

No.: V4RVP
Kit Format: 150 TESTS



Kit per virus respiratori

Test di immunofluorescenza indiretta per lo screening e l'identificazione dell'adenovirus, del virus dell'influenza A e B, del virus della parainfluenza tipo 1, 2 e 3 e del virus respiratorio sinciziale (RSV).



	Indice
Finalità del test	3
Introduzione	3
Principio del test	6
Componenti del kit	6
Materiali forniti	6
Altri materiali necessari	8
Precauzioni	9
Sicurezza	9
Norme procedurali	9
Conservazione e stabilità	10
Raccolta e preparazione dei campioni	10
Procedimento operativo	15
Interpretazione dei risultati	17
Valori previsti	18
Limitazioni d'uso	18
Caratteristiche delle prestazioni	19
Riepilogo della procedura del kit per i virus respiratori	21
Interpretazione dei simboli	23
Altri prodotti Biotrin	24
Bibliografia / riferimenti	25

Finalità del test

Il kit per i virus respiratori Biotrin è un test di immunofluorescenza per uso diagnostico in vitro da utilizzare nello screening e nell'identificazione dell'adenovirus, del virus dell'influenza A, dell'influenza B, della parainfluenza 1, 2 e 3 e del virus respiratorio sinciziale (RSV) mediante rilevazione indiretta e in coltura cellulare.

Introduzione

Le infezioni respiratorie possono essere causate da oltre 200 virus, ma solo sette (adenovirus, influenza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3 e virus respiratorio sinciziale (RSV)), sono responsabili della maggior parte delle patologie gravi nei soggetti molto giovani ed immunodeficienti. Questi virus sono anche responsabili della significativa morbidità degli adulti sani nel corso di epidemie. Le infezioni nosocomiali con il virus dell'RSV e dell'influenza possono rivelarsi fatali nei bambini ospedalizzati e nei pazienti in terapia intensiva.

L'identificazione precoce dei virus respiratori è fondamentale per una diagnosi efficace e per stabilire il trattamento del paziente. I tre metodi più comuni di identificazione in laboratorio sono (a) la rilevazione diretta, (b) la conferma tramite coltura e (c) il reperto sierologico. Di questi metodi, la rilevazione diretta e la conferma tramite coltura cellulare sono le procedure standard utilizzate dalla maggior parte dei laboratori di virologia. Il kit per i virus respiratori Biotrin utilizza anticorpi monoclonali di alta qualità specifici diretti contro antigeni specifici per gruppo e per tipo per la rilevazione diretta e la conferma tramite coltura, e fornisce risultati chiari e di facile interpretazione entro 60 minuti.

Tabella 1: patologie stagionali causate dai virus respiratori

Virus	Periodo dell'anno
Adenovirus	Tutto l'anno
Influenza A	Mesi invernali
Influenza B	Mesi invernali
Parainfluenza 1	Tutto l'anno con picchi alla fine dell'estate / autunno
Parainfluenza 2	Tutto l'anno con picchi alla fine dell'estate / autunno
Parainfluenza 3	Tutto l'anno con picchi alla fine dell'estate / autunno
RSV	Da fine autunno ad inizio primavera

Adenovirus

Gli adenovirus umani sono associati ad un vasto gruppo di patologie cliniche, tra le quali le infezioni respiratorie, quelle oculari e quelle del tratto gastrointestinale. Le infezioni sono particolarmente comuni nei bambini e nei giovani, ed avvengono sia sporadicamente che con episodi epidemici. Nei soggetti immunocompromessi si possono verificare gravi infezioni sistemiche che possono rivelarsi fatali.

Particolari sierotipi di adenovirus sono associati a diverse forme cliniche. I tipi 15-24 e 37 possono provocare patologie oculari, che vanno da forme lievi, come le congiuntiviti "da piscina" dovute all'acqua clorata, a forme gravi di cheratocongiuntiviti epidemiche.

L'adenovirus è stato associato al 4-15% di tutti i casi nosocomiali di gastroenterite virale nei bambini; i tipi 40 e 41 sono responsabili della maggior parte di questi casi.^(1,2)

L'adenovirus è coinvolto nella maggior parte delle principali patologie respiratorie. Le patologie delle vie respiratorie superiori causate da adenovirus si verificano per lo più nei bambini e nei ragazzi e si manifestano con riniti, faringiti e tonsilliti. L'adenovirus è anche associato alle infezioni del tratto respiratorio inferiore che si manifestano con bronchiti e bronchioliti.⁽³⁾ Inoltre, l'adenovirus (tipi 38, 39 e 17) è associato al 5% circa delle infezioni respiratorie acute (ARD) nei bambini, e al 10% delle polmoniti febbrili ed infantili.⁽⁴⁾

Le diagnosi di laboratorio delle infezioni da adenovirus hanno un ruolo importante nel trattamento efficace del paziente e nel controllo degli episodi epidemici. La coltura cellulare è il metodo convenzionale per identificare l'adenovirus, che può essere coltivato e isolato in numerose linee cellulari, ed identificato con vari metodi. Le linee cellulari idonee sono HEP-2, HeLa, KB e HEK. L'effetto citopatico (CPE) è normalmente formato dai gruppi di cellule a "grappolo" che compaiono entro 3-10 giorni. Tale effetto citopatico viene poi confermato dall'immunofluorescenza, dai test immunoenzimatici (EIA) o dall'ibridizzazione del DNA. Anche la microscopia elettronica delle feci è un metodo diagnostico standard di rilevazione dell'adenovirus, tuttavia queste attrezzature sono disponibili solamente nei laboratori specializzati.^(5,6)

Influenza A e B

Vi sono tre tipi di virus influenzali: i tipi A, B e C. L'influenza A e l'influenza B sono responsabili di una patologia respiratoria altamente contagiosa che si verifica durante i mesi invernali e sono spesso associate ad episodi epidemici. L'influenza C provoca raramente patologie del tratto respiratorio inferiore ed è più comunemente associata a sporadiche patologie del tratto respiratorio superiore.⁽⁷⁾

