

No: V4RVP

Kit Format: 150 TESTS



Respiratory Virus Panel

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta para la detección e identificación de adenovirus, influenza A y B, parainfluenza de tipos 1, 2 y 3 y VRS.



Índice

Uso previsto	3
Introducción	3
Principio del ensayo	6
Componentes del kit	6
Materiales suministrados	6
Materiales necesarios, no suministrados	8
Precauciones	9
Seguridad	9
Procedimientos	9
Conservación y estabilidad	10
Recogida y preparación de las muestras	10
Procedimiento del ensayo	15
Interpretación de los resultados	17
Valores previstos	18
Limitaciones de uso	18
Características de las prestaciones	19
Resumen del procedimiento del RVP	21
Interpretación de los símbolos	23
Otros productos Biotrin	24
Bibliografía / Referencias	25

Uso previsto

Biotrin Respiratory Viral Panel es un ensayo de inmunofluorescencia in vitro para la detección e identificación de adenovirus, virus de la influenza de tipos A y B, virus de la parainfluenza 1, 2 y 3 y virus respiratorio sincitial (VRS) mediante detección indirecta y en cultivo celular.

Introducción

Existen cerca de 200 virus capaces de causar infecciones respiratorias, aunque sólo siete (adenovirus, influenza A y B, parainfluenza 1, 2 y 3 y VRS) son responsables de enfermedades graves en niños y pacientes inmunosuprimidos. Estos virus son también responsables de una importante morbilidad en adultos sanos durante los períodos de epidemias. Una infección intrahospitalaria por el VRS y el virus de la influenza puede resultar mortal para lactantes hospitalizados y pacientes graves.

La identificación precoz de los virus respiratorios es fundamental para un diagnóstico eficaz y el tratamiento de los pacientes. Los tres métodos analíticos de identificación más habituales son: (a) detección directa, (b) confirmación por cultivo celular y (c) serología. Entre ellos, la detección directa y el cultivo celular son los métodos habituales utilizados por la mayoría de los laboratorios de virología. El kit Biotrin Respiratory Virus Panel utiliza anticuerpos monoclonales, de alta calidad, dirigidos contra antígenos específicos de grupo y de tipo para la detección directa y la confirmación por cultivo, proporcionando resultados claros y fáciles de interpretar en sólo 60 minutos.

Tabla I. Estacionalidad de las enfermedades respiratorias víricas

Virus	Época del año
Adenovirus	Todo el año
Influenza A	Meses de invierno
Influenza B	Meses de invierno
Parainfluenza 1	Todo el año con picos a finales de verano/otoño
Parainfluenza 2	Todo el año con picos a finales de verano/otoño
Parainfluenza 3	Todo el año con picos a finales de verano/otoño
VRS	Finales de otoño hasta comienzo de la primavera

Adenovirus

Los adenovirus humanos están relacionados con un gran número de enfermedades clínicas, como infecciones del aparato respiratorio, ocular y gastrointestinal. Dichas infecciones son especialmente habituales en niños y jóvenes, y aparecen tanto con carácter esporádico como en brotes. En pacientes inmunodeprimidos pueden producirse infecciones sistémicas graves, que incluso pueden provocar la muerte.

Concretamente, algunos serotipos de adenovirus están relacionados con diversas situaciones clínicas. Los tipos 15-24 y 37 pueden causar enfermedades en los ojos, desde leves trastornos como una conjuntivitis hasta una complicada queratoconjuntivitis

epidémica. El adenovirus está asociado al 4-15% de todos los casos de gastroenteritis víricas intrahospitalarias en lactantes. Los tipos 40 y 41 son responsables de la mayoría de estos casos^(1,2).

El adenovirus está implicado en la mayoría de los síndromes respiratorios. Los lactantes y los niños son los más afectados por las enfermedades de las vías respiratorias altas causadas por un adenovirus, como resfriados, faringitis y amigdalitis. El adenovirus está también relacionado con las infecciones de las vías respiratorias altas, bronquitis y bronquiolitis⁽³⁾. Además, el adenovirus (tipos 38, 39 y 17) está relacionado con casi el 5 % de las enfermedades respiratorias agudas (ERA) en niños y con el 10 % de las neumonías febriles e infantiles⁽⁴⁾.

El diagnóstico en laboratorio de la infección por adenovirus desempeña un papel importante en el tratamiento eficaz de los pacientes y en el control de los brotes. El cultivo celular es el método tradicional para la identificación del adenovirus, que puede cultivarse y aislarse en una variedad de líneas celulares, y detectarse a través de diversos métodos. Las líneas celulares idóneas son HEP-2, HeLa, KB y HEK. El efecto citopático (ECP) es normalmente un conjunto de células en forma de “racimo de uva”, que generalmente aparecen entre los 3 y los 10 días. Se confirma así la presencia del ECP por inmunofluorescencia, EIA o hibridación del ADN. La observación bajo microscopio electrónico (ME) de las heces es también un método estándar de diagnóstico del adenovirus; no obstante sólo se encuentra disponible en algunos laboratorios especializados^(5,6).

Influenza A y B

Existen tres tipos de virus de la gripe: los tipos A, B y C. Los virus de la gripe A y B son responsables de una enfermedad respiratoria sumamente contagiosa, que aparece en los meses fríos de invierno, y que con frecuencia va asociada a grandes brotes y epidemias. El virus de la gripe C rara vez provoca enfermedades de las vías respiratorias bajas y está más relacionado con enfermedades esporádicas de las vías respiratorias altas⁽⁷⁾.

La infección por el virus de la gripe causa un estado febril repentino, acompañado de faringitis, laringitis, espasmo laríngeo, bronquitis / traqueobronquitis, así como bronquitis, gripe y neumonía. Los ancianos y los jóvenes presentan cierto riesgo de infecciones graves con posibilidad de complicaciones pulmonares y cardíacas⁽⁸⁾.

