



Para la detección cualitativa e identificación de metapneumovirus humano (hMPV) en aspirados/lavados y muestras nasales y nasofaríngeas o en cultivos celulares

Para su empleo en diagnóstico *in vitro*.

Puede encontrar un glosario de símbolos en quidel.com/glossary.



USO INDICADO

El kit D³ DFA Metapneumovirus Identification Kit de Diagnostic Hybrids, Inc. está indicado para la detección cualitativa e identificación de metapneumovirus humano (hMPV) en aspirados/lavados y muestras nasales y nasofaríngeas o en cultivos celulares. La prueba detecta antígenos del hMPV por inmunofluorescencia utilizando una combinación de tres anticuerpos monoclonales (MABs), en pacientes que presentan signos y síntomas de infección respiratoria aguda. La prueba detecta, pero no está indicada para diferenciar, los cuatro subtipos genéticos de hMPV.

Los resultados negativos no excluyen infecciones por hMPV y no deben tomarse como base exclusiva para el diagnóstico, tratamiento u otras decisiones de manejo del caso. Se recomienda que los especímenes encontrados a ser negativa después de un examen directo de los resultados muestra ser confirmada por un ensayo molecular autorizadas por la FDA.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El metapneumovirus humano (hMPV) es un patógeno respiratorio viral que produce una serie de enfermedades, desde la infección asintomática a la bronquiolitis severa. En 2001, los investigadores del Centro Médico de la Universidad Erasmus de Róterdam, Holanda describieron por primera vez los metapneumovirus humanos.¹ Este patógeno viral humano recientemente descubierto se aisló a partir de muestras respiratorias enviadas para el cultivo viral durante el invierno. La mitad de los 28 aislados de hMPV iniciales se cultivaron a partir de pacientes que tenían menos de 1 año, y el 96% de los aislados se obtuvo de niños menores de 6 años. Los estudios de seroprevalencia revelaron que de todos los niños con edades entre 6 y 12 meses que se analizaron en el estudio del año 2001, un 25% presentaba anticuerpos detectables contra el hMPV; a los 5 años de edad, el 100% de los pacientes mostró signos de una infección anterior. En otro informe originado² en Australia que describe tres casos adicionales de infección por hMPV se sostiene que este virus recientemente descubierto es ubicuo, y es probable que en los próximos años surja información adicional relativa a la patogénesis y epidemiología continúa estando accesible.³

El diagnóstico de las infecciones por hMPV se ha basado principalmente en la detección por la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) en tiempo real.^{4,5,6} Se ha descrito el desarrollo de MABs específicos dirigidos contra los cuatro subtipos conocidos de hMPV.⁷ El uso de los MABs en aplicaciones de inmunofluorescencia en el laboratorio clínico mejorará enormemente la posibilidad de diagnosticar las

infecciones por hMPV al permitir la detección de virus viables directamente en las células infectadas del paciente y en los cultivos celulares.^{8,9,10,11,12}

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El kit D³ DFA Metapneumovirus Identification Kit de Diagnostic Hybrids, Inc. utiliza una combinación de tres MAbs murinos antígeno-específicos de hMPV directamente marcados directamente con fluoresceína para la detección de los antígenos contra hMPV. El Metapneumovirus DFA Reagent detecta los cuatro subtipos de hMPV identificados (subtipos A1, A2, B1 y B2), pero no los diferencia.

Las células a analizar, procedentes de una muestra clínica o de un cultivo celular, se colocan en un portaobjetos de vidrio, se dejan secar al aire y se fijan con acetona. Se añade el Metapneumovirus DFA Reagent a las células que luego se incuban durante 15 a 30 minutos a temperatura de 35°C a 37°C en una cámara o incubador humidificados. A continuación se lavan las células teñidas con Phosphate Buffered Saline (1X PBS) diluido, se añade una gota del Mounting Fluid suministrado y se coloca un cubreobjetos sobre la preparación de células. Se examinan las células utilizando un microscopio de fluorescencia. Las células infectadas por el hMPV presentarán fluorescencia verde manzana. Las células no infectadas no presentarán fluorescencia pero teñirán a rojo con el colorante de contraste Azul de Evans.

Tras el examen de la muestra directa, se recomienda confirmar el análisis de las muestras en las que no se detectaron células fluorescentes realizando otra prueba molecular para la detección del hMPV aprobada por la FDA.

REACTIVOS

El D³ DFA Metapneumovirus Identification Kit contiene lo siguiente:

Metapneumovirus DFA Reagent (Reactivo DFA de la Metapneumovirus)

5 mL

Un frasco gotero conteniendo una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos del hMPV. La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como.

hMPV Antigen Control Slides (Portas de control del Antígeno del hMPV)

5 slides

Cinco (5) portaobjetos control empaquetados individualmente, cada uno con dos pocillos, uno con células positivas y el otro con células negativas para el hMPV. En ambos casos las células proceden de cultivos celulares. Cada portaobjetos está indicado para ser teñido una sola vez. El material de control ha sido tratado para que no sea infeccioso; sin embargo, se deben tomar precauciones de seguridad contra riesgos biológicos durante el manejo de material infeccioso.

40X PBS Concentrate (Concentrado de PBS 40X)

25 mL

Un frasco de PBS concentrado 40X que contiene azida sódica al 4% (0,1% azida sódica en una dilución 1X con agua desmineralizada).

Mounting Fluid (Milieu de montaje)

7 mL

Un frasco gotero conteniendo una solución acuosa tamponada y estabilizada de glicerol y azida sódica al 0,1%.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Microscopio de fluorescencia con la correcta combinación de filtros para FITC (pico de excitación = 490 nm, pico de emisión = 520 nm); amplificación 200X a 400X.
- Cultivo celular para aislamiento de hMPV. Las líneas celulares sugeridas incluyen las células LLC-MK2, HEp-2, A549, R-Mix™ y R-Mix Too™ MixedCells™; y las células renales primarias de mono Rhesus. Todas las cuales están disponibles en DHI.

- Control de virus vivos de la cultura controles positivos: Cepas conocidas de hMPV para uso en la monitorización de cultivos celulares y procedimientos de tinción. Dichas cepas de virus control pueden obtenerse en DHI.
- Cubreobjetos (22 x 50mm) para Antigen Control Slides y para portaobjetos con la muestra.
- Universal Transport Medium. Disponible en Quidel.
- R-Mix™ Refeed Medium (para usar con R-Mix™ y R-Mix Too™ MixedCells) u otro medio de realimentación estándar. Disponible en Quidel.
- Acetona grado reactivo (>99% pura) refrigerada entre 2°C y 8°C para fijación de portaobjetos con la muestra directa y shell-vials, y los preparados de células cultivadas.

NOTAS:

- ▶ Conserve el recipiente de acetona grado reactivo firmemente sellado para evitar la absorción higroscópica de agua que puede producir una fluorescencia de fondo brumosa y no específica.
- ▶ Para fijar las células y en múltiples placas de plástico, utilice una mezcla de 80% acetona 20% de agua desmineralizada. Conservar a temperatura ambiente (20°C a 25°C).
- Pipetas graduadas estériles: 10 ml, 5 ml, y 1 ml.
- Pipetas Pasteur estériles u otra transferencia pipetas.
- **Precaución: No se debe utilizar solventes como la acetona con pipetas de transferencia de polietileno.**
- Fórceps de punta fina.
- Frasco de lavado de 200 ml.
- Aguja cardadora de punta curva (para retirar el cubreobjetos desde un shell-vial); dé forma a la aguja cardadora curvando la punta de una aguja de jeringa o un objeto similar (p.ej., aguja cardadora para micología) sobre la tapa de una mesa de trabajo o con un par de fórceps teniendo cuidado de evitar lesiones.
- Solución de hipoclorito de sodio (dilución final de 1:10 de lejía de uso doméstico).
- Cámara húmeda (p.ej., plato de Petri cubierto con una toalla de papel húmeda colocada en el fondo).
- Portaobjetos de vidrio para microscopio limpiado con acetona.
- Portaobjetos de vidrio para microscopio.
- Estéril, de nylon flocado o poliéster hisopos, no inhibidor para los virus y los cultivos celulares.
- Incubador, 35°C a 37°C (5% CO₂ o no CO₂, dependiendo del formato de cultivo celular usado).
- Centrífuga con rotor de cestillas de movimiento libre.
- Agua desmineralizada para la dilución de la 40X PBS Concentrate (see *REAGENT PREPARATION*) y para la dilución de la acetona de grado reactivo cuándo fijar las células para uso en placas multi-pocillo de poliestireno (ver *Materiales necesarios pero no suministrad*).
- Unidad aspiradora: Aspiradora de vacío con trampa desinfectante que contiene suficiente lejía de uso doméstico (5% de hipoclorito de sodio) que la concentración no se redujo en más de 10 veces, ya que se diluye con los fluidos desechados.
- Recipiente de lavado: Vaso, frasco de lavado o jarra Coplin para el lavado de portaobjetos.
- Recipiente de fijado: Jarra Coplin, o diapositiva plato titular de polietileno para uso en la fijación de células sobre los portaobjetos.
- Microscopio de luz invertida con magnificación de 40X a 100X: Utilizarse para el examen de monocapas de células para la toxicidad y la confluencia antes de la inoculación.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para su empleo en diagnóstico *in Vitro*.
- Tenga en cuenta que todas las muestras humanas, derivados sanguíneos, reactivos y materiales utilizados para el procesamiento pueden transmitir eventualmente enfermedades infecciosas por lo que deben emplearse de modo de evitar la infección del personal del laboratorio. No existe ningún método de análisis capaz de ofrecer una garantía absoluta de ausencia de agentes infecciosos.

