu (R-Mix), A549/MDCK (R-Mix Too), et les lignées cellulaires HEp2 et A549.⁷

Adénovirus

Les adénovirus (famille des Adenoviridae) sont des virus non enveloppés à ADN double brin. Il en existe 49 sérotypes, divisés en 6 groupes (de A à F), dont la plupart sont associés à des infections respiratoires et oculaires. En général, les infections à adénovirus ont une faible morbidité chez les adultes, à l'exception des patients immunodéprimés et des individus vivant dans des lieux confinés où les infections peuvent provoquer des pneumonies atypiques. Le virus se propage généralement par l'intermédiaire de gouttelettes dans l'air et par des matières contaminées qui infectent les membranes muqueuses des yeux, des voies respiratoires et l'intestin¹⁵.

L'adénovirus peut être isolé dans des cultures de lignées cellulaires mixtes A549/Mv1Lu (R-Mix), A549/MDCK (R-Mix Too), et les lignées cellulaires HEp2, HEK, A549 et MRC-5.⁷

Parainfluenzavirus 1, 2 et 3

Les virus parainfluenza (famille des Paramyxoviridae) sont des virus enveloppés à génome d'ARN à simple brin négatif. Les 4 différents types (1 à 4) provoquent un croup ou une pneumonie virale chez les enfants de moins de 5 ans et provoquent une maladie des voies aériennes supérieures chez les adultes. Les virus parainfluenza sont la deuxième cause principale de maladie des voies respiratoires inférieures chez l'enfant (après le VRS). Les maladies causées par les virus parainfluenza se déclarent à l'automne (P1 et P2) ou tout au long de l'année, avec un pic d'activité au printemps (P3).¹⁶

Les virus parainfluenza peuvent être isolés dans des cultures de lignées cellulaires mixtes A549/Mv1Lu (R-Mix), A549/MDCK (R-Mix Too), les lignées cellulaires singe rhésus MK, MRC-5 et LLC-MK2.⁷ La présence de trypsine dans le milieu est utile pour les types 1 et 2, mais pas pour le type 3.

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Le D³ Ultra 8 DFA (anticorps fluorescent direct) Respiratory Virus Screening & Identification Kit de Diagnostic Hybrids, Inc. utilise des anticorps monoclonaux murins spécifiques d'antigènes viraux directement marqués par de la fluorescéine pour détecter et identifier rapidement les virus respiratoires. Le kit comprend un DFA Screening Reagent qui contient un mélange d'anticorps monoclonaux (MAb) murins dirigés contre huit virus respiratoires (influenza A, influenza B, VRS, hMPV, adénovirus, parainfluenza 1, 2 et 3), ainsi que huit DFA Reagents individuels composés chacun de mélanges d'anticorps monoclonaux dirigés contre un virus respiratoire unique. Le kit peut être utilisé pour le dépistage direct d'échantillons ou après culture cellulaire, ainsi que pour l'identification finale du virus.

Les cellules à tester, provenant d'un échantillon clinique ou d'une culture cellulaire, sont fixées dans de l'acétone. Le DFA Screening Reagent est ajouté aux cellules pour déterminer la présence d'antigènes viraux. Après une incubation entre 35°C et 37°C, les cellules colorées sont rincées avec la Wash Solution (1X). Une goutte du Mounting Fluid fourni est ajoutée et une lamelle est placée sur les cellules préparées. Les cellules sont examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les cellules infectées par le virus émettent une fluorescence vert-pomme spécifique des virus lorsqu'elles sont révélées avec le DFA Screening Reagent, alors que les cellules non infectées n'émettent pas de fluorescence, mais sont colorées en rouge par le contre-colorant Bleu Evans. Si l'échantillon contient des cellules fluorescentes, le virus concerné est identifié à l'aide des réactifs DFA individuels sur de nouvelles préparations cellulaires.

Si à l'examen direct d'un échantillon, aucune cellule colorée fluorescente n'est détectée et que toutes les cellules sont rouges en raison de la contre-coloration au Bleu Evans, il est recommandé de mettre l'échantillon en culture et de le révéler avec le DFA Screening Reagent. En cas de présence de cellules fluorescentes, l'identification du virus est réalisée comme expliqué précédemment. La préparation cellulaire est fixée dans de l'acétone. Les DFA Reagents individuels sont ajoutés aux préparations cellulaires. Après une incubation entre 35°C et 37°C, les cellules colorées sont rincées avec la Wash Solution (1X). Une goutte du Mounting Fluid fourni est ajoutée et une lamelle est placée sur les cellules colorées. Les cellules sont examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence pour détecter la présence d'une fluorescence verte spécifique aux virus. Le virus respiratoire inconnu est ensuite identifié et signalé.

REACTIFS ET CONTENU DU KIT

Le D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening & Identification Kit de Diagnostic Hybrids, Inc. Contient les éléments suivants :

D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening Reagent 10 mL

(Réactif de dépistage D³ Ultra 8 DFA de virus respiratoires) Un flacon compte-gouttes contenant un mélange d'anticorps monoclonaux murins marqués à la fluorescéine dirigés contre les antigènes viraux respiratoires de l'influenza A, de l'influenza B, du virus respiratoire syncytial (VRS), du métapneumovirus, de l'adénovirus, ainsi que des parainfluenza 1, 2 et 3. La solution aqueuse tamponnée et stabilisée contient du Bleu Evans comme contre-colorant et de l'azoture de sodium à 0,1 % comme conservateur.

Influenza A DFA Reagent 2 mL

(Réactif DFA Influenza A) Un flacon compte-gouttes contenant des anticorps monoclonaux murins marqués à la fluorescéine dirigés contre des antigènes produits par les cellules infectées par le virus influenza A (souche Texas 1/77, H3N2). La solution tamponnée, stabilisée et aqueuse, contient du Bleu Evans, utilisé comme contre-colorant et de l'azoture de sodium à 0,1 % comme conservateur.

Influenza B DFA Reagent 2 mL

(Réactif DFA Influenza B) Un flacon compte-gouttes contenant des anticorps monoclonaux murins marqués à la fluorescéine dirigés contre des antigènes produits par les cellules infectées par le virus influenza B (Hong-Kong 5/72). La solution tamponnée, stabilisée et aqueuse, contient du Bleu Evans, utilisé comme contre-colorant et de l'azoture de sodium à 0,1 % comme conservateur.

RSV DFA Reagent 2 mL

(Réactif DFA VRS) Un flacon compte-gouttes contenant des anticorps monoclonaux murins marqués à la fluorescéine dirigés contre des antigènes produits par les cellules infectées par le VRS (souche Long). La solution tamponnée, stabilisée et aqueuse, contient du Bleu Evans, utilisé comme contre-colorant et de l'azoture de sodium à 0,1 % comme conservateur.

Metapneumovirus DFA Reagent 2 mL

(Réactif DFA Métapneumovirus) Un flacon compte-gouttes contenant des anticorps monoclonaux murins marqués à la fluorescéine dirigés contre des antigènes produits par les cellules infectées par le métapneumovirus. La solution tamponnée, stabilisée et aqueuse, contient du Bleu Evans, utilisé comme contre-colorant et de l'azoture de sodium à 0,1 % comme conservateur.

Adenovirus DFA Reagent 2 mL

(Réactif DFA Adénovirus) Un flacon compte-gouttes contenant des anticorps monoclonaux murins marqués à la fluorescéine dirigés contre des antigènes produits par les cellules infectées par l'adénovirus (souche type 3-GB et souche type 6-tonsil 99). La solution tamponnée, stabilisée et aqueuse, contient du Bleu Evans, utilisé comme contre-colorant et de l'azoture de sodium à 0,1 % comme conservateur.

Parainfluenza 1 DFA Reagent**2 mL**

(Réactif DFA Parainfluenza 1) Un flacon compte-gouttes contenant des anticorps monoclonaux murins marqués à la fluorescéine dirigés contre des antigènes produits par les cellules infectées par le virus parainfluenza 1 (souche VP-1). La solution tamponnée, stabilisée et aqueuse, contient du Bleu Evans, utilisé comme contre-colorant et de l'azoture de sodium à 0,1 % comme conservateur.

Parainfluenza 2 DFA Reagent**2 mL**

(Réactif DFA Parainfluenza 2) Un flacon compte-gouttes contenant des anticorps monoclonaux murins marqués à la fluorescéine dirigés contre des antigènes produits par les cellules infectées par le virus parainfluenza 2 (souche Greer). La solution tampon, stabilisée et aqueuse, contient du Bleu Evans, utilisé comme contre-colorant et de l'azoture de sodium à 0,1 % comme conservateur.

Parainfluenza 3 DFA Reagent**2 mL**

(Réactif DFA Parainfluenza 3) Un flacon compte-gouttes contenant des anticorps monoclonaux murins marqués à la fluorescéine dirigés contre des antigènes produits par les cellules infectées par le virus parainfluenza 3 (souche C243). La solution tamponnée, stabilisée et aqueuse, contient du Bleu Evans, utilisé comme contre-colorant et de l'azoture de sodium à 0,1 % comme conservateur.

Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent**10 mL**

(Réactif DFA gamma globuline normale de souris) Un flacon compte-gouttes contenant un mélange de gamma globulines murines marquées à la fluorescéine ayant montré une absence de réactivité vis à vis des virus respiratoires répertoriés. La solution tamponnée, stabilisée et aqueuse, contient du Bleu Evans, utilisé comme contre-colorant et de l'azoture de sodium à 0,1 % comme conservateur.

Respiratory Virus Antigen Control Slides**5 lames**

(Lames de contrôle antigènes de virus respiratoires) Cinq (5) lames de contrôle emballées individuellement contenant des puits avec des cellules de contrôle positives et négatives dérivées de culture cellulaire. Chaque puits positif est identifié d'après le virus infectant les cellules présentes dans le puits, à savoir l'influenza A, l'influenza B, le virus respiratoire syncytial (VRS), l'adénovirus, les virus parainfluenza 1, 2 et 3. Le puits négatif contient des cellules non infectées. Chaque lame est destinée à être révélée une fois uniquement.

hMPV Antigen Control Slides**5 lames**

(Lames de contrôle antigènes de hMPV) Cinq (5) contenant des puits avec des cellules de contrôle positives et négatives dérivées de culture cellulaire. Le puits positif contient des cellules infectées par le métapneumovirus. Le puits négatif contient des cellules non infectées. Chaque lame est destinée à être révélée une fois uniquement.

40X Wash Solution Concentrate**25 mL**

(Solution de lavage concentrée 40X), 25 mL. Un flacon de PBS 40X concentré composé de Tween 20 et 4% d'azide de sodium (0,1% d'azide de sodium après dilution à 1X utilisant de l'eau déminéralisée).

Mounting Fluid**15 mL**

(Milieu de montage) Un flacon compte-gouttes contenant une solution tamponnée, stabilisée et aqueuse de glycérol et de l'azoture de sodium à 0,1 %.

PRODUITS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

1. Microscope à fluorescence avec la combinaison de filtre appropriée pour FITC (pic d'excitation = 490 nm, pic d'émission = 520 nm); grossissement 200X à 400X.