L'infezione da virus influenzale provoca un improvviso stato febbrile ed è associata a faringite, laringite, laringite difterica, bronchite o tracheobronchite, come pure a bronchite, influenza e polmonite. I giovani e gli anziani sono parzialmente a rischio di gravi infezioni, in quanto possono insorgere complicazioni polmonari o cardiache.⁽⁸⁾

Il metodo classico di diagnosi dei virus dell'influenza è l'isolamento nelle linee cellulari PMK, A549 o MDCK, oppure nelle uova di gallina embrionate. L'effetto citopatico compare nei 3-7 giorni successivi all'inoculazione, seguono poi la vacuolizzazione e la degradazione cellulare.⁽⁹⁾

La parainfluenza 1, 2 e 3

I virus parainfluenzali, combinati con quello RSV, sono i principali virus respiratori patogeni nei bambini e nei ragazzi. Negli adolescenti e negli adulti, la malattia può essere asintomatica o avere sintomi simili a quelli di un normale raffreddore.

Sono stati identificati quattro tipi di parainfluenza. I tipi 1 e 2 sono le principali cause di laringite difterica, particolarmente grave nei bambini da 2 a 4 anni. La parainfluenza 3 può anche provocare laringite difterica, ma è più comunemente associata alla bronchiolite ed alla polmonite nei bambini (l'infezione più grave avviene nei bambini di età inferiore ad un anno). La parainfluenza 4 è stata associata alle infezioni lievi del tratto respiratorio superiore negli adulti e nei bambini. ^(7,12)

I virus parainfluenzali crescono bene nelle linee cellulari PMK, LLC-MK2 e HEK. Essi si possono coltivare anche facilmente nelle linee cellulari Vero, A549 e nei fibroblasti diploidi umani. L'effetto citopatico compare nei 4-7 giorni successivi all'inoculazione; si osserva un incremento delle piccole cellule arrotondate per il tipo 1, la formazione di cellule sinciziali nel tipo 2 e di "bordi filamentosi" nel tipo 3. ^(9, 10)

La conferma tramite coltura cellulare è in genere ottenuta utilizzando gli eritrociti della cavia. Tuttavia, l'immunofluorescenza (IF) con anticorpi offre un metodo rapido ed economico in grado di fornire specificità di tipo. È stato dimostrato che la IF è la migliore tecnica di rilevazione diretta nelle cellule epiteliali respiratorie.

Virus respiratorio sinciziale

RSV è la causa principale delle infezioni del tratto respiratorio inferiore nei bambini e nei ragazzi. Le infezioni spesso sfociano nelle bronchiti o tracheo-bronchiti, ma possono anche provocare laringite difterica, raffreddore e polmonite. Negli adulti e negli adolescenti, l'infezione tende ad essere asintomatica, oppure si manifesta come un comune raffreddore. Si osservano episodi epidemici stagionali ben distinti a partire da novembre o dicembre, che continuano per circa 3 mesi. ⁽¹⁴⁾

La rilevazione diretta (utilizzando IF o test immunoenzimatici (EIA)) è generalmente considerata come metodo di scelta. La conferma tramite coltura cellulare può essere comunque utilizzata da sola, oppure in aggiunta ai risultati della rilevazione diretta. Per l'isolamento primario del virus le linee cellulari HEp-2 e HeLa sono quelle ottimali, tuttavia sono state utilizzate anche le linee Vero, LLC-MK2 e CV-1. Il virus produce un caratteristico effetto citopatico con la formazione di sincizi, e la distruzione delle cellule. La IF è il metodo di scelta quale immunoreagente di conferma. ^(15,16)

Principio del saggio

Il **kit per i virus respiratori Biotrin** utilizza una tecnica di rilevazione degli anticorpi con immunofluorescenza indiretta per l'identificazione dei 7 principali agenti patogeni virali respiratori nelle colture tissutali infette e nei tamponi dei campioni con metodo diretto. Si utilizza un reagente per lo screening antivirale per confermare la presenza di un virus respiratorio. L'identificazione specifica del virus viene quindi ottenuta utilizzando gli anticorpi monoclonali anti-adenovirus, anti-influenza A e B, anti-parainfluenza 1, 2 e 3 e anti-RSV.

I campioni fissati del paziente vengono incubati in un vetrino con l'anticorpo monoclonale antivirale di topo. Se è presente antigene virale specifico, si forma un complesso stabile con l'anticorpo. Dopo una fase di lavaggio, viene aggiunto un coniugato di IgG di capra anti-IgG di topo con fluoresceina isotiocianato (FITC) che si lega al complesso antigene-anticorpo. Il reagente non legato viene rimosso con un'ulteriore fase di lavaggio, ed il campione viene poi visualizzato con l'aiuto di un microscopio a fluorescenza.

La reazione positiva è indicata da una fluorescenza verde brillante. Le cellule non infette appaiono di colore rosso spento per la presenza del colorante di contrasto blu di Evan nel coniugato FITC.

Componenti del kit

Materiali forniti

1. **Vetrini di controllo dell'antigene:**

SLIDE

5 Vetrini di controllo degli antigeni da 8 pozzetti ciascuno (Cod. Art. V4RVPS).

Ciascun vetrino è composto da un controllo positivo, infettato dai seguenti virus:

adenovirus, influenza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3 e RSV. Il pozzetto del controllo negativo contiene cellule non infette.

2. **Anticorpi monoclonali**:**

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

1 flacone da 1 ml contenente anticorpi monoclonali diretti contro l'adenovirus.

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

1 flacone da 1 ml contenente anticorpi monoclonali diretti contro l'influenza A.

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

1 flacone da 1 ml contenente anticorpi monoclonali diretti contro l'influenza B.

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

1 flacone da 1 ml contenente anticorpi monoclonali diretti contro la parainfluenza 1.

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

1 flacone da 1 ml contenente anticorpi monoclonali diretti contro la parainfluenza 2.