- ▶ Todos los procedimientos deben realizarse de acuerdo con la OSHA Standard on Bloodborne Pathogens;¹³ “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories”, CDC, 5th edition, 2007; y CLSI/NCCLS Approved Guideline, M29-A3, “Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections.”¹⁴
- ▶ El aislamiento de cultivo celular puede ser potencialmente peligroso. El personal que trabaja con cultivos celulares debe recibir formación adecuada en técnicas¹⁵ de manejo seguro y tener experiencia en cultivos celulares antes de intentar este procedimiento.
- ▶ Al manipular estos materiales, debe usarse el Nivel de bioseguridad 2 u otras prácticas de bioseguridad apropiadas.
- ▶ La manera más eficaz de lograr la descontaminación de muestras y cultivos es utilizar una solución de hipoclorito de sodio (en dilución final de 1:10 de lejía de uso doméstico).
- ▶ Si bien se ha demostrado que los Antigen Control Slides no son infecciosos, al usarlos se deben emplear las mismas precauciones que se toman para manipular y desechar otros materiales infecciosos.
- Nunca pipetee reactivos o muestras clínicas con la boca; evite todo contacto de las muestras clínicas con piel lastimada.
- Evite salpicaduras y la generación de aerosoles con las muestras clínicas.
- Utilice técnica aséptica y equipos y materiales estériles para todos los procedimientos de cultivo de tejidos.
- La acetona, reactivo requerido para la prueba pero no suministrado en el kit, es un solvente orgánico inflamable y volátil. Úsela en una zona bien ventilada y manténgala alejada de llamas u otras fuentes de ignición.
- La contra-tinción Azul de Evans es potencialmente carcinogénica. Si se produce contacto con la piel, lávela con agua inmediatamente. El Metapneumovirus DFA Reagent se suministra en concentración de trabajo. Cualquier dilución reducirá su sensibilidad.
- Los reactivos deben usarse antes de su fecha de caducidad.
- Cada hMPV Antigen Control Slide debe usarse una sola vez. No vuelva a usar un Control Slide.
- La contaminación microbiana de los Metapneumovirus DFA Reagent puede producir una reducción de su sensibilidad. Presencia de turbidez puede indicar contaminación.
- Conserve la 1X PBS en un recipiente limpio entre 20°C y 25°C para evitar la contaminación. Comprobar para la contaminación y desechar la solución si turbia.
- El equipo de vidrio reutilizable debe lavarse y aclararse bien para quitarle todos los detergentes.
- No exponga el Metapneumovirus DFA Reagent a la luz fuerte durante la tinción o la conservación.
- Azida sódica se incluye en el concentrado de PBS 40X a una concentración del 4% (p/v), y en las otras soluciones de este kit a una concentración del 0,1%.
 - ▶ Soluciones acuosas de azida sódica, cuando se mezclan con ácidos, pueden liberar gases tóxicos.
 - ▶ Azida sódica puede reaccionar con plomo y cobre para formar azidas metálicas altamente explosivas.
 - ▶ Evite la eliminación de estas soluciones en sistemas de plomería sanitarios o industriales.
 - ▶ Evitar su liberación al medio ambiente.
- El uso de reactivos distintos de los especificados con los componentes de este kit puede producir resultados erróneos.
- La prueba debe realizarse en una zona que disponga de la ventilación adecuada.
- Deseche los envases y contenido no utilizado conforme a los requerimientos locales, estatales y federales reglamentarios.
- Vista preferentemente ropa protectora, guantes y protección para ojos/cara cuando esté manipulando los componentes del kit.
- Lavarse bien las manos después de manipular el kit.
- Para obtener información adicional sobre símbolos de peligro, seguridad, manipulación y eliminación de los componentes de este kit, consulte la Ficha de datos de seguridad (*Safety Data Sheet, SDS*) que se encuentra en quidel.com

Preparación de la Solución de PBS 1X

- Tras la conservación entre 2°C y 8°C, algunas sales del 40X PBS Concentrate pueden haberse cristalizado. Caliente la solución para llevarla a temperatura ambiente (20°C a 25°C) para redissolver los cristales y mezcle.
- Añada el contenido de los 25 ml totalmente disueltos del 40X PBS Concentrate a 975 ml de agua desmineralizada.
- Rotule la 1X PBS con una fecha de caducidad de sesenta (60) días después de su reconstitución y conserve a temperatura ambiente.

Preparación de la Solución de acetona 80%

- Añada 20 ml de agua destilada o desmineralizada en el recipiente de 100 ml.
- Añada 80 ml de acetona en el recipiente y mezcle por inversión.
- Rotule el recipiente indicando el contenido, la fecha de la dilución y las iniciales del técnico. Almacenar la solución de acetona a temperatura ambiente.

Instrucciones de conservación

Table 1. Condiciones de almacenaje de los componentes del kit

Metapneumovirus DFA Reagent	Almacenar entre 2°C y 8°C en la oscuridad.
Mounting Fluid	
hMPV Antigen Control Slides	Almacenar entre 2°C y 8°C.
40X PBS Concentrate NOTA: El concentrado se puede cristalizar cuando se almacena entre 2°C y 8°C. Los cristales se disuelven cuando se calienta el concentrado a temperatura ambiente.	Almacenar líquido entre 2°C y 8°C antes de la dilución.
1X PBS	Almacenar a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C).

Estabilidad

Los reactivos y componentes retendrán toda su potencia hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta de cada frasco si ha sido conservado a las temperaturas recomendadas. La exposición a la luz de la DFA Reagent y Mounting Fluid debe mantenerse al mínimo.

Deseche la 1X PBS si se enturbia.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La correcta recogida y manipulación de la muestra del paciente son los factores más importantes para una exitosa detección de hMPV. La recogida de la muestra, su procesamiento y el cultivo celular de los virus deben realizarse únicamente por personal formado en dichos procedimientos. Durante toda la recogida y manipulación de muestras, debe prestarse atención para evitar la generación de aerosoles.

Para las recomendaciones sobre recogida y procesamiento de muestras, consulte CLSI Approved Viral Culture Guidelines.¹⁶

Todos los agentes potencialmente infecciosos deben transportarse según las normas de International Air Transport Association (IATA), International Civil Aviation Organization, (ICAO), Titles 42 y 49 del US Code of Federal Regulations, u otros requisitos regulatorios, según sean aplicables.

Las muestras deben transportarse al laboratorio entre 2°C y 8°C. Esta temperatura se puede alcanzar mediante el uso de paquetes de frío, el hielo húmedo, espuma refrigerante, u otros refrigerantes.

Las muestras deben transportarse sobre hielo húmedo hasta el laboratorio. Procesarlas y realizarles las pruebas con toda la prontitud posible o conservadas entre 2°C y 8°C. Las muestras deben conservarse entre 2°C y 8°C durante no más de 72 horas antes de realizar las pruebas. Si se requiere más tiempo de almacenamiento, las muestras deben congelarse a –70°C o menos.

Debe evitarse el congelamiento y descongelamiento de las muestras puesto que ello resultará en pérdida de viabilidad de los virus, y menor sensibilidad de la prueba.

PROCEDIMIENTO

Comentarios y precauciones preliminares

- Cumpla con los volúmenes y tiempos recomendados en el siguiente procedimiento para asegurar la obtención de resultados exactos.
- Cuando tiña con reactivos fluorescentes y examine las células microscópicamente para detectar para vírica específica la fluorescencia, es muy importante incluir controles, tanto positivos como negativos, para monitorizar el procedimiento y el rendimiento de los reactivos. Se recomienda correr dichos controles con cada tanda de muestras de pacientes.
- Coloque cerrado, cámara humidificado para la celebración de diapositivas durante la tinción en el incubador para equilibrar entre 35°C y 37°C antes de la tinción. Al hacerlo, los portaobjetos de la prueba y los reactivos llegarán a la temperatura más rápidamente, dando una tinción más rápida.
- Lleve el Metapneumovirus DFA Reagent a temperatura ambiente (20°C to 25°C) a temperatura ambiente antes del uso, e inmediatamente retórnelos al refrigerador después del uso para conservar entre 2°C y 8°C.

Pruebas de cultivo celular

- Las buenas prácticas de laboratorio indican correr los controles virales positivos y negativos con cada nueva tanda de células para confirmar su rendimiento en el cultivo de virus específicos.
- Es aconsejable retener el medio eliminado de las monocapas positivas hasta después de obtener resultados con la tinción. Si existiese alguna duda con respecto al resultado de la muestra, se puede pasar el medio a otra monocapa para repetir la prueba.
- Cuando use cultivos celulares en placas multi-pocillo de poliestireno, diluya el fijador de acetona al 80% añadiendo 20 ml de agua desmineralizada a 80 ml de acetona (ver *Materiales necesarios pero no suministrados*).
- No deje secar las monocapas antes de fijar; esto puede conducir a un alto teñido del fondo, no específicos de tinción y menor sensibilidad.
- No deje secar lo DFA Reagent sobre las monocapas; esto puede conducir a un alto teñido del fondo, no específicos de tinción y menor sensibilidad.

Microscopía de inmunofluorescencia:

- Examine los controles positivos y negativos antes de examinar las muestras de prueba. Si un control no tiene el rendimiento esperado, repase los pasos y las condiciones bajo las que se realizó la prueba para determinar la(s) causa(s) que dieron origen al fallo. No informe los resultados para las muestras de pacientes a menos que los controles tengan el rendimiento esperado.