2. Culture cellulaire pour l'isolement des virus respiratoires. Les lignées cellulaires suggérées comprennent les LLC-MK2, HEp-2, les cellules A549, les lignées cellulaires mixtes R-Mix™ and R-Mix Too™ Mixed Cells™, ainsi que les cellules primaires de rein de singe rhésus. Toutes sont disponibles auprès de Quidel.
3. Virus vivants de contrôle: Souches connues des 8 virus respiratoires utilisées comme contrôles des cultures cellulaires et des procédures de coloration. Ces souches de virus de contrôle sont disponibles auprès de Quidel.
4. Lamelles (22 x 50 mm) pour les lames de contrôle antigènes et les lames échantillons.
5. Milieu de transport universel. Disponible chez Quidel
6. R-Mix Refeed Medium (à utiliser avec les cellules mixtes R-Mix MixedCells et R-Mix Too) ou un autre milieu d'ensemencement standard. Disponibles chez Quidel.
7. Acétone de qualité réactif (pureté >99 %) réfrigéré entre 2°C et 8°C pour la fixation des lames d'échantillon direct, des shell-vials et les préparations des cultures cellulaires.
REMARQUE 1: Maintenir le récipient d'acétone de qualité réactif hermétiquement fermé afin d'éviter l'absorption hygroscopique d'eau pouvant générer une fluorescence de fond diffuse, non spécifique.
REMARQUE 2: Un mélange de 80 % d'acétone / 20 % d'eau déminéralisée est utilisé pour fixer les cellules dans les plaques multi-puits en plastique. Conserver à température ambiante (20°C à 25°C).
8. Pipettes graduées stériles: 10 mL, 5 mL et 1 mL.
9. Pipettes Pasteur stériles ou autres pipettes de « transfert ».
Attention: Ne pas utiliser de solvants tels que l'acétone avec des pipettes de transfert en polyéthylène.
10. Pincettes à embout fin.
11. Filtre pour seringue stérile de 0,45 µm.
12. Seringue stérile de 3 mL.
13. Bouteille de lavage de 200 mL.
14. Aiguille à dissocier à embout courbe (pour le retrait de la lamelle d'un shell-vial pour la partie « typage » de la procédure); façonner l'aiguille à dissocier en courbant l'extrémité d'une aiguille à seringue ou un objet similaire (par exemple, une aiguille à dissocier de mycologie) contre une paillasse ou à l'aide d'une paire de pincettes, en prenant soin de ne pas se blesser.
15. Solution d'hypochlorite de sodium (dilution finale 1:10 d'eau de javel domestique).
16. Chambre humide (par exemple, une boîte de Petri avec un essuie-tout humide placé dans le fond).
17. Lames de microscope en verre.
18. Lames de microscope en verre multipuits nettoyées à l'acétone (lames masquées de 2 et 8 puits).
19. Buvards pour lames de microscope multipuits en verre: Buvards absorbants pour 2 et 8 puits, utilisés pour absorber l'excès de liquide provenant du masque afin d'éviter la dispersion du liquide ou de cellules colorées d'un puit à un autre.
20. Écouvillons stériles en nylon floqué ou en polyester qui est non inhibiteur des virus et de culture cellulaire.
21. Incubateur, entre 35°C et 37°C (5 % de CO₂ ou de non-CO₂, selon le format utilisé pour la culture cellulaire).
22. Centrifugeuse avec rotor à ailettes à oscillation libre.
23. Eau déminéralisée pour la dilution de la 40X Wash Solution Concentrate (*PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE LAVAGE 1X*) ainsi que la dilution de l'acétone de qualité réactif utilisé dans les plaques multipuits en polystyrene. (**REMARQUE 2** ci-dessus).
24. PBS (tampon phosphate salin) stérile destiné à rincer et suspendre les cellules.
25. Configuration de l'aspirateur: Aspirateur avec trappe désinfectante contenant de la javel domestique (5%) en quantité suffisante pour que la concentration ne diminue pas plus de 10 fois, lorsqu'elle est diluée avec les liquides rejetés.
26. Récipient de lavage: Bécher, bouteille de lavage ou bocal Coplin pour le lavage des lames.
27. Récipient de fixation: Bocal Coplin, cuvette pour lames ou support en polyéthylène pour lames, utilisés pour fixer les cellules sur les lames.
28. Microscope inversé: Utilisé pour examiner les couches monocellulaires préalablement à l'inoculation et l'examen de la toxicité, la confluency et de l'effets cytopathiques (ECP). Sa capacité de grossissement doit être comprise entre 40X et 100X.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

- Utilisation pour diagnostic *in vitro*.
- Aucune méthode de test ne peut totalement garantir l'absence d'agents infectieux. En conséquence, tous les dérivés sanguins humains, réactifs et échantillons humains doivent être manipulés comme étant susceptibles de transmettre une infection. Il est recommandé de manipuler réactifs et échantillons humains selon le standard sur les pathogènes transmissibles par le sang OSHA.
 - ▶ L'isolement en culture cellulaire est potentiellement dangereux. Le personnel travaillant avec des cultures cellulaires doit être parfaitement formé aux techniques de manipulation sécurisées,^{17, 18, 19} et doit être expérimenté en cultures cellulaires avant d'appliquer cette procédure.
 - ▶ Toutes les procédures doivent être réalisées conformément à la 5^{ème} édition du Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux), 2007, édité par le CDC et aux indications générales approuvées M29- A du CLSI, Protection des techniciens de laboratoire contre les risques biologiques et les maladies infectieuses transmissibles par le sang, les liquides corporels et les tissus.
- Tous les échantillons et les matériels utilisés pour les traiter doivent être considérés comme potentiellement dangereux et doivent être manipulés de manière à éviter la contamination du personnel du laboratoire.
 - ▶ Des pratiques de biosécurité de niveau 2 ou d'autres mesures appropriées doivent être mises en œuvre lors de la manipulation de ces matériels.
 - ▶ La décontamination des échantillons et cultures présente la meilleure efficacité en utilisant une solution d'hypochlorite de sodium (dilution 1:10 de javel domestique).
 - ▶ Bien que les lames de contrôle d'antigènes ont montré ne pas être infectieuses, la manipulation et l'élimination doivent s'effectuer en suivant les mêmes précautions que pour d'autres produits infectieux.
- L'acétone, un réactif requis pour le test mais non fourni dans le kit, est un solvant organique volatil et inflammable. Il convient de l'utiliser dans un espace bien ventilé et à l'écart des flammes et les autres sources d'allumage.
- L'azoture de sodium est inclus à 4 % dans la 40X Wash Solution Concentrate et à 0,1 % dans les autres solutions de ce kit.
 - ▶ L'azide de sodium est considéré comme toxique. En cas d'ingestion de PBS concentré 40X, consulter immédiatement un médecin.
 - ▶ Mélangées à des acides, les solutions aqueuses d'azoture de sodium peuvent dégager des gaz toxiques.
 - ▶ Éviter d'éliminer ces solutions par les installations sanitaires ou les canalisations industrielles. L'azoture de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des conduites et former des azotures métalliques hautement explosifs.
 - ▶ Éviter de les déverser dans l'environnement.
- Le contre-colorant Bleu Evans est un agent cancérigène potentiel. En cas de contact avec la peau, rincer immédiatement avec de l'eau.
- Les réactifs DFA sont fournis prêts à l'emploi. Toute dilution des réactifs DFA diminuera leur sensibilité.
- Les réactifs doivent être utilisés avant leur date de péremption.
- Chaque lame de contrôle d'antigènes est à usage unique. Ne pas les réutiliser.
- Une contamination microbienne des réactifs DFA peut entraîner une diminution de la sensibilité.
- Ne jamais pipeter les réactifs ou les échantillons cliniques avec la bouche, éviter tout contact d'échantillons cliniques avec la peau éraflée.
- Éviter les projections et la production d'aérosols avec les échantillons cliniques.
- Utiliser une technique aseptique et un équipement et des matériels stériles pour toutes les procédures de culture de cellulaire.

- Conserver la 1X Wash Solution et le PBS (tampon phosphate salin) dans des récipients propres pour éviter toute contamination.
- Les articles de verre réutilisables doivent être nettoyés et rincés abondamment sans détergent.
- Ne pas exposer les réactifs DFA à une forte lumière pendant la coloration ou le stockage.
- L'utilisation d'autres réactifs que ceux spécifiés avec les composants de ce kit peut fausser les résultats.
- Le test doit être effectué dans une zone suffisamment ventilée.
- Éliminer les contenants et les contenus non utilisés conformément aux exigences fédérales, nationales et réglementations réglementaires locales.
- Porter des gants et des lunettes de protection, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire en manipulant cette kit.
- Lavez-vous soigneusement les mains après manipulation.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et l'élimination des composants de ce kit, veuillez vous référer à la Fiche de données de sécurité (FDS) que vous trouverez sur quidel.com.

Préparation de la Solution de Lavage 1X

1. Après conservation à une température comprise entre 2°C et 8°C, des sels du 40X Wash Solution Concentrate peuvent cristalliser. Ramener la solution à température ambiante (entre 20°C et 25°C) pour dissoudre les cristaux et mélanger.
2. Ajouter le contenu de 25 mL de la 40X Wash Solution Concentrate entièrement dissous dans 975 mL d'eau déminéralisée.
3. Mentionner sur la bouteille contenant la 1X Wash Solution Concentrate une date de péremption à soixante (60) jours après la reconstitution et la stocker à température ambiante.

INSTRUCTIONS DE CONSERVATION

Tableau 1. Conditions de Stockage des Réactifs

Respiratory Virus DFA Screening Reagent	Conserver entre 2°C et 8°C à l'obscurité
Influenza A DFA Reagent	
Influenza B DFA Reagent	
RSV DFA Reagent	
Metapneumovirus DFA Reagent	
Adenovirus DFA Reagent	
Parainfluenza 1 DFA Reagent	
Parainfluenza 2 DFA Reagent	
Parainfluenza 3 DFA Reagent	
Mounting Fluid	
Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent	Conserver entre 2°C et 8°C
Respiratory Virus Antigen Control Slides	
hMPV Antigen Control Slides	Conserver le liquide entre 2°C et 8°C avant dilution
40X Wash Solution Concentrate REMARQUE: Le Concentré peut cristalliser pendant sa conservation entre 2°C et 8°C. Les cristaux se dissolvent lorsque le Concentré est ramené à température ambiante.	
1X Wash Solution	Conserver à T° ambiante (20°C à 25°C)

Stabilité

Les réactifs et les composants conservent pleinement leur efficacité jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de chaque flacon, à condition que le stockage soit effectué conformément aux températures recommandées. L'exposition à la lumière des Réactifs DFA doit être la plus limitée possible.

Jeter la 1X Wash Solution Concentrate si elle devient trouble.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Le prélèvement et la manipulation appropriés de l'échantillon du patient sont les facteurs les plus importants pour réussir la détection de virus respiratoires. Le prélèvement de l'échantillon, son traitement et la culture cellulaire des virus ne doivent être effectués que par un personnel formé à de telles procédures. Veiller à ne pas produire d'aérosols pendant le prélèvement et la manipulation des échantillons.

En ce qui concerne les recommandations relatives à la manipulation des échantillons, se reporter aux indications générales approuvées par le CLSI.²⁰

Prélèvement Des Échantillons²¹

Aspire et lave contenant des sécrétions de l'épithélium du nasopharynx fournir les meilleurs spécimens pour les essais spécimen directe car ils contiennent un grand nombre de cellules épithéliales.