El método clásico para el diagnóstico de los virus de la gripe es el aislamiento en líneas celulares de PMK, A549 o MDCK, así como en huevos de gallina fecundados. El ECP aparece en los 3-7 días siguientes a la inoculación como vacuolización y degradación celular⁽⁹⁾.

Parainfluenza 1, 2 y 3

Los virus de la parainfluenza, junto con el VRS, son los principales virus respiratorios en lactantes y niños. En niños de más edad y en adultos, la enfermedad puede ser asintomática o presentar síntomas parecidos a los del resfriado común.

Se han identificado cuatro tipos de virus de la parainfluenza. Los tipos 1 y 2 son los principales responsables del espasmo laríngeo, que es especialmente grave en los niños de edades entre 2 y 4 años. Aunque el virus de la parainfluenza 3 también puede causar espasmo laríngeo, está más asociado a la bronquiolitis y a la neumonía en lactantes (las infecciones más graves afectan a niños menores de 1 año de edad). El virus de la parainfluenza 4 está relacionado con infecciones leves de las vías respiratorias altas en niños y adultos^(7,12).

El virus de la parainfluenza crece en líneas celulares de PMK, LLC-MK2 y HEK. También son fácilmente cultivables en Vero, A549 y en fibroblastos diploides humanos. El ECP aparece en los 4-7 días siguientes a la inoculación y se observa como un aumento de pequeñas células redondas para el tipo 1, una formación de células sincitiales para el tipo 2, y bordes fibrosos para el tipo 3^(9,10).

La confirmación por cultivo celular se consigue normalmente utilizando eritrocitos de cobaya. No obstante, la inmunofluorescencia (IF) con anticuerpos es un método rápido y barato, específico por el tipo. Se demostró que la IF funciona mejor para la detección directa en células respiratorias epiteliales.

Virus respiratorio sincitial

El VRS es la principal causa de infecciones de las vías respiratorias bajas en lactantes y niños. La infección suele provocar bronquitis / traqueobronquitis, pero también puede causar espasmo laríngeo, resfriado y neumonía. En adultos y en niños de más edad, la infección suele ser asintomática o se manifiesta como un simple resfriado. Tiene brotes estacionales que empiezan en noviembre o diciembre y que se prolongan durante aproximadamente 3 meses⁽¹⁴⁾.

La detección directa (mediante IF o EIA) es el método de elección más aceptado. No obstante, la confirmación por cultivo puede utilizarse tanto aisladamente como de forma complementaria para los resultados de detección directa. Para el aislamiento primario del virus, las líneas celulares HEp-2, HeLa son las mejores; sin embargo, también se han utilizado Vero, LLC-MK2 y CV-1. El virus produce un ECP característico con formación de sincitio y destrucción celular. La IF es el método de elección como inmunorreactivo de confirmación^(15,16).

Principio del ensayo

El kit **Biotrin Respiratory Viral Panel** utiliza la técnica de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta para la detección de los 7 virus respiratorios principales en cultivos de tejidos infectados, así como tampones de muestras con metododirecto. Se utiliza un reactivo de detección antivírica para confirmar la presencia del virus respiratorio. La identificación específica del virus se logra entonces utilizando anticuerpos monoclonales anti-adenovirus, anti-influenza A y B, anti- parainfluenza 1, 2 y 3 y anti-VRS.

Las muestras fijadas de los pacientes se incuban con el anticuerpo monoclonal antivírico de ratón en un portaobjetos de vidrio. Si el antígeno del virus específico se encuentra presente en la muestra, se forma un complejo estable con el anticuerpo. Tras la fase de lavado, se añade un conjugado de IgG de cabra anti-IgG de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) que se une al complejo antígeno-anticuerpo. Los reactivos que no se unen se eliminan en otra fase de lavado, visualizándose entonces la muestra a través de un microscopio de fluorescencia.

La reacción positiva se caracteriza por una fluorescencia verde brillante. Las células no infectadas se vuelven de un color rojo pálido debido a la presencia de la tinción de contraste con azul de Evans presente en el conjugado FITC.

Componentes del kit

Materiales suministrados

1. **Portaobjetos con antígeno de control:**

PORTAOBJETOS

5 portaobjetos con de antígeno de control, de 8 pocillos cada una (Cat. N° V4RVPS). Cada portaobjetos consta de un control positivo infectado por: adenovirus, influenza A y B, parainfluenza 1, 2 y 3 y VRS. El pocillo de control negativo contiene células no infectadas.

2. **Anticuerpos monoclonales**:**

CONTROL	+	A
---------	---	---

1 vial de 1 ml que contiene anticuerpos monoclonales anti-adenovirus

CONTROL	+	IA
---------	---	----

1 vial de 1 ml que contiene anticuerpos monoclonales anti-influenza A

CONTROL	+	IB
---------	---	----

1 vial de 1 ml que contiene anticuerpos monoclonales anti-influenza B

CONTROL	+	P1
---------	---	----

1 vial de 1 ml que contiene anticuerpos monoclonales anti-parainfluenza 1

CONTROL	+	P2
---------	---	----

1 vial de 1 ml que contiene anticuerpos monoclonales anti-parainfluenza 2

CONTROL + P3

1 vial de 1 ml que contiene anticuerpos monoclonales anti-parainfluenza 3

CONTROL + R

1 vial de 1 ml que contiene anticuerpos monoclonales anti-VRS

3. **Reactivo de detección antivírico**

DETECCIÓN +

1 vial de 5 ml de un conjunto de anticuerpos monoclonales agrupados dirigidos contra: adenovirus, influenza A y B, parainfluenza 1, 2 y 3 y VRS

4. **Control Negativo:**

CONTROL - IgG

1 vial de 5 ml de anticuerpo de ratón no inmune para ser utilizado como control negativo.

5. **Conjugado anti IgG de ratón marcado con FITC **:**

CONJ IgG

2 viales de 5 ml de anticuerpo IgG de cabra anti-IgG de ratón a conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC)

6. **Medio de montaje**:**

MM

1 vial de 5 ml en Tampón Tris – glicerol que contiene intensificador de fluorescencia y azida sódica como conservante.