- Tres son los aspectos del microscopio de fluorescencia que deben funcionar correcta y óptimamente para alcanzar el máximo brillo de la fluorescencia:
 - ▶ La fuente de luz de activación tiene una vida finita y al envejecer, su calidad disminuye, lo que resulta en una intensidad menor de fluorescencia de los DFA Reagent. Cambiar la bombilla fluorescente de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
 - ▶ Una serie de lentes y espejo(s) concentra fuente de luz. Para obtener la máxima intensidad, éstos deben estar correctamente alineados.
 - ▶ Los filtros utilizados en el camino de luz deben ser los apropiados para fluoresceína.
- Artefactos fluorescentes puede observarse durante el examen de las células teñidas:
 - ▶ Morfológicamente, los artefactos de tinción no tienen la apariencia de una célula completa y normalmente no parecen estar en el plano de la monocapa. Detritos celulares, pelusa, etc. pueden absorber no específicamente los DFA Reagent, con el resultado de una fluorescencia de alta intensidad.
 - ▶ La fluorescencia intensa alrededor de la periferia de los pocillos del portaobjetos indica el secado del DFA Reagent, sugiriendo que la incubación fue demasiado larga o que la humedad no fue controlada.
 - ▶ Inadecuada eliminación de moco de muestra directa de material puede conducir a la tinción no específica al realizar la prueba directa de especímenes.
 - ▶ En especímenes directas, leucocitos y monocitos mayo trampa fluorescencia o RBC puede dejar una zona verde bruma sobre la muestra.
 - ▶ Generalizada, de bajo grado, de color amarillo-verde fluorescente puede ser visto en particular en las zonas que tienen células agrupadas o cerca de los agujeros en la monocapa en cultivo celular. Difusión de los atrapados mancha fluorescente se ve obstaculizado durante el lavado en las medidas resultantes no específico de fluorescencia.
- Manchados diapositivas debe ser protegido de la luz tanto como sea posible durante la prueba urante la prueba.
 - ▶ La decoloración o empaldecimiento de la fluorescencia de las células teñidas puede producirse por la exposición a la luz, particularmente cuando es de alta intensidad.
 - ▶ Esta decoloración puede producirse cuando se examina una célula teñida teñida en un microscopio de fluorescencia durante un período prolongado.

Preparación de la muestra

Para las recomendaciones sobre procesamiento de muestras, consulte CLSI Approved Viral Culture Guidelines.¹⁶

Prueba directa de la muestra

1. Coloque (spot) 25 µl de la suspensión celular preparada en una etiqueta, portaobjetos de vidrio para microscopio limpiado con acetona. Repita este paso con cada muestra
2. Deje secar completamente los pocillos al aire.
3. Fije las células a los portaobjetos usando acetona fresca y refrigerada durante 5 a 10 minutos.
4. **Precaución: La acetona es volátil e inflamable; manténgala alejada de las llamas.**
5. Retire los portaobjetos del fijativo y déjelos secar al aire.
6. Añadir una gota del Metapneumovirus DFA Reagent para cubrir completamente seca, fija las células en la preparación de portaobjetos.
7. Añadir una gota del Metapneumovirus DFA Reagent a los aspectos positivos y negativos de los pozos de un nuevo hMPV Antigen Control Slide.
8. **Nota:** Utilice el control de antígeno portaobjetos una sola vez, no volver a teñir.
9. Coloque los portaobjetos en una cámara cubierta entre 35°C y 37°C durante 15 a 30 minutos.
10. Aclare las células teñidas con 1X PBS. Para sólo unos pocos portaobjetos, esto puede hacerse un vaso, frasco de lavado o jarra Coplin de 1X PBS. Para muchos portaobjetos, una placa portaobjetos con

capacidad para 10 a 20 portaobjetos puede colocarse en su recipiente de con 1X PBS. Para un enjuague efectivo, hunda y levante el(los) portaobjetos como mínimo cuatro veces.

11. Deseche el 1X PBS utilizado y repita el paso de lavado con nueva 1X PBS.
12. Realizar una última aclare las células teñidas con agua desmineralizada. Para sólo unos pocos portaobjetos, esto puede hacerse utilizar un vaso, frasco de lavado o jarra Coplin de agua desmineralizada. Para muchos portaobjetos, una placa portaobjetos con capacidad para 10 a 20 portaobjetos puede colocarse en su recipiente de con agua desmineralizada. Para un enjuague efectivo, hunda y levante el(los) portaobjetos como mínimo cuatro veces.
13. Absorba suavemente el exceso de agua desmineralizada.
14. Añada una gotita de Mounting Fluid a cada pocillo con células y cubra los pocillos con el cubreobjetos.
15. Examine las células teñidas y montadas usando un microscopio de fluorescencia con aumentos de entre 200X y 400X. (Ver '*Microscopía de Inmunofluorescencia*').
16. Ver '*Interpretación de Resultados*'.

Prueba de cultivo celular – Shell-vial

1. Examine la correcta morfología de las monocapas antes de la inoculación.
2. Aspire el medio de mantenimiento de las monocapas y añada 1 ml del medio de realimentación apropiado a cada shell-vial.
3. Añada 0,2 a 0,4 ml de la muestra o el control de virus preparada a cada shell-vial.
4. Centrifugue las shell-vials a 700xg durante 1 hora de 20°C a 25°C.
5. Coloque los shell-vials con tapón en un incubador entre 35°C y 37°C de hasta dos días.
6. Cuando una monocapa esté lista para la tinción, retire el medio por aspiración y añada 1 ml de 1X PBS debe lavarse.
7. Agite para mezclar y luego aspire.
8. Repita este lavado paso con 1 ml adicional de 1 X PBS y luego aspire el líquido de la monocapa.
9. Añada 1 ml de acetona refrigerada al 100% y permiten fijar de 5 a 10 minutos entre 20°C y 25°C.
10. **Precaución: La acetona es volátil e inflamable; manténgala alejada de las llamas.**
11. Extraiga el acetona-fijativo por aspiración.
12. Añada 0,5 ml del 1 X PBS para humedecer la monocapa
13. Mezclar por agitación de éste suavemente et aspirado completamente.
14. Añada 4 gotas del Metapneumovirus DFA Reagent a las monocapas fijadas de las muestras del paciente y de control, y incline a un lado y a otro para **asegurar una cobertura completa** de la monocapa por el Reactivo.
15. Coloque los shell-vials con tapón en un incubador entre 35°C y 37°C durante 15 a 30 minutos.
16. Aspire el Metapneumovirus DFA Reagent de las monocapas.
17. Añada 1 ml de 1X PBS debe lavarse.
18. Retire la 1X PBS por aspiración, repita el paso de lavado y vuelva a retirar por aspiración la 1X PBS.
19. Añada 1 ml de agua desmineralizada a cada shell-vial.
20. Extraiga el agua desmineralizada por aspiración.
21. Levante el cubreobjetos desde el fondo del shell-vial con una aguja de punta curva en un tambor de jeringa. Tomándolo con un fórceps de punta fina, transfíralo, con la monocapa hacia abajo, a una gotita de Mounting Fluid en un portaobjetos de microscopio estándar.
22. Examine las monocapas teñidas usando un microscopio de fluorescencia con aumentos de entre 200X y 400X. (Ver '*Microscopía de Inmunofluorescencia*').
23. Ver '*Interpretación de Resultados*'.

Prueba de cultivo celular – placa multi-pocillos

1. Examine la correcta morfología de las monocapas antes de la inoculación.

2. Aspire el medio de mantenimiento de las monocapas y añada 1 ml del medio de realimentación apropiado a cada monocapa de la placa multi-pocillos de 24 pocillos, añada 0,8 ml a cada monocapa de placa de 48 pocillos.
3. Añada 0,2 a 0,4 ml de la muestra preparada al pocillo que corresponde de una placa multi-pocillos.
4. Centrifugue las placas multi-pocillos a 700xg durante 1 hora de 20°C a 25°C.
5. Coloque las placas multi-pocillos tapadas en un incubador entre 35°C y 37°C con una atmósfera humidificada, de CO₂ al 5% hasta dos días después de la inoculación.
6. Cuando una monocapa esté lista para la tinción, retire el medio por aspiración y suavemente y añada 1 ml de 1X PBS.
7. Agite para mezclar y luego aspire.
8. Repita este lavado con 1 ml adicional de 1X PBS y luego aspire.
9. Añada 1 ml de acetona acuosa al 80% y permiten fijar de 5 a 10 minutos entre 20°C y 25°C.
10. **Nota:** No deje que el fijativo de acetona al 80% permanezca en los pocillos de poliestireno más de 10 minutos porque puede agrietar y enturbiar el plástico, dificultando el examen de las monocapas.
11. **Precaución: La acetona es volátil e inflamable; manténgala alejada de las llamas.**
12. Extraiga el acetona-fijativo por aspiración.
13. Añada 0,5 ml del 1X PBS para humedecer la monocapa.
14. Agite y luego aspire completamente.
15. Añada 4 gotas del Metapneumovirus DFA Reagent a las monocapas fijadas de las muestras del paciente y de control en cada monocapa de la placa multi-pocillos de 24 pocillos, añada 3 gotas del Metapneumovirus DFA Reagent a las monocapas fijadas de las muestras del paciente y de control en cada monocapa de la placa de 48 pocillos. Incline a un lado y a otro para **asegurar una cobertura completa** de la monocapa por el Reactivo.
16. Coloque la placa multi-pocillos tapada en un incubador humidificado entre 35°C y 37°C durante 15 a 30 minutos.
17. Aspire el Metapneumovirus DFA Reagent de las monocapas.
18. Añada 1 ml de 1X PBS debe lavarse.
19. Retire la 1X PBS por aspiración, repita el paso de lavado y vuelva a retirar por aspiración al 1X PBS.
20. Añada 1 ml de agua desmineralizada a cada pocillo.
21. Añada 1 ml de agua desmineralizada.
22. Añada 2 a 3 gotas de Mounting Fluid a cada monocapa, luego tape la placa.
23. Examine las monocapas teñidas
24. Examine las células teñidas y montadas usando un microscopio de fluorescencia con aumentos de entre 200X y 400X. (Ver '*Microscopía de Inmunofluorescencia*').
25. Ver '*Interpretación de Resultados*'.

CONTROL DE CALIDAD

Reactivos

- Un fresco hMPV Antigen Control Slide deben teñirse cada vez que se realiza el procedimiento de tinción para asegurar el correcto rendimiento de la prueba.
- Los pocillos positivos mostrarán múltiples células infectadas de fluorescencia verde manzana.
- El pocillo negativo mostrará únicamente células negativas teñidas a rojo apagado que debido de contraste Azul de Evans.
- Para considerarlos válidos, los controles positivos y negativos deben demostrar la fluorescencia apropiada a los resultados de las muestras. Los Antigen Control Slides también puede ayudar a interpretar las muestras de los pacientes.

