

PathoDx

Kit Herpes Typing

REF

R62250

FR

1. DOMAINE D'APPLICATION

Le kit PathoDx™ Herpes Typing est un test d’immunofluorescence conçu pour la détection et le typage des virus Herpes simplex de types I et II (HSV-I et HSV-II) dans des échantillons cliniques directs après prolifération dans une culture de tissus. Les dosages faisant appel à des lames de confirmation par culture et à un tube shell vial peuvent être utilisés pour la détection et le typage via une procédure de coloration bivalente. Tous les échantillons directs qui sont négatifs ou présentent un nombre inadéquat de cellules doivent être réévalués par culture cellulaire.

2. RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le virus Herpes simplex (HSV) est un virus ancien et ubiquitaire, connu pour les infections aiguës et récidivantes qu’il provoque chez l’homme. Le virus pénètre dans l’organisme par les muqueuses (yeux, parties génitales ou bouche) et se reproduit localement.^{12,16} Chez les nouveau-nés, l’infection lors de l’accouchement par voie basse peut provoquer des lésions neurologiques voire la mort.^{2,15} Chez une faible proportion de sujets infectés, le virus peut devenir latent en pénétrant dans le ganglion de la racine sensitive ce qui donne lieu à des infections récidivantes.¹

Dans les années 1960, on a découvert que le HSV comprenait en fait en deux types distincts, HSV-I et HSV-II.¹⁶ HSV-I était principalement considéré comme associé aux infections orales et oculaires (au-dessus de la ceinture) alors que HSV-II était considéré comme essentiellement responsable des infections génitales (sous la ceinture). Cependant, ces distinctions sont aujourd’hui plus floues et les deux souches du HSV peuvent être isolées dans les lésions herpétiques.

Le typage du virus est donc nécessaire pour déterminer le traitement approprié chez les nouveau-nés infectés et les sujets immunodéprimés,³ proposer une prise en charge adaptée aux femmes enceintes,^{14,15} et réaliser des études épidémiologiques.¹⁴ De plus, les personnes infectées par le HSV-II sont susceptibles de connaître plus d’épisodes récidivants que celles infectées par le HSV-I.⁴ Il a également été prouvé que le HSV-II est un cofacteur du papillomavirus dans l’apparition du cancer du col de l’utérus.¹⁶ L’identification de la souche infectieuse peut en outre permettre de traiter plus efficacement l’infection.

À ce jour, la méthode standard de diagnostic du HSV est la prolifération dans des cellules de culture tissulaire.^{11,14} Les cellules sensibilisées présentent un effet cytopathique caractéristique (ECP) généralement dans les 1 à 4 jours, mais cela peut aller parfois jusqu’à 7 jours en culture.^{5,13} Les modifications cytologiques (noyaux ayant l’apparence de verre dépoli, inclusions intra-nucléaires et cellules polynucléées) permettent d’établir le diagnostic d’une infection au HSV des tissus en culture.¹⁷ Les dosages immunologiques de type ELISA,¹⁴ coloration à l’immunoperoxydase,¹¹ et coloration des anticorps à la fluorescéine⁵ ont été souvent utilisés pour l’identification et le typage des isolats du HSV après mise en culture. Le diagnostic peut également être effectué directement à partir de l’échantillon, sans amplification en culture cellulaire, si un nombre suffisant de

cellules infectées est disponible.

L’identification formelle du HSV-I ou du HSV-II peut se faire en fonction de la taille des pustules sur un embryon de poussin, de la sensibilité aux antiviraux¹⁸ et de l’isolement des endonucléases de restriction.^{7,18} mais c’est seulement depuis que les anticorps monoclonaux sirigés contre les épitopes spécifiques de HSV-I et HSV-II sont disponibles qu’on peut obtenir une identification et un typage précis et pratiques du HSV.^{2,7,8,16}

3. PRINCIPE DE LA METHODE

Le kit PathoDx Herpes Typing utilise quatre anticorps monoclonaux marqués à la fluorescéine, spécifiques de HSV-I et HSV-II (deux pour le HSV-I et deux pour le HSV-II) pour détecter et identifier le virus Herpes simplex. Le réactif de typage HSV-I contient deux anticorps monoclonaux qui réagissent avec les polypeptides d’un poids moléculaire égal à 85 000 et 142 000 daltons. Le réactif de typage HSV-II contient deux anticorps monoclonaux spécifiques de HSV-II. L’un des anticorps reconnaît un polypeptide d’environ 79 000 daltons, et le second reconnaît une molécule de 41 000 daltons. Lorsque les réactifs de typage sont ajoutés dans les puits contenant les cellules infectées par le virus de l’herpès, les anticorps monoclonaux marqués à la fluorescéine réagissent de manière spécifique avec les antigènes viraux des cellules infectées. Après rinçage de l’anticorps non lié dans une solution saline tamponnée, l’examen au microscope par fluorescence, montre une fluorescence vert pomme caractéristique des antigènes viraux alors que les cellules sont contre-colorées en rouge par le bleu d’Evans. Les réactifs sont spécifiques de chaque type de HSV et ne présentent aucune coloration de réactivité croisée.

Une procédure de coloration bivalente en option, faisant appel à des réactifs de typage combinés HSV-I et HSV-II est également décrite pour utilisation dans les tests sur lames de confirmation par culture et les tests en tube shell vial.

4. REACTIFS

CONTENU DU KIT

Kit Herpes Typing	100 tests (R62250)
1. Réactif de typage HSV-I	1 flacon compte-gouttes (bouchon violet)
2. Réactif de typage HSV-II	1 flacon compte-gouttes (bouchon rose)
3. Milieu de montage (R62230)	1 flacon compte-gouttes (bouchon noir)
4. Lames témoin pour le typage de l’herpès (R62251)	1 paquet de 5
5. Mode d’emploi	1

DESCRIPTION, PREPARATION POUR UTILISATION ET CONDITIONS DE CONSERVATION RECOMMANDEES

Se référer également au paragraphe **Précautions et restrictions d’emploi**.