7. **Concentrado de tampón de lavado (PBS)**:**

BUF WASH CONC

1 vial sobre de sales de suero salino con tampón fosfato para reconstituir con 1 litro de agua destilada. Se guarda en un recipiente limpio y cerrado, a temperatura ambiente.

8. **Tween 20:**

TWEEN

1 vial de 5 ml de Tween 20 (monolaurato de polioxietileno sorbitán) que contiene azida de sodio (NaN₃), concentrado para diluir 1:100 en PBS.

9. **Instrucciones:**

INS

Instrucciones de uso.

** La azida sódica (presente en el conjugado, anticuerpos monoclonales, tampón de lavado y líquido de montaje) es un material potencialmente peligroso. Puede reaccionar con plomo o cobre, lo que produciría azidas metálicas potencialmente explosivas. Cuando se desechen estos productos, debe aclararse con abundante agua para evitar la acumulación de azida.

Materiales necesarios, no suministrados

- Cultivo celular para el aislamiento de virus respiratorios: todos los laboratorios deben mantener una reserva de células viables que en condiciones adecuadas permitan la replicación eficaz de los virus respiratorios a partir de muestras procesadas de pacientes. Estas células deberán ser inspeccionadas periódicamente para determinar su capacidad de permitir el crecimiento de virus respiratorios. Las líneas celulares más utilizadas son: MDCK, LLC-MK2, A549, HEp-2 y fibroblastos diploides (W138, HNF, MRC-5).
- Medio de transporte para el virus (MTV) que no sea inhibidor de los virus respiratorios y de las células de cultivo de tejidos, adenovirus, influenza A y B, parainfluenza 1, 2 y 3 y VRS utilizados por la estabilización del virus. Solución de sal equilibrada de Hank que contenga antibióticos y estabilizadores proteicos en un medio adecuado.

Nota: no debe utilizarse como estabilizador proteico sueros de animales que no sean suero fetal bovino precalostrado para evitar la interferencia de anticuerpos inherentes a los sueros de animales).

- Medio de mantenimiento del cultivo de tejido. El RPMI o el medio esencial mínimo de eagles con la cantidad adecuada de suero fetal bovino precalostrado son ideales para el mantenimiento tras la infección vírica.
- Tubos de cultivo de tejido estéril, viales pequeños y placas con varios pocillos.
- Hisopos estériles (algodón o dracón) que no sean inhibidores de los virus respiratorios y de las células de cultivo de los tejidos.
- Viales para el transporte y la recogida de las muestras
- Pipetas Pasteur estériles o pipetas de precisión y puntas desechables.
- Pipetas graduadas de 1 ml, 5 ml y 10 ml.
- Pinzas de punta fina.
- Microesferas de vidrio estériles (1-3 mm de diámetro)
- Agua desionizada o destilada de alta calidad
- Solución de hipoclorito sódico (0,05 %).
- Acetona 99,5 %.
[NOTA: la acetona es higroscópica y debe guardarse en un frasco cerrado herméticamente. La acetona contaminada con agua puede provocar una apariencia turbia del sustrato en las pruebas de fluorescencia.]
- Portaobjetos de vidrio (preferentemente con 2 y 8 pocillos para la detección y la identificación) lavados con acetona y limpios.
- Cubreobjetos de vidrio de grosor nº 1 (22x50mm)
- Cámara húmeda para la incubación de los portaobjetos (35-37°C)
- Microscopio de fluorescencia con combinación de filtros adecuados para FITC (pico de excitación = 490 nm, pico de emisión = 520 nm)
- Vórtex u homogeneizador ultrasónico
- Centrífuga
- Cronómetro
- Frasco para distribuir la solución de lavado
- Incubadora con reóstato para el ajuste de la temperatura (35-37°C)

Precauciones

Seguridad

- Únicamente para uso diagnóstico *in vitro*.
- Este kit está destinado a su uso por personal cualificado del laboratorio.
- Conjugados, anticuerpos monoclonales, tampón de lavado y medio de montaje contienen azida sódica como conservante, que puede formar componentes metálicos explosivos en tubos de cobre o plomo. Para su eliminación, el reactivo debe aclararse con agua abundante para evitar la acumulación de azida.
- El conjugado anti-IgG de ratón contiene azul de Evans, que es potencialmente cancerígeno. En caso de contacto con la piel, lávela con abundante agua inmediatamente.
- La acetona es muy inflamable y perjudicial si se ingiere o inhala. Manténgala alejada de fuentes de calor, chispas o llamas. Evite respirar el vapor. Ventile adecuadamente.
- Aunque los portaobjetos con antígeno de control se hayan inactivado, deberán manipularse y eliminarse como se haría con otros productos que puedan ser infecciosos.
- Deseche todas las muestras clínicas, el material infectado o potencialmente infectado según las normas de buena práctica de laboratorio. Todos estos materiales deberán manipularse y eliminarse como si fuesen potencialmente infecciosos.
- No pipetee materiales con la boca ni coma o beba nunca en la mesa de trabajo del laboratorio.
- Solamente personal con experiencia debe llevar a cabo los procedimientos de cultivo de los tejidos.
- Los restos de sustancias químicas, preparaciones y componentes del equipo se considerarán en términos generales como materiales peligrosos. Todos estos materiales se eliminarán conforme a las normas de seguridad establecidas.
- Utilice material y ropa de protección, guantes desechables de látex y protección para los ojos cuando manipule las muestras y lleve a cabo los ensayos. Lávese bien las manos al acabar.

Procedimientos

- No utilice los kits ni ninguno de sus componentes después de la fecha de caducidad.
- La modificación del protocolo proporcionado puede dar lugar a resultados erróneos.
- No mezcle ni sustituya los reactivos de números de lote distintos.
- No sustituya por reactivos de otros fabricantes.
- El agrupamiento o la dilución de conjugados o anticuerpos monoclonales pueden dar lugar a resultados erróneos.
- Evite dejar los reactivos a más de 4°C por un período prolongado.
- Evite dejar los reactivos expuestos a la luz solar durante su conservación o incubación.