CONTROL	+	P3
---------	---	----

1 flacone da 1 ml contenente anticorpi monoclonali diretti contro la parainfluenza 3.

CONTROL	+	R
---------	---	---

1 flacone da 1 ml contenente anticorpi monoclonali diretti contro RSV.

3. **Reagente per screening antivirale**

SCREEN +

1 flacone da 5 ml contenente anticorpi monoclonali riuniti in un pool diretti contro: adenovirus, influenza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3 e RSV.

4. **Controllo negativo:**

CONTROL - IgG

1 flacone da 5 ml di anticorpo di topo non immune da utilizzarsi come controllo negativo.

5. **Coniugato di anti-IgG di topo e FITC**:**

CONJ IgG

2 flaconi da 5 ml di anticorpo IgG di capra anti-IgG di topo coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC).

6. **Liquido di montaggio**:**

MM

1 flacone da 5 ml di tampone Tris-glicerolo contenente un intensificatore della fluorescenza e sodio azide come conservante.

7. **Soluzione del tampone di lavaggio concentrata** (PBS, soluzione tampone fosfato)**:

BUF WASH CONC

1 bustina di sali di tampone PBS da portare a un litro con acqua distillata. Conservare in un contenitore sigillato e pulito a temperatura ambiente.

8. **Tween 20:**

TWEEN

1 flacone da 5 ml di poliossietilene sorbitano monolaurato (Tween 20) e sodio azide (NaN₃) concentrato da diluire 1:100 nel PBS.

9. **Istruzioni del prodotto:**

INS

Istruzioni per l'uso.

**** La sodio azide (presente nel coniugato, negli anticorpi monoclonali, nel tampone di lavaggio e nel liquido di montaggio) è un materiale potenzialmente rischioso. Essa può reagire con le tubazioni in piombo o in rame, formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Durante lo smaltimento di questi materiali, far correre abbondante acqua per evitare la formazione di azidi.**

Altri materiali necessary

- Coltura cellulare per l'isolamento dei virus respiratori: ciascun laboratorio deve conservare scorte vitali di cellule all'opportuno stato di passaggio, che consentano di moltiplicare in maniera efficace i virus respiratori dai campioni dei pazienti processati. Si deve controllare periodicamente la capacità di queste cellule di supportare la crescita dei virus respiratori. Le linee cellulari utilizzate più comunemente sono MDCK, LLC-MK2, A549, HEp-2 e i fibroblasti diploidi (W138, HNF, MRC-5).
- Terreno di trasporto dei virus (VTM), che non inibisca i virus respiratori e le cellule della coltura tissutale, adenovirus, influenza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3 o RSV, utilizzati per la stabilizzazione del virus. La soluzione salina bilanciata di Hank con stabilizzanti antibiotici e proteici è un terreno idoneo.
[NOTA: per evitare interferenze derivanti da anticorpi neonatali, non utilizzare, come stabilizzanti proteici, sieri animali diversi dal siero fetale bovino precolostro.]
- Terreno di mantenimento della coltura tissutale. I terreni di coltura RPMI o Eagles Minimal Essential Medium, con la quantità appropriata di siero fetale bovino precolostro, sono idonei per il mantenimento dopo l'infezione da parte del virus.
- Tubi di coltura tissutale sterile, flaconi piccoli o piastre con pozzetti multipli.
- Tamponi sterili (in cotone o in Dracon) che non inibiscano i virus respiratori e le cellule della coltura tissutale.
- Flaconi per il trasporto e la raccolta dei campioni.
- Pipette Pasteur sterili o pipette di precisione e puntali monouso.
- Pipette graduate sterili da 1 ml, 5 ml e 10 ml.
- Pinzette a punta fine.
- Microsfere di vetro sterili (diametro 1-3 mm).
- Acqua distillata o deionizzata di alta qualità.
- Soluzione di sodio ipoclorito (allo 0,05%).
- Acetone al 99,5%
[NOTA: l'acetone è igroscopico e deve essere conservato in un contenitore perfettamente sigillato. L'acetone contaminato con l'acqua può dare al substrato un aspetto torbido nei saggi fluorescenti].
- Vetrini di vetro (preferibilmente con 2 e 8 pozzetti per lo screening e l'identificazione), lavati in acetone e puliti.
- Vetrino coprioggetto di spessore N. 1 (22 x 50 mm).
- Camera umida di incubazione dei vetrini (35-37°C).
- Microscopio a fluorescenza con una corretta combinazione di filtri per FITC (picco di eccitazione = 490 nm, picco di emissione = 520 nm).
- Agitatore Vortex o sonicatore.
- Centrifuga.
- Cronometro.
- Bottiglia per dispensare la soluzione di lavaggio.
- Incubatore con reostato per la regolazione della temperatura (35-37°C)

Precauzioni

Sicurezza

- Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.
- Il kit deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato.
- Il coniugato, gli anticorpi monoclonali, il tampone di lavaggio ed il liquido di montaggio contengono sodio azide come conservante. La sodio azide, in presenza di piombo o rame nelle tubazioni, può formare azidi metalliche potenzialmente esplosive. Durante il loro smaltimento, far correre abbondante acqua per evitare la formazione di azidi.
- Il coniugato anti-IgG di topo, contiene il colorante di contrasto blu di Evan, una sostanza potenzialmente cancerogena. In caso di contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua.
- L'acetone è estremamente infiammabile e nocivo se ingerito o inalato. Tenere lontano da fonti di calore, scintille o fiamme libere. Non respirare i vapori. Utilizzare un opportuno sistema di aerazione.
- Nonostante i vetrini di controllo siano inattivati, manipolarli e smaltirli come gli altri materiali potenzialmente infettivi.
- Smaltire tutti i campioni clinici, il materiale infetto o potenzialmente infetto, in conformità con le buone pratiche di laboratorio. Maneggiare e smaltire tutti questi materiali come potenzialmente infettivi.
- Non pipettare i materiali con la bocca, non bere né mangiare sul bancone del laboratorio.
- Le procedure relative alla coltura tissutale sono riservate esclusivamente a personale qualificato.
- I residui di sostanze chimiche, delle preparazioni e dei componenti del kit sono generalmente considerati rifiuti pericolosi. Smaltire tutti questi materiali secondo le procedure di sicurezza stabilite.
- Maneggiando i campioni ed effettuando il saggio indossare indumenti protettivi, guanti in lattice monouso ed occhiali protettivi. Lavarsi accuratamente le mani al termine della procedura.