Aspiration peuvent être recueillies à l'aide d'un stérile, polyéthylène souple # 8 tube d'alimentation infantile attaché à une trappe d'aspiration jetable relié à un dispositif d'aspiration. Lavages peuvent être collectées en instillant et d'aspiration 1 mL- à 2 mL de sérum physiologique dans la narine du patient lorsque le patient est en décubitus dorsal.

Aspirations et les lavages doivent être dilués avec des volumes égaux de milieu de transport contenue dans un tube à centrifuger avec plusieurs billes de verre stériles. Prélèvements de nez, de la gorge et du rhinopharynx zones souvent ne contiennent pas un nombre suffisant de cellules épithéliales cylindriques pour permettre la détection directe spécimen de virus respiratoires.

Transport et Conservation des Echantillons

Tous les agents potentiellement infectieux doivent être transportés conformément à la réglementation de l'Association du transport aérien international (IATA), de l'Organisation de l'aviation civile internationale, (ICAO), aux Titres 42 et 49 de l'US Code of Federal Regulations, ou aux autres exigences réglementaires en vigueur.

Les échantillons doivent être transportés au laboratoire entre 2°C et 8°C. Cette température peut être atteinte en utilisant des compresses froides, de la glace humide, mousse, fluide frigorigène ou réfrigérants autres.²² Les échantillons doivent être traités et testés dès que possible et ensuite stocké entre 2°C et 8°C.

Les échantillons doivent être conservés à 2°C à 8°C pendant une durée pas plus de 2 jours avant le test. Si une conservation plus longue est nécessaire, les échantillons doivent être congelés à -70°C ou moins.

Les cycles de congélation-décongélation des échantillons doivent être évités car cela entraîne une perte de viabilité des virus et une diminution de la sensibilité du test.

PROCÉDURE

Commentaires Préliminaires et Précautions

- Se conformer aux volumes et aux temps indiqués dans la présente notice pour s'assurer de l'exactitude des résultats.
- Les écouvillons reçus en milieu de transport avec billes de verre doivent être vigoureusement vortexés pendant environ 15 secondes pour permettre de dissocier les cellules adhérentes. Les écouvillons d'échantillons non reçus dans des milieux de transport viral doivent être transférés dans un milieu de transport viral contenant des billes de verre et être vortex vigoureusement pendant environ 15 secondes pour dissocier les cellules adhérentes.
- Lors des étapes de coloration et d'observation de la fluorescence au microscope, il est très important d'inclure des contrôles positifs et négatifs pour contrôler la procédure suivie et les performances des réactifs. Il est recommandé d'intégrer ces contrôles lors de chaque série des échantillons de patients.
- Placer la chambre humide fermée pour la tenue de lames pendant la coloration dans l'incubateur pour la porter à 35°C-37°C avant l'étape de coloration. Ainsi, les lames et les réactifs seront portés plus rapidement à température, avec pour effet d'obtenir une coloration intense plus rapidement.
- Amener les réactifs DFA à température ambiante (20°C à 25°C) avant utilisation, et retourner immédiatement au réfrigérateur après son utilisation pour le stockage à 2°C à 8°C.

Tests Sur Culture Cellulaire

- Les bonnes pratiques de laboratoire imposent d'effectuer des contrôles viraux positifs et négatifs à chaque nouveau lot de cellules pour pouvoir confirmer leur performance dans la culture de virus spécifiques.
- C'est la bonne pratique pour retenir le milieu enlevé des monocouches jusqu'après les résultats de coloration a été obtenu. En cas de doute sur les résultats de l'échantillon, le milieu peut être passé à une autre monocouche cellulaire pour l'essai répété.
- Lorsque les cultures cellulaires sont réalisées dans des plaques multi-puits en polystyrène, l'acétone doit être dilué à 80 % avec d'eau déminéralisée, en ajoutant 20 mL d'eau déminéralisée à 80 mL d'acétone (Section PRODUITS NECESSAIRES MASIS NON FOURNIS, REMARQUE 2).
- Ne pas laisser les couches monocellulaires sécher avant la fixation; cela peut provoquer un bruit de fond important et une diminution de la sensibilité.
- Ne pas laisser les DFA Reagents sécher sur les monocouches ce qui peut occasionner un bruit de fond important.

Microscopie D'immunofluorescence

- Examiner les contrôles positifs et négatifs avant l'examen des échantillons. Si un des contrôles ne présente pas les résultats attendus, passer en revue les étapes et les conditions dans lesquelles le test a été effectué afin d'en déterminer la ou les causes. Ne pas communiquer les résultats des échantillons avant que les contrôles n'aient été validés.
- Trois aspects du microscope à fluorescence doivent impérativement fonctionner de façon optimale pour obtenir une luminosité maximale de la fluorescence:
 - ▶ La source de lumière d'activation a une vie définie. Son rendement décroît avec le temps, aboutissant à une diminution de l'intensité de fluorescence des réactifs DFA.
 - ▶ La source de lumière est concentrée par de nombreuses lentilles et miroir(s). Pour obtenir une intensité maximale, ceux-ci doivent être correctement alignés.
 - ▶ Les filtres utilisés dans le trajet de la lumière doivent être appropriés à la fluorescence spécifique, dans ce cas, la fluorescéine.
- Les artéfacts fluorescents peuvent être observés dans les couches monocellulaires examinées:
 - ▶ Les débris cellulaires, etc... peuvent absorber les réactifs DFA de manière non spécifique et engendrer une fluorescence extrêmement intense. Ces débris peuvent être identifiés par leur morphologie; ils

n'ont pas l'apparence d'une cellule complète et, de manière générale, ils n'apparaissent pas sur le même plan que la couche monocellulaire.

- ▶ Une fluorescence jaune-vert de faible intensité est parfois observée, en particulier dans les zones où les cellules sont empilées ou à proximité de trous dans la couche monocellulaire. Dans les deux cas, la diffusion de DFA Reagent piégés est retardée pendant l'étape de lavage, générant une fluorescence non spécifique.
 - ▶ Une fluorescence intense à la périphérie des puits indique un séchage du DFA Reagent pendant l'incubation, suggérant que le temps d'incubation est trop long ou que l'humidité n'a pas été contrôlée.
 - ▶ Un lavage insuffisant peut entraîner une fluorescence de faible intensité, liée à la présence de réactif DFA résiduel sur la couche monocellulaire.
 - ▶ La fluorescence non spécifique provoquée par l'adsorption de la DFA Reagent pris au piège par élimination mauvaise de mucus à partir d'échantillons direct.
 - ▶ Sur échantillons directs, la fluorescence peut être piégée par les leucocytes et les monocytes. De même, la présence d'hématies dans l'échantillon peut laisser un voile vert sur l'échantillon.
- Protégez les lames colorées et des monocouches de la lumière autant que possible pendant les tests.
- ▶ Le décoloration ou une perte d'intensité de la fluorescence des cellules colorées peut survenir en cas d'exposition à la lumière, en particulier à une lumière de forte intensité.
 - ▶ Ce décoloration peut survenir lorsqu'une cellule colorée est visualisée dans un microscope à fluorescence pendant une période de temps trop longue.

Préparation Des Echantillons²¹

En ce qui concerne les recommandations relatives à la manipulation des échantillons, se reporter aux indications générales approuvées par le CLSI.²⁰

1. Vortexer l'échantillon vigoureusement pendant 10 à 15 secondes.
2. Centrifuger entre 400 et 600xg pendant 5 à 10 minutes.
3. Prélever le surnageant et le mettre de côté en vue d'un isolement viral (l'étape 4 ci-dessous.)
4. Ajouter 5 mL de PBS et vortexer vigoureusement pendant 10 à 15 secondes.
5. Centrifuger entre 400 et 600xg pendant 5 à 10 minutes.
6. Retirer le surnageant et la couche de mucus au-dessus du culot cellulaire en veillant à ne pas toucher au culot.
7. Renouveler les étapes 4 à 6 jusqu'à ce que la couche de mucus soit complètement éliminée.

REMARQUE: Il est important de retirer la totalité du mucus car il peut générer une fluorescence non spécifique.

8. Ajouter 0,5 mL à 1 mL de PBS.
9. Mélanger la suspension en pipetant de haut en bas pour ré-suspendre le culot cellulaire et former une suspension qui est légèrement trouble. Cette suspension cellulaire servira à tester les échantillons directs (Section VI ci-dessous).

REMARQUE: La qualité de la préparation dépend de la concentration de cellules présentes dans la suspension; un nombre excessif de cellule peut rendre difficile la lecture tandis qu'un manque de cellules diminue la sensibilité du test. Les échantillons peuvent également être centrifugés si l'utilisateur préfère obtenir une couche monocellulaire.

10. En cas d'isolement du virus en culture cellulaire (Section PROCÉDURE), ajouter le surnageant réservé à l'étape VI ci-dessus dans la suspension cellulaire restant après le test direct de l'échantillon. Ajouter quelques billes de verre stériles dans le tube et agiter pendant 15 secondes environ pour rompre les cellules et libérer les virus. Répéter cette étape pour chaque échantillon.

Immunofluorescence Directe

1. Déposer 25 µL de la suspension cellulaire²³ sur deux puits d'une lame à 2 puits et 8 puits d'une lame à 8 puits. Répéter cette étape pour chaque échantillon.
2. Laisser sécher complètement les puits à l'air libre.

3. Fixer les cellules sur les lames avec de l'acétone 100 %, frais et réfrigéré, pendant 5 à 10 minutes entre 20°C et 25°C.
Attention: L'acétone est volatile et inflammable; Se tenir à l'écart de toute flamme.
4. Retirer les lames du fixateur et laisser sécher à l'air libre.
5. Ajouter une goutte de DFA Screening Reagent pour recouvrir complètement les cellules séchées et fixées, sur un puits de chaque lame à 2 puits.
6. Ajouter également une goutte de DFA Screening Reagent sur chaque puits d'une Respiratory Virus Antigen Control Slide et d'une hMPV Antigen Control Slide. Une lame de contrôle d'antigènes ne doit être colorée qu'une seule fois car elle contient des puits individuels de cellules infectées et de cellules non infectées.
7. Ajouter une goutte de Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent pour recouvrir complètement les cellules séchées et fixées sur le deuxième puits des lames à 2 puits.
8. Incuber les lames entre 35°C et 37°C pendant 15 à 30 minutes en chambre humide fermée.
9. Rincer les cellules colorées avec la 1X Wash Solution Concentrate. Il est possible d'effectuer le rinçage à l'aide d'un bécher de 1X Wash Solution Concentrate (pour un petit nombre de lames uniquement). Pour rincer plusieurs lames, placer un porte-lame contenant entre 10 et 20 lames dans un récipient contenant une 1X Wash Solution Concentrate. Pour effectuer un rinçage efficace, plonger la ou les lames dans un mouvement de va et vient vertical au moins quatre fois.
10. Jeter la solution de lavage utilisée et renouveler l'étape de rinçage avec une nouvelle 1X Wash Solution Concentrate.
11. Rincer les cellules colorées avec de l'eau déminéralisée. Il est possible d'effectuer le rinçage à l'aide d'un bécher d'eau déminéralisée (pour quelques lames uniquement). Pour rincer plusieurs lames, placer un porte-lame contenant entre 10 et 20 lames dans un récipient avec de l'eau déminéralisée. Pour effectuer un rinçage efficace, tremper la ou les lames dans un mouvement de va et vient vertical au moins quatre fois.
12. Absorber doucement l'excès de l'eau déminéralisée.
13. Ajouter une petite goutte de Mounting Fluid dans chaque puits contenant des cellules puis déposer une lamelle sur les puits.
14. Examiner sous microscope à fluorescence les cellules montées et colorées en utilisant un objectif entre X200 et X400 (Section «*MICROSCOPIE D'IMMUNOFLUORESCENCE* »).
15. Se référer à la Section «*INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS* ».
16. Si le résultat est positif avec le mélange de virus respiratoires, la procédure de coloration peut être répétée à l'aide des lames d'échantillons à 8 puits réservées afin d'identifier le virus respiratoire présent.
 - ▶ Ajouter une goutte de réactif DFA de chaque virus dans le puits correspondant de la lame d'échantillons à 8 puits. Déposer le Metapneumovirus DFA Reagent dans le puits identifié « Nég ».
 - ▶ Déposer une goutte de réactif DFA de chaque virus dans le puits identifié correspondant de la Respiratory Virus Antigen Control Slide.
REMARQUE: Une lame de contrôle d'antigènes doit être colorée une seule fois. Ne pas réutiliser.
 - ▶ Déposer une goutte de Metapneumovirus DFA Reagent dans chaque puits de la hMPV Antigen Control Slide.
REMARQUE: Une lame de contrôle d'antigènes doit être colorée une seule fois. Ne pas réutiliser.
 - ▶ Poursuivre avec les étapes 8 à 15, décrites ci-dessus.