Cultivo celular

- Los controles hMPV positivos y negativos deben correrse con cada nueva tanda de células para confirmar su rendimiento en el cultivo hMPV.
- Para asegurar la sensibilidad viral, las monocapas control con virus inoculado deben incluirse cada vez que se use un nuevo lote de cultivo celular.
- Debe teñirse una monocapa no inoculada de cada lote para que sirva como control negativo. Las condiciones adversas de conservación o los procedimientos de manipulación también se reflejarán en el control negativo.
- Si los cultivos de control no tienen un rendimiento correcto, los resultados se consideran no válidos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Examen de las muestras y los controles

- Examine primero los controles para asegurar el correcto rendimiento de la prueba antes de examinar las muestras de los pacientes.
- Una reacción positiva hMPV es aquella en la que se observa una fluorescencia verde manzana brillante en las células citoplasma.
- La fluorescencia de las no infectadas será de un rojo apagado debido a la contra-tinción Azul de Evans incluida en el DFA Reagent.
- Examine todo el punto (spot) celular o monocapa de células antes de informar los resultados finales.
- No informe los resultados para las muestras de pacientes a menos que los controles tengan el rendimiento esperado.

Artefactos de la tinción

- Los bordes secos de la monocapa o los agrupamientos celulares pueden tener una fluorescencia no específica debido al atrapamiento de anticuerpos.
- Las células muertas, redondeadas, pueden tener una fluorescencia no específica verde oliva apagado debido a la toxicidad de la muestra o a la conservación celular incorrecta.
- La humedad controlada correctamente durante la tinción y el lavado adecuado entre un paso y otro ayuda a prevenir la tinción no específica.

Resultados de la prueba directa de la muestra

- Se evalúa la calidad de la muestra con respecto al número de células del epitelio columnar presentes examinando diferentes campos a una amplificación de 200X.
- Si se observan células fluorescentes en una muestra, se informa: "Se han detectado antígenos virales de metapneumovirus en el análisis directo de la muestra".
- Para informar una muestra como negativa, la misma debe contener 20 o más células del epitelio columnar. No se consideran válidas las muestras que contienen menos de 20 células epiteliales. Se debe obtener y analizar una nueva muestra. Una muestra satisfactoria en la que no se detectan células fluorescentes específicas del virus debe informarse como "No se detectaron antígenos de metapneumovirus en la prueba directa de la muestra". Sin embargo, dichos resultados negativos deben confirmarse utilizando otra prueba molecular autorizada por la FDA.

Resultados del aislamiento/confirmación del cultivo

- Examine toda el pocillo o la monocapa de células para determinar si hay células fluorescentes específicamente infectadas por el hMPV. Si no se detectan células fluorescentes, informe: "Ningún metapneumovirus aislado por cultivo celular".

- Si se detecta fluorescencia específica de hMPV, infórmela como “Metapneumovirus aislado por cultivo celular”.

LÍMITES DEL PROCEDIMIENTO

- La detección de antígenos virales específicos del hMPV depende de la recogida adecuada de la muestra, su manejo, transporte, almacenamiento y preparación. Si estos procedimientos no se llevan a cabo correctamente en cualquiera de sus pasos los resultados obtenidos pueden ser erróneos.¹⁷
- No se han establecido las características de rendimiento de la prueba para la tinción directa de la muestra en muestras respiratorias que no sean de escobillones de muestras y aspirados/lavados nasales o nasofaríngeos. El empleo del D³ DFA Metapneumovirus Identification Kit para la prueba directa de otras muestras respiratorias está restringido y es responsabilidad del usuario establecer los parámetros de rendimiento de la prueba.
- Los tiempos de incubación o las temperaturas distintas de las citadas en las instrucciones para la prueba puede dar resultados erróneos.
- La detección del hMPV variará enormemente según la calidad de la muestra en el momento de la recogida y su manejo posterior. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de que exista infección por hMPV y no debe utilizarse como la única base para tomar decisiones sobre el diagnóstico, el tratamiento o la medicación del paciente. Los resultados de la prueba deben ser interpretados por un profesional de atención de la salud formado conjuntamente con la información disponible de los estudios epidemiológicos, los signos y síntomas clínicos, el historial médico del paciente y los resultados de otros procedimientos diagnósticos.
- Los anticuerpos monoclonales utilizados en este kit provienen de hibridomas generados utilizando células infectadas con el virus como inmunógeno. No se han determinado los antígenos virales específicos detectados por los anticuerpos.
- Dado que los anticuerpos monoclonales han sido preparados utilizando cepas de hMPV definidos, pueden no detectar todas las variantes antigénicas o las nuevas cepas de los virus, si aparecieran. Los anticuerpos monoclonales puede no detectar cepas de virus que han sufrido cambios menores de aminoácidos en la región epitópica objetivo.
- El Metapneumovirus DFA Reagent detecta los cuatro subtipos de hMPV reconocidos (subtipos A1, A2, B1 y B2), pero no los diferencia.
- No se han establecido los efectos de la terapia antiviral sobre el rendimiento de este kit.
- Un resultado negativo sobre en una muestra directa o cultivada no excluye la presencia de hMPV. Dichos resultados negativos deben confirmarse utilizando otra prueba molecular autorizada por la FDA.
- Los antígenos hMPV virales detectados en algunas muestras directas pueden provenir de virus no viables y no pueden aislarse por cultivo.
- No se ha establecido el rendimiento del D³ DFA Metapneumovirus Identification Kit en pacientes inmunocomprometidos.
- El rendimiento del kit únicamente puede asegurarse cuando los componentes usados en el ensayo son los suministrados por Diagnostic Hybrids, Inc.
- La conservación prolongada de los Metapneumovirus DFA Reagent bajo luz brillante reducirá la intensidad de la tinción.
- La tinción con fondo claro puede producirse con muestras contaminadas con cepas de *Staphylococcus aureus* que contienen grandes cantidades de proteína A. La proteína A se ligará no específicamente a las porciones F_c de los anticuerpos conjugados. Dicha unión puede distinguirse de la unión del antígeno viral sobre la base de la morfología, p.ej., la fluorescencia ligada a *S. aureus* aparece como pequeños (~1 diámetro micrón) puntos brillantes. Los resultados de los cultivos celulares con contaminación bacteriana deben interpretarse, por lo tanto, con precaución.

VALORES ESPERADOS

Muchas infecciones respiratorias son estacionales. El carácter estacional del hMPV todavía no se ha establecido. En el estudio clínico prospectivo multicentro realizado con el D³ DFA Metapneumovirus Identification Kit (D³ DFA MPV Kit) de muestras respiratorias directas, se realizaron las pruebas a un total de 2109 muestras procedentes de tres laboratorios clínicos de los EE.UU. Las muestras se tomaron durante las estaciones de los virus respiratorios de los años 2005 y 2006 (diciembre 2005 a abril 2006 y diciembre 2006 a marzo 2007). La prevalencia del hMPV según lo determina el D³ DFA MPV Kit en la muestra directa varió de 8,1% a 11,3% según el centro, siendo el promedio total de 9,3%. La Tabla 2 siguiente muestra los datos correspondientes al número y porcentaje de casos positivos para hMPV, calculados por edad y grupo, obtenidos con la prueba de muestra directa utilizando el D³ DFA MPV Kit:

Tabla 2. Prevalencia de hMPV en Estudios Clínicos

Grupo de Edad	Total de Muestras Evaluado	hMPV Positivo para el D ³ DFA MPV Kit	
		Numero Positivo	Prevalencia Observado
< 1 mes	104	1	1.0%
≥ 1 mes a < 2 años	1249	124	9.9%
≥ 2 años a < 5 años	293	30	10.2%
≥ 5 años a < 12 años	151	11	7.3%
≥ 12 años a < 18 años	65	1	1.5%
≥ 18 años a < 21 años	10	1	10.0%
≥ 21 años a < 60 años	90	3	3.3%
≥ 60 años	123	13	10.6%
No se información	24	0	0%
Suma	2109	184	8.7%

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO ESPECÍFICAS

Características Clínicas de Funcionamiento

Prueba Directa de la Muestra

Las características del rendimiento del DHI D³ DFA Metapneumovirus Identification Kit para la prueba de muestra directa se establecieron durante los estudios prospectivos realizados en 3 laboratorios clínicos situados en distintas ubicaciones de los EE.UU. durante las estaciones de los virus respiratorios de los años 2005 y 2006 (diciembre 2005 a abril 2006 y diciembre 2006 a marzo 2007). Todas las muestras utilizadas en los estudios que cumplían los criterios de inclusión y exclusión representaron el exceso, restos de muestras respiratorias recogidas prospectivamente de individuos sintomáticos con presunta infección respiratoria, sometidos a un examen de rutina o un análisis por cada centro, muestras que de lo contrario habrían sido desechadas. Las muestras individuales fueron desvinculadas de todos los identificadores de los pacientes y se les asignó un código de muestra en el estudio. Todos los centros clínicos recibieron exenciones del consentimiento informado de sus respectivos CRI para este estudio.

El rendimiento del DHI D³ DFA MPV Kit se evaluó y comparó con un algoritmo predeterminado que empleó métodos de comparación compuestos en los centros 1 y 2 del estudio. Los métodos de comparación compuestos consistieron en el cultivo viral, una RT-PCR en tiempo real del hMPV desarrollada y validada por

DHI seguida por un ensayo de secuenciación genético bidireccional.^a El ensayo de comparación por RT-PCR en tiempo real para el hMPV desarrollado por DHI tiene como objetivo el gen de la nucleocápside del hMPV. Se consideró “verdadero” positivo para el hMPV cualquier muestra con resultado positivo por cultivo viral, o cuyos datos de secuenciación bidireccional cumplieran los criterios predefinidos de aceptación de la calidad y se alineaban correctamente con las secuencias del hMPV depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), presentando valores E (esperados) aceptables.^b Se consideró una muestra como “verdadero” negativo para el hMPV cuando el resultado de la prueba fue negativo tanto en cultivo viral como en la prueba de comparación por la RT-PCR en tiempo real para el hMPV desarrollada por DHI.