Conserver entre 2 et 8°C, à l’abri de la lumière. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l’emballage. Tous les éléments doivent être à température ambiante (15 et 28°C) avant utilisation ; bien mélanger en retournant les flacons.

Les éléments de ce kit sont interchangeable avec les éléments d’autres lots ayant le même numéro de référence.

HSV I

Réactif de typage HSV-I

HSV II

Un flacon compte-gouttes en plastique contenant 5,0 ml d’anticorps monoclonaux murins, purifiés, marqués à la fluorescéine, spécifiques du HSV-I, le contre-colorant bleu d’Evans, un inhibiteur de coloration non spécifique, dans une solution tampon stabilisée avec des protéines, et 0,098% d’azide de sodium comme conservateur.

Réactif de typage HSV-II

Un flacon compte-gouttes en plastique contenant 5,0 ml d’anticorps monoclonaux murins purifiés, marqués à la fluorescéine, spécifiques du HSV-II, le contre-colorant bleu d’Evans, un inhibiteur de coloration non spécifique, dans une solution tampon stabilisée avec des protéines, et 0,098% d’azide de sodium comme conservateur.

Milieu de montage

Un flacon compte-gouttes en plastique contenant 5,0 ml de liquide de montage, composé de glycérol tamponné, avec 0,01% d’azide de sodium comme conservateur.

Lames témoin pour le typage de l’herpès

Cinq lames emballées individuellement, dans une poche à fermeture zip, avec dessiccant. Chaque lame de contrôle comporte quatre puits. Les deux puits supérieurs contiennent des cellules RK-13 infectées par le HSV-I (souche MacIntyre) et les deux puits inférieurs contiennent des cellules RK-13 infectées par le HSV-II (souche MS). Avant utilisation, laisser la lame atteindre la température ambiante (15 et 28°C) en la laissant dans la poche. Sortir la lame en la tenant uniquement par les bords.

5. PRECAUTIONS ET RESTRICTIONS D'EMPLOI

IVD

Les réactifs sont destinés exclusivement au diagnostic *in vitro*.

Réservé à un usage professionnel.

Pour obtenir des informations sur les composants potentiellement dangereux, se référer à la fiche de sécurité fournie par le fabricant et à l’étiquetage du produit.

INFORMATIONS DE SECURITE

- L’azide de sodium, à une concentration inférieure à 0,1%, a été ajouté à certains éléments comme agent antibactérien. Pour prévenir l’accumulation d’azides métalliques explosifs dans les canalisations en plomb et en cuivre, les réactifs ne doivent être déversés dans le système d’égouts que s’ils sont dilués et mélangés à de grands volumes d’eau. Il est préférable d’utiliser des canalisations sans cuivre et sans plomb.
- Echantillons cliniques** : Suivre les procédures de biosécurité de routine lors du prélèvement et du traitement des échantillons infectés par le HSV. Considérer les échantillons et tous les matériels en contact avec les échantillons comme potentiellement infectieux ; il convient de les éliminer selon la procédure appropriée. Ne jamais pipetter à la bouche. Éviter la formation d’aérosols.
- Déchets** : Stériliser tous les déchets avant de les jeter,

en suivant les procédures propres au laboratoire et les réglementations locales.

- Lames de contrôle** : Les lames de contrôle contiennent des cellules de mammifères (RK-13) infectées par le HSV-I (MacIntyre) et le HSV-II (MS). Ces cellules ont été traitées et fixées pour rendre le virus non infectieux. Néanmoins, les utilisateurs doivent manipuler les contrôles avec toutes les précautions de sécurité adaptées aux échantillons cliniques.
- Présence du colorant bleu Evans dans le réactif. Bien que le produit soit en concentrations inférieures à celles qui requièrent qu’on le classe comme cancérrogène, éviter tout contact avec la peau.
- L’acétone (non fournie) est un solvant organique inflammable. Utiliser dans un endroit bien ventilé et conserver à l’écart de toute flamme ou source d’étincelles.

6. PRELEVEMENT, CONSERVATION ET TRANSPORT DES ECHANTILLONS

Pour de meilleurs résultats, les échantillons doivent être prélevés à l’aide d’écouvillons en polyester ou coton (pas en alginate de calcium)^{9,10} dans les 3 à 7 jours suivant l’apparition des symptômes.^{1,12,13} Les lésions qui ont déjà commencé à cicatriser contiennent moins de particules virales et ne sont pas les meilleurs sites de prélèvements possibles. Par ailleurs, le traitement des zones infectées avec des désinfectants, du savon, etc., peut inactiver le virus. Au cours du prélèvement des échantillons, un soin tout particulier doit être apporté pour ne pas contaminer l’écouvillon par contact avec la zone environnante ou le sang.^{9,10} Les échantillons destinés à une détection directe des antigènes doivent être prélevés sur un écouvillon supplémentaire pour la confirmation par culture d’un test direct négatif.

Placer les échantillons pour une confirmation par culture dans un milieu de transport viral (VTM) et les envoyer immédiatement au laboratoire, sur de la glace. Si les échantillons ne peuvent pas être traités dans les 24 heures, ils doivent être congelés à –20°C.

Vésicules

Aspirer le liquide avec une seringue à aiguille de 25–27 G et rincer dans le milieu de transport viral (VTM). Appuyer l’écouvillon à la base de la lésion pour obtenir un nombre suffisant de cellules infectées. Bien que le liquide contenu dans les vésicules soit une bonne source de virus pour la mise en culture,¹² il est nécessaire de recueillir des cellules infectées pour la détection directe par coloration fluorescente.