Norme procedurali

- Non utilizzare il kit o i singoli reagenti dopo la data di scadenza.
- La modifica del protocollo fornito può generare risultati errati.
- Non mescolare o sostituire i reagenti di numeri di lotto diversi.
- Non sostituire i reagenti con quelli di altri produttori.
- La diluizione dei coniugati o degli anticorpi monoclonali o la loro riunione in pool può generare risultati errati.
- Non lasciare i reagenti ad una temperatura superiore ai 4°C per periodi prolungati.
- Non esporre i reagenti alla luce diretta durante la conservazione o l'incubazione.
- Analizzare il controllo negativo (anticorpo di topo normale) separatamente in ciascuna coltura cellulare. La fluorescenza indica una reazione aspecifica ed il test non è considerato valido.
- Non lasciare mai asciugare i vetrini in alcuna fase della procedura di colorazione.
- Se si colorano più campioni nello stesso vetrino, prestare attenzione affinché non avvenga la contaminazione crociata tra i campioni.

- Utilizzare sempre vetreria pulita, preferibilmente monouso per tutte le preparazioni dei reagenti.

Conservazione e stabilità

- Il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della scatola esterna, purché esso sia stato conservato ad una temperatura di 2-8°C. Non congelare o esporre ad elevate temperature. Eliminare tutti i reagenti residui dopo la data di scadenza del kit.
- Il coniugato e gli anticorpi monoclonali sono stabili per 12 mesi se conservati al riparo dalla luce ad una temperatura di 4°C.
- Conservare il PBS in un contenitore sigillato e pulito a temperatura ambiente.
- Durante l'incubazione, proteggere i vetrini dalla luce e tenerli in una camera umida.
- L'acetone è igroscopico e deve essere conservato in un contenitore perfettamente sigillato.

Raccolta e preparazione dei campioni

La raccolta, il trasporto, la preparazione e la conservazione dei campioni in modo corretto sono fondamentali per una diagnosi di laboratorio soddisfacente. La possibilità di isolare il virus aumenta se i campioni vengono raccolti prima possibile (3-7 giorni) dall'inizio dei sintomi. A seconda del tipo di sindrome respiratoria diagnosticata nel paziente, possono essere raccolti numerosi campioni diversi.

Campioni di scelta

Infezioni del tratto respiratorio superior

Raffreddore: lavaggi e aspirati nasali (danno di norma titoli elevati), comunque sono anche accettabili i tamponi nasofaringei.

Faringiti: raccogliere tamponi o aspirati (specialmente se i sintomi nasali sono importanti). Se la faringite è importante, possono essere preferibili i lavaggi della gola o i tamponi.

Laringiti: raccogliere tamponi o aspirati nasofaringei.

Laringiti difteriche o laringotracheobronchiti: il campione di scelta è l'aspirato nasofaringeo.

Infezioni del tratto respiratorio inferior

Bronchiti o laringotracheobronchiti: il campione di scelta è l'aspirato nasofaringeo.

Bronchioliti: il campione di scelta è l'aspirato nasofaringeo.

Sindrome simile alla pertosse: raccogliere tamponi o aspirati nasofaringei.

Sindrome influenzale: raccogliere tamponi o aspirati nasofaringei.

Polmoniti: sono accettabili tamponi nasofaringei o tamponi faringei.

Raccolta dei campioni

Tampone nasofaringeo: inserire un tampone asciutto in una o in entrambe le narici fino all'area nasofaringea (un tampone per ciascuna narice può aumentare il volume del campione). Lasciare che il tampone assorba le secrezioni per alcuni secondi, dopodiché ruotarlo delicatamente e rimuoverlo. Collocare il tampone in 1-2 ml di terreno di trasporto del virus, rompere lo stelo e sigillare bene il contenitore.

Tampone alla gola: inumidire un tampone con PBS sterile o con il terreno di trasporto del virus e sfregarlo accuratamente sulle tonsille e sulla parte posteriore della faringe. Collocare il tampone in 1-2 ml di terreno di trasporto del virus, rompere lo stelo e sigillare bene il contenitore.

Lavaggio della gola: far fare al paziente gargarismi con 3-5 ml di PBS sterile, che sarà poi raccolto in un flacone sterile contenente 1-2 ml di terreno di trasporto del virus, e sigillare bene.

Lavaggio nasale: versare 2-3 ml di PBS sterile in ciascuna narice, mentre il paziente tiene la testa all'indietro. Quando la testa viene raddrizzata, raccogliere il liquido in un flacone sterile contenente terreno di trasporto del virus, e sigillare bene.

Lavaggio nasofaringeo: vengono aspirati 3-7 ml di PBS sterile in un bulbo in gomma morbida. Collocare il paziente su un lato e chiudere delicatamente con le dita una narice. Utilizzare l'estremità del bulbo per occludere completamente l'altra narice, dopodiché versare il PBS nel naso e aspirarlo velocemente. Le secrezioni vengono poi introdotte in un flacone sterile contenente 1-2 ml di terreno di trasporto del virus e sigillate bene.

Aspirato nasofaringeo: un tubo di alimentazione da 8 French in plastica morbida viene collegato ad una pompa aspirante elettrica attraverso una trappola per liquidi dotata di valvola. Introdurre il catetere sterile attraverso le narici fino alla parte posteriore del naso. Effettuare aspirazioni intermittenti ritirando lentamente il catetere. Il processo può essere ripetuto una volta per ciascuna narice in modo da ottenere 0,2-0,8 ml di secrezione. Trasferire poi la secrezione in 1-2 ml di terreno di trasporto del virus, dopodiché sigillare bene il contenitore.