El rendimiento del DHI D³ DFA MPV Kit se evaluó y comparó únicamente con la misma RT-PCR en tiempo real para el hMPV desarrollada y validada por DHI seguida de un ensayo de análisis de secuenciación bidireccional según descrito más arriba en el Centro de Estudio 3. Toda muestra cuyos datos de secuenciación bidireccional cumplieran los criterios predefinidos de aceptación de la calidad y se alineaban correctamente con las secuencias del hMPV depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), presentando valores E aceptables fue considerada positiva para el hMPV. Las pruebas negativas de la RT-PCR en tiempo real para hMPV desarrollada por DHI se consideraron negativas para el hMPV.

Centro de Estudio 1

El **Centro de Estudio 1** evaluó un total de 1564 muestras respiratorias nuevas, recogidas desde diciembre 2006 a marzo 2007, enviadas al laboratorio de análisis de virus respiratorios. Se prepararon portaobjetos con células lavadas con tampón salino fosfato (PBS) provenientes de las muestras recién recogidas y fijadas según el protocolo recomendado. Los portaobjetos se tiñeron de acuerdo con el procedimiento indicado en las instrucciones del producto.

La Tabla 3 siguen muestra la distribución de edad y género de los individuos estudiados en el Centro 1 del Estudio:

Tabla 3. Centro de Estudio 1 –Distribución de Edad y Género

Sexo	Femenino	Masculino
Suma	687	877
Años		
< 1 mes	42	50
≥ 1mes a < 2 años	444	617
≥ 2 años a < 12 años	164	185
≥ 12 años a < 18 años	30	20
≥ 18 años a < 21 años	4	3
≥ 21 años	3	2
Edad no informó	0	0

^a La validación analítica del RT-PCR de hMPV en tiempo real seguida por el ensayo comparativo de secuenciación bi-direccional incluyó sensibilidad analítica y estudio de reactividad, estudio de especificidad analítica y estudio de eficiencia de extracción. La sensibilidad analítica (límite de detección o “LoD”) del RT-PCR de hMPV en tiempo real seguida por el ensayo comparativo de secuenciación bi-direccional fue determinada usando muestras en existencia ya cuantificadas (TCID₅₀/mL) de las 4 cepas de hMPV (subtipos A1, A2, B1 y B2) diluidas en matriz nasofaríngeo clínico hMPV negativo, y varió entre 10 y 50 TCID₅₀/mL.

^b Los valores E (esperanza) obtenidos a partir de los ensayos clínicos variaron de 2e-77 a 2e-67. El valor E del alineamiento NCBI BLAST indica la significancia estadística de un alineamiento dado por pares y refleja el tamaño de la base de datos y el sistema de puntuación utilizado. Cuanto menor es la esperanza, más significativo es el alineamiento. Si un alineamiento tiene un valor E de 1e-3 significa que existe una probabilidad de 1 en 1000 de que ocurra solamente por azar. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=handbook.section.614>). Por lo tanto un valor E que varía de 2e-67 a 2e-77 tiene una muy baja probabilidad de que el alineamiento se produzca únicamente por azar.

De las 1564 muestras respiratorias recién recogidas que se analizaron, 1509 fueron muestras de aspirados nasofaríngeos o lavados nasales. Debido al número insuficiente de muestras para establecer el rendimiento del D³ DFA Metapneumovirus Identification Kit, se eliminaron otros 55 tipos de muestras respiratorias para el análisis de rendimiento. De las 1509 muestras de aspirados nasofaríngeos y lavados nasales recién recogidas que se analizaron, se excluyeron 27 muestras más del análisis del rendimiento debido a su insuficiente volumen para los métodos de comparación. Se contó, por lo tanto, con un total de 1482 muestras de aspirados nasofaríngeos y lavados nasales recién recogidas para la prueba. La Tabla 4 siguen muestra los resultados del estudio del tipo de muestra en el Centro de Estudio 1:

Tabla 4. Centro de Estudio 1 – Comparación de los resultados utilizando D³ DFA MPV Kit, con los resultados utilizando el comparador de Métodos compuesto

Lavados Nasals Frescos/Aspirados Nasofaríngeos	Comparador de Métodos compuesto		
	DS-FA	Positivo	Negativo
Positivo	122	3	125
Negativo	108	1249	1357
Suma	230	1252	1482
95% CI			
Sensibilidad	122/230	53.0%	46.6% to 59.5%
Especificidad	1249/1252	99.8%	99.3% to 99.9%

Centro de Estudio 2

El Centro de Estudio 2 evaluó un total de 371 muestras respiratorias nuevas, recogidas desde diciembre 2005 a enero 2006, enviadas al laboratorio de análisis de virus respiratorios. Se prepararon portaobjetos con células lavadas con tampón salino fosfato (PBS) provenientes de las muestras recién recogidas y fijadas según el protocolo recomendado. Los portaobjetos se tiñeron de acuerdo con el procedimiento indicado en las instrucciones del producto.

La Tabla 5 siguen muestra la distribución de edad y género de los individuos estudiados en el Centro 2 del Estudio:

Tabla 5. Centro de Estudio 2 –Distribución de Edad y Género

Sexo	Femenino	Masculino
Suma	155	216
Años		
< 1 mes	2	5
≥ 1 mes a < 2 años	50	83
≥ 2 años a < 12 años	26	37
≥ 12 años a < 18 años	2	5
≥ 18 años a < 21 años	1	0
≥ 21 años	74	86
Edad no informó	0	0

De las 371 muestras respiratorias recién recogidas que se analizaron, todo fueron muestras de escobillones nasofaríngeos o nasales. Tres (3) fueron excluidos del análisis debido a su insuficiente volumen para los métodos de comparación, lo que resulta en un total de 368 fresco muestras de escobillones nasofaríngeos o

nasales para su análisis. La Tabla 6 muestra los resultados del estudio del tipo de muestra en el Centro de Estudio 2:

Tabla 6. Centro de Estudio 2 – Comparación de los resultados utilizando D³ DFA MPV Kit, con los resultados utilizando el comparador de Métodos compuesto

Escobillones frescas nasals/nasofaríngeos	Comparador Métodos compuesto		
	Positivo	Negativo	Suma
DS-FA			
Positivo	41	1	42
Negativo	17	309	326
Suma	58	310	368
95% CI			
Sensibilidad	41/58	70.7%	57.3% to 81.9%
Especificidad	309/310	99.7%	98.2% to 100%

Centro de Estudio 3

El Centro de Estudio 3 evaluó un total de 174 muestras respiratorias nuevas, recogidas desde marzo 2006 a abril 2006, enviadas al laboratorio de análisis de virus respiratorios. Se prepararon portaobjetos con células lavadas con tampón salino fosfato (PBS) provenientes de las muestras recién recogidas y fijadas según el protocolo recomendado. Los portaobjetos se tiñeron de acuerdo con el procedimiento indicado en las instrucciones del producto.

La Tabla 7 siguen muestra la distribución de edad y género de los individuos estudiados en el Centro 3 del Estudio:

Tabla 7. Centro de Estudio 3 –Distribución

Sexo	Femenino	Masculino	Sexo no informó
Suma	78	95	1
Años			
< 1 mes	1	1	0
≥ 1 mes a < 2 años	19	37	0
≥ 2 años a < 12 años	16	17	0
≥ 12 años a < 18 años	3	6	0
≥ 18 años a < 21 años	2	0	0
≥ 21 años	26	22	0
No se informó	11	12	1

De las 174 muestras respiratorias recién recogidas que se analizaron, 62 fueron muestras de aspirados nasofaríngeos o lavados nasales, y 110 fueron muestras de escobillones nasofaríngeos o nasales. De los 62 muestras de aspirados nasofaríngeos o lavados nasales, 30 fueron excluidos del análisis debido a la falta de volumen para el método de comparación, lo que resulta en un total de 32 muestras de aspirados nasofaríngeos o lavados nasales para su análisis. De las 110 muestras de escobillones nasofaríngeos o nasales, 44 fueron excluidos del análisis debido a su insuficiente volumen para los métodos de comparación, lo que resulta en un total de 66 muestras de escobillones nasofaríngeos o nasales para su análisis. Los siguen Tablas 8 y 9 muestra los resultados del estudio del tipo de muestra en el Centro de Estudio 3:

Tabla 8. Centro de Estudio 3 - Comparación de los resultados utilizando D³ DFA MPV Kit, con los resultados utilizando el DHI hMPV RT-PCR en tiempo real seguida de un ensayo comparador de secuenciación

Lavados Nasals Frescos/Aspirados Nasofaríngeos	hMPV RT-PCR en tiempo real seguida de un ensayo comparador de secuenciación			
	DS-FA	Positivo	Negativo	Suma
Positivo		9	0	9
Negativo		0	23	23
Suma		9	23	32
95% CI				
Coincidencia de porcentaje positivo*	9/9	100.0%	66.4% a 100%	
Coincidencia de porcentaje negativo*	23/23	100.0%	85.2% a 100%	

Tabla 9. Centro de Estudio 3 – Comparación de los resultados utilizando D³ DFA MPV Kit, con los resultados utilizando el DHI hMPV RT-PCR en tiempo real seguida de un ensayo comparador de secuenciación

Escobillones frescas nasals/nasofaríngeos	hMPV RT-PCR en tiempo real seguida de un ensayo comparador de secuenciación			
	DS-FA	Positivo	Negativo	Suma
Positivo		3	0	3
Negativo		1	62	63
Suma		4	62	66
95% CI				
Coincidencia de porcentaje positivo*	3/4	75.0%	19.4% to 99.4%	
Coincidencia de porcentaje negativo*	62/62	100.0%	94.2% to 100%	

*Debido a que no se evaluó el rendimiento del D³ DFA MPV Kit en el Centro de Estudio 3 por comparación con los métodos se utilizan concordancias porcentuales positivas y negativas en lugar de datos de sensibilidad y especificidad para representar el rendimiento.