Lésions ulcérées

Enlever la croûte avec une aiguille stérile et jeter. Enlever le pus avec un écouvillon stérile, le cas échéant. Avec un nouvel écouvillon, appuyer fortement sur la base de la lésion pour recueillir les cellules infectées. Éviter de récupérer du sang car il peut interférer avec la sensibilité de l’essai.

7. PROCEDURE

MATERIEL FOURNI

Le kit Herpes Typing (R62250) permet la réalisation de 100 tests (voir **Contenu du kit**).

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Aiguille stérile 25–27 G (pour enlever le liquide des vésicules et la croûte en cas de lésion sèche)
- Écouvillons stériles (coton ou polyester) pour prélever les échantillons et enlever le mucus ou le pus des lésions ulcérées

- Milieu de transport viral (VTM), qui ne doit pas inhiber la croissance du HSV ou des cellules en culture^{9,10}
- Lames de microscope avec des puits de 7 à 10 mm de diamètre, avec revêtement hydrophobe résistant à l'acétone. Les puits doivent être suffisamment espacés pour éviter que les échantillons ou les réactifs n'entrent en contact les uns avec les autres (environ 5 mm)
- Acétone (qualité réactif ou supérieure) conservée dans du verre
- Boîte à lames de microscope pour la conservation et le transport des lames
- Tubes de culture contenant des cellules convenant à l'isolement du HSV¹³
- Souches de HSV-I et HSV-II connues comme contrôles, par exemple, souches ATCC®, MacIntyre (HSV-I), MS (HSV-II) ou isolats de laboratoire identifiés auparavant
- Pipettes stériles
- Micropipette capable de délivrer jusqu'à 30 µl, avec embouts jetables
- Solution saline de tampon phosphate (PBS : phosphate de sodium à 0,01 M, chlorure de sodium à 0,15 M, pH 7,2–7,4, exempt d'ions calcium et magnésium)
- Lamelles de protection, 22 × 50 mm
- Bécher, flacon ou jarre de Coplin pour laver les lames
- Papier buvard pour les lames
- Microscope à fluorescence avec système de filtre adapté à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (excitation maximum = 490 nm ; émission maximum = 520 nm ; objectifs grossissants de 160 à 250X et de 400 à 630X)
- Chambre noire humide pour l'incubation des lames.

PROCEDURE DU TEST

Préparation des lames pour échantillon direct

- Etape 1** Les échantillons à colorer pour la détection directe des antigènes par des anticorps rendus fluorescents doivent contenir un nombre suffisant de cellules infectées. Prélever l'échantillon comme décrit ci-dessus, en vérifiant que la base des lésions est frottée avec force.
- Etape 2** Faire rouler l'écouvillon en appuyant fortement sur 2 puits d'une lamelle en verre. Faire attention à ne pas étaler l'échantillon sur la lame pour éviter toute distorsion des cellules. Vérifier que les puits sont bien recouverts de cellules. Si nécessaire, passer l'écouvillon à nouveau sur les puits.
- Remarque :** Jeter l'échantillon dans un sac pour déchets biologiques.
- Etape 3** Laisser la lame sécher complètement à l'air libre. Si le séchage n'est pas correctement effectué, des cellules peuvent se perdre au cours du processus de coloration.
- Etape 4** Fixer la lame avec 0,5 ml d'acétone pendant 10 minutes.
- Etape 5** Les lames contenant un échantillon direct peuvent être transportées au laboratoire à température ambiante (15 et 28°C). Si elles ne sont pas colorées dans les 4 heures, elles peuvent être conservées entre 2 et 8°C pendant 24 heures.

Inoculation des cultures cellulaires

Inoculer les cultures cellulaires sensibilisées conformément aux procédures standard.¹³ Pour résumer, l'échantillon contenant l'écouvillon est passé au vortex pour libérer le virus et les cellules infectées, ainsi que le liquide extrait de l'écouvillon. L'échantillon peut être passé aux ultrasons ou au vortex avec des particules de verre pour fractionner les cellules. L'échantillon est alors centrifugé à 1000 g pour éliminer les débris cellulaires et le surnageant est utilisé comme inoculum viral.

Les cultures de contrôle positif et négatif composées de souches connues du HSV-I et HSV-II doivent être inoculées dans les cultures cellulaires avec chaque groupe d'échantillons de patients. Il peut s'agir de souches ATCC®, MacIntyre (HSV-I), MS (HSV-II) ou d'isolats de laboratoire identifiés auparavant.

Préparation des lames pour confirmation de culture

Etape 1 Examiner la monocouche cellulaire pour détecter toute trace d'ECP. Lorsque environ 50% (ECP 2+) de la monocouche présente un ECP, généralement au bout de 1 à 4 jours, traiter les cellules pour la confirmation par culture HSV. Un ECP ayant progressé au-delà de 2+ peut provoquer un flou du fait de la libération des antigènes viraux spécifiques (voir la partie **Remarques à propos de la technique**).

Etape 2 Enlever le milieu de croissance de la culture et la placer dans un tube stérile au cas où un passage supplémentaire serait nécessaire.

Etape 3 Ajouter une petite quantité de PBS (environ 0,2 ml) dans le tube contenant la monocouche.

Etape 4 Gratter et/ou décoller les cellules des parois du tube à l'aide d'une pipette Pasteur. (Utiliser une nouvelle pipette pour chaque isolat.)

Etape 5 Avec la même pipette, aspirer doucement les cellules en suspension pour obtenir une suspension de cellules simples. Il doit y avoir suffisamment de cellules pour que la suspension apparaisse comme trouble.

Etape 6 Déposer 20 à 30 µl de la suspension (selon la taille des puits) dans chacun des deux puits d'une lame propre. Changer l'embout de la pipette pour chaque échantillon. Laisser la lame sécher complètement à l'air libre.

Remarque : Pour la procédure de coloration bivalente en option, déposer 20 à 30 µl de la suspension de cellules (selon la taille des puits) dans un puits d'une lame propre.