- El control negativo (anticuerpo de ratón normal) se analizará en cada aislado de cultivo celular. La presencia de fluorescencia indica una reacción inespecífica por lo que la prueba no deberá considerarse válida.
- No deje que los portaobjetos se sequen durante ninguna de las fases del procedimiento de tinción.
- Cuando se colorean varias muestras en un mismo portaobjetos, evite la contaminación cruzada entre ellos.
- Para la preparación de los reactivos, utilice siempre materiales de vidrio limpios y preferiblemente desechables.

Conservación y estabilidad

- El kit se mantendrá estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta de la caja siempre que se conserve a 2-8°C. No lo congele ni exponga a temperaturas elevadas. Pasada la fecha de caducidad, deseche cualquier resto de reactivos.
- El conjugado y los anticuerpos monoclonales se mantendrán estables durante 12 meses siempre que se conserven protegidos de la luz y a 4°C.
- El PBS deberá guardarse en un frasco limpio, cerrado y a temperatura ambiente.
- Durante la incubación, los portaobjetos deberán protegerse de la luz y dejarse en una cámara húmeda.
- La acetona es higroscópica y deberá guardarse en un frasco sellado herméticamente.

Recogida y preparación de las muestras

La recogida, el transporte y la preparación correctos de las muestras son fundamentales para el éxito del diagnóstico en el laboratorio. La posibilidad de aislar el virus es mayor cuando la muestra se recoge en cuanto aparecen los primeros síntomas (3-7 días). Según el tipo de síndrome respiratorio que sufra el paciente, podrán recogerse diferentes muestras.

Muestras de elección

Infecciones de las vías respiratorias altas

Resfriado: Lavado nasal y aspirados (normalmente muestran títulos altos) pero una muestra con hisopo nasofaríngeo también es aceptable.

Faringitis: Pueden recogerse muestras con hisopos nasofaríngeos o aspirados (sobre todo si los síntomas nasales son notables). En caso de faringitis notable, es preferible un lavado de garganta o hisopos.

Laringitis: Pueden recogerse muestras con hisopos o aspirados nasofaríngeos.

Espasmo laríngeo /laringotraqueobronquitis:
La muestra preferible es el aspirado nasofaríngeo.

Infecciones de las vías respiratorias bajas

Bronquitis/traqueobronquitis: La muestra preferible es el aspirado nasofaríngeo.

Bronqueolitis: La muestra preferible es el aspirado nasofaríngeo.

Tosferina como síndrome: Pueden recogerse muestras con hisopos o aspirados nasofaríngeos.

Influenza/Síndrome : Pueden recogerse muestras con hisopos o aspirados nasofaríngeos.

Neumonía: Pueden recogerse muestras con hisopos nasofaríngeos o de garganta.

Recogida de las muestras

Hisopos nasofaríngeos:

Introduzca un hisopo seco dentro de una o las dos fosas nasales hasta la zona nasofaríngea (un hisopo para cada fosa nasal puede aumentar el volumen de la muestra). Deje que el hisopo absorba las secreciones durante algunos segundos, gírelo con cuidado y retírelo. Coloque el hisopo en 1 ó 2 ml de medio de transporte de virus (MTV) , rompa la funda y precinte el tubo.

Hisopos de la garganta:

Humedezca un hisopo en PBS estéril o MTV y frote con cuidado las amígdalas y la parte posterior de la faringe. Coloque el hisopo en 1 ó 2 ml de MTV y precinte el tubo.

Lavados de garganta:

El paciente deberá hacer gárgaras con 3 ó 5 ml de PBS, que se recogerán en un recipiente estéril con 1 ó 2 ml de MTV, que se precintará.

Lavados nasales:

Pase 2-3 ml de PBS estéril por ambas fosas nasales con el paciente con la cabeza inclinada para atrás. El paciente levantará la cabeza y el lavado se recogerá en un recipiente estéril con MTV, que se precintará.

Lavado nasofaríngeo:

Aspire 3-7 ml de PBS estéril con una pera de goma blanda. Coloque al paciente de lado y con cuidado tape una de las fosas nasales con el dedo. Utilice la punta de la pera de manera que pueda tapar la otra fosa nasal totalmente y vierta el PBS dentro de la nariz y luego aspirelo inmediatamente. Ponga las secreciones en un recipiente estéril con 1 ó 2 ml de MTVM, y precíntelo.

Aspirados nasofaríngeos:

Se conecta una sonda de alimentación de plástico, nº 8 French, a través de una trampilla que contiene una válvula junta a una bomba eléctrica de succión. Introduzca la sonda estéril en ambas fosas nasales hasta llegar a la parte posterior de la nariz. Aplique la succión intermitentemente a medida que vaya retirando la sonda lentamente. El proceso puede repetirse una vez en cada fosa nasal para obtener 0,2-0,8 ml de secreción. La secreción obtenida se traslada a un recipiente con 1 ó 2 ml de MTV, que se precintará.

Transporte y conservación de las muestras

Tras la recogida, deberán transportarse inmediatamente todas las muestras al laboratorio y en baño de hielo. Muchos virus respiratorios se muestran inestables y sensibles a congelaciones y descongelaciones repetidas. Por consiguiente, las muestras deben mantenerse a 2-8°C antes de la inoculación. En caso de que las muestras no puedan procesarse en el plazo de 72 horas, se recomienda congelarlas a -70°C o menos. Una congelación rápida en acetona en baño de hielo seco permite mantener la infección vírica. No obstante, la congelación de las muestras reduce considerablemente la posibilidad de aislamiento.

