



Para la identificación cualitativa de enterovirus en cultivos celulares por inmunofluorescencia.

Para uso diagnóstico *in vitro*.

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



USO PREVISTO

El D³ IFA Enterovirus Identification Kit de Diagnostic Hybrids, Inc. está diseñado para usarse en la identificación cualitativa de enterovirus en cultivos celulares por inmunofluorescencia.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Los enterovirus (género *Enterovirus*, familia *Picornaviridae*) son algunos de los virus más comunes que infectan a los seres humanos a nivel mundial. Los enterovirus son virus de ARN monocatenario, sin envoltura, pequeños (aproximadamente de 30 nm) y con una cápside icosaédrica compuesta por 60 subunidades que se componen de cuatro proteínas estructurales (VP1 a VP4). Los enterovirus están asociados a diferentes síndromes clínicos, que varían desde una enfermedad febril leve hasta afecciones graves y potencialmente mortales (p. ej.: meningitis aséptica, encefalitis, parálisis, miocarditis y sepsis neonatal por enterovirus), y podrían estar relacionados con el desarrollo de algunas enfermedades crónicas (p. ej.: diabetes tipo 1 y cardiomiopatía dilatada).^{1,2} Se calcula que cada año ocurren entre 10 y 15 millones de infecciones sintomáticas por enterovirus en los Estados Unidos.³

Tradicionalmente, los enterovirus humanos se han clasificado en echovirus, coxsackievirus de los grupos A y B, y poliovirus. Esta taxonomía tradicional se basaba en la enfermedad asociada en sistemas con modelos animales y en humanos que, a veces, conducía a la superposición entre grupos y dificultaba su clasificación. En consecuencia, a inicios de 1960, a los recién descubiertos enterovirus se les designó numéricamente (p. ej.: enterovirus 71) en lugar de ser asignados a uno de los grupos tradicionales.^{1,4}

La taxonomía actual⁴ tiene en cuenta las características biológicas y moleculares, y divide los enterovirus en cuatro especies (enterovirus humanos [EVH] A, B, C y D), pero mantiene los nombres tradicionales para los serotipos individuales. Debido a que las técnicas moleculares de tipificación de los enterovirus son cada vez más accesibles, se continúan identificando nuevos enterovirus y, recientemente, se han descrito los enterovirus 79 al 101 (CDC, datos inéditos, 2005).

Los echovirus 22 y 23 se han reclasificado como un nuevo género (*Parechovirus*) dentro de la familia *Picornaviridae* y se les ha llamado parechovirus humano 1 y 2, respectivamente.^{4,5} Aunque pertenecen a géneros biológica y genéticamente diferentes, los parechovirus humanos comparten muchas características clínicas y epidemiológicas.⁴

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El D³ IFA Enterovirus Identification Kit utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales (AcM) murinos específicos para el antígeno del enterovirus VP1 que, cuando se combina con un anticuerpo antimurino marcado con isotiocianato de fluoresceína, permite una identificación rápida de los antígenos enterovíricos en el cultivo celular.

Las células que se vayan a analizar (en un portaobjetos preparado a partir de un cultivo celular en tubo convencional o una monocapa de tubo de cultivo de fondo plano) se fijan en acetona. Se agrega a las células el reactivo de AcM de enterovirus. Después de incubar durante 30 minutos a entre 35 °C y 37 °C, las células teñidas se lavan con la solución salina tamponada con fosfato diluida (PBS 1x). Se agrega a las células el conjugado antimurino, el cual ha sido marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Después de incubar durante 30 minutos a entre 35 °C y 37 °C, las células teñidas se lavan otra vez con PBS 1x nueva. Para preparar el portaobjetos para el examen, se agrega una gota del líquido para montaje suministrado a las células teñidas y se coloca la tapa en el portaobjetos. Para preparar los cultivos celulares con contraste para centrifugado para el estudio, se coloca una gota del líquido para montaje en un portaobjetos para microscopio limpio. Se retira la tapa del tubo de cultivo de fondo plano y se coloca sobre una gota de líquido para montaje. Para placas multipocillos, se agrega el líquido para montaje en cada pocillo hasta cubrir las monocapas. Los portaobjetos o pocillos se analizan utilizando un microscopio fluorescente equipado con la combinación de filtros correcta para el FITC y con un aumento de 200 a 400x. Las células infectadas con el virus se teñirán con una fluorescencia de color verde manzana brillante, mientras que las células no infectadas, no; sin embargo, habrá una fluorescencia de color rojo apagado producto de la tinción de contraste azul de Evans.⁶

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

El D³ IFA Enterovirus Identification Kit contiene lo siguiente:

Reactivo de AcM de enterovirus **5 ml**

Un frasco cuentagotas que contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos dirigidos a los antígenos enterovíricos. La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene azida sódica al 0,1 % como conservante.

Conjugado antimurino **5 ml**

Un frasco cuentagotas que contiene anticuerpos antimurinos marcados con FITC. La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene azul de Evans como tinción de contraste y azida sódica al 0,1 % como conservante.

Portaobjetos de control de antígenos de enterovirus **5 portaobjetos**

Cinco (5) portaobjetos de control envasados individualmente que contienen pocillos con células de control positivas y negativas obtenidas de cultivo celular. Cada pocillo positivo se identifica con el virus infectado presente; es decir, echovirus, coxsackie A, etc. El pocillo negativo contiene células no infectadas. Cada portaobjetos está diseñado para que ser teñido una sola vez.

Concentrado de PBS 40x **25 ml**

Un frasco de concentrado de PBS 40x se compone de azida sódica al 4 % (azida sódica al 0,1 % después de dilución 1x usando agua desmineralizada).

Líquido de montaje **7 ml**

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

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Microscopio de fluorescencia con la combinación de filtros adecuada para el FITC (pico de excitación = 490 nm, pico de emisión = 520 nm); con un aumento de 200x a 400x.