Etape 7 Placer la lame dans une jarre de Coplin ou un bécher et fixer à l'acétone à température ambiante (15 et 28°C) pendant 10 minutes. Jeter l'acétone toutes les 10 à 12 lames.

Etape 8 Enlever la lame de l'acétone et laisser sécher complètement à l'air libre.

Si les lames fixées ne peuvent pas être colorées immédiatement, elles peuvent être réfrigérées entre 2 et 8°C pendant 24 heures maximum. Si une lame fixée ne peut pas être colorée dans les 24 heures, elle peut être conservée à -20°C avec un dessiccant, dans un conteneur fermé.¹³ Laisser les lames parvenir à température ambiante (15 et 28°C) avant la coloration.

Procédure de coloration basique pour le typage

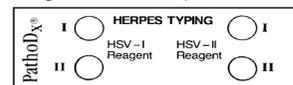
Tous les éléments doivent être à température ambiante (15 et 28°C) avant coloration. Bien mélanger les réactifs d'anticorps en remuant doucement les flacons.

Attention : Utiliser une technique aseptique tout au long de la procédure de test.

Échantillon direct et confirmation par culture

Etape 1 Placer une à deux gouttes de réactif de typage HSV-I dans le premier puits d'échantillons appariés. Vérifier que le réactif recouvre tout le puits. Sur la lame témoin pour le typage de l'herpès, placer le réactif HSV-I sur la paire gauche de puits étiquetés I et II, qui contiennent les cellules infectées par le HSV-I et le HSV-II, respectivement (voir la figure 1 ci-dessous).

Etape 2 Placer une à deux gouttes de réactif de typage HSV-II dans le deuxième puits d'échantillons appariés et dans les puits de contrôle. Vérifier que le réactif recouvre tout le puits. Sur la lame témoin pour le typage de l'herpès, placer le réactif HSV-II sur la paire droite de puits étiquetés I et II, qui contiennent les cellules infectées par le HSV-I et le HSV-II, respectivement (voir la Figure 1 ci-dessous).



Etape 3 Placer les lames dans une chambre noire humide et incubé pendant 30 minutes à température ambiante (15 et 28°C). Ne pas exposer les lames et le réactif à la lumière pendant une période prolongée. Ne pas laisser le colorant sécher sur la lame car une coloration non spécifique peut apparaître sur le bord du puits.

Etape 4 Enlever les lames de la chambre et bien rincer chaque puits au PBS en les arrosant avec une pipette, dirigée vers un seul côté de chaque puits. Vérifier que le colorant ne glisse pas d'un puits à un autre.

Etape 5 Placer les lames dans une jarre de Coplin contenant du PBS. Laver les lames en les agitant pendant 2 à 4 minutes et en changeant une fois le PBS. (Le cas échéant, il est possible d'utiliser un flacon pour laver les lames avec du PBS ou de l'eau distillée. Si de l'eau distillée est utilisée, laisser les lames sécher à l'air libre avant d'ajouter le liquide de montage).

Etape 6 Tapoter ou tamponner les lames pour éliminer l'excès de PBS. Ne pas laisser sécher.

Etape 7 Ajouter immédiatement une goutte de milieu de montage et appliquer une lamelle de protection. Enlever les bulles d'air et l'excès de liquide de montage avec du papier buvard.

Etape 8 La lame doit être lue immédiatement au microscope à fluorescence avec un grossissement de 160 à 250X. La morphologie des cellules infectées peut être confirmée au grossissement de 400 à 630X. Si nécessaire, les lames peuvent être conservées dans l'obscurité entre 2 et 8°C, et lues dans les 24 heures. Laisser les lames atteindre la température ambiante (15 et 28°C) avant lecture. Après lecture, les lames peuvent être stockées sous atmosphère sèche à -20°C ou à -70°C.

Procédure de coloration bivalente en option

Cette procédure facultative peut être envisagée pour la détection et le typage du HSV dans les tests faisant appel à des lames de confirmation par culture et un tube shell vial.

Etape 1 Suivre la procédure de test pour la coloration des lames de contrôle comme indiqué ci-dessus au point Procédure de coloration basique.

Etape 2 Déposer une goutte des réactifs de typage HSV-I et HSV-II dans chaque puits d'échantillonnage dans le tube shell vial.

Etape 3 Pour les lames, suivre les étapes 3 à 8 comme indiqué ci-dessus aux points correspondants.

Etape 4 Pour les tubes shell vial, voir les étapes 11 à 15 de la procédure ci-dessous.

Procédure de culture pour tube shell vial

En utilisant une technique aseptique tout au long de la procédure, aspirer et jeter le milieu de conservation des tubes shell vial à inoculer. Ne pas laisser sécher la monocouche.

Etape 1 Inoculer deux tubes shell vial avec 0,2 ml d'échantillon et reboucher les flacons.

Etape 2 Centrifuger les flacons à 600–700 g pendant 45 minutes entre 18 et 35°C.

Etape 3 Après centrifugation, aspirer l'inoculum et laver la monocouche avec 2 ml de PBS stérile ou de milieu de conservation (préchauffé à 35 et 37°C). Aspirer tout liquide restant. Ajouter 2 ml de milieu de conservation récent de la culture de tissus avant incubation.

Etape 4 Incuber les tubes shell vial en double entre 33 et 36°C pendant 24 à 26 heures.

Etape 5 Aspirer le milieu de conservation sans fractionner la monocouche cellulaire présente sur la lamelle de protection à l'intérieur du flacon.

Etape 6 Rincer deux fois la monocouche avec 1 ml de PBS, ajouté dans le fond du flacon pour éviter de fractionner la monocouche cellulaire.

Etape 7 Après avoir aspiré le rinçage final, ajouter immédiatement 1 ml d'acétone.