Pruebas de Células Cultivadas

Las características del rendimiento del DHI D³ DFA MPV Kit el análisis de muestras de cultivos celulares se estableció durante la realización de un estudio prospectivo en DHI durante el período estacional del virus en el año 2007 (enero a abril 2008). Todas las muestras utilizadas en los estudios que cumplieran los criterios de inclusión y exclusión representaron el exceso, restos de muestras respiratorias que fueron recogidas prospectivamente de individuos sintomáticos con presunta infección respiratoria, sometidos a un examen de rutina o un análisis por cada centro, muestras que de lo contrario habrían sido desechadas. Las muestras individuales fueron desvinculadas de todos los identificadores de los pacientes y se les asignó un código de muestra en el estudio.

El rendimiento del D³ DFA MPV Kit se evaluaron y compararon muestras de cultivos celulares con la misma RT-PCR en tiempo real para hMPV desarrollada y validada por DHI seguidas de una prueba de análisis de secuenciación genética bidireccional como se ha descrito más arriba en el Centro de Estudio 4. Toda muestra derivada de un cultivo celular cuyos datos de secuenciación genética bidireccional cumplieran los criterios predefinidos de aceptación de la calidad y se alineaban correctamente con las secuencias del hMPV depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) presentando valores E aceptables fue considerada positiva para hMPV. Las pruebas

negativas para la RT-PCR en tiempo real de DHI sobre muestras de cultivos celulares se consideraron hMPV negativas.

Centro de Estudio 4

Centro de Estudio 4 evaluados un total de 74 por congelación descongelado escobillones nasofaríngeos que fueron cultivadas y se tiñen de conformidad con la D³ DFA MPV Kit procedimiento. Cuadro 10 a continuación muestra los resultados del estudio en cultivo de células en las muestras del sitio de Estudio 4:

Tabla 10. Centro de Estudio 4 - Comparación de los resultados utilizando D³ DFA MPV Kit, con Resultados utilizando el DHI hMPV RT-PCR en tiempo real seguida de un ensayo comparador de secuenciación

Congelación descongelado escobillones nasofaríngeos amplificadas en cultivos celulares	hMPV RT-PCR en tiempo real seguida de un ensayo comparador de secuenciación			
	DFA	Positivo	Negativo	Suma
Positivo		5	0	5
Negativo		1	68	69
Suma		6	68	74
95% CI				
Coincidencia de porcentaje positivo*	5/6	83.3%	35.9% to 99.6%	
Coincidencia de porcentaje negativo*	68/68	100.0%	99.7% to 100%	

Estudio Analíticos

Estudio analítico para apoyar los cultivos de células de prueba para la reclamación para el D³ DFA Metapneumovirus Identification Kit

Los técnicos de tres laboratorios realizaron un estudio analítico para complementar los datos del estudio clínico obtenidos del análisis de células cultivadas en el Centro de Estudio 4. En dicho estudio se utilizaron aislados de hMPV bien caracterizados en cultivos celulares para apoyar que las células cultivadas confirman por el D³ DFA MPV Kit.

Se inocularon células LLC-MK₂ cultivadas con cepas aisladas conocidas (bien caracterizadas) de hMPV procedentes de University of Iowa Emerging Pathogens Laboratory (Laboratorio de patógenos emergentes de la Universidad de Iowa), situado en Coralville, IA. Se incubó el cultivo celular durante 48 horas para amplificar el virus. Se prepararon muestras celulares en portaobjetos de vidrio según describe el D³ DFA MPV Kit, utilizando suspensiones celulares de cada uno de los cultivos a tres concentraciones diferentes de células infectadas (inferior al 10%, entre un 20 y un 30%, y entre un 40 y un 50%). Se enviaron los portaobjetos a tres investigadores externos que tiñeron los preparados utilizando el D³ DFA MPV Kit, y los examinaron. Cada investigador proporcionó las interpretaciones de los resultados del ensayo, es decir, presencia o ausencia de células fluorescentes. Los portaobjetos preparados replicados fueron evaluados en DHI mediante tinción y examen con un anticuerpo monoclonal murino alternativo no marcado (MAb-8) dirigido contra la cepa de hMPV MPV75-1988/CAN98-75, que se desarrolló en el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) por métodos estándar. [Nota: El MAb-8 está disponible únicamente para su uso en investigación pues no ha sido autorizado por la FDA. Sin embargo, existen datos en la bibliografía que abordan su especificidad y sensibilidad para detectar el hMPV. (Landry et al, 2005)^{Error! Bookmark not defined.}] Quidel realizó también la prueba RT-PCR en tiempo real /secuenciación para el hMPV de DHI en cada uno de los aislados virales para verificar su identidad como hMPV.

El D³ DFA MPV Kit se detectó el 98,7% (74 de 75) de las suspensiones que se esperaba que contenían células infectadas derivadas de cultivos celulares. El MAb-8 producido en el CDC detectó el 100% (75 de 75) de las

muestras en suspensión que se esperaba que contenían células infectadas derivadas de cultivos celulares. El D³ DFA MPV Kit no detectó una muestra en suspensión correspondiente a la cepa hMPV B2. El nivel de infección estimado, según se vio en la muestra en suspensión teñida con el MAb-8 del CDC, fue menor que el 2%. Es posible que debido cuestiones de muestreo, el portaobjetos teñido con el D³ DFA MPV Kit no contuviera ninguna célula infectada.

La Tabla 11 siguen muestra se resumen los datos obtenidos en los tres sitios externos utilizando el D³ DFA MPV Kit, comparados con los resultados generados en las instalaciones de DHI utilizando el MAb-8:

Tabla 11. Comparación de los Resultados utilizando el D³ DFA MPV Kit, con los resultados utilizando el CDC MAb-8 Resultados (los datos de los 3 sitios combinados)

Portaobjetos derivadas de suspensiones cultivos celulares	CDC MAb-8			
	DFA	Positivo	Negativo	Suma
Positivo		74	0	74
Negativo		1	51	52
Suma		75	51	126
95% CI				
Coincidencia de porcentaje positivo *	74/75	98.7%	92.9% to 99.8%	
Coincidencia de porcentaje negativo *	51/51	100.0%	93.0% to 100%	

La Tabla 12 siguen muestra se resumen los datos obtenidos en los tres sitios externos utilizando el D³ DFA MPV Kit en comparación con el DHI hMPV RT-PCR en tiempo real / Secuencia de ensayo los resultados obtenidos en el DHI instalación:

Tabla 12. Comparación de los Resultados utilizando el D³ DFA MPV Kit, con los Resultados utilizando el hMPV RT-PCR en tiempo real Seguida de un ensayo comparador de secuenciación (datos obtenidos en los tres sitios combinado)

Portaobjetos derivadas de suspensiones cultivos celulares	hMPV RT-PCR en tiempo real Seguida de secuenciación			
	DFA	Positivo	Negativo	Suma
Positivo		74	0	74
Negativo		1	51	52
Suma		75	51	126*
95% CI				
Coincidencia de porcentaje positivo *	74/75	98.7%	92.9% to 99.8%	
Coincidencia de porcentaje negativo *	51/51	100.0%	93.0% to 100%	

* hMPV RT-PCR en tiempo real seguida por la secuencia de datos extrapolados a partir de la prueba, el más bajo de células positivas suspensión

Reproducibilidad

La reproducibilidad de la prueba fue evaluada en 3 laboratorios diferentes utilizando un panel de portaobjetos control con nivel de competencia del antígeno. El panel de reproducibilidad se componía de 5 miembros del panel. Cada miembro del panel se correspondía con un portaobjetos con 2 pocillos, cada una de los cuales contenía la misma preparación de células. Se utilizaron los siguientes preparados celulares para construir los portaobjetos:

- Células LLC-MK₂ no infectadas.

- hMPV (cepa A1) con título bajo crecido en células LLC-MK₂ (fabricado para contener entre 4 y 10% de células infectadas).
- hMPV (cepa A1) con título medio crecido en células LLC-MK₂ (fabricado para contener entre 20 y 30% de células infectadas).
- hMPV (cepa A1) con título alto crecido en células LLC-MK₂ (fabricado para contener entre 50 y 75% de células infectadas).

Tres laboratorios diferentes analizaron diariamente cada panel en dos análisis independientes durante 5 días (30 análisis en total). Se asignaron al azar los miembros del panel mediante diferentes números de identificación de los portaobjetos para que sirvieran como paneles "ciegos". Se tiñó en cada análisis un hMPV Antigen Control Slide (un portaobjetos de dos pocillos, uno pocillo con células positivas para hMPV derivadas de un cultivo celular, y otra con células derivadas de un cultivo celular no infectado) según las instrucciones de uso del D³ DFA MPV Kit. Se registraron los siguientes resultados para los portaobjetos control y los portaobjetos del panel:

- Presencia o ausencia de fluorescencia verde.
- Presencia de células que presentan fluorescencia verde.

Se utilizó un único lote de reactivo del D³ DFA MPV Kit. Se incluyó un total de 210 puntos de datos en el análisis de los datos del estudio de reproducibilidad (7 muestras y controles/experimento X 2 experimentos/día X 5 días X 3 centros = 210). El análisis de los datos combinados correspondientes a los tres centros demostró que la detección del hMPV se produce de manera reproducible. Se notificó la presencia de células infectadas por el hMPV en el 100% (120 de 120) de los pocillos en los que había células infectadas. El análisis de los datos combinados correspondientes a los tres centros demostró también que no se detectó hMPV en las células no infectadas. Se informó la ausencia de hMPV en 100% (90 de 90) de los pocillos en las que no había células infectadas. El porcentaje de concordancia total para el D³ DFA MPV Kit fue del 100% (210/210).