- Cultivo celular para aislamiento de enterovirus. Las líneas celulares sugeridas¹⁴ incluyen BGMK, A549, fibroblastos diploides humanos, células RD, Super E-Mix™ MixedCells™ y células de riñón de mono Rhesus (todas disponibles en Quidel).
- Virus de control vivos para controles de cultivos positivos: cepas conocidas de enterovirus para su uso en el seguimiento del cultivo celular y de los procedimientos de tinción. Esas cepas de virus de control se pueden obtener en Quidel.
- Tapas (22 x 50 mm) para portaobjetos de control de antígenos y para portaobjetos de muestras.
- Medio de transporte universal (disponible en Quidel).
- Medio de realimentación E-Mix Refeed Medium u otro medio de realimentación normal (disponible en Quidel).
- Acetona de calidad reactiva (pura >99 %) enfriada a entre 2 °C y 8 °C para la fijación de portaobjetos con muestras preparadas, tubos de cultivo de fondo plano y preparaciones de cultivos celulares.

NOTAS:

- ▶ Conservar el recipiente de la acetona de calidad reactiva herméticamente cerrado para evitar la absorción higroscópica del agua, ya que puede causar fluorescencia de fondo inespecífica y borrosa.
 - ▶ Para fijar las células en las placas multipocillos de plástico, se usa una mezcla de acetona al 80 % y agua desmineralizada al 20 %. Conservar a temperatura ambiente (entre 20 °C y 25 °C).
 - Pipetas graduadas estériles: 10 ml, 5 ml y 1 ml.
 - Pipetas Pasteur estériles u otras pipetas de transferencia.
- Advertencia: No deben usarse solventes como la acetona con pipetas de transferencia de polietileno.**
- Pinzas de punta fina.
 - Matraz de lavado, 200 ml.
 - Filtro de jeringa estéril de 0,45 µm.
 - Jeringa estéril de 3 ml.
 - Aguja de disección curva (para retirar la tapa del tubo de cultivo de fondo plano); moldear la aguja de disección doblando la punta de una aguja de jeringa u objeto similar (p. ej.: aguja de disección para micología) contra la sobremesa o con un par de pinzas prestando cuidado para evitar una lesión.
 - Solución de hipoclorito de sodio (dilución final de lejía casera al 1:10).
 - Cámara de humidificación (p. ej.: placa de Petri cubierta con un papel mojado colocado en el fondo).
 - Portaobjetos de vidrio para microscopio.
 - Portaobjetos de vidrio de varios pocillos para microscopio limpiados con acetona.
 - Papel secante para portaobjetos de vidrio de varios pocillos para microscopio: papel secante absorbente para dos pocillos, usado para secar el exceso de líquido de la máscara para impedir que el líquido o las células manchadas se esparzan de un pocillo a otro.
 - Hisopos de nailon estériles o hisopos de poliéster, que no sean inhibidores de los virus y el cultivo celular.
 - Incubadora, de 35 °C a 37 °C (5 % CO₂ o sin CO₂, dependiendo del formato del cultivo celular usado).
 - Centrifugadora con rotor de cubo basculante.
 - Agua desmineralizada para dilución del concentrado de PBS 40x y para dilución de la acetona con calidad reactiva para usar en las placas multipocillos de poliestireno.
 - Configuración del aspirador: aspirador de vacío con trampa desinfectante que contiene suficiente lejía casera (5 %), de manera que la concentración no se reduzca más de diez veces mientras se diluye con los líquidos descartados.
 - Recipiente para lavado: vaso de precipitados, matraz de lavado o cubeta Coplin para lavado de portaobjetos.
 - Recipiente para fijación: cubeta Coplin, placa portaobjetos o soporte de polietileno para portaobjetos para usar en la fijación de las células en los portaobjetos.
 - Microscopio de luz invertida: se usa para analizar las monocapas antes de la inoculación y el análisis de toxicidad, confluencia y para efectos citopáticos (ECP). Debe tener una capacidad de amplificación de entre 40x y 100x.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- No existe ningún método de prueba que ofrezca garantía total de que los agentes infecciosos estén ausentes; por lo tanto, todos los derivados de sangre humana, reactivos y muestras humanas deben manipularse como si fueran capaces de transmitir una enfermedad infecciosa. Se recomienda que los reactivos y las muestras humanas sean manipuladas de conformidad con la norma de la OSHA (Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de EE. UU.) sobre patógenos transmitidos por la sangre.
 - ▶ El aislamiento del cultivo celular puede ser potencialmente peligroso. El personal que trabaja con cultivos celulares debe estar debidamente formado en técnicas de manipulación seguras^{7,8,9} y tener experiencia con cultivos celulares antes de intentar este procedimiento.
 - ▶ Todos los procedimientos deben realizarse de conformidad con la 5.ª edición de Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos (2007) de los CDC de EE. UU. y la Directriz M29-A aprobada por el CLSI, Protección de los trabajadores de laboratorios ante instrumentos de riesgo biológico y enfermedades infecciosas transmitidas por sangre, fluidos corporales y tejidos.
- Todas las muestras y materiales que se usan para procesarlos deben considerarse potencialmente infecciosos y deben manipularse de tal manera que se prevenga la infección del personal del laboratorio.
 - ▶ Se deben utilizar las prácticas del nivel 2 de bioseguridad u otras prácticas de bioseguridad pertinentes cuando se manipulen estos materiales.
 - ▶ La descontaminación de muestras y cultivos se puede lograr óptimamente usando una solución de hipoclorito de sodio (dilución final de lejía casera al 1:10).
 - ▶ Aunque se ha demostrado que los portaobjetos de control de antígenos no son infecciosos, cuando se utilicen deben tomarse las mismas precauciones que se toman para la manipulación y eliminación de otros materiales infecciosos.
- La acetona, un reactivo que se necesita para la prueba, pero que no se suministra en el kit, es un solvente orgánico volátil e inflamable. Usar en un área bien ventilada y mantener fuera del alcance de las llamas u otras fuentes de ignición.
- Nunca pipetear reactivos y muestras clínicas con la boca. Evitar todo contacto de las muestras clínicas con lesiones cutáneas.
- La tinción de contraste azul de Evans es potencialmente cancerígena. Si tuviese contacto con la piel, enjuagar con agua inmediatamente.
- El reactivo de AcM de enterovirus y el conjugado antimurino se suministran en una concentración de trabajo. Cualquier dilución de estos reactivos disminuirá la sensibilidad.
- Los reactivos deben usarse antes de su fecha de caducidad.
- Cada portaobjetos de control de antígenos de enterovirus debe usarse solo una vez. No reutilizar los portaobjetos de control.
- La contaminación microbiana de los reactivos puede causar una disminución en la sensibilidad.
- Conservar la PBS 1x en un recipiente limpio para impedir la contaminación.
- Evitar salpicaduras y producción de aerosoles con las muestras clínicas.
- Usar una técnica aséptica, y equipos y materiales estériles para todos los procedimientos de cultivo celular.
- Los materiales de vidrio reutilizables deben lavarse y enjuagarse bien hasta que no tengan detergente.
- No exponer el reactivo de AcM de enterovirus ni el conjugado antimurino a luz intensa durante la tinción o conservación.
- La 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 %.
 - ▶ La azida sódica se considera venenosa. Si se ingiriese el concentrado de PBS 40x, solicite atención médica de inmediato.
 - ▶ Cuando se mezclan con ácidos, la soluciones acuosas de azida sódica pueden liberar gases tóxicos.