Preparación de las muestras

- Para separar las células existentes en las fibras del hisopo, éste deberá girarse en cuanto se sumerja en el medio. Los hisopos se desecharán en una solución de hipoclorito sódico.
- Para aumentar la recuperación de células, añada unas cuantas microesferas de vidrio a la muestra y mezcle en Vórtex sonicar u homogenice en ultrasonidos (8-12 kciclos/seg) durante 1 minuto.
- Centrifugue a 2000 g durante 10 minutos para eliminar contaminantes y los residuos bacterianos. El sobrenadante deberá utilizarse como material de inoculación.

Procesamiento de las muestras para el examen directo

Si las muestras van a utilizarse para el examen directo y el cultivo celular, deberá eliminarse la mitad de las células con un centrifugado de 300 a 500 g y utilizarlas con el procedimiento a seguir. El sobrenadante y las células restantes de la muestra deberán utilizarse en el procedimiento “Aislamiento y Fijación del cultivo celular”.

1. Retire el material del recipiente original y colóquelo en un tubo de centrifugado estéril de 10-15 ml.
2. Añada 4 ml de solución fisiológica en tampón fosfato (PBS) y mezcle.
3. Centrifugue las muestras a 300-500 g durante 10 minutos a 2-8°C.
4. Recoja el sobrenadante para utilizarlo en los procedimientos de aislamiento.
[Nota: consulte las instrucciones completas en el apartado “Aislamiento y Fijación del cultivo celular”]
5. Lave el centrifugado añadiendo 4-8 ml de PBS y mediante la resuspensión cuidadosa de las células.
6. Centrifugue a 300-500 g durante 10 minutos a 2-8°C.
7. En caso de presencia de moco, éste formará una capa turbia sobre el centrifugado. Retirar el sobrenadante y el moco con cuidado con una pipeta Pasteur. Si persiste la presencia de moco, repita los pasos 6 a 8 hasta conseguir eliminar todo el moco
8. Resuspenda las células en 0,1-0,2 ml de PBS hasta conseguir una suspensión turbia. Una suspensión excesivamente densa es difícil de leer y reduce la calidad del portaobjetos. Las suspensiones celulares que no contienen suficientes células llevan a una pérdida de sensibilidad. La extensión debe contener como mínimo 2 células epiteliales por campo de 250x.
9. Ponga una gota de suspensión celular en los pocillos previstos del portaobjetos previamente limpiado. . Deje secar el portaobjetos al aire.
10. Fije los portaobjetos en acetona (2-8°C) durante 10 minutos. No deje que la acetona se contamine con agua y sales. Esto puede producir una coloración turbia.
11. Tras la fijación, deje secar los portaobjetos al aire. Aplique la tinción a los portaobjetos lo antes posible. En caso de que fuera necesario almacenarlos, ponga los portaobjetos en un recipiente secante a -20°C. Los portaobjetos así almacenados podrán guardarse durante 1 año. Los portaobjetos se guardarán en recipientes al vacío para evitar la penetración de humedad.
12. Vaya a la sección “Selección de la muestra” (véase la página 15).

Aislamiento y fijación de los cultivos celulares

1. Examine los cultivos celulares inmediatamente antes de proceder a la inoculación para garantizar una buena viabilidad y morfología celular.
2. Retire el medio antiguo del cultivo celular con la ayuda de una pipeta estéril y vuelva aplicar en la capa el medio de cultivo de mantenimiento. Añada como mínimo 2 ml de medio fresco a los tubos de cultivo (16x125 mm) o 1 ml de medio a los viales.
3. Añada 0,2-0,5 ml de muestra a cada frasco e incúbelos durante 60 minutos a 35-37°C. Se recomienda inocular las muestras por duplicado.
[NOTA: la adsorción del virus de la muestra y/o el centrifugado a baja velocidad puede potenciar el aislamiento de algunos virus y provocar la aparición del ECP en sólo 48 horas.]
4. Para garantizar la sensibilidad de la infección y el ECP pertinente, puede utilizarse una cepa de virus representativa (comercial) para inocular la línea celular. Tras el período de inoculación, cubra las células con el medio de mantenimiento fresco e incube en reposo a 35-37°C.
5. El medio de cultivo deberá renovarse cada 3 ó 4 días para aumentar la formación de ECP.
6. Examine diariamente el ECP de las células.
7. Cuando se observe el ECP, fije las células (como se indica a continuación) en la preparación para la confirmación de la coloración.
8. Aspire el medio de cultivo con la ayuda de una pipeta estéril y colóquelo en un tubo estéril.
9. Lave las células 3 veces con 1-2 ml de solución de Hank. Deseche los lavados en solución de hipoclorito sódico.
10. Añada 1/10 de volumen de cultivo de tripsina (0,05%) sódica-EDTA (0,53 mM) y deje reposar durante 30 segundos.
11. Golpee con suavidad el vaso de cultivo para desprender las células.
12. Añada un medio fresco suficiente para recuperar el volumen original.
13. Centrifugue a 200-500 g durante 7-10 minutos.
14. Resuspenda el centrifugado con algunas gotas de PSB estéril para obtener una suspensión relativamente densa (aprox. 2×10^6 cel/ml).
15. Coloque la suspensión de células en como mínimo un portaobjetos de selección (con 2 cavidades) y un portaobjetos de identificación (con 8 pocillos) y déjela secar en una estufa de convección (30-35°C) o a séquelo rápidamente a temperatura ambiente. [Nota: se recomiendan pocillos de 5 mm de diámetro]
16. Fije los portaobjetos en acetona (-4°C) durante 10 minutos y séquelas bien.
17. Guarde los portaobjetos no utilizados con secante a -20°C.

Procedimiento del ensayo

- **Preparación de los reactivos**

Preparación del Tampón de Lavado (PBST):

1. Disuelva el contenido del sobre de PBS en 990 ml de agua destilada.
2. Añada 5 ml de Tween 20/azida sódica (100x concentrado) a 495 ml de esta solución y mézclelos [Nota: la solución de PBS restante deberá desecharse].
3. Traslade a un recipiente limpio, identificado y herméticamente cerrado.

Todos los demás reactivos están **listos para el uso** en la dilución de trabajo.