Culture Cellulaire en Tubes Roulants

1. Examiner les couches monocellulaires pour en vérifier la morphologie avant l'inoculation.
2. Aspirer le milieu d'entretien des monocouches et ajouter 0,2 à 0,4 mL de chaque échantillon préparé (Étape 4 ci-dessus) dans chaque lignée cellulaire utilisée pour cultiver les virus respiratoires.
3. Placer les tubes selon un angle permettant de recouvrir les couches monocellulaires d'inoculum et permettre l'adsorption du virus pendant 1 heure entre 35°C et 37°C.
4. Après adsorption, ajouter 2 mL de milieu de survie approprié.

5. Incuber les tubes entre 35°C et 37°C sur un tambour de 1 à 3 tr/min. Examiner quotidiennement les couches monocellulaires jusqu'à l'apparition d'un ECP, ou tester l'hémadsorption.
 6. Quand les couches monocellulaires sont prêtes, retirer le milieu par aspiration et rincer doucement deux fois les couches monocellulaires avec 1 à 2 mL de PBS.
 7. Ajouter 0,5 mL de PBS dans le tube, puis préparer une suspension cellulaire en grattant la couche monocellulaire à l'aide d'une pipette, puis en rompant les agrégats de cellules par flux et reflux successifs.
 8. Déposer 25 µL de la suspension dans chaque puits d'une lame à 2 puits et d'une lame à 8 puits. Répéter cette étape pour chaque échantillon.
 9. Laisser sécher complètement les puits à l'air libre.
 10. Fixer les cellules sur les lames avec de l'acétone 100 %, frais et réfrigéré, pendant 5 à 10 minutes, entre 20°C et 25°C.
Attention: L'acétone est volatile et inflammable; Se tenir à l'écart de toute flamme.
 11. Retirer les lames du fixateur et laisser sécher à l'air libre.
 12. Ajouter une goutte de DFA Screening Reagent pour recouvrir complètement les cellules séchées et fixées, sur un puits de chaque lame à 2 puits.
 13. Ajouter également une goutte de DFA Screening Reagent sur chaque puits d'une Respiratory Virus Antigen Control Slide. Une lame de contrôle d'antigènes ne doit être colorée qu'une seule fois car elle contient des puits individuels de cellules infectées et de cellules non infectées.
 14. Incuber les lames entre 35°C et 37°C pendant 15 à 30 minutes en chambre humide.
 15. Rincer les cellules colorées avec la 1X Wash Solution Concentrate. Il est possible d'effectuer le rinçage à l'aide d'un bécher de 1X Wash Solution Concentrate (pour un petit nombre de lames uniquement). Pour rincer plusieurs lames, placer un porte-lame contenant entre 10 et 20 lames dans un récipient contenant une 1X Wash Solution Concentrate. Pour effectuer un rinçage efficace, plonger la ou les lames dans un mouvement de va et vient vertical au moins quatre fois.
 16. Jeter la solution de lavage utilisée et renouveler l'étape de rinçage avec une nouvelle 1X Wash Solution Concentrate.
 17. Rincer les cellules colorées avec de l'eau déminéralisée. Il est possible d'effectuer le rinçage à l'aide d'un bécher d'eau déminéralisée (pour quelques lames uniquement). Pour rincer plusieurs lames, placer un porte-lame contenant entre 10 et 20 lames dans un récipient avec de l'eau déminéralisée. Pour effectuer un rinçage efficace, tremper la ou les lames dans un mouvement de va et vient vertical au moins quatre fois.
 18. Retirer l'eau déminéralisée par aspiration.
 19. Absorber doucement l'excès de liquide.
 20. Ajouter une petite goutte de Mounting Fluid dans chaque puits contenant des cellules puis déposer une lamelle sur les puits.
 21. Examiner sous microscope à fluorescence les cellules montées et colorées en utilisant un objectif entre X200 et X400 (Section « *MICROSCOPIE D'IMMUNOFLUORESCENCE* »).
 22. Consulter la Section « *INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS* ».
 23. Si le résultat est positif avec le mélange de virus respiratoires, la procédure de coloration peut être répétée à l'aide des lames d'échantillons à 8 puits réservées afin d'identifier le virus respiratoire présent.
 - ▶ Ajouter une goutte de réactif DFA de chaque virus dans le puits correspondant de la lame d'échantillons à 8 puits. Déposer le Metapneumovirus DFA Reagent dans le puits identifié « Nég ».
 - ▶ Déposer une goutte de réactif DFA de chaque virus dans le puits identifié correspondant de la Respiratory Virus Antigen Control Slide.
 - ▶ Déposer une goutte de Metapneumovirus DFA Reagent dans chaque puits de la hMPV Antigen Control Slide.
- REMARQUE:** Une lame de contrôle d'antigènes doit être colorée une seule fois. Ne pas réutiliser.
- ▶ Poursuivre avec les étapes 14 à 22, ci-dessus.

Culture Cellulaire En Shell-Vial

1. Calculer le nombre de shell-vials nécessaires (ce protocole de coloration requiert 3 shell-vials):
 - ▶ Un shell-vial est nécessaire pour chaque jour où la culture sera testée avec le DFA Screening Reagent (Par ex. 2 flacons sont nécessaires pour un test après 16 et 24 heures, puis un test entre 48 et 72 heures).
 - ▶ Un shell-vial supplémentaire est nécessaire pour préparer des lames à 8 puits qui seront utilisées pour l'identification lorsque le test de dépistage sera positif.
2. Examiner les monocouches pour en vérifier la morphologie avant l'inoculation.
3. Aspirer le milieu de conservation des monocouches et ajouter 1 mL de milieu de survie approprié dans chaque shell- vial.
4. Ajouter entre 0,2 mL et 0,4 mL d'échantillon dans chaque shell-vial.
5. Centrifuger les shell-vials à 700xg pendant 1 heure entre 20°C et 25°C.
6. Incuber les shells-vials fermés par un capuchon dans une étuve entre 35°C et 37°C.
7. Lorsqu'une couche monocellulaire est prête à être testée avec le DFA Screening Reagent, retirer le milieu par aspiration et ajouter 1 mL de PBS.
8. Remuer pour mélanger et puis aspirer.
9. Répéter ce rinçage avec un 1 mL supplémentaire de PBS puis aspirer.
10. Ajouter 1 mL d'acétone frais et réfrigéré à 100 % et laisser agir pendant 5 à 10 minutes, entre 20°C et 25°C.
Attention: L'acétone est volatile et inflammable; Se tenir à l'écart de toute flamme.
11. Retirer le fixateur par aspiration.
12. Ajouter 0,5 mL de PBS pour humidifier la monocouche.
13. Remuer puis aspirer la totalité.
14. Ajouter 4 gouttes de DFA Screening Reagent sur les couches monocellulaires fixées des échantillons de patients et les contrôles puis **incliner pour les recouvrir intégralement** de réactif.
15. Incuber pendant 15 à 30 minutes les shells-vials fermés par un capuchon dans une étuve entre 35°C et 37°C.
16. Aspirer le DFA Screening Reagent des monocouches.
17. Ajouter 1 mL de 1X Wash Solution.
18. Aspirer la 1X Wash Solution Concentrate; renouveler l'étape de lavage puis aspirer à nouveau.
19. Ajouter 1,0 mL d'eau déminéralisée.
20. Aspirer l'eau déminéralisée.
21. Soulever la lamelle du fond du shell-vial à l'aide d'une aiguille à extrémité courbe placée sur un corps de seringue et, en le tenant à l'aide de pincettes à extrémité fine, le transférer, côté couche monocellulaire orientée vers le bas, sur une petite goutte de Mounting Fluid déposée sur une lame de microscope standard.
22. Examiner sous microscope à fluorescence les cellules colorées en utilisant un objectif entre X200 et X400 (Section « Microscopie d'immunofluorescence »).
23. Consulter la Section « Interprétation des résultats ».
24. Si le résultat est positif pour le mélange de virus respiratoires, utiliser un duplicat de culture réservé en suspension cellulaire et déposer sur une lame échantillons à 8 puits afin d'identifier le virus respiratoire présent (référer à la Section relatives à la préparation d'une lame d'échantillon), puis:
 - ▶ Ajouter une goutte de réactif DFA de chaque virus dans le puits correspondant de la lame d'échantillons à 8 puits. Déposer le Metapneumovirus DFA Reagent dans le puits identifié « Nég ».
 - ▶ Déposer une goutte de réactif DFA de chaque virus dans le puits identifié correspondant de la Respiratory Virus Antigen Control Slide.
REMARQUE: Une lame de contrôle d'antigènes doit être colorée une seule fois. Ne pas réutiliser.
 - ▶ Déposer une goutte de Metapneumovirus DFA Reagent dans chaque puits de la hMPV Antigen Control Slide.
REMARQUE: Une lame de contrôle d'antigènes doit être colorée une seule fois. Ne pas réutiliser.
 - ▶ Poursuivre avec les étapes 14 à 23 de la Section « CULTURE CELLULAIRE EN TUBES ROULANTS ».