- ▶ Evite eliminar estas soluciones por el sistema sanitario o los sistemas de tuberías industriales. La azida sódica puede reaccionar con tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas.
- ▶ Evitar su liberación al medio ambiente.
- Usar otros reactivos diferentes a aquellos especificados con los componentes de este kit puede producir resultados erróneos.
- La prueba se debe realizar en una zona con ventilación suficiente.
- Los envases y el contenido sin usar deben desecharse conforme a la normativa nacional, regional y local.
- Utilice prendas protectoras, guantes y protección ocular/facial adecuada cuando manipule el contenido del kit.
- Lávese bien las manos después de la manipulación.
- Para obtener información adicional sobre los símbolos de peligro, seguridad, manipulación y eliminación de los componentes de este kit, consulte la ficha técnica de seguridad que se encuentra en quidel.com.

Preparación de la PBS 1x

Después de su conservación a entre 2 °C y 8 °C, algunas sales del concentrado de PBS 40x pueden haberse cristalizado. Calentar la solución a temperatura ambiente (entre 20 °C y 25 °C) para volver a disolver los cristales; después, mezclar. Agregar el contenido del concentrado de PBS 40x 25 ml totalmente disuelto a 975 ml de agua desmineralizada. Etiquetar la PBS 1x con la fecha de caducidad a los 60 días después de reconstituirlo y conservarla a temperatura ambiente.

Conservación

Tabla 1. Condiciones de conservación de los reactivos

Reactivo de AcM de enterovirus	Conservar en la oscuridad a entre 2 °C y 8 °C.
Conjugado antimurino	
Líquido de montaje	
Portaobjetos de control de antígenos de enterovirus	Conservar a entre 2 °C y 8 °C.
Concentrado de PBS 40x NOTA: El concentrado puede cristalizarse cuando se conserva a entre 2 °C y 8 °C. Los cristales se disuelven cuando el concentrado se calienta a temperatura ambiente.	Conservar el líquido a entre 2 °C y 8 °C antes de la dilución.
PBS 1x	Conservar a temperatura ambiente (entre 20 °C y 25 °C).

Estabilidad

Los reactivos y componentes conservarán su potencia completa hasta la fecha de caducidad que se muestra en la etiqueta de cada frasco siempre que se conserven a las temperaturas recomendadas. Debe mantenerse al mínimo la exposición del reactivo de AcM de enterovirus y del conjugado antimurino.

Desechar la PBS 1x si se vuelve turbia.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los factores más importantes son la recogida y manipulación adecuadas de la muestra del paciente para la detección satisfactoria del enterovirus. La recogida y procesamiento de muestras y el cultivo celular de los

virus debe realizarlos solo el personal que haya recibido formación en tales procedimientos. Se debe tener cuidado durante toda la recogida y manipulación de las muestras para evitar la formación de aerosoles.

Para la recogida y procesamiento de las muestras, consultar las Directrices para cultivos víricos aprobadas por el CLSI.¹⁰

Recogida de la muestra^{11,12}

Entre las muestras que se aceptan para cultivo enterovírico se incluyen: exudados o lavados faríngeos, líquido cefalorraquídeo (LCR), tejido ocular, lesión ulcerosa o vesicular y heces. Las muestras deben recibirse en un medio de transporte vírico.

Las muestras que no se reciban en un medio de transporte vírico deben transferirse inmediatamente después de su recepción a un tubo de medio de transporte.

Transporte y conservación de muestras

Todos los agentes potencialmente infecciosos deben transportarse de conformidad con la Asociación de Transporte Aéreo Internacional (IATA), con la Organización de Aviación Internacional (OACI), los Títulos 42 y 49 del Código de Normas Federales de los Estados Unidos o cualquier otro requisito normativo, según sea aplicable.

Las muestras deben transportarse al laboratorio a entre 2 °C y 8 °C. Esta temperatura se puede obtener usando bolsas de gel frío, hielo húmedo, espuma refrigerante u otro refrigerante.¹³ Las muestras deben procesarse y someterse a la prueba lo más pronto posible y, después, conservarse a entre 2 °C y 8 °C.

Las muestras deben conservarse a entre 2 °C y 8 °C durante no más de 2 días antes de someterlas a la prueba. Si se requiere un almacenamiento más prolongado, las muestras deben congelarse a -70 °C o menos.

Debe evitarse congelar y descongelar las muestras, ya que se producirá una pérdida de viabilidad de los virus, provocando la disminución de la sensibilidad de la prueba.

PROCEDIMIENTO

Comentarios preliminares y precauciones

- Seguir los volúmenes y tiempos recomendados en el procedimiento a continuación para garantizar que se obtengan resultados precisos.
- Para muestras de exudados recibidas en medio de transporte con microesferas de vidrio, agitar vigorosamente durante 15 segundos para disociar las células adheridas. Para exudados no recibidos en medio de transporte, transferirlos a un tubo de medio de transporte que contenga microesferas de vidrio y agitar vigorosamente durante 15 segundos para disociar las células adheridas.
- Cuando se tiñe con reactivos fluorescentes y se analizan las células microscópicamente para ver las fluorescencias, es muy importante incluir controles, tanto positivos como negativos, para supervisar el procedimiento y el rendimiento de los reactivos. Se recomienda que tales controles se lleven a cabo con cada lote de las muestras del paciente.
- Colocar la cámara humedecida y cerrada para el soporte de portaobjetos durante la tinción en la incubadora para equilibrar a entre 35 °C y 37 °C antes de la tinción. Al hacer esto, los portaobjetos y los reactivos de prueba llegarán rápidamente a la temperatura deseada, produciendo una tinción más intensa y rápida.
- Llevar el reactivo de AcM de enterovirus y el conjugado antimurino a temperatura ambiente (entre 20 °C y 25 °C) antes de usar y devolverlos inmediatamente al refrigerador después de usarlos para conservarlos a entre 2 °C y 8 °C.