Trasporto e conservazione dei campioni

Dopo la raccolta, trasportare immediatamente tutti i campioni in laboratorio in ghiaccio. La maggior parte dei virus respiratori è instabile, ed è sensibile ai cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. Conservare quindi i campioni ad una temperatura di 2-8°C prima di procedere all'inoculazione. Se non è possibile analizzare i campioni entro 72 ore, si raccomanda di congelarli ad una temperatura inferiore o uguale a -70°C. Un congelamento rapido in bagno di acetone/ghiaccio secco aiuta a mantenere l'infettività virale. Il congelamento dei campioni riduce tuttavia sensibilmente le possibilità di isolamento.

Preparazione dei campioni

- Per rimuovere le cellule intrappolate all'interno delle fibre del tampone, ruotare quest'ultimo mentre è immerso nel terreno di trasporto. Eliminare poi i tamponi in una soluzione di sodio ipoclorito.
- Per aumentare il recupero delle cellule, aggiungere alcune microsfere di vetro sterili al campione, e agitare su Vortex o sonicare (8-12 kcicli/sec) per un minuto al massimo.
- Centrifugare il campione a 2000 gravità per 10 minuti per rimuovere i contaminanti batterici e i residui cellulari. Utilizzare poi il surnatante come materiale da inoculazione.

Trattamento dei campioni per l'esame diretto

Se i campioni devono essere utilizzati sia per la rilevazione diretta sia per la conferma tramite coltura cellulare, rimuovere la metà delle cellule per centrifugazione a 300-500 gravità, ed utilizzarle con la seguente procedura. Utilizzare il surnatante e le cellule rimanenti del campione con la procedura "Isolamento e fissazione della coltura cellulare" (vedere pag. 14).

1. Rimuovere il materiale del campione dal contenitore di origine e collocarlo in un tubo da centrifuga sterile da 10-15 ml.
2. Aggiungere 4 ml di soluzione fisiologica in tampone fosfato (PBS) sterile al campione e mescolare.
3. Centrifugare il campione a 300-500 gravità per 10 minuti a 2-8°C.
4. Il surnatante viene raccolto per essere utilizzato nelle procedure di isolamento del virus.
[NOTA: fare riferimento alla sezione "Isolamento e fissazione della coltura cellulare" per le istruzioni complete (vedere pag. 14)].
5. Lavare il sedimento cellulare aggiungendo 4-8 ml di PBS e risospendere delicatamente le cellule.
6. Centrifugare a 300-500 gravità per 10 minuti a 2-8°C.
7. Se è presente del muco, si forma uno strato torbido sul sedimento cellulare. Rimuovere con cura il surnatante ed il muco con una pipetta Pasteur sterile. Se il muco è ancora presente, ripetere i punti 6-8 fino a rimuoverlo completamente.
8. Risospendere le cellule in 0,1-0,2 ml di PBS per ottenere una sospensione torbida. Sospensioni di densità eccessiva sono difficili da leggere e forniscono vetrini di scarsa qualità. Le sospensioni cellulari che non contengono una quantità sufficiente di cellule comportano una perdita di sensibilità. Gli strisci devono contenere almeno due cellule epiteliali per un campo di 250x.

9. Aggiungere una goccia di sospensione cellulare nel numero di pozzetti desiderato dei vetrini precedentemente puliti. Far asciugare il vetrino all'aria.
10. Fissare i vetrini in acetone freddo (2-8°C) per 10 minuti. Evitare che l'acetone si contaminino con l'acqua ed i sali. Ciò può provocare una colorazione non definita.
11. Far asciugare il vetrino all'aria dopo la fissazione. Procedere rapidamente alla colorazione dei vetrini. Se è necessaria la conservazione, collocare i vetrini in un contenitore a -20°C in presenza di essiccante. I vetrini conservati a -20°C si conservano per un anno. Conservare i vetrini in contenitori ermetici per evitare la penetrazione di umidità.
12. Passare alla sezione "Screening del campione" (vedere pag. 15).

Isolamento e fissazione della coltura cellular

1. Esaminare le colture cellulari immediatamente prima dell'inoculazione per garantire una buona vitalità e morfologia delle cellule.
2. Rimuovere il terreno vecchio dalla coltura cellulare utilizzando una pipetta sterile e ristabilire il monostrato cellulare con un terreno di mantenimento della coltura. Aggiungere almeno 2 ml di terreno fresco ai tubi in vetro della coltura (16 x 125 mm), oppure almeno 1 ml di terreno ai flaconi piccoli.
3. Aggiungere 0,2-0,5 ml del campione nel recipiente di ciascuna coltura ed incubare per 60 minuti a 35-37°C. Si raccomanda di inoculare i campioni in duplicato.
[NOTA: l'assorbimento del virus presente nel campione e/o la centrifugazione a bassa velocità possono migliorare l'isolamento di alcuni virus, e l'effetto citopatico può apparire più precocemente, dopo 48 ore].
4. Per garantire la sensibilità dell'infezione ed un appropriato effetto citopatico, utilizzare uno striscio virale tipico (disponibile in commercio) per inoculare la linea cellulare. Dopo il periodo di inoculazione, coprire le cellule con terreno di mantenimento fresco ed incubarle a 35-37°C senza muoverle.
5. Il terreno di coltura deve essere sostituito ogni 3-4 giorni per favorire la formazione dell'effetto citopatico.
6. Esaminare l'effetto citopatico delle cellule tutti i giorni.
7. Quando si osserva l'effetto citopatico, fissare le cellule (come segue) per prepararle alla colorazione di conferma.
8. Aspirare il terreno cellulare utilizzando una pipetta sterile e conservarlo in un tubo sterile (è possibile effettuare con questo terreno una sottocoltura se la coltura cellulare è stata distrutta durante la colorazione).
9. Lavare delicatamente le cellule 3 volte con volumi di 1-2 ml di soluzione salina bilanciata di Hank. Eliminare il liquido di lavaggio in una soluzione di sodio ipoclorito.
10. Aggiungere 1/10 del volume della coltura di tripsina (0,05%), sodio EDTA (0,53 mM) e lasciar riposare per 30 secondi.
11. Picchiettare delicatamente il recipiente della coltura per staccare le cellule.
12. Aggiungere terreno fresco sufficiente per ritornare al volume di origine della coltura cellulare.
13. Centrifugare la sospensione cellulare a 200-500 gravità per 7-10 minuti.
14. Risospendere il sedimento cellulare con alcune gocce di PBS sterile per ottenere una sospensione relativamente pesante (circa 2×10^6 cellule/ml).
15. Aggiungere la sospensione cellulare almeno in un vetrino di screening (2 pozzetti) e un vetrino di identificazione (8 pozzetti) e far asciugare in una stufa termostatica a convezione (30-35°C), oppure far asciugare rapidamente all'aria a temperatura ambiente.
16. [NOTA: si raccomandano pozzetti del diametro di 5 mm]
17. Fissare i vetrini in acetone freddo (2-4°C) per 10 minuti e far asciugare completamente all'aria.
18. Conservare i vetrini inutilizzati con essiccante a -20°C.