Culture Cellulaire Sur Plaque Multipuits

1. Calculer le nombre de puits nécessaires (ce protocole de coloration requiert 3 puits):
 - ▶ Un puits est nécessaire pour chaque jour où la culture sera testée avec le DFA Screening Reagent (Par ex. 2 puits sont nécessaires pour un test après 16 et 24 heures, puis un test entre 48 et 72 heures).
 - ▶ Un puits supplémentaire est nécessaire pour préparer des lames à 8 puits qui seront utilisées pour l'identification lorsque le test de dépistage sera positif.
 - ▶ Il est recommandé de placer les dupliqués sur des lames multipuits différentes ce qui permettra de tester indépendamment chaque lame le jour voulu.
2. Examiner les couches monocellulaires pour en vérifier la morphologie avant l'inoculation.
3. Aspirer le milieu de conservation des monocouches et ajouter 1 mL de milieu de survie approprié à chaque monocouche d'une plaque à multipuits de 24 puits; ajouter 0,8 mL à chaque monocouche dans le cas d'utilisation de plaque à 48 puits.
4. Ajouter 0,2 mL à 0,4 mL d'échantillon dans le puits appropriés d'une plaque multipuits.
5. Centrifuger les plaques à 700xg pendant 1 heure entre 20°C et 25°C.
6. Incuber les plaques couvertes entre 35°C et 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO₂.
7. Lorsqu'une couche monocellulaire est prête à être testée avec le DFA Screening Reagent, retirer le milieu par aspiration et ajouter 1 mL de PBS.
8. Remuer pour mélanger, puis aspirer.
9. Répéter ce rinçage avec un 1 mL supplémentaire de PBS puis aspirer.
10. Ajouter 1 mL d'acétone aqueuse à 80 % et laisser agir pendant 5 à 10 minutes.
REMARQUE: Ne pas laisser l'acétone à 80 % dans le puits de polystyrène pendant plus de 10 minutes car il peut précipiter et obscurcir le plastique et rendre difficile l'examen des couches monocellulaires.
Attention: L'acétone est volatile et inflammable; Se tenir à l'écart de toute flamme.
11. Retirer le fixateur par aspiration
12. Ajouter 0,5 mL de PBS pour humidifier la monocouche.
13. Remuer puis aspirer la totalité.
14. Ajouter 4 gouttes de DFA Screening Reagent sur chaque couche monocellulaire fixée des échantillons de patients et des contrôles dans les plaque à 24 puits; ajouter 3 gouttes de DFA Screening Reagent sur chaque couche monocellulaire fixées des échantillons de patients et des contrôles dans les plaque à 48 puits. Incliner pour **recouvrir complètement** la couche monocellulaire par le Réactif.
15. Incuber la plaque multipuits couverte pendant 15 à 30 minutes en atmosphère humide entre 35°C et 37°C.
16. Aspirer le DFA Screening Reagent des monocouches.
17. Ajouter 1 mL de la 1X Wash Solution Concentrate de lavage.
18. Aspirer la 1X Wash Solution Concentrate par aspiration; renouveler l'étape de lavage puis aspirer à nouveau.
19. Ajouter 1,0 mL d'eau déminéralisée.
20. Aspirer l'eau déminéralisée.
21. Ajouter 2 à 3 gouttes du Mounting Fluid sur chaque couche monocellulaire, puis couvrir la plaque.
22. Examiner les monocouches colorées en utilisant un objectif entre X200 et X400 (Section « *MICROSCOPIE D'IMMUNOFLUORESCENCE* »).
23. Consulter la Section « *INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS* ».
24. Si le résultat est positif pour le mélange de virus respiratoires, utiliser un dupliqué de culture réservée en suspension cellulaire et déposer sur une lame échantillons à 8 puits afin d'identifier le virus respiratoire présent. (référer à la Section relatives à la procédure de préparation d'une lame d'échantillon), puis:
 - ▶ Ajouter une goutte de réactif DFA de chaque virus dans le puits correspondant de la lame échantillons à 8 puits. Déposer le Metapneumovirus DFA Reagent dans le puits identifié « Nég ».
 - ▶ Déposer une goutte de réactif DFA de chaque virus dans le puits identifié correspondant de la Respiratory Virus Antigen Control Slide.

- ▶ Déposer une goutte de réactif Metapneumovirus DFA Reagent dans chaque puits de la hMPV Antigen Control Slide.
- ▶ **REMARQUE:** Une lame de contrôle d'antigènes doit être colorée une seule fois. Ne pas réutiliser.
- ▶ Poursuivre avec les étapes 14 à 21 de la Section « *CULTURE CELLULAIRE EN TUBES ROULANTS* ».

CONTROLE QUALITE

Reactifs

- Une Respiratory Virus Antigen Control Slide neuve ainsi qu'une hMPV Antigen Control Slide neuve devrait être utilisées dans chaque série pour valider celle-ci.
- Les puits positifs présenteront de nombreuses cellules infectées à fluorescence brillante vert-pomme, alors que les cellules négatives apparaîtront rouge-sombre en raison de la contre-coloration au Bleu Evans.
- Le puits négatif ne présentera que des cellules négatives en rouge sombre.
- Les contrôles positifs et négatifs doivent présenter la fluorescence attendue pour que les résultats des échantillons soient validés. Les lames de contrôle d'antigène peuvent également faciliter l'interprétation des échantillons du patient.
- L'utilisation de Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent en méthode d'immunofluorescence directe permet d'exclure les rares cas où des cellules présentes fixent non spécifiquement le fragment F_c de la gamma globuline de souris, pouvant entraîner un résultat faussement positif.

Culture Cellulaire

- Des contrôles viraux positifs et négatifs devraient être inclus pour tout nouveau lot de cellules pour confirmer leurs performances.
- Des monocouches inoculées de contrôle devraient être incluses à chaque nouveau lot de cellules pour contrôler la sensibilité.
- Une monocouche non inoculée devrait être testée comme contrôle négatif. Ce contrôle négatif révélerait également de mauvaises conditions de conservation ou de manipulation.
- Les résultats doivent être considérés comme invalides si les contrôles de culture ne se comportent pas correctement.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Examen des Echantillons et Contrôles

- Il est recommandé d'examiner les contrôles avant les échantillons afin de s'assurer de la performance correcte du test.
- Une réaction positive apparaît sous forme de fluorescence brillante vert-pomme dans les cellules infectées.
- Les cellules non infectées présenteront une coloration rouge sombre due à la contre-coloration au Bleu Evans inclus dans le Réactif DFA.
- Examiner la totalité du dépôt cellulaire ou de la monocouche avant de rapporter les résultats finaux.
- Ne pas rendre de résultat d'échantillon de patients si les contrôles ne se comportent pas correctement.

Artéfacts de Coloration

- Les bordures séchées de la monocouche ou des amas cellulaires peuvent générer une fluorescence non spécifique due au piégeage de l'anticorps.
- En raison de la toxicité de l'échantillon ou d'un mauvais stockage des cellules, des cellules mortes arrondies peuvent présenter une coloration verte olive.
- Des étapes de correctement réalisées et un contrôle de l'humidité contribuent à prévenir une coloration non spécifique.

Types de Fluorescence de Cellules Infectées par des Virus Respiratoires

Les descriptions de modèles types de fluorescence présentées ci-dessous peuvent servir de guide pour identifier des virus spécifiques. Noter que ces identifications requièrent d'obtenir ces types de fluorescence caractéristiques en utilisant des anticorps monoclonaux.

Le « typique » vert pomme motif de coloration par fluorescence pour chaque virus est la suivante:

- **Influenza A et B:** La fluorescence est cytoplasmique, nucléaire ou les deux à la fois. La coloration cytoplasmique est souvent ponctuée avec de grandes inclusions, tandis que la coloration nucléaire est uniformément brillante.
- **Virus respiratoire syncytial:** La fluorescence est cytoplasmique et ponctuée avec de petites inclusions dans le syncytium.
- **Adénovirus:** La fluorescence est cytoplasmique et ponctuée, nucléaire brillante ou les deux à la fois.
- **Parainfluenzavirus types 1, 2, 3:** La fluorescence est cytoplasmique et ponctuée, avec des inclusions irrégulière. Les types 2 et 3 entraînent la formation de syncytium.
- **Métapneumovirus:** La fluorescence est cytoplasmique et ponctuée, avec de petites inclusions dans le syncytium.

Des co-infections avec plusieurs virus présents dans l'échantillon a été rapportées dans de nombreuses études. La présence de multiple virus est signalée par la présence de fluorescence dans plusieurs puits de la lame à 8 puits. L'identification des virus repose sur l'apparition de fluorescence avec l'utilisation des réactifs DFA spécifiques. Dans ce cas, le résultat doit être rendu ainsi: « ... et ... détectés par immunofluorescence directe. » ou « ... et ... isolés par culture cellulaire. »

Résultats de tests en immunofluorescence directe

Evaluation de la Qualité de l'échantillon

- Chaque échantillon de patient coloré doit être contrôlé pour la présence de cellules épithéliales. La qualité de l'échantillon en ce qui concerne le nombre de cellules épithéliales peut être évaluée en examinant plusieurs champs à avec un objectif 200X.
- Un échantillon satisfaisant doit comporter au moins 2 cellules épithéliales par champ. Un résultat négatif est indiqué par l'absence de fluorescence dans un échantillonnage minimum de 20 cellules épithéliales.
- Un échantillon qui comporte une quantité inférieure à 20 cellules épithéliales est inadéquat; dans ce cas, le test est considéré comme ininterprétable. Un nouvel échantillon doit être prélevé et testé, ou une culture cellulaire doit être mise en œuvre à partir du reliquat de l'échantillon.

Rendu des résultats de tests en immunofluorescence directe

- La présence de cellules infectées à fluorescence vert-pomme doit être recherchée sur la totalité du dépôt cellulaire ou de la monocouche.
- Un échantillon satisfaisant dans lequel aucune cellule fluorescente n'est observée doit être rendu ainsi: « Absence d'influenza A, d'influenza B, de virus respiratoire syncytial, de métapneumovirus, d'adénovirus, de parainfluenza 1, 2 ou 3 détecté en immunofluorescence directe. ». Cependant, ces résultats négatifs devraient être confirmés par culture cellulaire.
- Les résultats des échantillons négatifs en immunofluorescence directe, mais dont la culture cellulaire est positive doivent être rendus ainsi: « ...isolé par culture cellulaire », où « ... » désigne le virus en question (par ex. influenza A, influenza B, virus respiratoire syncytial, métapneumovirus, adénovirus, parainfluenza 1, 2 ou 3) (Section « Résultats de l'isolement par culture / confirmation », ci-dessous).
- Si des cellules à fluorescence vert-pomme sont détectées, identifier le (ou les) virus avec les réactifs DFA individuels spécifiques de chaque virus (conformément à la Section PROCÉDURE). Le réactif DFA spécifique qui produira des cellules fluorescentes permettra d'identifier le virus respiratoire concerné. Le résultat sera alors rendu ainsi: « ... détecté en immunofluorescence directe » où « ... » désigne le virus en

question (par ex. influenza A, influenza B, métapneumovirus, adénovirus, virus respiratoire syncytial, parainfluenza 1, 2 ou 3).

RÉSULTATS DE L'ISOLEMENT PAR CULTURE / CONFIRMATION

- La totalité du dépôt cellulaire ou de la monocouche cellulaire doivent être examinés pour rechercher la présence de cellules infectées à fluorescence vert-pomme. Si aucune cellule fluorescente n'est détectée, les résultats doivent être rendus ainsi: « Absence d'influenza A, d'influenza B, de virus respiratoire syncytial, métapneumovirus, d'adénovirus, de parainfluenza 1, 2 ou 3 isolés par culture cellulaire ».
- Si des cellules à fluorescence vert-pomme sont détectées, identifier le (ou les) virus avec les réactifs DFA individuels spécifiques de chaque virus (conformément à la Section PROCÉDURE). Le réactif DFA spécifique qui produira des cellules fluorescentes permettra d'identifier le virus respiratoire concerné. Le résultat sera alors rendu ainsi: « ... isolé par culture cellulaire » où « ... » désigne le virus en question (par ex. influenza A, influenza B, métapneumovirus, adénovirus, virus respiratoire syncytial, parainfluenza 1, 2 ou 3).

LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Un prélèvement, un stockage et un transport incorrects des échantillons peuvent entraîner de faux résultats négatifs²⁴ de cultures.
- Les caractéristiques de performances du test en immunofluorescence directe n'ont pas été établies sur d'autres échantillons que les échantillons respiratoires. Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'établir des performances pour les échantillons autres que les échantillons respiratoires.
- Des incubations à durées ou températures autres que celles citées dans les instructions de cette notice technique peuvent produire des résultats erronés.
- La détection de virus varie considérablement selon la qualité de l'échantillon et les manipulations auxquelles il est soumis. Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'infection virale. Les résultats du test doivent être interprétés conjointement avec les informations disponibles des études épidémiologiques, la clinique du patient et d'autres méthodes de diagnostic.
- Les effets de thérapies antivirales sur la performance de ce kit n'ont pas été établis.
- Les anticorps monoclonaux utilisés dans ce kit proviennent d'hybridômes créés en utilisant des cellules infectées comme immunogène. Les antigènes viraux spécifiquement détectés par les anticorps ne sont pas déterminés.
- Dans la mesure où les anticorps monoclonaux ont été préparés en utilisant des souches définies de virus, ils peuvent ne pas identifier tous les variants antigéniques ou de nouvelles souches virales. Les anticorps monoclonaux peuvent ne pas détecter des souches virales avec des changements mineurs d'acides aminés dans la région de l'épitope cible.
- Les anticorps monoclonaux utilisés dans ce kit ne sont pas spécifiques de groupe et ne permettent donc pas de différencier les différents types d'adénovirus et de VRS.
- Les antigènes viraux détectés dans certains échantillons en immunofluorescence directe peuvent provenir de virus non viables et non cultivables. Cela s'applique notamment au VRS, connu pour son instabilité et sa perte de viabilité.
- Un échantillon négatif en immunofluorescence **directe** doit être inoculé dans une culture de cellules appropriée, puis incubé pour isoler et identifier tout virus respiratoire pouvant être présent dans l'échantillon.
- Un résultat négatif en immunofluorescence directe ou après culture n'exclut pas la présence de virus.
- La performance du kit ne peut être garantie qu'avec l'utilisation des réactifs fournis par QUIDEL.
- Une conservation prolongée du réactif DFA sous une lumière forte va diminuer l'intensité de la coloration.
- Un léger bruit de fond peut apparaître avec les échantillons contaminés par des souches de *Staphylococcus aureus* qui contiennent des quantités importantes de protéine A. La protéine A va se fixer aux segments Fc des anticorps conjugués. Cette fixation peut se distinguer de la fixation à l'antigène viral sur la base de la morphologie, la fluorescence liée au *S. aureus* apparaissant sous la forme de petits points brillants (~ 1

micron de diamètre). Les résultats de cultures cellulaires présentant une contamination bactérienne doivent donc être interprétés avec prudence.

VALEURS ATTENDUES

Les infections à virus respiratoire sont souvent saisonnières; le virus de l'influenza est généralement présent de novembre à avril dans l'hémisphère Nord et les infections à adénovirus se produisent le plus souvent à la fin de l'hiver et au début de l'été. Le VRS est lui aussi généralement une infection saisonnière (hiver et début du printemps); les épidémies à VRS peuvent durer jusqu'à 5 mois, tandis que les virus parainfluenza peuvent se déclarer tout au long de l'année.

Les études cliniques présentées dans la Section (Caractéristiques de performances spécifiques) comprenaient des échantillons respiratoires prélevés pendant l'hiver et au début du printemps 2007/2008. La prévalence des virus respiratoires au sein de la population d'échantillons, recueillis prospectivement et testés frais, est indiquée dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2: Prévalence des virus respiratoires dans la population étudiée

Valeurs attendues	Adéno	Flu A	Flu B	Para 1	Para 2	Para 3	VRS	MPV
Échantillons direct (n = 516)	23	71	5	4	1	4	74	12
Prévalence	4.5%	13.8%	1.0%	0.8%	0.2%	0.8%	14.3%	2.3%

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES SPÉCIFIQUES

Caractéristiques de Performances Cliniques

Site d'Étude 1

L'étude comprenait un total de 300 échantillons frais, soumis de janvier à février 2007 au laboratoire afin qu'il réalise des tests de virus respiratoires. Les lames ont été préparées à partir de cellules lavées par PBS et issues d'échantillons frais, puis fixées conformément à la procédure de la notice du produit comparateur (même procédure pour les dispositifs sujet et comparateur).

Les lames ont été conservées à -70 °C jusqu'à ce que le test soit réalisé. La préparation de lames échantillons, la fixation dans l'acétone, et congélation est une pratique courante de laboratoire afin de tester lot à une date ultérieure. Le tableau 3 montre la répartition par âge des individus à étudié à Site d'Étude 1.

Tableau 3. Site d'Étude 1 – Répartition Selon l'âge

Selon l'âge	Répartition
0 - 1 mois	7
1 mois - 2 ans	130
2 - 12 ans	49
12 - 21 ans	16
22 - 30 ans	13
31 - 40 ans	13
41 - 50 ans	20
51 - 60 ans	11
61 - 70 ans	8
71 - 80 ans	9
81 - 90 ans	19
91 - 100 ans	4
Âge inconnu	1
Total	300

Les tableaux suivants indiquent les résultats de Site d'Étude 1:

Le tableau 4 compare les résultats de la D³ Ultra 8 Screening Reagent (D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening Reagent) avec celles du D³ Ultra Screening Reagent (D³ Ultra DFA Respiratory Virus Screening Reagent) pour détecter les sept virus respiratoires identifiés par le D³ Ultra Screening Reagent dans les cellules provenant d'un échantillon.

Le tableau 5 compare le D³ Ultra 8 Screening Reagent avec ceux du D³ Metapneumovirus DFA Reagent pour détecter métapneumovirus dans des cellules dérivées à partir d'un échantillon.

Tableau 4. Site d'Étude 1 - Comparaison des D³ Ultra 8 et D³ Ultra Pour Détecter Tous les Virus Respiratoires Sept

Échantillons direct (300 Échantillons)		D ³ Metapneumovirus DFA Reagent	
		Pos	Nég
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	101	0
	Nég	0	199
Pourcentage de concordance de positifs (PPA) ^a		100% (101/101)	
IC de 95 %- PPA ^b		96.3, 100%	
Pourcentage de concordance de négatifs (NPA) ^c		100% (199/199)	
IC de 95 % - NPA		98.1, 100%	

- a Les valeurs de « pourcentage de concordance de positifs », ou « PPA », ont été calculées de la manière suivante : $\frac{\text{[(nombre total de résultats positifs concordants pour les tests sujets et prédictifs)]}}{\text{[(nombre total de résultats positifs concordants pour les tests sujets et prédictifs)] + \text{[(nombre de résultats positifs pour le test prédictif mais négatif pour le test sujet)]}}$ multiplié par 100 %.
- b IC de 95 % » fait référence à un intervalle de confiance de 95 %, calculé selon la méthode Exacte (Clopper, C. and S. Pearson, *Biometrika* 26:404-413, 1934).
- c Les valeurs de « pourcentage de concordance de négatifs », ou « NPA », ont été calculées de la manière suivante : $\frac{\text{[(nombre total de résultats négatifs concordants pour les tests sujet et prédictif)]}}{\text{[(nombre total de résultats négatifs concordants pour les tests sujet et prédictif)] + \text{[(nombre de résultats négatifs pour le test prédictif mais positif pour le test sujet)]}}$ multiplié par 100 %.

Tableau 5. Site d'Étude 1 - D³ Ultra 8 Identification du Métapneumovirus Échantillons Positifs

Échantillons direct (300 Échantillons)		D ³ Metapneumovirus DFA Reagent	
		Pos	Nég
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	5	0
	Nég	0	295
Pourcentage de concordance de positifs (PPA)		100% (5/5)	
IC de 95 %- PPA		56.6, 100%	
Pourcentage de concordance de négatifs (NPA)		100% (295/295)	
IC de 95 % - NPA		97.1, 100%	

Site d'Étude 1 – Conclusion

Une variété de pathogènes respiratoires viraux ont été détectés: virus respiratoire syncytial [prévalence de 15% (45/300)], influenza A [prévalence de 9 % (27/300)], influenza B [prévalence de 0,3 % (1/300)],

métapneumovirus [prévalence de 1.7% (5/300)], adénovirus [prévalence de 7% (21/300)], parainfluenza 1 [prévalence de 1% (3/300)] and parainfluenza 3 [prévalence de 1.3 % (4/300)]. Pas de co-infections ont été détectées.

La capacité de D³ Ultra 8 à identifier sept virus dans les échantillons directe a été comparée à la capacité de la D³ Ultra. Le pourcentage de concordance de positifs était de 100 % (95 % CI gamme de 96,3 % à 100 %). Le pourcentage de concordance de négatifs était de 100 % (95 % CI gamme de 98,1 % à 100%). La capacité de D³ Ultra 8 à identifier métapneumovirus dans les échantillons directe a été comparée à la capacité du D³ Metapneumovirus DFA Reagent. Le pourcentage de concordance de positifs était de 100 % (95% CI gamme de 56,6 % à 100 %). Le pourcentage de concordance de négatifs était de 100 % (95 % CI gamme de 97,1 % à 100 %).

Pour Site d'Étude 1, les résultats de performance du D³ Ultra 8, par rapport à ceux des dispositifs de comparaison, D³ Ultra et D³ Metapneumovirus DFA Reagent, démontrer que les dispositifs de détecter les antigènes du virus respiratoires dans les échantillons directe dans les moeurs similaires, et que l'ajout des MAbs métapneumovirus ne nuisent pas au MAbs d'autres pour la détection des autres virus respiratoires trouvé (c.-influenza A, influenza B, virus respiratoire syncytial, adénovirus et parainfluenza types 1 et 3). Pas d'augmentation en arrière-plan a été observée avec le D³ Ultra 8.

Site d'Étude 2

Deux cent soixante-huit (268) échantillons ont été traités pour échantillon direct des tests effectués conformément à la procédure dans la notice du produit D³ Ultra (même procédure pour les dispositifs sujet et comparateur). Les premières quarante-huit échantillons n'ont pas été inclus dans l'analyse en raison d'un problème de traitement, les cellules ne sont pas suffisamment rincé et ne pas rester fixé sur la lame. Une étape de rinçage supplémentaire a été ajoutée à la procédure pour les 220 échantillons restants, les cellules restaient fixées sur les diapositives. Sur ces 220 exemplaires, 4 avait pas suffisamment de cellules (<20) présente, doit être interprété. Un total de 216 échantillons est resté pour l'analyse finale.

Deux cent soixante-huit (268) échantillons ont été traités pour culture cellulaire des tests effectués conformément à la procédure dans la notice du produit D³ Ultra (même procédure pour les dispositifs sujet et comparateur). Les échantillons ont été traités pour la culture cellulaire à l'aide de R-Mix Too FreshCells sur des plaques de culture de 24 de remplissage 48 puits. Treize (13) échantillons ont été toxiques et 1 a été contaminée en culture cellulaire. Un total de 252 échantillons est resté pour l'analyse finale.

Le tableau 6 indique la répartition par âge des individus a étudié à Site d'étude 2.