Información acerca de la prueba de cultivo celular

- Las buenas prácticas de laboratorio ordenan que los controles de virus positivos y negativos se lleven a cabo con cada nuevo lote de células para confirmar su rendimiento en los cultivos de virus específicos.
- Es una buena práctica conservar el medio que se retiró de las monocapas hasta después que se hayan obtenido los resultados de la tinción. Si hubiese alguna pregunta sobre los resultados de la muestra, el medio se puede pasar a otra monocapa e incubar por el período de tiempo adecuado para volver a repetir la prueba.
- Cuando se usan cultivos celulares en placas multipocillos de poliestireno, diluir la acetona fijadora al 80 % y agregar 20 ml de agua desmineralizada a 80 ml de acetona.
- No dejar que las monocapas se sequen antes de la fijación, ya que pueden causar una alta tinción de fondo y disminuir la sensibilidad.
- No dejar que el reactivo de AcM de enterovirus o el conjugado antimurino se sequen en las monocapas, ya que pueden causar una alta tinción de fondo.

Información acerca de la microscopía de inmunofluorescencia

- Analizar los controles positivos y negativos antes de analizar las muestras de prueba. Si uno de estos no tuviese el rendimiento que se esperaba, revisar los pasos y las condiciones bajo los cuales se realizó la prueba para determinar la causa original. No informar de los resultados de las muestras del paciente hasta que los controles tengan el rendimiento esperado.
- Hay tres aspectos del microscopio fluorescente que deben funcionar adecuada y óptimamente para alcanzar el máximo brillo de la fluorescencia:
 - ▶ La fuente de luz activadora tiene una vida finita y, conforme envejece, su emisión disminuye, dando lugar a una intensidad fluorescente menor del conjugado antimurino.
 - ▶ La fuente de luz se enfoca con varias lentes y espejos. Para obtener la máxima intensidad, estos deben estar debidamente alineados.
 - ▶ Los filtros que se usen en el recorrido de luz deben ser los adecuados para el centelleador determinado; en este caso, la fluoresceína.
- Se pueden observar artefactos fluorescentes en las monocapas celulares:
 - ▶ Morfológicamente, los artefactos de tinción no tienen la apariencia de una célula completa y, por lo general, no aparecen en el plano de la monocapa. Los residuos celulares, hebras, etc. pueden absorber de forma inespecífica el conjugado antimurino, originando una fluorescencia muy intensa.
 - ▶ A veces se puede observar una fluorescencia verde amarillenta de baja calidad, particularmente en las áreas donde hay células apiladas o cerca de los orificios de la monocapa celular. En ambos casos, la difusión del conjugado antimurino atrapado se retrasa durante el paso de lavado, originando una fluorescencia inespecífica.
 - ▶ La fluorescencia intensa alrededor de la periferia de los pocillos del portaobjetos indica que el conjugado antimurino se está secando durante la incubación, lo que indica que se ha incubado durante demasiado tiempo o que la humedad no estaba bien controlada.
 - ▶ El lavado inadecuado puede llevar a una fluorescencia general de baja calidad debido al conjugado antimurino residual que queda en la monocapa de las células.
- Durante la prueba, proteger los portaobjetos teñidos y las monocapas de la luz lo más que se pueda.
 - ▶ Puede darse una decoloración o desteñido de la fluorescencia de las células teñidas cuando se exponen a la luz, particularmente la luz de alta intensidad.
 - ▶ Esta decoloración puede aparecer cuando la célula teñida se observa en un microscopio de fluorescencia por un período prolongado de tiempo.

Preparación de las muestras

No hay requisitos especiales para procesar las muestras para el cultivo enterovírico.¹⁵ Las muestras deben procesarse conforme la procedimiento de laboratorio establecido.