BIOTRIN Respiratory Virus Panel	Neg	AD	IA	IB
				
				
	P1	P2	P3	RSV

Figura 1. Ejemplo de portaobjetos de los antígenos de control

- **Selección de las muestras**

1. Saque los portaobjetos de las muestras (con 2 pocillos) y uno de los antígenos control del embalaje y déjelos reposar a temperatura ambiente.
2. Añada 1 gota (40µl) de reactivo de detección antivírico a un pocillo del portaobjetos de detección de las muestras y a cada pocillo del portaobjetos del antígeno de control. [NOTA: el reactivo de detección antivírico se utilizará para determinar la presencia de adenovirus, influenza A y B, parainfluenza 1, 2 y 3 o VRS].
3. Añada 1 gota (40µl) de anticuerpo de ratón normal al segundo pocillo del portaobjetos de detección de las muestras y al pocillo negativo del portaobjetos del antígeno de control. [NOTA: este control negativo permite detectar cualquier fluorescencia no específica].
4. Incube las muestras y los portaobjetos de control durante 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda.
5. Lave bien los portaobjetos con tampón de lavado durante 10-15 segundos. Retire el exceso de tampón de los portaobjetos y seque entre los pocillos.
6. Añada 1 gota (40µl) de conjugado anti-IgG de ratón marcado con FITC en cada pocillo de los portaobjetos de las muestras y de los controles.
7. Incube las muestras y los portaobjetos de control durante 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda.
8. Enjuague bien los portaobjetos con tampón de lavado durante 10-15 segundos. Retire el exceso de tampón de lavado de los portaobjetos y seque entre los pocillos.
9. Monte los portaobjetos utilizando los cubreobjetos y el medio de montaje. Retire el exceso de medio de los portaobjetos.

10. Examine los portaobjetos en el microscopio de fluorescencia a 100-200x. Los detalles pueden verse a 400x [NOTA: el portaobjetos de control debe ser examinada primero para comprobar la correcta coloración].
11. En caso de que el portaobjetos de muestras sea negativa, se notificará “no se observaron virus”. Pase a la fase 12 para todas las muestras positivas.

Identificación del virus

1. Saque los portaobjetos de identificación (8 pocillos) correspondientes a cada muestra positiva y un portaobjetos de antígeno de control. Deje que los portaobjetos alcancen la temperatura ambiente.
2. Añada 1 gota (40µl) de cada anticuerpo monoclonal a cada pocillo del portaobjetos de identificación de la muestra.
3. Añada 1 gota (40µl) de cada anticuerpo monoclonal a cada pocillo del portaobjetos de identificación de la muestra.
4. Añada 1 gota (40µl) de Control Negativo a un pocillo separado del portaobjetos de identificación de la muestra y al pocillo negativo del portaobjetos del antígeno de control.
5. Incube las muestras y los portaobjetos de control durante 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda.
6. Lave bien los portaobjetos con tampón de lavado durante 10-15 segundos. Retire el exceso de tampón de los portaobjetos y seque entre los pocillos.
7. Añada 1 gota (40µl) de conjugado anti-IgG de ratón marcado con FITC en cada pocillo de los portaobjetos de detección de las la muestras y de los controles.
8. Incube las muestras y los portaobjetos de control durante 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda.
9. Enjuague bien los portaobjetos con el tampón de lavado durante 10-15 segundos. Retire el exceso de tampón de los portaobjetos y seque entre las cavidades.
10. Monte los portaobjetos utilizando los cubreobjetos y el medio de montaje. Retire el exceso de medio de los portaobjetos [NOTA: los portaobjetos pueden guardarse protegidos de la luz, en un recipiente al vacío a 2-8°C durante un máximo de 24 horas sin que se produzca una pérdida significativa de fluorescencia. Se recomienda la observación inmediata tras la coloración. Para períodos de conservación más largos, guarde los portaobjetos a -20°C en un recipiente al vacío].

Interpretación de los resultados

A continuación se describen los modelos de coloración exhibidos para los virus infecciosos. El tipo de coloración encontrado en el portaobjetos dependerá de los virus existentes y reflejará su tipo de crecimiento.

Adenovirus

Fluorescencia verde brillante en el núcleo, en el citoplasma o en ambos. La coloración nuclear es uniformemente brillante pero poco definida. La coloración citoplasmática es normalmente punteada.

Influenza A y B

Fluorescencia verde brillante en el núcleo, en el citoplasma o en ambos. La coloración nuclear es uniformemente brillante pero poco definida. La coloración citoplasmática es normalmente punteada con grandes inclusiones.

Parainfluenza 1, 2 y 3

Fluorescencia verde brillante solamente en el citoplasma. La coloración citoplasmática es normalmente punteada con inclusiones irregulares.

Virus respiratorio sincitial

Fluorescencia verde brillante en el citoplasma y asociada con sincitio. La coloración citoplasmática es normalmente punteada con pequeñas inclusiones.

Células negativas

Las células coloreadas presentan un color rojo pálido en el citoplasma y un castaño oscuro, casi negro, en el núcleo. La coloración de esas células se debe a la presencia del contraste Azul de Evans.

Se recomienda examinar primero las células negativas para establecer la inexistencia de coloración de fondo fluorescente.

La muestra se considerará positiva para la presencia de un virus si se observan por lo menos 2 células o más con fluorescencia verde brillante en un campo observado a 400x.

El control positivo debe presentar células con fluorescencia en el núcleo, en el citoplasma o en ambos, según la fase de crecimiento. El control negativo debe presentar una coloración roja pálida causada por la presencia del contraste Azul de Evans.

[NOTA: no tenga en cuenta la coloración fluorescente de fragmentos de células ya que puede deberse a la unión del conjugado con estos residuos. Si el portaobjetos de selección presenta un resultado positivo y el portaobjetos de identificación presenta un resultado negativo, deberá repetirse la prueba para confirmar los resultados].