Tableau 6. Site d'Étude 2 – Répartition Selon l'âge

Selon l'âge	Répartition
0 - 1 mois	2
1 mois - 2 ans	78
2 - 12 ans	38
12 - 21 ans	35
22 - 30 ans	39
31 - 40 ans	19
41 - 50 ans	19
51 - 60 ans	11
61 - 70 ans	12
71 - 80 ans	7
81 - 90 ans	5
>90 ans	1
Âge inconnu	2
Total	268

Les tableaux suivants indiquent les échantillons directs essais résultats de Site d'étude 2:

Le tableau 7 compare les résultats de la D³ Ultra 8 Screening Reagent avec celles du D³ Ultra Screening Reagent pour détecter les sept virus respiratoires identifiés par le D³ Ultra Screening Reagent dans les cellules provenant d'un échantillon.

Le tableau 8 compare le D³ Ultra 8 Screening Reagent avec celles du D³ Metapneumovirus DFA Reagent pour détecter métapneumovirus dans des cellules dérivées à partir d'un échantillon.

Tableau 7. Site d'Étude 2 - Comparaison des D³ Ultra 8 et D³ Ultra Pour Détecter Tous les Virus Respiratoires Sept

Échantillons direct (216 Échantillons)		D ³ Ultra Screening Reagent	
		Pos	Nég
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	80	0
	Nég	0	136
Pourcentage de concordance de positifs (PPA)		100% (80/80)	
IC de 95 %- PPA		95.4, 100%	
Pourcentage de concordance de négatifs (NPA)		100% (136/136)	
IC de 95 % - NPA		97.3, 100%	
*R-PE et positifs FITC combinés			

Tableau 8. Site d'Étude 2 - D³ Ultra 8 Identification du Métapneumovirus Échantillons Positifs

Échantillons direct (216 Échantillons)		D ³ Metapneumovirus DFA Reagent	
		Pos	Nég
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	7	0
	Nég	0	209
Pourcentage de concordance de positifs (PPA)		100% (7/7)	
IC de 95 %- PPA		64.6, 100%	
Pourcentage de concordance de négatifs (NPA)		100% (209/209)	
IC de 95 % - NPA		98.2, 100%	

Site d'Étude 2 - Méthode Directe sur Échantillons – Conclusion

Une variété de pathogènes respiratoires viraux ont été détectés: virus respiratoire syncytial [prévalence de 13,4 % (29/216)], influenza A [prévalence de 20,4 % (44/216)], influenza B [prévalence de 1,9 % (4/216)], métapneumovirus [prévalence de 3,2 % (7/216)], adénovirus [prévalence de 0,9 % (2/216)], parainfluenza 1 [prévalence de 0,5 % (1/216)], parainfluenza 2 virus [prévalence de 0,5 % (1/216)]. Il y avait une co-infection d'influenza A + parainfluenza 1.

La capacité de D³Ultra 8 à identifier sept virus dans les échantillons directe a été comparée à la capacité de la D³ Ultra. Le pourcentage de concordance de positifs était de 100 % (95 % CI gamme de 95,4 % à 100 %). Le pourcentage de concordance de négatifs était de 100 % (95 % CI gamme de 97,3 % à 100 %). La capacité de D³ Ultra 8 à identifier métapneumovirus dans les échantillons directe a été comparée à la capacité du D³ Metapneumovirus DFA Reagent. Le pourcentage de concordance de positifs était de 100 % (95 % CI gamme de 64,6 % à 100 %). Le pourcentage de concordance de négatifs était de 100 % (95 % CI gamme de 98,2 % à 100 %).

Pour Site d'Étude 2, les résultats de performance du D³ Ultra 8, par rapport à ceux des dispositifs de comparaison, D³ Ultra et D³ Metapneumovirus DFA Reagent, démontrent que les dispositifs de détecter les antigènes du virus respiratoires dans les échantillons directe dans les mœurs similaires, et que l'ajout des MABs métagneumovirus ne nuisent pas au MABs d'autres pour la détection des autres virus respiratoires trouvé (c.-influenza A, influenza B, virus respiratoire syncytial, adénovirus et parainfluenza types 1 et 3). Pas d'augmentation en arrière-plan a été observée avec le D³ Ultra 8.

Les tableaux suivants détaillent les résultats de test sur culture de cellules pour le Site d'Étude 2: Le tableau 9 compare les résultats de la D³ Ultra 8 Screening Reagent avec celles du D³ Ultra Screening Reagent pour détecter les sept virus respiratoires identifiés par le D³ Ultra Screening Reagent dans des cellules dérivées de la culture.

Tableau 10 compare le D³ Ultra 8 Screening Reagent avec celles du D³ Metapneumovirus DFA Reagent pour détecter métagneumovirus dans des cellules dérivées d'une culture.

Tableau 9: Site d'Étude 2 – Comparaison des D³ Ultra 8 et D³ Ultra Pour Détecter Tous les Virus Respiratoires Sept

Culture cellulaire (252 échantillons)		D ³ Metapneumovirus DFA Reagent	
		Pos	Nég
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	119	0
	Nég	0	133
Pourcentage de concordance de positifs (PPA)		100% (119/119)	
IC de 95 %- PPA		96.9, 100%	
Pourcentage de concordance de négatifs (NPA)		100% (133/133)	
IC de 95 %- NPA		97.2, 100%	

Tableau 10: Site d'Étude 2 – D³ Ultra 8 Identification du Métagneumovirus Échantillons Positifs

Culture cellulaire (252 échantillons)		D ³ Metapneumovirus DFA Reagent	
		Pos	Nég
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	7	0
	Nég	0	245
Pourcentage de concordance de positifs (PPA)		100% (7/7)	
IC de 95 %- PPA		64.6, 100%	
Pourcentage de concordance de négatifs (NPA)		100% (245/245)	
IC de 95 %- NPA		98.5, 100%	

Site d'Étude 2 – Confirmation de la culture – Conclusion

Une variété de pathogènes respiratoires viraux ont été détectés: virus respiratoire syncytial [prévalence de 16,7 % (42/252)], influenza A [prévalence de 24,6 % (62/252)], influenza B [prévalence de 4 % (10/252)], métagneumovirus [prévalence de 2,8 % (7/252)], adénovirus [prévalence de 1,6 % (4/252)], et parainfluenza 2 [prévalence de 0,4 % (1/252)]. Il y avait deux co-infections comme suit: deux (2) influenza A + virus respiratoire syncytial.

La capacité de D³ Ultra 8 à identifier sept virus dans les cellules dérivées de la culture a été comparée à la capacité de la D³ Ultra. Le pourcentage de concordance de positifs était de 100 % (95 % CI gamme de 96,9 % à 100 %). Le pourcentage de concordance de négatifs était de 100 % (95 % CI gamme de 97,2 % à 100 %). La capacité de D³ Ultra 8 à identifier métapneumovirus dans les cellules dérivées de la culture a été comparée à la capacité du D³ Metapneumovirus DFA Reagent. Le pourcentage de concordance de positifs était de 100 % (95 % CI gamme de 64,6 % à 100 %). Pourcentage de concordance de négatifs était de 100 % (95 % CI gamme de 98,5 % à 100 %).

Pour Site d'Étude 2, les résultats de performance du D³ Ultra 8, par rapport à ceux des dispositifs de comparaison, D³ Ultra et D³ Metapneumovirus DFA Reagent, démontrer que les dispositifs de détecter les antigènes du virus respiratoires en culture dans les mœurs similaires, et que l'ajout des MAbs métapneumovirus ne nuisent pas au MAbs d'autres pour la détection des autres virus respiratoires trouvés (c.- influenza A, influenza B, virus respiratoire syncytial, adénovirus et parainfluenza types 1 et 3). Pas d'augmentation en arrière-plan a été observée avec le D³ Ultra 8.

Caractéristiques de Performance Analytiques

Test de réactivité croisée

Les DFA Reagents du D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening & Identification Kit de Diagnostic Hybrids, Inc. ont été testés en termes de réactivité croisée contre une grande variété de cellules et de microorganismes. Aucune réactivité croisée n'a été observée pour 21 types de cellules de cultures hôtes, ni pour 62 souches virales (mises en culture et révélées). Vingt-cinq (25) cultures bactériennes, une culture de levure, trios sp et une culture protozoaire ont été évalués en termes de réactivité croisée, y compris *Staphylococcus aureus*, une bactérie qui produit de la protéine A. La coloration de *S. aureus* est apparue sous la forme de petits points de fluorescence alors que toutes les autres cultures bactériennes étaient négatives. [Voir le tableau 11 concernant les résultats des études de réactivité croisée. Le tableau indique les réactivités des organismes en fonction des DFA Reagents.]

Pour les tests de réactivité croisée, des conditions d'utilisation rigoureuses ont été obtenues en utilisant une concentration élevée de DFA Reagents et des titres de micro-organismes élevés. Les DFA Reagents (anticorps monoclonaux marqués directement à la fluorescéine) ont été préparés à 1,5X de la concentration fournie dans le kit. Chacun des virus testés a été préparé en couches monocellulaires infectées (250 cellules infectées inoculées en culture en shell-vial et incubées pendant 24 à 48 heures, afin de produire une infection de 3+ à 4+), traitées et révélées avec les DFA Reagents 1.5X selon la procédure détaillée dans cette notice. Des souches bactériennes ont été cultivées, traitées comme des suspensions, puis placées sur des lames de microscope (production > 150 bactéries pour un champ de microscope 400X), puis révélées avec les DFA Reagents 1.5X selon la procédure détaillée dans cette notice. Les cultures cellulaires ont été révélées en monocouches confluentes.

Tableau 11. Résultats de réactivité croisée

Organisme	Souche ou type	D ³ Ultra 8 Respiratory Screening Reagent à 1,5 fois la Concentration	TCID ₅₀ /Source/ ou UFC
Lignée cellulaire	A549	-	monocouche
	BGMK	-	monocouche
	CV-1	-	dépôt de cellules
	HEp-2	-	monocouche
	Hs27 (HFF)	-	monocouche
	LLC-MK2	-	monocouche
	McCoy	-	monocouche

Organisme	Souche ou type	D ³ Ultra 8 Respiratory Screening Reagent à 1,5 fois la Concentration	TCID ₅₀ /Source/ ou UFC
Lignée cellulaire	MRC-5	-	monocouche
	MRHF	-	monocouche
	Mv1Lu	-	monocouche
	NCI-H292	-	dépôt de cellules
	pAGMK	-	dépôt de cellules
	pCMK	-	dépôt de cellules
	pRhMK	-	monocouche
	pRhMK II	-	monocouche
	pRK	-	dépôt de cellules
	RD	-	dépôt de cellules
	R-Mix™	-	monocouche
	R-Mix Too™	-	monocouche
	Vero	-	dépôt de cellules
	WI-38	-	monocouche
Adénovirus	Type 1	+	714 TCID ₅₀
	Type 3	+	714 TCID ₅₀
	Type 5	+	714 TCID ₅₀
	Type 6	+	714 TCID ₅₀
	Type 7	+	714 TCID ₅₀
	Type 10	+	714 TCID ₅₀
	Type 13	+	714 TCID ₅₀
	Type 14	+	714 TCID ₅₀
	Type 18	+	714 TCID ₅₀
	Type 31	+	714 TCID ₅₀
	Type 40	+	714 TCID ₅₀
	Type 41	+	714 TCID ₅₀
Influenza A	Mexico/4108/2009 (H1N1) de CDC*	+	714 TCID ₅₀
	California/07/2009 (H1N1) de CDC*	+	714 TCID ₅₀
	Aichi (H3N2)	+	714 TCID ₅₀
	Mal (H1N1)	+	714 TCID ₅₀
	Hong Kong (H3N2)	+	714 TCID ₅₀
	Denver (H1N1)	+	714 TCID ₅₀
	Port Chalmers (H3N2)	+	714 TCID ₅₀
	Victoria (H3N2)	+	714 TCID ₅₀
	New Jersey (HSWN1)	+	714 TCID ₅₀
	WS (H1N1)	+	714 TCID ₅₀
	PR (H1N1)	+	714 TCID ₅₀
Influenza B	Hong Kong	+	714 TCID ₅₀
	Maryland	+	714 TCID ₅₀
	Mass	+	714 TCID ₅₀
	GL	+	714 TCID ₅₀
	Taiwan	+	714 TCID ₅₀