Prueba de cultivo celular – Cultivo en tubo

1. Examinar las monocapas para ver si presentan una correcta morfología antes de la inoculación.
2. Aspirar el medio de mantenimiento de las monocapas y agregar de 0,2 ml a 0,4 ml de cada muestra preparada (consultar *Preparación de las muestras*) a cada una de las líneas celulares usadas para los cultivos de enterovirus.
3. Colocar los tubos en ángulo suficiente para que las monocapas queden cubiertas por el inóculo. Colocar los tubos en una incubadora durante 1 hora a entre 35 °C y 37 °C para permitir que se absorba el virus.
4. Después de la absorción, agregar 2 ml del medio de realimentación pertinente.
5. Incubar los tubos a entre 35 °C y 37 °C en un agitador de rodillos a entre 1 y 3 rpm o en una gradilla estacionaria en ángulo suficiente para que las monocapas queden cubiertas con el inóculo y el medio. Examinar las monocapas diariamente para detectar signos de toxicidad o ECP víricos.
6. Cuando las monocapas estén listas para la tinción, remover el medio mediante aspiración y enjuagar con cuidado dos veces la monocapa con 1 ml de PBS 1x.
7. Agregar 0,5 ml de PBS 1x al tubo y preparar la suspensión de las células raspando la monocapa con una pipeta y rompiendo el cúmulo de células pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces.
8. Preparar las manchas celulares usando aproximadamente 25 µl de suspensión sobre el portaobjetos previamente limpiado con acetona. Repetir este paso para cada muestra.
9. Dejar secar completamente al aire los pocillos.
10. Fijar las células en los portaobjetos usando acetona al 100 % fresca y refrigerada. Dejar reposar de 5 a 10 minutos a entre 20 °C y 25 °C.
Precaución: La acetona es volátil e inflamable. Mantener lejos de las llamas abiertas.
11. Retirar los portaobjetos del fijador y dejar secar al aire.
12. Agregar una gota del reactivo de AcM de enterovirus hasta que cubra completamente las células fijadas y secas del portaobjetos.
13. Colocar los portaobjetos en una cámara cubierta a entre 35 °C y 37 °C durante 30 minutos.
14. Enjuagar las células teñidas usando la PBS 1x. Esto se puede hacer para unos pocos portaobjetos usando un vaso de precipitado de PBS 1x. Si se trata de muchos portaobjetos, se puede colocar una gradilla para 10 a 20 portaobjetos en su recipiente con la PBS 1x. Para un enjuague eficaz, introducir y sacar el portaobjetos un mínimo de cuatro veces.
15. Desechar la PBS usado y repetir el paso de lavado usando una nueva PBS 1x.
16. Secar con cuidado el exceso de líquido.
17. Agregar una gota del conjugado antimurino hasta que cubra completamente las células fijadas y secas del portaobjetos.
18. Colocar los portaobjetos en una cámara cubierta a entre 35 °C y 37 °C durante 30 minutos.
19. Enjuagar las células teñidas usando la PBS 1x. Esto se puede hacer para unos pocos portaobjetos usando un vaso de precipitado de PBS 1x. Si se trata de muchos portaobjetos, se puede colocar una gradilla para 10 a 20 portaobjetos en su recipiente con la PBS 1x. Para un enjuague eficaz, introducir y sacar el portaobjetos un mínimo de cuatro veces.
20. Desechar la PBS usado y repetir el paso de lavado usando una nueva PBS 1x.
21. Enjuagar las células teñidas usando agua desmineralizada. Esto se puede hacer para unos pocos portaobjetos usando un vaso de precipitados de agua desmineralizada. Si se trata de muchos portaobjetos, se puede colocar una gradilla para 10 a 20 portaobjetos en su recipiente con agua desmineralizada. Para un enjuague eficaz, introducir y sacar el portaobjetos un mínimo de cuatro veces.
22. Secar con cuidado el exceso de líquido.
23. Agregar una gota pequeña de líquido de montaje en cada pocillo que contenga células y cubrir los pocillos con una tapa.
24. Examinar las células montadas y teñidas usando un microscopio de fluorescencia con aumento de entre 200x y 400x (consultar *Información acerca de la microscopía de inmunofluorescencia*).
25. Consultar *INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS*.

Prueba de cultivo celular – Tubo de cultivo de fondo plano

1. Calcular el número de tubos de cultivo de fondo plano que se necesitan basándose en el protocolo de tinción que se vaya a usar (para este protocolo de tinción se necesitan 2 tubos de cultivo de fondo plano).
 - ▶ Se necesita un tubo de cultivo de fondo plano para cada día que el cultivo sea cribado con el D³ IFA Enterovirus Identification Kit (es decir, se necesitan 2 tubos de cultivo de fondo plano para la tinción durante 48 a 72 horas y después durante 5 a 7 días).
2. Examinar las monocapas para ver si presentan una correcta morfología antes de la inoculación.
3. Aspirar el medio de mantenimiento de las monocapas y agregar 1 ml del medio de realimentación indicado a cada tubo de cultivo de fondo plano.
4. Agregar de 0,2 ml a 0,4 ml de la muestra preparada a cada tubo de cultivo de fondo plano.
5. Centrifugar los tubos de cultivo de fondo plano a 700 xg durante 1 hora a entre 20 °C y 25 °C.
6. Colocar los tubos de cultivo de fondo plano con tapón en una incubadora a entre 35 °C y 37 °C.
7. Cuando la monocapa esté lista para la tinción usando el reactivo de AcM de enterovirus, retirar el medio y agregar 1 ml de PBS 1x.
8. Girar para mezclar y después, aspirar.
9. Repetir este lavado con 1 ml de PBS 1x y después, aspirar.
10. Agregar 1 ml de acetona al 100 % fresca y refrigerada, y dejar reposar durante 5 a 10 minutos a entre 20 °C y 25 °C.

Precaución: La acetona es volátil e inflamable. Mantener lejos de las llamas abiertas.

11. Retirar el fijador por aspiración.
12. Agregar 0,5 ml de PBS 1x para humedecer la monocapa.
13. Girar y luego, aspirar completamente.
14. Agregar 4 gotas del reactivo de AcM de enterovirus a las monocapas fijadas de las muestras de control y del paciente, y balancear para **garantizar la cobertura total** de la monocapa con el reactivo de AcM.
15. Colocar los tubos de cultivo de fondo plano con tapón en una incubadora a entre 35 °C y 37 °C durante 30 minutos.
16. Aspirar el reactivo de AcM de enterovirus de las monocapas.
17. Agregar 1 ml de PBS 1x.
18. Retirar la PBS 1x por aspiración, repetir el paso del lavado y, nuevamente, retirar por aspiración.
19. Agregar 4 gotas del conjugado antimurino a las monocapas fijadas de las muestras de control y del paciente, y balancear para **garantizar la cobertura total** de la monocapa con el conjugado.
20. Colocar los tubos de cultivo de fondo plano con tapón en una incubadora a entre 35 °C y 37 °C durante 30 minutos.
21. Aspirar el conjugado antimurino de las monocapas.
22. Agregar 1 ml de PBS 1x.
23. Retirar la PBS 1x por aspiración, repetir el paso del lavado y, nuevamente, retirar por aspiración.
24. Agregar 1 ml de agua desmineralizada.
25. Retirar el agua desmineralizada por aspiración.
26. Levantar la tapa del fondo del tubo de cultivo de fondo plano usando una aguja de punta curva en un cilindro de una jeringa. Sujetarlo con las pinzas de punta fina, transferirlo con la monocapa hacia abajo a una pequeña gota de líquido de montaje en un portaobjetos para microscopio regular.
27. Examinar las monocapas teñidas usando un microscopio de fluorescencia con aumento de entre 200x y 400x (consultar *Información acerca de la microscopía de inmunofluorescencia*).
28. Consultar *INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS*.