Etape 8 Aspirer l'acétone et ajouter à nouveau 1 ml d'acétone. Laisser les flacons se fixer pendant 10 minutes à température ambiante (15 et 28°C).

Etape 9 Enlever l'acétone et laisser sécher la monocouche. (Si la lamelle de protection n'est pas colorée immédiatement, reboucher le flacon et stocker à une température ne dépassant pas -20°C. Lorsque la lamelle de protection est prête à être colorée, laisser le flacon atteindre la température ambiante avant d'enlever le bouchon).

Etape 10 Rincer le flacon avec 1 ml de PBS pour augmenter la cohésion de surface. Aspirer le PBS du flacon avant d'ajouter les réactifs de typage.

REMARQUE : Pour la procédure de coloration bivalente en option, ajouter 2–3 gouttes de chaque réactif de typage dans un flacon.

Etape 11 Ajouter 2–3 gouttes (environ 150 µl) de réactif de typage HSV-I dans le flacon, en vérifiant que le réactif recouvre entièrement la lamelle de protection. Répéter l'opération avec le réactif de typage HSV-II dans le second tube shell vial. Reboucher les flacons et incuber à température ambiante (15 et 28°C) pendant 30 minutes, dans l'obscurité.

Etape 12 Aspirer les réactifs de typage HSV-I et HSV-II dans les flacons et laver chaque tube shell vial deux fois avec 1 ml de PBS.

Etape 13 Enlever les lamelles de protection à l'aide d'une aiguille courbe ou d'une pince et tapoter doucement ou faire toucher le bord des lamelles de protection sur du papier buvard pour enlever l'excès de PBS.

Etape 14 Monter les deux lamelles de protection sur une lame de microscope en verre en les plaçant sur une goutte de milieu de montage, cellules vers le bas.

Etape 15 Enlever les bulles d'air et l'excès de milieu de montage sur les lamelles de protection avec du papier buvard. Examiner au microscope à fluorescence, avec un grossissement de 100X à 400X.

Remarques a propos de la technique

- Une fluorescence peut apparaître autour des cellules infectées et sur le fond si l'ECP a progressé au-delà de 2+ (50%) du fait de la libération d'antigènes spécifiques par les cellules. Pour éviter ce problème, vérifier que l'infection de la monocouche n'a pas progressé au-delà de ce niveau avant coloration.
- Des artefacts peuvent se produire si les puits sèchent après le rinçage au PBS. Dans ce cas, rincer la lame brièvement dans du PBS et la monter immédiatement. Inversement, une faible fluorescence peut apparaître si les lames lavées à l'eau distillée ne sont pas mises à sécher avant le montage.
- L'acétone absorbe l'humidité si elle n'est pas conservée correctement. Cette humidité provoque un flou non spécifique après la coloration. Dans ce cas, utiliser un nouveau flacon d'acétone et refaire le test avec une lame fraîchement préparée.
- Une fluorescence ou un verdissement non spécifique du fond peuvent se produire avec certaines lames, en fonction du fabricant. Pour éviter ce problème, laver les lames à l'acétone pendant 5 à 10 minutes avant utilisation.
- Un verdissement non spécifique apparaît à la périphérie du puits si le colorant sèche sur la lame. Vérifier qu'il y a suffisamment de colorant pour recouvrir le puits, et que la chambre d'incubation est bien humidifiée.

8. CONTROLE QUALITE

Test d'échantillons cliniques directs : Pour vérifier la spécificité et le motif de coloration de chaque réactif, une lame témoin pour le typage de l'herpès doit être incluse dans chaque lot d'échantillons cliniques directs. Deux puits, contenant l'un des cellules infectées par le HSV-I et l'autre des cellules infectées par le HSV-II (les deux puits de gauche) doivent être colorés avec le réactif de typage HSV-I et les deux derniers puits (les deux puits de droite), avec le réactif de typage HSV-II.

Résultat positif : Cellules infectées par le HSV-I (puits en haut à gauche) associées au réactif de typage HSV-I. Cellules infectées par le HSV-II (puits en bas à droite) associées au réactif de typage HSV-II.

Résultat négatif : Cellules infectées par le HSV-I (puits en haut à droite) associées au réactif de typage HSV-II. Cellules infectées par le HSV-II (puits en bas à gauche) associées au réactif de typage HSV-I.

Test d'isolats à partir d'une culture cellulaire : Des souches ou des isolats connus des HSV-I et HSV-II doivent être mis en culture avec chaque groupe d'échantillons de patients. Ces isolats agissent comme des contrôles des tissus en culture pour la prolifération virale. En outre, les réactifs de typage HSV-I et HSV-II doivent être testés sur des lames contenant des cellules infectées par les contrôles HSV-I et HSV-II. Ces contrôles aident à l'interprétation des résultats des échantillons de patients et permettent d'établir la spécificité des réactifs, l'intensité de la coloration et la présence d'une coloration non spécifique pouvant se produire sur la lignée cellulaire utilisée.

REMARQUE : Si les contrôles positif et négatif ne réagissent pas comme décrit au point **Interprétations**, les réactifs et les performances de l'essai doivent être revus.

9. INTERPRETATION

Lame avec échantillon direct : Lire la lame témoin pour le typage de l'herpès en premier lieu pour déterminer l'intensité de la réaction et le motif de coloration. Pour la lame contenant l'échantillon, au moins 20 cellules épithéliales non superficielles doivent être visibles dans chaque puits pour que l'échantillon soit acceptable. Un résultat est considéré comme positif si au moins une cellule présente une fluorescence caractéristique à l'un des deux réactifs de typage (ou aux deux réactifs dans la Procédure de coloration bivalente) tel que décrit ci-dessous. Tous les échantillons directs négatifs ou ne contenant pas suffisamment de cellules doivent être retestés par culture cellulaire.