Procedimento operative

- *Preparazione dei reagent*

Preparazione della soluzione del tampone di lavaggio (PBST):

1. Sciogliere il contenuto della bustina di PBS in 990 ml di acqua distillata.
2. A 495 ml di questa soluzione aggiungere 5 ml di Tween 20/sodio azide (concentrato 100x) e mescolare accuratamente.

[Nota: eliminare la soluzione rimanente di PBS].

3. Trasferire in una beuta pulita ed etichettata e sigillare bene il tappo.

Tutti i reagenti rimanenti sono **pronti per l'uso** e si trovano già alla diluizione di lavoro.













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

Figura 1: vetrino di controllo degli antigeni del campione

- *Screening del campione*

1. Rimuovere i vetrini dei campioni (2 pozzetti) ed un vetrino di controllo degli antigeni dal luogo di conservazione e portarli a temperatura ambiente.
2. Aggiungere 1 goccia (40 µl) di reagente di screening antivirale in un pozzetto del vetrino di screening dei campioni ed in ciascun pozzetto del vetrino di controllo degli antigeni. [NOTA: il reagente di screening antivirale viene utilizzato per determinare la presenza dell'adenovirus, del virus dell'influenza A, dell'influenza B, della parainfluenza 1, 2 e 3 o di RSV].
3. Aggiungere 1 goccia (40 µl) di anticorpo normale di topo nel secondo pozzetto del vetrino di screening dei campioni e nel pozzetto negativo del vetrino di controllo degli antigeni. [NOTA: questo controllo negativo permette di individuare la fluorescenza aspecifica].
4. Incubare i campioni ed i vetrini di controllo per 30 minuti a 37°C in camera umida.
5. Lavare accuratamente i vetrini con la soluzione di tampone di lavaggio per 10-15 secondi. Rimuovere l'eccesso della soluzione di lavaggio dai vetrini ed asciugare tra i pozzetti.
6. Aggiungere 1 goccia (40 µl) di coniugato di anti-IgG di topo e FITC in ciascun pozzetto dei vetrini dei campioni e dei controlli.
7. Incubare i campioni ed i vetrini di controllo per 30 minuti a 37°C in una camera umida.
8. Lavare accuratamente i vetrini con la soluzione di tampone di lavaggio per 10-15 secondi. Rimuovere l'eccesso della soluzione di lavaggio dai vetrini ed asciugare tra i pozzetti.
9. Montare i vetrini utilizzando un vetrino coprioggetto N. 1 ed il liquido di montaggio. Rimuovere l'eccesso di liquido di montaggio dai vetrini.

10. Esaminare i vetrini con un microscopio a fluorescenza a 100-200x. È possibile effettuare un esame dettagliato a 400x. [NOTA: esaminare inizialmente il vetrino di controllo per verificare che la colorazione sia appropriata].
11. Se i vetrini di screening sono negativi, refertare i risultati come “Non è stata osservata la presenza di virus”. Passare al punto 12 per tutti i campioni positivi.

Identificazione del virus

1. Rimuovere i vetrini di identificazione (8 pozzetti) corrispondenti a ciascun campione positivo ed un vetrino di controllo degli antigeni dal luogo di conservazione. Portarli a temperatura ambiente.
2. Aggiungere 1 goccia (40 µl) di ciascun anticorpo monoclonale in ciascun pozzetto del vetrino di identificazione del campione.
3. Aggiungere 1 goccia (40 µl) di ciascun anticorpo monoclonale nel corrispondente pozzetto del vetrino di controllo degli antigeni.
4. Aggiungere 1 goccia (40 µl) di controllo negativo in un pozzetto a parte del vetrino di identificazione del campione e nel pozzetto negativo del vetrino di controllo degli antigeni.
5. Incubare il campione ed i vetrini di controllo per 30 minuti a 37°C in una camera umida.
6. Lavare accuratamente i vetrini con la soluzione di tampone di lavaggio per 10-15 secondi. Rimuovere l'eccesso della soluzione di lavaggio dai vetrini ed asciugare tra i pozzetti.
7. Aggiungere 1 goccia (40 µl) coniugato di anti-IgG di topo e FITC in ciascun pozzetto dei vetrini dei campioni e dei controlli.
8. Incubare il campione ed i vetrini di controllo per 30 minuti a 37°C in camera umida.
9. Lavare accuratamente i vetrini con la soluzione di tampone di lavaggio per 10-15 secondi. Rimuovere l'eccesso della soluzione di lavaggio dai vetrini ed asciugare tra i pozzetti.
10. Montare i vetrini utilizzando un vetrino coprioggetto N. 1 ed il liquido di montaggio con glicerolo. Rimuovere l'eccesso di liquido di montaggio dai vetrini.