Prueba de cultivo celular – Placa multipocillos

1. Calcular el número de pocillos que se necesitan basándose en el protocolo de tinción que se vaya a usar (para este protocolo de tinción se necesitan 2 pocillos).
 - ▶ Se necesita un pocillo para cada día que el cultivo sea cribado con el D³ IFA Enterovirus Identification Kit (es decir, se necesitan 2 pocillos para la tinción durante 48 a 72 horas y después durante 5 a 7 días).

- Se recomienda que cada pocillo de reproducción esté en una placa multipocillos diferente. Esto permite que cada placa se procese en el día adecuado.
2. Examinar las monocapas para ver si presentan una correcta morfología antes de la inoculación.
 3. Aspirar el medio de mantenimiento de las monocapas y agregar 1 ml del medio de realimentación adecuado en cada monocapa de las placas multipocillos de 24 pocillos, agregar 0,8 ml a cada monocapa de la placa de 48 pocillos.
 4. Agregar de 0,2 ml a 0,4 ml de la muestra preparada a los pocillos correspondientes de la placa multipocillos.
 5. Centrifugar las placas multipocillos a 700 xg durante 1 hora a entre 20 °C y 25 °C.
 6. Colocar las placas multipocillos cubiertas en una incubadora a entre 35 °C y 37 °C con una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂.
 7. Cuando la monocapa esté lista para la tinción usando el reactivo de AcM de enterovirus, retirar el medio por aspiración y agregar 1 ml de PBS 1x.
 8. Girar para mezclar y después, aspirar.
 9. Repetir este lavado con 1 ml de PBS 1x y después, aspirar.
 10. Agregar 1 ml de acetona acuosa al 80 % y dejar reposar durante 5 a 10 minutos a entre 20 °C y 25 °C.
NOTA: No permitir que el fijador de acetona al 80 % permanezca en los pocillos de poliestireno más de 10 minutos, ya que puede agrietar y enturbiar el plástico, lo que dificultaría el análisis de las monocapas.
Precaución: La acetona es volátil e inflamable. Mantener lejos de las llamas abiertas.
 11. Retirar el fijador por aspiración.
 12. Agregar 0,5 ml de PBS 1x para humedecer la monocapa.
 13. Girar y luego, aspirar completamente.
 14. Agregar 4 gotas del reactivo de AcM de enterovirus a cada pocillo de una placa multipocillos de 24 pocillos a las monocapas fijadas de las muestras de control y del paciente. Agregar 3 gotas del reactivo de AcM de enterovirus a cada pocillo de la placa de 48 pocillos a las monocapas fijadas de las muestras de control y del paciente. Balancear para **garantizar la cobertura completa** de la monocapa con el reactivo de AcM.
 15. Colocar la placa multipocillos cubierta en una incubadora humidificada a entre 35 °C y 37 °C durante 30 minutos.
 16. Aspirar el reactivo de AcM de enterovirus de las monocapas.
 17. Agregar 1 ml de PBS 1x y mezclar para lavar.
 18. Retirar la PBS 1x por aspiración, repetir el paso del lavado y, de nuevo, retirar por aspiración.
 19. Agregar 4 gotas del conjugado antimurino a cada pocillo de una placa multipocillos de 24 pocillos a las monocapas fijadas de las muestras de control y del paciente. Agregar 3 gotas del conjugado antimurino a cada pocillo de la placa de 48 pocillos a las monocapas fijadas de las muestras de control y del paciente. Balancear para **garantizar la cobertura completa** de la monocapa con el conjugado.
 20. Colocar la placa multipocillos cubierta en una incubadora humidificada a entre 35 °C y 37 °C durante 30 minutos.
 21. Aspirar el conjugado antimurino de las monocapas.
 22. Agregar 1 ml de PBS 1x y mezclar para lavar.
 23. Retirar la PBS 1x por aspiración, repetir el paso del lavado y, nuevamente, retirar por aspiración.
 24. Agregar 1 ml de agua desmineralizada.
 25. Retirar el agua desmineralizada por aspiración.
 26. Agregar de 2 a 3 gotas de líquido de montaje a cada monocapa y, después, cubrir la placa.
 27. Examinar las monocapas teñidas usando un microscopio de fluorescencia con aumento de entre 200x y 400x (consultar *Información acerca de la microscopía de inmunofluorescencia*).
 28. Consultar *INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS*.

Control de calidad

Reactivos

- Se debe teñir un portaobjetos de control de antígenos de enterovirus nuevo cada vez que se realice el proceso de tinción para garantizar el rendimiento adecuado de la prueba.
- Los pocillos positivos mostrarán varias células infectadas con fluorescencia de color verde manzana brillante con células negativas teñidas de color rojo apagado debido a que se incluyó el contraste azul de Evans.
- El pocillo negativo mostrará solo las células negativas teñidas de rojo apagado.
- Los controles negativos y positivos deben demostrar la fluorescencia adecuada para considerar que los resultados de las muestras son válidos. Los portaobjetos de control de antígenos también pueden ayudar a interpretar las muestras del paciente.

Cultivo celular

- Los controles de enterovirus positivos y negativos deben llevarse a cabo con cada nuevo lote de células para confirmar su rendimiento en los cultivos de enterovirus.
- Para garantizar la sensibilidad vírica, se deben incluir las monocapas de control inoculadas con enterovirus cada vez que se utilice un nuevo lote de cultivo celular.
- Debe teñirse una monocapa no inoculada de cada lote para que sirva como control negativo. Las condiciones de conservación o los procedimientos de manipulación adversos se reflejarán también en el control negativo.
- Si los cultivos de control no se realizan de forma correcta, los resultados se considerarán inválidos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Análisis de las muestras y controles

- Analizar primero los controles para garantizar el rendimiento adecuado de la prueba antes de analizar las pruebas del paciente.
- La reacción positiva para enterovirus es aquella en la que se observa la fluorescencia de color verde manzana brillante en las células infectadas.
- Las células no infectadas tendrán una fluorescencia de color rojo apagado debido al contraste azul de Evans incluido en el conjugado antimurino.
- Analizar la mancha celular completa o la monocapa de las células antes de informar de resultados finales negativos. No informar de los resultados de las muestras del paciente a menos que los controles tengan el rendimiento esperado.