Confirmation par culture : Lire la lame de contrôle contenant les isolats connus de HSV-I et HSV-II en premier lieu pour déterminer l'intensité de la coloration et la coloration non spécifique. Au cas où les deux réactifs de typage HSV-I et HSV-II présentent une réaction positive sur les isolats, retester les réactifs sur de nouvelles lames fraîchement préparées pour confirmer une double infection.

Test avec tube shell vial : Lire la lame témoin pour le typage de l'herpès en premier lieu pour déterminer l'intensité des réactions et les motifs de coloration, ainsi que pour détecter la présence d'une coloration non spécifique.

Motif de coloration

Cellules infectées par le HSV-I : Le réactif de typage HSV-I présente une fluorescence vert pomme brillante et diffuse, homogène. Les cellules infectées par le HSV-I ne doivent pas présenter de fluorescence spécifique en présence du réactif de typage HSV-II.

Cellules infectées par le HSV-II : Le réactif de typage HSV-II présente une coloration mouchetée (aspect granuleux) d'une intense fluorescence dans le cytoplasme et le noyau. Les cellules infectées par le HSV-II ne doivent pas présenter de fluorescence spécifique en présence du réactif de typage HSV-I.

Cellules non infectées : Les cellules non infectées se contrecolorent en rouge du fait de la présence du bleu d'Evans.

Double infection : Une double infection aux HSV-I et HSV-II se traduit par les motifs de coloration décrits ci-dessus avec chaque réactif.

Coloration bivalente : Dans les infections à un seul type, le motif de coloration est celui décrit pour le réactif de typage HSV-I ou le réactif de typage HSV-II. Une double infection présente un motif de coloration reflétant les cellules infectées à la fois au HSV-I et au HSV-II.

10. LIMITES

- L'intensité de la fluorescence dépend de l'intensité de la source de lumière fluorescente, et peut varier en fonction de l'ampoule, de la taille du filtre, etc. Il est donc essentiel que le microscope à fluorescence soit correctement aligné et en bon état de marche. Une exposition prolongée à la lumière peut également produire une baisse de l'intensité de fluorescence.
- Les réactifs sont fournis à leur concentration de travail optimale. La dilution des réactifs produit des résultats qui ne sont pas optimaux.
- Il est toléré de procéder à un mélange des réactifs dans le cadre de la Procédure de coloration bivalente en option. Toutefois, la stabilité du mélange n'a pas été étudiée.
- Un résultat négatif après coloration des échantillons directs n'exclut pas la possibilité d'une infection au HSV. Tous les échantillons négatifs à la coloration ou ne contenant pas suffisamment de cellules pour l'analyse doivent être testés dans une culture cellulaire pour rechercher la présence du virus. L'interprétation de tous les résultats doit inclure une évaluation clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.
- Ne pas utiliser les résultats des échantillons directs comme seul outil de dépistage du HSV lorsqu'une césarienne est envisagée. Le cas échéant, les résultats obtenus avant la mise en culture et l'examen clinique doivent également être pris en compte.
- Le fait de tester des échantillons avec seulement l'un des deux réactifs d'anticorps peut générer des résultats erronés. Les échantillons doivent être évalués avec les deux réactifs.
- L'effet d'un traitement antiviral antérieur ou concomitant sur les performances du test n'est pas connu.
- Les résultats positifs pour le HSV doivent être interprétés en tenant compte de l'état clinique général du patient. Par exemple, un résultat positif sur un échantillon prélevé dans la gorge peut être dû à une réactivation suite à un accès de fièvre.
- Le test direct est destiné à être utilisé uniquement sur les lésions symptomatiques de l'infection au HSV. Il ne doit pas être utilisé pour le diagnostic des patients asymptomatiques, notamment chez la femme enceinte.
- Le transfert occasionnel de cellules entre les puits peuvent se produire lors de la fabrication du tiroir de commande. Cela peut entraîner un faible nombre de cellules positives observées en haut à droite et puits inférieur gauche. Le tiroir de commande sera toujours servir un contrôle approprié pour indiquer la performance du réactif

11. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Spécificité : Pour vérifier la spécificité du kit PathoDx® Herpes Typing, des micro-organismes bactériens, fongiques et viraux ont été testés avec les réactifs. Les micro-organismes (voir tableau) ont été mis en culture dans un bouillon et 10 µl d'une suspension

contenant 1 × 10⁹ unités formant colonie par millilitre a été fixée sur une lame contenant des cellules non infectées de tissus mis en culture. Les virus ont été cultivés en monocouche et testés lorsqu'un ECP de 2+ était évident ou après 7 jours en culture. Aucun des organismes testés n'a montré de réactivité avec les réactifs.

Micro-organisme	Souche
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC® 17904
Adénovirus type 3	ATCC® VR3
Adénovirus type 5	ATCC® VR5
Adénovirus type 7	ATCC® VR7
Adénovirus type 10	ATCC® VR11
Adénovirus type 14	ATCC® VR15
<i>Candida albicans</i>	166 Nelsen/CA
<i>Candida tropicalis</i>	PN 1164
<i>Chlamydia trachomatis</i> Type E	ATCC® VR348B
Coxsackievirus A9	ATCC® VR186
Coxsackievirus B4	ATCC® VR184
Cytomégalo virus AD169	ATCC® VR538
Échovirus 4	ATCC® VR34
Échovirus 20	ATCC® VR50
Échovirus 22	ATCC® VR52
<i>Enterococcus faecalis</i>	PN 1120
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 29194
<i>Haemophilus influenzae</i> Type A	AANEN 1217
Grippe A	ATCC® VR100
Grippe B	ATCC® VR523
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® 33495
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	PN 1126
<i>Lactobacillus casei</i>	PN 1078
<i>Moraxella osloensis</i>	PN 1339
<i>Mycoplasma arginini</i>	ATCC® 23838
<i>Mycoplasma hominis</i>	ATCC® 23114
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC® 15531
<i>Mycoplasma genitalium</i>	ATCC® 33530
<i>Mycoplasma salivarius</i>	ATCC® 23064
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PN 1138
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PN 1177
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PN 1282
<i>Neisseria meningitidis</i> Groupe A	ATCC® 13077
<i>Neisseria meningitidis</i> Groupe B	ATCC® 13090
<i>Neisseria meningitidis</i> Groupe C	ATCC® 13102
<i>Neisseria meningitidis</i> Groupe D	ATCC® 13113
<i>Neisseria sicca</i>	PN 1101
Parainfluenza 1 souche C-35	ATCC® VR94
Parainfluenza 2 souche Green	ATCC® VR92
Parainfluenza 3 souche C-243	ATCC® VR93
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 25933
<i>Proteus vulgaris</i>	PN 1062
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PN 1280
Virus respiratoire syncytial	Souche 9320
Rhinovirus 32	ATCC® VR329
Rhinovirus 39	ATCC® VR340
<i>Salmonella minnesota</i>	R 595
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I	ATCC® 12598
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PN 5204
<i>Streptococcus agalactiae</i>	090R
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC® 10389