[NOTA: i vetrini possono essere conservati al buio, in una scatola ermetica a 2-8°C per 24 ore, senza perdite significative di fluorescenza. Si raccomanda comunque l'immediata osservazione dopo la colorazione. Per una conservazione prolungata tenere i vetrini in una scatola ermetica ad una temperatura uguale o inferiore a -20°C].

Interpretazione dei risultati

Di seguito è descritta la distribuzione tipica della fluorescenza dovuta al virus infettante. La distribuzione della fluorescenza osservata sul vetrino dipende dal/dai virus presente/i, e riflette il modello di crescita.

Adenovirus

La fluorescenza verde brillante è nucleare, citoplasmatica o in entrambi. La colorazione nucleare è uniformemente brillante con scarsa definizione. La colorazione citoplasmatica è spesso punteggiata.

Influenza A e B

La fluorescenza verde brillante è nucleare, citoplasmatica o in entrambi. La colorazione nucleare è uniformemente brillante con scarsa definizione. La colorazione citoplasmatica è spesso punteggiata con vaste inclusioni.

Parainfluenza 1, 2, e 3

La fluorescenza verde brillante è limitata al citoplasma. La colorazione citoplasmatica è punteggiata con inclusioni irregolari.

Virus respiratorio sinciziale

Si osserva la fluorescenza verde brillante citoplasmatica ed è associata ai sincizi. La colorazione citoplasmatica è punteggiata con piccole inclusioni.

Cellule negative

Le cellule si colorano di rosso spento nel citoplasma e di marrone scuro tendente al nero nel nucleo. La colorazione di queste cellule è dovuta alla presenza del colorante di contrasto blu di Evan.

Si raccomanda di esaminare inizialmente le cellule negative per stabilire se sono presenti fluorescenze di fondo.

Il campione è considerato positivo per la presenza di un virus se si osservano 2 o più cellule di colore verde fluorescente brillante per campo ad un ingrandimento di 400x.

Il controllo positivo mostra cellule con nucleo o citoplasma o entrambi fluorescenti, a seconda dello stadio di crescita. Il controllo negativo mostra una colorazione rosso spento dovuta alla presenza del colorante di contrasto blu di Evan.

[NOTA: ignorare la colorazione fluorescente dei frammenti cellulari. Ciò può accadere a causa del coniugato intrappolato in questi frammenti. Se il vetrino di screening mostra un risultato positivo e il vetrino di identificazione mostra un risultato negativo, il test deve essere ripetuto per confermare i risultati].

Valori previsti

I risultati dell'isolamento e dell'identificazione variano a seconda dell'area geografica, dell'età della popolazione, del periodo dell'anno (alcuni virus sono stagionali), della condizione socio-economica, del modo in cui il campione è stato maneggiato e del tipo di sistema di rilevazione adottato.

Per il periodo settembre-luglio (1991-1992) sono state ottenute le seguenti percentuali di rilevazione: *

Virus	Percentuali di	Percentuali di
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%
RSV	66/646	10,2%

*La valutazione comprende ospedali, ospedali pediatrici, Università e laboratori di riferimento negli Stati Uniti.

Limitazioni d'uso

- Analizzare i controlli positivi e negativi di ciascun campione: perché il test sia valido essi devono dare la colorazione appropriata. [NOTA: sono disponibili anche i vetrini di controllo aggiuntivi, Cod. Art. V4RVPS (5 per confezione)].
- Un risultato negativo non preclude la presenza dell'adenovirus, del virus dell'influenza A e B, della parainfluenza 1, 2 e 3, o dell'RSV. Interpretare i risultati insieme alle informazioni cliniche relative al paziente ed ad altre procedure diagnostiche. La mancata individuazione del virus può dipendere da diversi fattori, quali la raccolta o la manipolazione inadeguata del campione, tecniche di coltura errate, l'utilizzo di una linea cellulare inadeguata o una temperatura non corretta durante l'isolamento. Refertare tutti i risultati negativi con "Non è stata osservata la presenza di virus".
- Gli anticorpi monoclonali contenuti nel kit sono specifici di gruppo per adenovirus e RSV, perciò non possono essere utilizzati per la tipizzazione.

I campioni contaminati da *Staphylococcus aureus* possono manifestare una fluorescenza scura giallo-verde dovuta alla presenza di grandi quantità di proteina A. La fluorescenza deriva dal legame aspecifico tra la proteina A ed i frammenti FC degli anticorpi.

Prestazioni metodologiche

• *Confronto clinico della conferma tramite coltura cellulare*

I seguenti risultati sono stati ottenuti effettuando la conferma tramite coltura cellulare su campioni provenienti dall'apparato respiratorio (sono stati analizzati complessivamente 646 campioni):

ANTICORPI MONOCLONALI:	Adeno	RSV	Inf. A	Inf. B	Para 1	Para 2	Para 3
Totale positivi	43	66	11	4	11	5	28
Sensibilità %	97.7	100	100	100	100	100	100
Specificità %	100	100	100	100	100	100	100
Valore predittivo positivo (+) %	100	100	100	100	100	100	100
Valore predittivo negativo (-) %	99.8	100	100	100	100	100	100

I seguenti risultati sono stati ottenuti effettuando la conferma tramite coltura cellulare su campioni congelati provenienti dall'apparato respiratorio (sono stati analizzati complessivamente 151 campioni):

ANTICORPI MONOCLONALI:	Adeno	RSV	Inf. A	Inf. B	Para 1	Para 2	Para 3
Totale positivi	7	3	30	36	33	5	16
Sensibilità %	100	100	100	100	100	100	100
Specificità %	100	100	100	100	100	100	100
Valore predittivo positivo (+) %	100	100	100	100	100	100	100
Valore predittivo negativo (-) %	100	100	100	100	100	100	100

• *Reattività crociata*

I seguenti risultati sono stati ottenuti dagli studi di rilevazione virale e batterica con ciascun anticorpo monoclonale.