Artefactos de la tinción

- Los bordes secos de la monocapa o la aglomeración de células pueden presentar una fluorescencia inespecífica debido al atrapamiento de anticuerpos.
- Las células redondas y muertas pueden presentar una fluorescencia inespecífica de color verde oliva apagado debido a la toxicidad de la muestra o a la conservación inadecuada de las células.
- La humedad controlada adecuadamente durante la tinción y el adecuado lavado entre los pasos ayudan a eliminar la tinción inespecífica.

Resultados del aislamiento celular/confirmación

- El patrón de tinción de fluorescencia de color verde manzana brillante es **citoplasmático**.
- Analizar la mancha celular completa o la monocapa de células para detectar células fluorescentes específicas de enterovirus. Si no se encuentran células fluorescentes, informar como: "El cultivo celular no ha aislado enterovirus".
- Si se observa fluorescencia específica de enterovirus, informar como: "El cultivo celular ha aislado enterovirus".

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los procedimientos inadecuados de obtención, conservación y transporte de las muestras pueden provocar cultivos con resultados falsos negativos.¹⁶
- Los tiempos o temperaturas de incubación diferentes a los citados en las instrucciones de la prueba pueden dar lugar a resultados erróneos.
- La detección de virus puede variar mucho dependiendo de la calidad de la muestra y su posterior manipulación. Un resultado negativo no descarta la posibilidad de infección vírica. Los resultados de la prueba deben interpretarse en conjunto con la información disponible de estudios epidemiológicos, la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.
- Como los AcM han sido preparados usando cepas de virus específicas, puede que no detecten todas las variantes antigénicas o nuevas cepas de enterovirus, en caso de que aparezcan. Es posible que los AcM no detecten cepas de virus que hayan sufrido cambios menores en los aminoácidos de la región epítipo específica.
- Un resultado negativo en una muestra directa o cultivada no descarta la presencia de virus.
- El rendimiento del kit solo se puede garantizar cuando los componentes utilizados en el ensayo son los suministrados por Quidel.
- La conservación prolongada del conjugado antimurino bajo luz intensa disminuirá la intensidad de la tinción.
- Se ha observado reactividad cruzada limitada en los adenovirus de tipos 11 y 16.
- La tinción de fondo suave puede aparecer en muestras contaminadas con cepas de *Staphylococcus aureus* que contengan grandes cantidades de proteína A. La proteína A se fijará a las porciones Fc de los anticuerpos conjugados. Dicha fijación se distingue de la fijación del antígeno vírico por la morfología; es decir, la fluorescencia unida al *S. aureus* se muestra como puntos brillantes pequeños (~1 micrón de diámetro). Por lo tanto, los resultados de cultivos celulares con contaminación bacteriana deben interpretarse con precaución.
- Cualquier fluorescencia **nuclear** inespecífica presente en células de cultivo o en portaobjetos de control de antígenos debe interpretarse como negativa para enterovirus.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICAS

Reactividad del enterovirus

Un total de 224 cepas de enterovirus clínicos se volvieron a cultivar y a someter a prueba con el D³ IFA Enterovirus Identification Kit en dos lugares (centro 1: 168, centro 2: 56). La identidad de cada cepa se determinó por neutralización. El D³ IFA Enterovirus Identification Kit identificó correctamente todas las cepas de enterovirus cuando se compararon con los resultados de neutralización. Los datos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Cepas de enterovirus identificadas correctamente por el D³ IFA Enterovirus Identification Kit cuando se compararon con los resultados de neutralización

Tipo de enterovirus	N.º de cepas	Tipo de enterovirus	N.º de cepas
Coxsackie A9	20	Echovirus 9	17
Coxsackie A16	5	Echovirus 11	20
Coxsackie A24	1	Echovirus 13	1
Coxsackie B1	6	Echovirus 14	4
Coxsackie B2	20	Echovirus 15	1
Coxsackie B3	11	Echovirus 18	5
Coxsackie B4	9	Echovirus 21	1
Coxsackie B5	16	Echovirus 24	2
Coxsackie B6	1	Echovirus 25	2
Echovirus 3	3	Echovirus 30	18
Echovirus 4	8	Enterovirus 70	2

Tipo de enterovirus	N.º de cepas	Tipo de enterovirus	N.º de cepas
Echovirus 5	8	Enterovirus 71	5
Ecovirus 6	10	Poliovirus tipo 1	4
Echovirus 7	12	Poliovirus tipo 2	5
		Poliovirus tipo 3	6

Un total de seis cepas de enterovirus clínicos 68 se volvieron a cultivar y a someter a prueba con el D³ IFA Enterovirus Identification Kit. Todas las cepas de enterovirus 68 se identificaron positivamente mediante el D³ IFA Enterovirus Identification Kit, mientras que las mismas células infectadas con el virus teñidas con la IgG antimurina caprina marcada con fluoresceína produjeron solo resultados negativos. Los datos se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Detección de seis cepas clínicas de EV68 con el D³ IFA Enterovirus Identification Kit

Cepa de EV68	D ³ IFA Enterovirus Identification Kit	Únicamente conjugado de IgG antimurina caprina
US/MO/14-18947	Positivo	Negativo
US/MO/14-18949	Positivo	Negativo
US/IL/14-18952	Positivo	Negativo
US/KY/14-18953	Positivo	Negativo
US/IL/14-18956	Positivo	Negativo
Cepa Fermon	Positivo	Negativo

Especificidad del enterovirus

Se probó el D³ IFA Enterovirus Identification Kit para detectar reactividad cruzada frente a una amplia variedad de células y microorganismos. No se observó reactividad cruzada en ninguna de las 47 cepas de virus (cultivadas y procesadas para tinción) ni en los 17 tipos de células de cultivo hospedadoras. Se tiñeron treinta (30) cultivos bacterianos y se analizaron para detectar reactividad cruzada; entre ellos, *Staphylococcus aureus*, una bacteria productora de proteína A. La tinción de *S. aureus* apareció en forma de pequeños puntos de fluorescencia (consultar *LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO*); sin embargo, todos los demás cultivos bacterianos fueron negativos. (En las tablas 4, 5 y 6 a continuación se enumeran los organismos que se analizaron para detectar la reactividad cruzada con el reactivo de AcM de enterovirus).