Micro-organisme	Souche
Virus varicelle-zona souche Ellen	ATCC® VR586

De plus, les réactifs ont été testés par rapport à des lignées cellulaires courantes de tissus mis en culture pour déterminer toute possibilité de réactivité croisée ou de coloration non spécifique. Toutes les lignées cellulaires se sont révélées négatives.

Lignée cellulaire	Souche
A549	ATCC® CCL 185
Rein de bébé hamster (clone 13)	ATCC® CCL 10
Flow 5000	Flow 59368
Hep 2	ATCC® CCL 23
L929	ATCC® CCL 1
LLC-MK ₂	ATCC® CCL 7
McCoy	Bartels
MRC-5	ATCC® CCL 171
RK-13	ATCC® CCL 37
Vero	ATCC® CCL 81
WI-38	ATCC® CCL 75

12. VALEURS ATTENDUES

Les échantillons ont été prélevés sur deux sites de recherche à partir de lésions semblables à celles provoquées par l'herpès chez des patients de sexe masculin et féminin conformément aux instructions de la notice produit. Les échantillons directs et les échantillons mis en culture ont été testés à l'aide de la Procédure basique pour le typage. Les cultures ont été testées à l'aide des réactifs PathoDx Herpes Typing et d'une méthode d'identification/typage de référence. Les tests directs ont été effectués avec les mêmes réactifs PathoDx Herpes Typing que ceux utilisés pour le test des cultures.

Les frottis d'échantillon ont été préparés, séchés à l'air libre, fixés à l'acétone pendant 10 minutes, et testés conformément à la notice produit du fabricant. Les échantillons ont également été mis en culture dans le respect des procédures standard. Les cultures ont été incubées jusqu'à ce qu'un ECP 2+ se développe (50% de la monocouche). Les cellules ont ensuite été grattées, recueillies sur deux puits (environ 6 à 8 mm de diamètre) d'une lame en verre, séchées à l'air libre, fixées à l'acétone, et testées dans le respect des procédures standard.

Au total, 313 échantillons de patients, incluant 109 hommes et 204 femmes, ont fait l'objet d'une recherche du virus herpétique sur deux sites de recherche. La prévalence globale, définie par la méthode de référence de culture cellulaire et coloration des anticorps par fluorescence, était d'environ 76%. Ainsi, 51% de ces infections herpétiques ont été identifiées comme étant de type HSV-I et 49% comme étant de type HSV-II. Le test PathoDx Herpes Typing a correctement identifié 169 cultures / 170 déclarées positives par la méthode de référence et 49 cultures / 49 déclarées négatives par la méthode de référence (soit une sensibilité de 99,4% ; spécificité 100%, voir **Tableau 1**). Sur les 166 cultures positives non doubles, le test PathoDx Herpes Typing a donné des résultats identiques pour les 166 échantillons (**Tableau 2**).

Tableau 1 : Typage des cultures par PathoDx versus

typage des cultures par méthode de référence

PathoDx Référence	+	-	-	+	n	Sensibilité	Spécificité
Site 1	81	21	0	0	102	100%	100%
Site 2	88	28	1*	0	117	98,9%	100%
Combinés	169	49	1	0	219	99,4%	100%

*Identifié par PathoDx sur une coloration directe.

Tableau 2 : Typage des cultures par PathoDx versus typage des cultures par méthode de référence

Site 1 (n = 81)	Typage des cultures par méthode de référence	
	HSV-I	HSV-II
Typage des cultures par PathoDx	HSV-I	69
	HSV-II	0

Site 2 (n = 85)*	Typage des cultures par méthode de référence	
	HSV-I	HSV-II
Typage des cultures par PathoDx	HSV-I	24
	HSV-II	0

*Cinq échantillons non inclus dans l'analyse ci-dessus ont été identifiés comme des infections doubles de type I et type II par la méthode de culture de référence. Parmi ceux-ci, trois ont été testés avec le PathoDx Herpes Typing et deux ont été identifiés comme des infections doubles de type I et type II. Le troisième a été identifié comme une infection double lors du typage des cultures par la méthode de référence, mais seulement comme une infection de type I par le kit PathoDx Herpes Typing.