La Tabla 13 siguen muestra los resultados del estudio de reproducibilidad:

Tabla 13. Reproducibility Study Results

	Membro Grupo	hMPV A1 Bajo nivell	hMPV A1 Medio nivel	hMPV A1 Alto nivel	hMPV A1 Negativo	Control Positivo	Control Negativo	% de concordancia Total
	Concentración	4 a 10% células infectadas	20 a 30% células infectadas	50 a 75% células infectadas	Células no infectadas	50 a 75% células infectadas	Células no infectadas	
Centro 1	Concordancia con Resultado esperado	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	20/20 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	70/70 (100%)
Centro 2	Concordancia con Resultado esperado	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	20/20 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	70/70 (100%)
Centro 3	Concordancia con Resultado esperado	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	20/20 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	70/70 (100%)
	Concordancia total con Resultado esperado	30/30 (100%)	30/30 (100%)	30/30 (100%)	60/60 (100%)	30/30 (100%)	30/30 (100%)	210/210 (100%)
	95% CI	88.4% a 100%	88.4% a 100%	88.4% a 100%	94.0% a 100%	88.4% a 100%	88.4% a 100%	98.3% a 100%

Análisis de Sensibilidad y Reactividad

Límites de detección analíticos fueron determinados para cada uno de los 4 sub-lineajes genéticos reconocidos de hMPV (A1, A2, B1 y B2) para pruebas de muestras directas y de muestras cultivadas. Los resultados de

estos estudios también indicaron la existencia de reactividad analítica con representantes de cada uno de los cuatro subtipos genéticos de hMPV identificados, A1, A2, B1 y B2.

Límite de detección para muestras directas

Los límites de detección analíticos en especímenes directos para el D³ DFA MPV Kit fueron evaluados usando cultivos cuantificados de aislados caracterizados de cada uno de los 4 sub-lineajes de hMPV (A1, A2, B1 y B2). Las células infectadas fueron diluidas en serie a partir de un cultivo celular de 1.000 células/mL con una suspensión de células LLC-MK₂ no infectadas. Alícuotas de veinticinco microlitros (25 µL) de cada nivel de dilución fueron añadidas en láminas de microscopio de 10 réplicas, luego fijadas y teñidas de acuerdo a las instrucciones de uso descritas en esta hoja de información del producto. Cada celda fue examinada a una magnificación de 200X. Los resultados fueron reportados como el número de réplicas positivas por cada serie de 10. Los Límites de detección analíticos para cada uno de los 4 sub-lineajes genéticos de hMPV fueron definidos como las diluciones más bajas a las cuales por lo menos 9 de cada 10 réplicas fueron detectadas. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 14 a continuación:

Tabla 14. Limite de Detección del D³ DFA Metapneumovirus Identification Kit para Muestras Directas

Cepas virales	Células infectadas/mL	Número de repeticiones de células positivas	Limite de Detección determinación
hMPV A1	1000	10/10	25 células infectadas/mL
	200	10/10	
	100	10/10	
	50	9/10	
	25	9/10	
	12.5	2/10	
	6	0/10	
	3	2/10	
	1.5	0/10	
	0.8	0/10	
hMPV A2	1000	10/10	200 células infectadas/mL
	200	10/10	
	100	8/10	
	50	6/10	
	25	6/10	
	12.5	0/10	
	6	1/10	
	3	1/10	
	1.5	0/10	
	0.8	0/10	
hMPV B1	250	10/10	50 células infectadas/mL
	50	10/10	
	5	5/10	
	2.5	1/10	
	1.3	0/10	
	0.6	0/10	

Cepas virales	Células infectadas/mL	Número de repeticiones de células positivas	Limite de Detección determinación
	0.3	0/10	
	0.2	0/10	
	0.1	0/10	
	0.04	0/10	
hMPV B2	1000	10/10	100 células infectadas/mL
	200	10/10	
	100	9/10	
	50	2/10	
	25	0/10	
	12.5	1/10	
	6	0/10	
	3	0/10	
	1.5	0/10	
	0.8	0/10	

Límite de detección en muestras amplificadas en cultivos celulares

Se analizó el límite de detección del D³ DFA MPV Kit en muestras amplificadas en cultivos celulares utilizando sistemas de cultivo de células. Los resultados de estos estudios también indicaron la existencia de reactividad analítica con representantes de cada uno de los cuatro subtipos genéticos de hMPV identificados, A1, A2, B1 y B2. Se establecieron los límites de detección analítica de muestras amplificadas en cultivos celulares detectados con el D³ DFA MPV Kit para los cuatro subtipos de virus detectados en función del número de células fluorescentes detectadas por monocapa. Se realizaron diluciones decimales de cada stock del virus original. Se inocularon ocho pocillos de una placa R-Mix de 48 pocillos con 0,2 ml de los volúmenes con cada dilución. Las placas se centrifugaron a 700g durante 60 minutos, y se incubaron durante 48 horas entre 35°C y 37°C. Se tiñó cada pocillo con el D³ DFA MPV Kit, se la examinó a continuación a una magnificación 200X y se determinó el número de células fluorescentes. En este estudio, se define el límite de detección del ensayo en muestras amplificadas en cultivo como la concentración mínima de inóculo a la que se detectan pocillos positivos (es decir, que contienen células fluorescentes), en términos de TCID₅₀ (dosis infectiva del 50% en cultivo celular). La Tabla 15 siguen muestra los resultados:

Tabla 15. Limit of Detection of the D³ DFA MPV Kit for Cell Culture Amplified Specimens

Cepas Virales	Concentración de inóculo/pocillo	Células fluorescentes/pocillo
hMPV A1	50-TCID ₅₀	47,39,41,31,26,30,21,29
	5-TCID ₅₀	0,0,0,3,1,0,2,0
	0.5-TCID ₅₀	0,0,0,0,0,0,0,0
hMPV A2	50-TCID ₅₀	10,13,23,13,23,15,17,12
	5-TCID ₅₀	3,1,1,4,2,2,0,0
	0.5-TCID ₅₀	0,0,0,0,0,0,0,0
hMPV B1	50-TCID ₅₀	36,56,23,41,28,29,34,28
	5-TCID ₅₀	4,7,0,3,1,0,4,4
	0.5-TCID ₅₀	0,0,0,0,0,0,0,0

Cepas Virales	Concentración de inóculo/pocillo	Células fluorescentes/pocillo
hMPV B2	50-TCID ₅₀	25,49,36,41,53,68,43,27
	5-TCID ₅₀	0,3,1,1,5,6,3,5
	0.5-TCID ₅₀	0,0,0,0,0,0,0,0

NOTA: los valores son cifras de células fluorescentes por monocapa de células

Especificidad Analítica

El D³ DFA MPV Kit se analizó la reactividad cruzada con una variedad de células y microorganismos. Se alcanzaron condiciones estrictas de pruebas de reactividad cruzada combinando alta concentración del D³ DFA MPV Kit y títulos relativamente elevados de microorganismos. Se preparó el D³ DFA MPV Kit a una concentración 1,5X respecto de la suministrada en el kit. No se observó reactividad cruzada en ninguna de las 59 cepas de virus ni en los 16 tipos celulares analizados. Se evaluó la reactividad cruzada en veinticinco (25) cepas bacterianas, una de levaduras, 3 especies de Chlamydia spp., y un protozoo, incluyendo Staphylococcus aureus, bacteria productora de proteína A. A excepción de S. aureus, que presentó reactividad cruzada con el D³ DFA MPV Kit, todos los otros microorganismos dieron resultado negativo. En las tinciones de S. aureus se detectaban pequeños puntos de fluorescencia. Es posible que la proteína A producida por la bacteria S. aureus se una a la región Fc de algunos anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína. Dicha unión se puede distinguir de una interacción con el antígeno viral por su morfología, es decir, la fluorescencia asociada a S. aureus se caracteriza por unos pequeños puntos brillantes (~1 diámetro micrón). Por lo tanto, se deben interpretar con cautela los resultados de cultivos que presentan contaminación bacteriana.

Se analizó la reactividad cruzada de cincuenta y nueve (59) cepas virales. Según el tipo de virus particular, se inocularon de 71 a 714 TCID₅₀ virus en shell vials o en cultivos de placas multi-pocillos y se incubaron de 24 a 48 horas, para obtener un efecto citopático de +1 a +4. Se procesaron y tiñeron con el Metapneumovirus DFA Reagent 1,5X de acuerdo al procedimiento que se detalla en el prospecto del producto. Se examinaron las células teñidas a una amplificación de 200X. No se observó reactividad cruzada en los virus que figuran en la lista Tabla 16 siguen:

Tabla 6. Cepas Virales Probado para Reactividad Cruzada con D³ DFA MPV Kit Reagent

Virus	Cepa o Typo	D ³ DFA hMPV Resultados	Inóculo (TCID ₅₀)
Adenovirus	Type 1	–	714
	Type 3	–	714
	Type 5	–	714
	Type 6	–	714
	Type 7	–	714
	Type 10	–	714
	Type 13	–	714
	Type 14	–	714
	Type 18	–	714
	Type 31	–	714
	Type 40	–	714
Type 41	–	714	
Influenza A	Aichi (H3N2)	–	714
	Mal (H1N1)	–	714

Virus	Cepa o Typo	D³ DFA hMPV Resultados	Inóculo (TCID₅₀)
	Hong Kong (H3N2)	–	714
	Denver (H1N1)	–	714
	Port Chalmers (H3N2)	–	714
	Victoria (H3N2)	–	714
	New Jersey (HSWN1)	–	714
	WS (H1N1)	–	714
	PR (H1N1)	–	714
Influenza B	Hong Kong	–	714
	Maryland	–	714
	Mass	–	714
	GL	–	714
	Taiwan	–	714
	JH-001 isolate	–	714
	Russia	–	714
RSV	Long	–	714
	Wash	–	714
	9320	–	714
Parainfluenza 1	C-35	–	714
Parainfluenza 2	Greer	–	714
Parainfluenza 3	C-243	–	714
Parainfluenza 4	M-25	–	714
Parainfluenza 4b	CH-19503	–	714
HSV-1	1(f)	–	71
	MacIntyre	–	71
HSV-2	MS	–	71
	Strain G	–	71
CMV	Towne	–	714
	Davis	–	714
	AD169	–	714
Varicella-zoster	Webster	–	71
	Ellen	–	71
Echovirus	4	–	Porto control
	6	–	Porto control
	9	–	Porto control
	11	–	Porto control
	30	–	Porto control
	34	–	Porto control
Coxsackievirus	B1	–	Porto control
	B2	–	Porto control
	B3	–	Porto control
	B4	–	Porto control
	B5	–	Porto control
	B6	–	Porto control
Mumps	Bion (CDC V5-004)	–	Porto control
Rubeola (Measles)	Bion	–	Porto control