Valores previstos

Los valores de aislamiento e identificación varían según la localización geográfica, la edad de la población, la estación del año (algunos virus son estacionales), los factores socio-económicos, la manipulación de la muestra y el tipo de sistema de detección utilizado.

Para el período de septiembre a julio (1991-1992), se obtuvieron los siguientes resultados*:

Virus respiratorio	Detección (muestra nº)	Porcentaje de detección
Adenovirus	43/646	6,7 %
Influenza A	11/646	1,7 %
Influenza B	4/646	0,6 %
Parainfluenza 1	11/646	1,7 %
Parainfluenza 2	5/646	0,8 %
Parainfluenza 3	28/646	4,3 %
VRS	66/646	10,2 %

*Las definiciones para las estimaciones incluyen hospitales, hospitales pediátricos, universidades y laboratorios de referencia de EE.UU.

Limitaciones de uso

- Para que la prueba sea considerada válida, se analizarán los controles positivo y negativo en cada muestra, que deben presentar la coloración adecuada. (NOTA: hay disponibles portaobjetos de control adicionales – Cat nº V4R/PS (5 por caja)
- Un resultado negativo no excluye la presencia de los virus adenovirus, influenza A y B, parainfluenza 1, 2 y 3 y VRS. Los resultados deben interpretarse conjuntamente con la información clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico. El fallo en la detección del virus puede deberse a factores tales como una recogida incorrecta de la muestra, una técnica de cultivo incorrecta, el uso de una línea celular inadecuada o la temperatura durante el aislamiento. Todos los resultados negativos deben notificarse como "no se observaron virus".
- Los anticuerpos monoclonales de este kit son específicos para el adenovirus y el VRS y, por tanto, no deben utilizarse para la diferenciación del tipo.

Las muestras contaminadas por *Staphylococcus aureus* pueden presentar una fluorescencia amarilla verdosa debido a la presencia de grandes cantidades de proteína A. La fluorescencia es el resultado de la unión inespecífica de la proteína A a los fragmentos Fc de los anticuerpos.

Características de las Prestaciones

- *Comparación clínica de confirmación por Cultivo Celular*

Se obtuvieron los siguientes resultados cuando se procedió a la confirmación por cultivo celular en las muestras respiratorias (se analizaron un total de 646 muestras):

ANTICUERPOS MONOCLONALES	Adeno	VRS	Infl A	Infl B	Para 1	Para 2	Para 3
Total positivos	43	66	11	4	11	5	28
% Sensibilidad	97.7	100	100	100	100	100	100
% Especificidad	100	100	100	100	100	100	100
% Valor predictivo (+)	100	100	100	100	100	100	100
% Valor predictivo (-)	99.8	100	100	100	100	100	100

Se obtuvieron los siguientes resultados cuando se procedió a la confirmación por cultivo celular en las muestras respiratorias congeladas (se analizaron un total de 151 muestras):

ANTICUERPOS MONOCLONALES	Adeno	VRS	Infl A	Infl B	Para 1	Para 2	Para 3
Total positivos	7	3	30	36	33	5	16
% Sensibilidad	100	100	100	100	100	100	100
% Especificidad	100	100	100	100	100	100	100
% Valor predictivo (+)	100	100	100	100	100	100	100
% Valor predictivo (-)	100	100	100	100	100	100	100

- *Reacción cruzada*

Se obtuvieron los siguientes resultados a partir de los estudios de detección de virus y bacterias con cada anticuerpo monoclonal.

ANTICUERPOS MONOCLONALES	Adeno	VRS	Infl A	Infl B	Para 1	Para 2	Para 3
Adenovirus	+	-	-	-	-	-	-
Coronavirus	-	-	-	-	-	-	-
Coxsackievirus	-	-	-	-	-	-	-
Virus Echo	-	-	-	-	-	-	-
Herpes virus	-	-	-	-	-	-	-
Virus de la influenza de tipo A	-	-	+	-	-	-	-
Virus de la influenza de tipo B	-	-	-	+	-	-	-
Virus del sarampión	-	-	-	-	-	-	-
Virus de la parotiditis	-	-	-	-	-	-	-
Parainfluenza de tipo 1	-	-	-	-	+	-	-
Parainfluenza de tipo 2	-	-	-	-	-	+	-
Parainfluenza de tipo 3	-	-	-	-	-	-	+
Rinovirus	-	-	-	-	-	-	-
Virus de los simios	-	-	-	-	-	-	-
VRS	-	+	-	-	-	-	-
Acholeplasma laidlawii	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella pertussis	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	-	-	-	-	-
Branhamella catarrhais	-	-	-	-	-	-	-
Chlamydia trachomatis	-	-	-	-	-	-	-
Corynebacterium diphteriae	-	-	-	-	-	-	-
Legionella pneumophila	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium avium	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium intracellulare	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium tuberculosis	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma fermentaris	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma hominis	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma orale	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae	-	-	-	-	-	-	-
Naisseria meningitidis	-	-	-	-	-	-	-
Ureaplasma urealyticum	-	-	-	-	-	-	-

Controles de células huésped	Todos los anticuerpos monoclonales resultaron negativos frente a las siguientes células de control
Adenovirus	pHEK, HEp-2, NCI-H292, RD, HLF, HeLa & A549 células de control
Poliomavirus	PMK células de control
Enterovirus	RD & HLF células de control
Paramixovirus	HEp-2, Vero & células de control

Resumen del procedimiento del Respiratory Virus Panel

Nota importante: lea el manual de instrucciones completo antes de iniciar el ensayo. Este resumen es sólo una guía rápida.

Detección de la muestra

Añada 1 gota (40µl) de reactivo de detección antivírico a un pocillo del portaobjetos de detección de las muestras y a cada pocillo del portaobjetos del antígeno de control.



Añada 1 gota (40µl) de anticuerpo de ratón normal a un segundo pocillo del portaobjetos de detección de la muestra y al pocillo negativo del portaobjetos del antígeno de control



Incube durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.