Organisme	Souche ou type	D ³ Ultra 8 Respiratory Screening Reagent à 1,5 fois la Concentration	TCID ₅₀ /Source/ ou UFC
	Russia	+	714 TCID ₅₀
VRS	Long	+	714 TCID ₅₀
	Wash	+	714 TCID ₅₀
	9320	+	714 TCID ₅₀
Parainfluenza 1	C-35	+	714 TCID ₅₀
Parainfluenza 2	Greer	+	714 TCID ₅₀
Parainfluenza 3	C 243	+	714 TCID ₅₀
Parainfluenza 4a	M-25	-	714 TCID ₅₀
Parainfluenza 4b	CH19503	-	714 TCID ₅₀
Métagneumovirus	Subgroup A1	+	714 TCID ₅₀
	Subgroup A2	+	714 TCID ₅₀
	Subgroup B1	+	714 TCID ₅₀
	Subgroup B2	+	714 TCID ₅₀
Virus herpès simplex de type 1	1F	-	71 TCID ₅₀
	MacIntyre9	-	71 TCID ₅₀
Virus herpès simplex de type 2	MS	-	71 TCID ₅₀
	Strain G	-	71 TCID ₅₀
Cytomégalovirus	Towne	-	714 TCID ₅₀
	Davis	-	714 TCID ₅₀
	AD169	-	714 TCID ₅₀
Varicelle-zona	Webster	-	714 TCID ₅₀
	Ellen	-	714 TCID ₅₀
Echovirus	4	-	lame de contrôle
	6	-	lame de contrôle
	9	-	lame de contrôle
	11	-	lame de contrôle
	30	-	lame de contrôle
	34	-	lame de contrôle
Coxsackievirus	B1	-	lame de contrôle
	B2	-	lame de contrôle
	B3	-	lame de contrôle
	B4	-	lame de contrôle
	B5	-	lame de contrôle
	B6	-	lame de contrôle
Oreillons	Bion	-	lame de contrôle
Rubeola (rougeole)	Bion	-	lame de contrôle
Bactéries	<i>Acholeplasma laidlawi</i>	-	~1.0x10 ⁷ CFU
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	9.7x10 ⁵ CFU
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	1.8x10 ⁵ CFU
	<i>Bordetella pertussis</i>	-	4.7x10 ⁶ CFU
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	2.5x10 ⁶ CFU
	<i>Escherichia coli</i>	-	2.6x10 ⁵ CFU
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	5.0x10 ⁵ CFU

Organisme	Souche ou type	D ³ Ultra 8 Respiratory Screening Reagent à 1,5 fois la Concentration	TCID ₅₀ /Source/ ou UFC
Bactéries	<i>Haemophilis influenzae type A</i>	-	9.3x10 ⁵ CFU
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	6.4x10 ⁶ CFU
	<i>Legionella pneumophila</i>	-	6.5x10 ⁴ CFU
	<i>Moraxella cartarrhalis</i>	-	6.4x10 ⁴ CFU
	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	~1.0x10 ⁴ CFU
	<i>Mycoplasma orale</i>	-	~1.0x10 ⁴ CFU
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	~1.0x10 ⁴ CFU
	<i>Mycoplasma salivarium</i>	-	~1.0x10 ⁷ CFU
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	1.3x10 ⁶ CFU
	<i>Proteus mirabilis</i>	-	2.1x10 ⁶ CFU
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1.0x10 ⁷ CFU
	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	2.5x10 ⁶ CFU
	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	1.8x10 ⁶ CFU
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+d	1.0x10 ⁷ CFU
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	9.6x10 ⁶ CFU
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	8.0x10 ⁵ CFU
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	2.9x10 ⁷ CFU
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	~1.0x10 ⁴ CFU
	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	control slide lame de contrôle
	<i>Chlamydophila psittaci</i>	-	lame de contrôle
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	Lame de contrôle
	<i>Candida glabrata</i>	-	8.7x10 ⁶ CFU
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	Lame de contrôle
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+d	1.0x10 ⁷ CFU
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	9.6x10 ⁶ CFU	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	8.0x10 ⁵ CFU	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	2.9x10 ⁷ CFU	
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	~1.0x10 ⁴ CFU	
Chlamydia sp.	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	control slide lame de contrôle
	<i>Chlamydophila psittaci</i>	-	lame de contrôle
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	lame de contrôle
Levure	<i>Candida glabrata</i>	-	8.7x10 ⁶ CFU
Protozoaires	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	Lame de contrôle
<p>^dColoration des <i>S. aureus</i> apparaît comme de petits points de la fluorescence tandis que tous les autres cultures étaient négatives. Ce sera noté dans l'étiquetage dans la section «Limites du test»: La une protéine produite par la bactérie <i>Staphylococcus aureus</i>, liera la portion Fc de certains anticorps marqué à la fluoescéine monoclonal utilisé dans ce kit. Cette liaison peut être distinguée de l'antigène viral contraignant sur la base de la morphologie, à savoir, la fluorescence <i>S. aureus</i> lié apparaît comme faible (~ 1 microns de diamètre), des points lumineux. Les résultats des cultures de cellules à une contamination bactérienne doit donc être interprétées avec prudence.</p>			
<p>Bien que cet essai a été démontré pour détecter le virus H1N1 de la grippe 2009 dans deux isolats de culture, les caractéristiques de performance de ce dispositif avec les échantillons cliniques qui sont positifs pour le virus H1N1 de la influenza 2009 n'ont pas été établies. Le D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening & Identification Kit peut distinguer entre l'influenza A et l'influenza B, mais il ne peut pas différencier les sous-types d'influenza.</p>			

ASSISTANCE

En cas de questions concernant l'utilisation de ce produit, veuillez contacter l'assistance technique de Quidel au 1.800.874.1517 (aux États-Unis) ou par e-mail à technicalsupport@quidel.com. Hors des États-Unis, contactez votre distributeur local ou l'un des centres d'assistance technique répertoriés ci-après. Vous pouvez également nous contacter via le site quidel.com.

D³, Duet, R-Mix, R-Mix Too, FreshCells et MixedCells sont des marques commerciales ou des marques déposées de Diagnostic Hybrids, Inc., aux États-Unis et d'autres pays.

BIBLIOGRAPHY

1. FDA Guidance Document: In Vitro Diagnostic Devices to Detect Influenza A Viruses: Labeling and Regulatory Path; Issued 4/10/2006.
2. Englund, J.A., (2002). Antiviral therapy of influenza. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, 13(2):120-128.
3. Patel, N., Hartwig, R., Kauffmann, L. and Evans, M. (2000). Rapid influenza A and B culture 20-hour detection using R-Mix: A new gold standard. Presented at The Sixteenth Annual Clinical Virology Symposium, April 30-May 3, Clearwater Beach, FL.
4. Rodriguez, W.J., Schwartz, R.H. and Thorne, M.M. (2002). Evaluation of diagnostic tests for influenza in a pediatric practice. *Pediatr. Inf. Dis. J.*, 3:193-6.
5. Gould, I.M. (2002). Antibiotic Policies and control of resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 15(4):395-400.
6. Bischofberger, N., Webster, R.G. and Laver, G. (1999). Disarming Flu Viruses. *Scientific American*, January.
7. Wiedbrauk, D.L. and Johnston, S.L.G. (1993). Chapter 17, Influenza Virus. In: *Manual of Clinical Virology*. New York, Raven Press, 127-140.
8. Fete, T.J., Noyes, B. (1996). Common (but not always considered) viral infections of the lower respiratory tract. *Pediatr. Ann.*, 25:10), 577-584.
9. Hall, C.B. (1981). Respiratory Syncytial Virus. In: Feigin, R. D., Cherry, J.D., eds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, Phila., W.B. Saunders, 1247-1267.
10. Hall, C.B., Hall, W.J., Gala, C.L., McGill, F.B., Leddy, J.P. (1984). Longterm prospective study in children after Respiratory Syncytial Virus infection. *J. Pediatr.*, 105:358-364.
11. Falsey, Ann R. and Walsh, E.E. (2000). Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults. *Clinical Microbiology Reviews* 13(3):371-384.
12. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. 2001 *Nat Med* 7:719-24.
13. Nissen MD, Siebert DJ, Mackay LM, Sloots TP, Withers SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. 2002 *Med J Aust.* 176:188.
14. Kahn, Jeffrey S. Epidemiology of human metapneumovirus. 2006 *Clin Microbiol Rev.* 19(3):546-557.
15. Foy, H.M. (1997). Adenoviruses. In: Evans, A., Kaslow, R., eds. *Viral Infections in Humans: Epidemiology and Control*. 4th ed., New York, Plenum, 119-138.
16. Easton, A.J., Eglin, R.P. (1989). Epidemiology of Parainfluenza virus type 3 in England and Wales over a 10 year period. *Epidemiol. Infect.*, 102:531-535.
17. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (BMBL), 5th edition, 2007, CDC-NIH manual. <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbI5/bmbI5toc.htm>
18. *Biosafety Manual*, 3rd edition, 2004. World Health Organization [Manual may be available in additional languages; refer to WHO web page http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/]
19. *Laboratory Biosafety Guidelines*, 3rd edition, 2004. Published by authority of the Minister of Health, Population and Public Health Branch, Centre for Emergency Preparedness and Response [Guideline is

available in French or English; refer to web page [<http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/lbg-ldmbl-04/index.html>]

20. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Viral Culture; Approved Guidelines*. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA 2006.
21. Isenberg, Henry D. (1992). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, published by American Society for Microbiology, Washington DC, pg. 8.2.3.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Viral Culture; Approved Guidelines*. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006, Section 7.4.
23. Isenberg, Henry D., 2004. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, published by American Society for Microbiology, Washington DC, 10.7.1 – 10.7.10.
24. Leland, Diane S. (1996). *Clinical Virology*, published by W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

REF I-01-110000 – D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening & Identification Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Diagnostic Hybrids, Inc. – a subsidiary of Quidel Corporation

2005 East State Street, Suite 100

Athens, OH 45701 USA

quidel.com

PI3120001FR00 (05/19)

GLOSSAIRE

REF

Numéro de catalogue



Marquage de conformité CE

EC REP

Représentant autorisé dans
la Communauté Européenne

LOT

Code de lot



Date de péremption



Fabricant



Limite de température



Utilisation prévue



Consulter les instructions
électroniques



Ne pas réutiliser

IVD

Utilisation pour diagnostic in vitro



160 to 250

Contient une quantité suffisante pour
160 à 250 déterminations

CONT NaN₃

Contient de l'azote de sodium

NaN₃ 4%

Contient 4% l'azote de
sodium sans dilution