Se analizó la reactividad cruzada de dieciséis (16) tipos celulares. Se analizaron las células como monocapas intactas o puntos celulares legrados y punteados y se fijaron todos en acetona. Se tiñeron las monocapas confluentes o los puntos celulares con una preparación 1,5X del Metapneumovirus DFA Reagent según el procedimiento detallado en el prospecto del producto, y luego se examinó la reactividad cruzada. No se observó reactividad cruzada en las líneas celulares que figuran en la lista Tabla 17 siguientes:

Tabla 17. Líneas Celulares Probado para Reactividad Cruzada con D³ DFA MPV Kit Reagent

Línea celular	Tipo	D ³ DFA hMPV Resultados	Monocapa/ cell spot
A549	Human lung carcinoma	–	monocapa
Vero	African green monkey kidney	–	monocapa
HEp-2	Human epidermoid larynx carcinoma	–	monocapa
MRC-5	Human embryonic lung	–	monocapa
Mv1Lu	Mink lung	–	monocapa
MDCK	Canine kidney	–	monocapa
pRK	Rabbit kidney, primary	–	cell spot
pCMK	Cynomolgus monkey kidney, primary	–	cell spot
pRhMK	Rhesus monkey kidney, primary	–	monocapa
R-Mix	Mixed A-549 + Mv1Lu	–	monocapa
LLC-MK ₂	Rhesus monkey kidney	–	monocapa
BGMK	African green monkey kidney	–	monocapa
MRHF	Human foreskin fibroblast	–	monocapa
WI-38	Human embryonic lung	–	cell spot
NCI-H292	Human pulmonary mucoepidermoid carcinoma	–	monocapa
RD	Human rhabdomyosarcoma	–	monocapa

Se analizó la reactividad cruzada en portaobjetos controles disponibles comercialmente para treinta (30) microorganismos, entre los que se incluyeron cultivos de 25 bacterias y uno de levaduras, tres especies de *Chlamydia* y un protozoo. Se cultivaron las bacterias en suspensión y se depositaron sobre portaobjetos a una UFC (unidades formadoras de colonia) variable de $6,4 \times 10^4$ a $2,93 \times 10^7$ /pocillo en un punto de $10 \mu\text{l}$, dependiendo del tipo de bacteria. A continuación se tiñeron con el Metapneumovirus DFA Reagent 1,5X según el procedimiento detallado en el prospecto del producto. Se examinó la reactividad cruzada en las células teñidas a 400X aumentos. Se determinaron las concentraciones de cada organismo bacteriano cultivado por DHI para las pruebas de reactividad cruzada a partir de suspensiones de las bacterias en PBS utilizando el espectrofotómetro según los niveles estándar de la escala de McFarland 1,0 y 2,0 (equivalentes aproximadamente a $3,0 \times 10^6$ y $6,0 \times 10^6$ UFC por ml). Se prepararon portaobjetos con gotas de $10 \mu\text{l}$ de las suspensiones para obtener $3,0 \times 10^4$ ó $6,0 \times 10^4$ ufc por gota. Al mismo tiempo se colocó 1 ml de cada suspensión en placas de agar adecuadas para confirmar la formación de colonias. De acuerdo con la confirmación de los cultivos sobre agar, las concentraciones iniciales de las bacterias en el estudio variaron entre $6,4 \times 10^4$ y $2,93 \times 10^7$ UFC/pocillo. A excepción de *Staphylococcus aureus*, que presentó reactividad cruzada con el Metapneumovirus DFA Reagent, todos los otros microorganismos arrojaron resultado negativo. La reactividad con *S. aureus* se debe probablemente a la unión de la proteína A producida por *S. aureus*. Los microorganismos que se analizaron son Tabla 18 siguientes:

Tabla 18. Microorganismos sometidos a pruebas de reactividad cruzada con D³ DFA MPV Kit Reagent

Organismo	D ³ DFA hMPV Resultados	CFU Prueba
Bacteria		
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	–	~1.0 x 10 ⁷
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	–	9.7 x 10 ⁵
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	–	1.8 x 10 ⁵
<i>Bordetella pertussis</i>	–	4.7 x 10 ⁶
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	–	Porta control
<i>Chlamydophila psittaci</i>	–	Porta control
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	Porta control
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	–	2.5 x 10 ⁶
<i>Escherichia coli</i>	–	2.6 x 10 ⁵
<i>Gardnerella vaginalis</i>	–	5.0 x 10 ⁵
<i>Haemophilis influenzae type A</i>	–	9.3 x 10 ⁵
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	6.4 x 10 ⁶
<i>Legionella pneumophila</i>	–	6.5 x 10 ⁴
<i>Moraxella cartarrhalis</i>	–	6.4 x 10 ⁴
<i>Mycoplasma hominis</i>	–	~1.0 x 10 ⁴
<i>Mycoplasma orale</i>	–	~1.0 x 10 ⁴
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	–	~1.0 x 10 ⁴
<i>Mycoplasma salivarium</i>	–	~1.0 x 10 ⁷
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	–	1.3 x 10 ⁶
<i>Proteus mirabilis</i>	–	2.1 x 10 ⁶
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	1.0 x 10 ⁷
<i>Salmonella enteritidis</i>	–	2.5 x 10 ⁶
<i>Salmonella typhimurium</i>	–	1.8 x 10 ⁶
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	1.0 x 10 ⁷
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	9.6 x 10 ⁶
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	–	8.0 x 10 ⁵
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	2.9 x 10 ⁷
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	–	~1.0 x 10 ⁴
Protozoo		
<i>Trichomonas vaginalis</i>	–	Porta control
Levaduras		
<i>Candida glabrata</i>	–	8.7 x 10 ⁶

ASISTENCIA

Para realizar un pedido o para obtener servicio técnico, llame a un representante de Quidel al 800-874-1517 (en EE. UU.) o al +1 858-552-1100 (fuera de EE. UU.) de lunes a viernes, de 8:00 a. m. a 5:00 p. m. (horario de la costa este). Los pedidos se pueden realizar también por fax en el 740-592-9820. Para recibir servicio técnico por correo electrónico, póngase en contacto con customerservice@quidel.com o technicalsupport@quidel.com.

Para servicios fuera de EE. UU., póngase en contacto con su distribuidor local. Puede encontrar más información sobre Quidel y nuestros productos y distribuidores en nuestro sitio web, quidel.com.

BIBLIOGRAFÍA

1. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. 2001 Nat Med 7:719-24.
2. Nissen MD, Siebert DJ, Mackay LM, Sloots TP, Withers SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. 2002 Med J Aust. 176:188.
3. Kahn, Jeffrey S. Epidemiology of human metapneumovirus. 2006 Clin Microbiol Rev. 19(3):546-557.
4. Esper, Frank, Richard A. Martinello, Derek Boucher, Carla Weibel, David Ferguson, Marie L. Landry, and Jeffrey S. Kahn, A 1 year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. 2004 J Infect Dis. 189:1388-1396.
5. Falsey, Ann R., Mary C. Criddle, Edward E. Walsh, Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. 2006 J Clin Virol. 35:46-50.
6. Maertzdorf, J., C.K. Wang, J.B. Brown, J.D. Quinto, M. Chu, M. de Graff, B.G. van den Hoogen, R. Spaete, A.D.M.E. Osterhaus, and R.A.M. Fouchier. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known lineages. 2004 J Clin Microbiol. 42:981-986.
7. Percivalle E, Sarasini A, Visia L, Revello G, Gerna G. Rapid Detection of Human Metapneumovirus Strains in Nasopharyngeal Aspirates and Shell Vial Cultures by Monoclonal Antibodies. 2005 J Clin Microbiol. 43(7).3443-3446
8. Landry, Marie L., David Ferguson, Sandra Cohen, Teresa C.T. Peret, and Dean D. Erdman, Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines. 2005 J Clin Micro 43(4):1950-1952.
9. Ebihara, Takashi, Rika Endo, Xiaoming Ma, Nobuhisa Ishiguro, and Hideaki Kikuta, Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test. 2005 J Clin Microbiol 43(3):1138-1141.
10. Kyung Ran Jun, Young Dae Woo, Heungsup Sung, and Mi-Na Kim, Detection of human metapneumovirus by direct antigen test and shell vial cultures using immunofluorescent antibody staining. 2008 J Virol Meth. 152:109-111.
11. Manoha, C., J.B. Bour, C. Pitoiset, M. Darniot, S. Aho, and P. Pothier, Rapid and sensitive detection of metapneumovirus in clinical specimens by indirect fluorescence assay using a monoclonal antibody. 2008 J Med Virol. 80:154-158.
12. Gerna, Giuseppe, Antonella Sarasini, Elena Percivalle, Giulia Campanini, Francesca Rovida, Antonietta Marchi, Fausto Baldanti, Prospective study of human metapneumovirus infection: Diagnosis, typing and virus quantification in nasopharyngeal secretions from pediatric patients. 2007 J Clin Virol. 40:236-240
13. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational safety and health standards, bloodborne pathogens.
14. CLSI/NCCLS M29A3 Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline, David L. Sewell, Third Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, 01Mar2005.
15. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL), 5th edition, 2007; CDC-NIH manual. <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Viral Culture; Approved Guidelines*. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA 2006.
17. Leland, Diane S. (1996). *Clinical Virology*, published by W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

REF

01-030000 – D³ DFA Metapneumovirus Identification Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Diagnostic Hybrids, Inc. – a subsidiary of Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PI1570003ES00 (09/20)

GLOSARIO

REF

Número del catálogo



Marca CE de conformidad

EC REP

Representante autorizado
En la Comunidad Europea

LOT

Código de lote



Fecha de caducidad



Fabricante



Límites de temperatura



Indicaciones

Rx ONLY

Uso bajo receta solamente



Consulte los instrucciones e-etiquetado de uso



No reutilizar

IVD

Para diagnósticos *in vitro*



20 to 30

Contiene una cantidad suficiente para 20 a 30
determinaciones

CONT NaN₃

Contenido/ Contiene

NaN₃ 4%

Contiene 4% de azide sodia al puro