Enjuague bien los portaobjetos.



Añada 1 gota (40µl) de conjugado anti-IgG de ratón marcado con FITC



Incube los portaobjetos durante 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda.



Enjuague bien los portaobjetos.



Monte los portaobjetos con un medio de montaje y cubreobjetos



Examine los portaobjetos en un microscopio de fluorescencia.



Identificación del virus para las muestras positivas en la detección mencionada arriba (véase la página siguiente)

Resumen del procedimiento del Respiratory Virus Panel

Nota importante: lea el manual de instrucciones completo antes de iniciar el ensayo.
Este resumen es sólo una guía rápida.

Identificación del Virus

Añada 1 gota (40µl) de cada anticuerpo monoclonal a cada pocillo del portaobjetos de identificación de la muestra.



Añada 1 gota (40µl) de cada anticuerpo monoclonal al pocillo correspondiente del portaobjetos del antígeno de control.



Añada 1 gota (40µl) de anticuerpo de ratón normal a un pocillo separado del portaobjetos de identificación de la muestra y al pocillo negativo del portaobjetos del antígeno de control.



Incube los portaobjetos durante 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda.



Enjuague bien los portaobjetos.



Añada 1 gota (40µl) de conjugado anti-IgG de ratón marcado con FITC a todos los pocillos.



Incube los portaobjetos durante 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda.



Enjuague bien los portaobjetos.







Monte los portaobjetos con un medio de montaje y cubreobjetos



Examine los portaobjetos en un microscopio de fluorescencia.

Identificación de los símbolos

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro	IVD
Código de lote	LOT
Código de producto	REF
Límite de temperatura	
Fecha de caducidad	
Fabricante	
Posible riesgo biológico	

Otros productos Biotrin

Código n°:	Descripción	Formato del ensayo
V3HHV6	Human Herpesvirus 6 IgG IFA	4 portaobjetos x 10 pocillos
V17HHV6	Human Herpesvirus 6 IgM IFA	4 portaobjetos x 10 pocillos
V15HHV6	Human Herpesvirus 6 IgG EIA	96 pocillos EIA
V18HHV8	Human Herpesvirus 8 IgG IFA	6 portaobjetos x 10 pocillos EIA
V19HHV8	Human Herpesvirus 8 IgG EIA	96 pocillos EIA
V119IF	Parvo IgG & IgM IFA	6 portaobjetos x 10 pocillos
V519IG	Parvo IgG EIA	96 pocillos EIA
V619IM	Parvo IgM EIA	96 pocillos EIA
*V519IGUS	Parvo IgG EIA	96 pocillos EIA
*V619IMUS	Parvo IgM EIA	96 pocillos EIA

- Ensayos B19 de parvovirus autorizados por la FDA.

Bibliografía / Referencias

- 1. Wadell, G.** (1987) Adenoviruses. In principles and practice of clinical virology (Eds. Zuckerman et al) John Wiley and Sons Ltd.
- 2. Horowitz, M.S.** (1985) Adenovirus diseases. In Virology 9. (Eds. Fields B.N. et al.) Raven Press New York pp 477-495.
- 3. Hierholzer, J.** Adenoviruses. Ch. 86 In : Manual of Clinical Microbiology. 5th Ed. (Eds Balows et al). ASM Washington D.C. pp 896.
- 4. Bell J. et al** (1955) Pharyngoconjunctival fever. Epidemiological studies of a recently recognised disease entity. JAMA 175, pp1083-1092.
- 5. Kasel, J** (1980) Adenoviruses Ch. 9 In : Viral Rickettsial and Chlamydial Infections. American Publ. Health Assos. (Eds. Lennett, E. and Schmidt, N.)
- 6. Cooney, MK.** (1985) Adenoviruses. In Manual of Clinical Microbiology, 4th Ed. (Eds. Lennett, E. et al) American Society for Microbiology, Washington.
- 7. Harmon M.W. and Kendal A.P.** Influenza Viruses. Ch. 81 In : Manual of Clinical Microbiology. 5th Ed. (Eds Balows et al). ASM Washington pp868.
- 8. Glezen WP, Paredes A, Taber LH.** Influenza in children. Relationship to other respiratory agents. JAMA 1980; 243: 1345-1349.
- 9. Frank, A.L et al** (1979) Comparison of different tissue cultures for isolation and quantitation of influenza and parainfluenza viruses. J. Clin. Microbiol. 10
- 10. McIntosh, K and Chancock, R.M.** (1990) Parainfluenza viruses. Ch 35 In Fields Virology Vol. 1 (Eds Fields B.N and Knipes D.M). Raven Press New York, p 963.
- 11. McIntosh, K and Chancock, R.M.** (1990) Respiratory syncytial virus. Ch 38 In Fields Virology Vol. 1 (Eds Fields B.N and Knipes D.M). Raven Press New York, p 1045.
- 12. Zinsser Microbiology.** (Eds. Joklik W.K. et al) 19th Edn. Appleton & Lange.
- 13. Gardner, P.S. and McQuillin** (1980) Rapid Virus Diagnosis- applications of immunofluorescence. 2nd Ed. Butterworth and Co. Ltd. London.
- 14. Ahulwalia, G et al.** (1987) comparison of nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal swab specimens for respiratory syncytial virus diagnosis by cell culture, indirect immunofluorescence assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol 25:763-767.
- 15. Chernesky, M.A et al** (1982) Laboratory diagnosis of viral infections. Coordinating Ed. Drew E.L. American Society for Microbiology, Washington.
- 16. Hall, C.B.** (1985) Acute laryngotracheobronchitis and croup p. 360-364 in Principles and practice of infectious diseases. (Eds. Mandell G et al.). Wiley and Sons, Inc. New York.



Biotrin International Ltd.
93 The Rise, Mount Merrion
Co Dublin
Ireland
Tel: + 353 (01) 2831166
Fax: + 353 (01) 2831232
e-mail: info@biotrin.ie
www.biotrin.com