Le test direct avec le kit PathoDx Herpes Typing a correctement identifié 37 échantillons de culture positifs / 40 et 27 échantillons de culture négatifs / 27 lorsqu'une technique de préparation des échantillons optimale était utilisée (sensibilité de 92,5% ; spécificité de 100%, voir **Tableau 3**). En outre, le typage des échantillons directs a donné des résultats identiques à ceux de la coloration par fluorescence des isolats de cultures cellulaires par la méthode de référence (**Tableau 3**). Lorsqu'une autre technique de prélèvement des échantillons a été utilisée, impliquant le repérage du surnageant de l'échantillon obtenu par passage au vortex des écouvillons après transport dans un milieu de transport viral, le test direct avec le kit PathoDx Herpes Typing a correctement identifié 26 échantillons de culture positifs / 64 et 26 échantillons de culture négatifs / 26 (sensibilité de 41% ; spécificité de 100%). D'après les estimations de sensibilité et de spécificité pour le test direct PathoDx Herpes Typing lors de l'emploi d'une technique optimale de préparation des échantillons (sensibilité 92,5% ; spécificité 100%), on a calculé les valeurs prédictives de résultats positif et négatif, soit 100% et 81,6%, respectivement, dans une population présentant une prévalence hypothétique de 75%.

Tableau 3 : Test direct PathoDx versus culture de référence Identification

PathoDx Référence	+	-	-	+	n	Sensibilité	Spécificité
	37	27	3	0	67	92,5%	100%

Typage (n = 37)	Culture de référence	
	HSV-I	HSV-II
Test direct PathoDx	HSV-I	32
	HSV-II	0

Dans une autre étude menée sur un troisième site, 139 isolats cliniques du HSV (85 HSV-1 et 54 HSV-2), tous typés par la

méthode de référence, ont été inoculés dans des cultures cellulaires conformément aux procédures standard et incubés jusqu'à ce qu'un ECP 3+ à 4+ apparaisse. Les cellules ont été grattées, recueillies sur deux puits, et testées selon la procédure de coloration bivalente en option PathoDx. L'ensemble des 139 échantillons ont été détectés et correctement typés avec cette méthode (voir **Tableau 4**).

Tableau 4 : Procédure de coloration bivalente en option PathoDx versus Méthode de référence

Échantillons positifs pour HSV-1		Échantillons positifs pour HSV-2		% de corrélation entre les kits	
Réf.	PDx	Réf.	PDx	HSV-1	HSV-2
85	85	54	54	100%	100%

Dans une étude similaire, 86 isolats cliniques au total, connus comme étant positifs pour le HSV, ont été inoculés dans une série de trois tubes shell vial contenant des lamelles de protection avec des monocouches de cellules Vero. Les tubes ont été centrifugés à 600 g pendant 45 minutes à température ambiante, et incubés pendant 24 à 26 heures à 37°C. Deux des tubes shell vial pour chaque culture ont été colorés et typés à l'aide de la méthode de référence. Le troisième a été coloré et typé à l'aide de la procédure de coloration bivalente en option PathoDx. La corrélation entre la méthode de référence et la méthode PathoDx était de 100% (voir **Tableau 5**).

Tableau 5 : Coloration bivalente PathoDx versus méthode de référence pour le test en tube Shell Vial

Échantillons positifs au HSV-1		Échantillons positifs au HSV-2		% de corrélation entre les kits	
Réf.	PDx	Réf.	PDx	HSV-1	HSV-2
48	48	38	38	100%	100%

13. BIBLIOGRAPHIE

- Glaser, R. and R. Gotlieb-Stematski. 1982. Human Herpesvirus Infections. Marcel Dekker, New York, NY.
- Balachandran, N., B. Frame, M. Chernesky, E. Krausebard, Y. Kouri, D. Garcia, et al. 1982. J. Clin. Microbiol. 1:205–208.
- Corey, L. 1982. JAMA. 248:1041–1049.
- Corey, L., H.G. Adams, Z.A. Brown and K.K. Holmes. 1983. Ann. Intern. Med. 98:958–972.
- Drew, W.L. 1983. Clin. Lab. Med. 4:721–740.
- Simon, C. and P. Wilkinson. 1986. Diagnosis of Infectious Disease – New Aspects. Schattaur, New York, NY.
- Goldstein, L.C., L. Corey, J.K. McDougall, E. Tolentino and R.C. Nowinski. 1983. J. Infect. Dis. 5:829–837.
- Johnston, S.L.G. 1993. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 16:130–132.
- Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover. 2003. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM, Washington, D.C.
- Lenette, E.H., P. Halonen, and F.A. Murphy. 1988. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principles and Practice. Vol. 2. Springer-Verlag, New York, NY.
- Moseley, R.C., L. Corey, D. Benjamin, C. Winter, and M.L. Remington. 1981. J. Clin. Microbiol. 13:913–991.
- Spector, S., and G.J. Lancz. 1986. Clinical Virology Manual. Elsevier, New York, NY.
- Lenette, E.H. and N. J. Schmidt. 1979. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 5th ed. APHA.
- Young, H., and A. McMillan. 1988. Immunological Diagnosis of Sexually Transmitted Disease. Marcel Dekker, New York, NY.

- Stagno, S. and R.J. Whitely. 1985. N. Engl. J. Med. 313:1270–1274, 1327–1330.
- Sunstrum, J. 1989. J. Clin. Immunoassay. 3:175–178.
- Zhao, L., M.L. Landry, E.S. Balkovic, and G.D. Hsiung. 1987. J. Clin. Microbiol. 8:1401–1405.
- Zimmerman, D.H., F.K. Mundon, S.E. Croson L.S. Henchal, J.J. Doherty and S.P. O'Neill. 1985. J. Med. Virol. 15:215–222.

14. CONDITIONNEMENT

REF R62250..... 100 tests/kit

Légende des symboles

REF	Numéro de référence
IVD	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
LAB	Utilisation en laboratoire
i	Consulter le mode d'emploi
	Limite de température
LOT	Code de lot
	A utiliser avant le
	Fabricant



PathoDx est une marque de commerce déposée de Remel Inc. ATCC® est une marque de commerce déposée d'American Type Culture Collection.

IFU X7787A-FR Révisée Décembre 2013

Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT
Royaume-Uni

Pour obtenir une assistance technique, contacter le distributeur local.