ANTICORPI MONOCLONALI:	Adeno	RSV	Inf. A	Inf. B	Para 1	Para 2	Para 3
Adenovirus	+	-	-	-	-	-	-
Coronavirus	-	-	-	-	-	-	-
Coxsackievirus	-	-	-	-	-	-	-
Echovirus	-	-	-	-	-	-	-
Herpesvirus	-	-	-	-	-	-	-
Virus dell'influenza tipo A	-	-	+	-	-	-	-
Virus dell'influenza tipo B	-	-	-	+	-	-	-
Virus del morbillo	-	-	-	-	-	-	-
Virus della parotite	-	-	-	-	-	-	-
Parainfluenza tipo 1	-	-	-	-	+	-	-
Parainfluenza tipo 2	-	-	-	-	-	+	-
Parainfluenza tipo 3	-	-	-	-	-	-	+
Rinovirus	-	-	-	-	-	-	-
Virus delle scimmie	-	-	-	-	-	-	-
RSV	-	+	-	-	-	-	-
Acholeplasma laidlawii	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella pertussis	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	-	-	-	-	-
Branhamella catarrhalis	-	-	-	-	-	-	-
Chlamydia trachomatis	-	-	-	-	-	-	-
Corynebacterium diphtheriae	-	-	-	-	-	-	-
Legionella micdadei	-	-	-	-	-	-	-
Legionella pneumophila	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium avium	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium intracellulare	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium tuberculosis	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma fermentans	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma hominis	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma orale	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae	-	-	-	-	-	-	-
Neisseria meningitidis	-	-	-	-	-	-	-
Ureaplasma urealyticum	-	-	-	-	-	-	-

Controlli sulle cellule ospite	Il test su tutti gli anticorpi monoclonali ha dato esito negativo rispetto ai seguenti controlli cellulari
Adenovirus	Controlli cellulari pHEK, HEp-2, NCI-H292, RD, HLF, HeLa, & A549
Polyomavirus	Controllo cellulare PMK
Enterovirus	Controlli cellulari RD e HLF
Paramyxovirus	Controlli cellulari HEp-2, Vero, e PMK

Riepilogo della procedura del kit per virus respiratori

Nota importante: leggere completamente il foglietto illustrativo del prodotto prima di iniziare il saggio. Il presente riepilogo va inteso unicamente come guida rapida.

Screening del campione

Aggiungere 1 goccia (40 µl) di reagente di screening antivirale in un pozzetto del vetrino di screening dei campioni ed in ciascun pozzetto del vetrino di controllo degli antigeni .



Aggiungere 1 goccia (40 µl) di anticorpo di topo normale in un secondo pozzetto del vetrino di screening del campione ed al pozzetto negativo del vetrino di controllo degli antigeni.



Incubare per 30 minuti a 37°C in camera umida



Lavare accuratamente i vetrini



Aggiungere 1 goccia (40 µl) di coniugato di anti-IgG di topo e FITC



Incubare i vetrini per 30 minuti a 37°C in camera umida



Lavare accuratamente i vetrini



Montare i vetrini con il liquido di montaggio ed il vetrino coprioggetto



Esaminare i vetrini al microscopio a fluorescenza



Identificazione del virus per i campioni positivi allo screening descritto in precedenza
(vedere la pagina seguente)

Riepilogo della procedura del kit per virus respiratori

Nota importante: leggere completamente il foglietto illustrativo del prodotto prima di iniziare il saggio. Il presente riepilogo va inteso unicamente come guida rapida.

Identificazione del virus

Aggiungere 1 goccia (40 µl) di ciascun anticorpo monoclonale in ciascun pozzetto del vetrino di identificazione del campione.



Aggiungere 1 goccia (40 µl) di ciascun anticorpo monoclonale al corrispondente pozzetto del vetrino di controllo degli antigeni.



Aggiungere 1 goccia (40 µl) di anticorpo normale di topo in un pozzetto a parte del vetrino di identificazione del campione e nel pozzetto del controllo negativo del vetrino di controllo degli antigeni.



Incubare i vetrini per 30 minuti a 37°C in camera umida



Lavare accuratamente i vetrini.



Aggiungere a tutti i pozzetti 1 goccia (40 µl) di coniugato di anti-IgG di-topo e FITC



Incubare i vetrini per 30 minuti a 37°C in camera umida



Lavare accuratamente i vetrini



Montare i vetrini con il liquido di montaggio ed il vetrino coprioggetto



Esaminare i vetrini al microscopio a fluorescenza

Interpretazione dei simboli

Dispositivo medico per uso diagnostico *in vitro*



Numero di lotto



Numero di catalogo



Limiti di temperature



Data di scadenza



Fabbricante



Rischio biologico



Altri prodotti Biotrin

Cod. Art.	Descrizione	Formato del saggio
V3HHV6	IgG anti-Herpesvirus umano 6 IFA	4 vetrini x 10 pozzetti
V17HHV6	IgM anti-Herpesvirus umano 6 IFA	4 vetrini x 10 pozzetti
V15HHV6	IgG anti-Herpesvirus umano 6 EIA	96 pozzetti EIA
V18HHV8	IgG anti-Herpesvirus umano 8 IFA	6 vetrini x 10 pozzetti
V19HHV8	IgG anti-Herpesvirus umano 8 EIA	96 pozzetti EIA
V119IF	IgG e IgM anti-parvovirus B19 IFA	6 vetrini x 10 pozzetti
V519IG	IgG anti-parvovirus B19 EIA	96 pozzetti EIA
V619IM	IgM anti-parvovirus B19 EIA	96 pozzetti EIA
*V519IGUS	IgG anti-parvovirus B19 EIA	96 pozzetti EIA
*V619IMUS	IgM anti-parvovirus B19 EIA	96 pozzetti EIA

* Saggi per parvovirus B19 approvati da FDA.

Bibliografia / riferimenti

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

**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**