Se analizaron cuarenta y siete (47) cepas de virus para detectar reactividad cruzada. No se observó reactividad cruzada con los virus que se enumeran a continuación (tabla 4).

Tabla 4. Cepas de virus usadas en el estudio de reactividad cruzada

Adenovirus	Tipo 1	Paragripal 1	C-35
	Tipo 3	Paragripal 2	Greer
	Tipo 5	Paragripal 3	C 243
	Tipo 6	VHS-1	1F
	Tipo 7		CWOH 0026
	Tipo 11		MacIntyre
	Tipo 14	VHS-2	MS
	Tipo 16		Cepa G
	Tipo 18	CMV	Towne
Gripe A	Aichi		Davis
	Mal		AD169
	Hong Kong	Webster	
		Varicela	

Tabla 4. Cepas de virus usadas en el estudio de reactividad cruzada

	Denver	Rinovirus humano	Ellen
	Port Chalmers		tipo 7
	Victoria		tipo 16
	New Jersey		tipo 26
	PR		tipo B37
Gripe B	Hong Kong		tipo A40
	Maryland		tipo A78
	Mass		Portaobjetos de EMD Millipore
	Taiwán		Portaobjetos de EMD Millipore
	GL		Portaobjetos de Cell Marque
	Rusia		
VSR	Long		
	Wash		

Se sometieron a prueba diecisiete (17) células de cultivo hospedadoras para detectar reactividad cruzada, pero no se observó para las líneas celulares enumeradas a continuación (tabla 5).

Tabla 5. Líneas celulares usadas en el estudio de reactividad cruzada

A549	NCL-H292
BGMK	pRhMK
HEp-2	pRK
LLC-MK2	RD
MDCK	RhMKII
MRC-5	R-Mix
MRHF	Vero
Mv1Lu	Wi-38
Super E-Mix	

Se tiñeron treinta (30) cultivos bacterianos y se analizaron para detectar reactividad cruzada; entre ellos, *Staphylococcus aureus*, una bacteria productora de proteína A (consultar *LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO*). La tinción de *S. aureus* apareció como pequeños puntos de fluorescencia; sin embargo, no se observó reactividad cruzada en ninguno de los otros cultivos enumerados en la tabla 6.

Tabla 6. Bacterias usadas en el estudio de reactividad cruzada

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Mycoplasma orale</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Clostridium diphtheriae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>

Tabla 6. Bacterias usadas en el estudio de reactividad cruzada

<i>Haemophilus influenzae, tipo A</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>

Las condiciones restrictivas para probar la reactividad cruzada se alcanzaron usando una alta concentración de anticuerpos monoclonales primarios y una alta titulación de microorganismos. El reactivo de AcM de enterovirus se preparó a 1,5 veces la concentración que se suministra en el kit. El reactivo antimurino caprino secundario marcado con fluoresceína (conjugado antimurino) se usó tal como se suministra en el kit. Cada uno de los virus sometidos a prueba se preparó en forma de monocapas de células infectadas (250 células infectadas inoculadas en un cultivo de tubo de cultivo de fondo plano y se incubaron durante 24 a 48 horas para obtener una infección de 3+ a 4+). Luego, se procesaron y tiñeron con el reactivo de AcM de enterovirus a 1,5x, de conformidad con el procedimiento detallado en esta ficha técnica. Se cultivaron las cepas de bacterias, se procesaron como suspensiones y, después, se mancharon en los portaobjetos para microscopio (se obtuvieron >150 bacterias por campo de microscopio a 400x); luego, se tiñeron con el reactivo de AcM de enterovirus a 1,5x, de conformidad con el procedimiento detallado en esta ficha técnica. Los cultivos celulares se tiñeron como monocapas confluentes.

ASISTENCIA

Para realizar un pedido o para recibir asistencia técnica, póngase en contacto con un representante de Quidel en los números de teléfono 800-874-1517 (en EE. UU.) o +1 858-552-1100 (desde 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 asistencia técnica 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, nuestros productos y distribuidores en nuestro sitio web quidel.com.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knippe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001:723-775.
2. Khetsuriani N, Parashar UD. Enteric viral infections. En: Dale DC, Federman DD, eds. *Scientific American medicine*. New York, NY: WebMD, Inc.; 2003:1758-1766.
3. Strikas RA, Anderson L, Parker RA. Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enteroviruses in the United States, 1970-1983. *J Infect Dis* 1986;153:346-351
4. Stanway G, Brown F, Christian P, et al. *Picornaviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus taxonomy---classification and nomenclature of viruses*. 8th report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Academic Press; 2005:757-778.
5. Stanway G, Joki-Korpela P, Hyypia T. Human parechoviruses---biology and clinical significance. *Rev Med Virol* 2000;10:57-69.
6. Specter, S., Hodinka, R. L., and Young, S.A. 2000, *Clinical Virology Manual*, Washington D.C., ASM Press, 420-424.

7. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, 5th edition, 2007, CDC-NIH manual. [<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/bmbl5toc.htm>]
8. *Biosafety Manual*, 3rd edition, 2004. World Health Organization [Manual disponible en otros idiomas; consultar la página web de la OMS http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/]
9. *Laboratory Biosafety Guidelines*, 3rd edition, 2004. Publicado por la administración del Minister of Health, Population and Public Health Branch, Centre for Emergency Preparedness and Response [Directrices disponibles en francés o inglés; consultar la página web [<http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/lbg-ldmbl-04/index.html>]]
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Viral Culture; Approved Guidelines*. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006.
11. Eisenberg, Henry D. 1992. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, publicado por la American Society for Microbiology, Washington DC, p 8.2.3.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Viral Culture: Proposed Guideline*. CLSI document M41-P. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006. pp. 15 - 17
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Viral Culture; Approved Guidelines*. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006, Section 7.4.
14. IBID, pg. 28
15. IBID, pp. 22 - 25
16. Leland, Diane S. (1996). *Clinical Virology*, publicado por W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

REF 01-050000 – D³ IFA Enterovirus Identification Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanover,
Alemania



Diagnostic Hybrids, Inc. – una filial de Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PI1780002ES00 (03/21)

Cambios introducidos en la revisión:

- Se ha añadido una declaración sobre el glosario
- Se ha actualizado según los resultados actuales de las pruebas

GLOSARIO

REF

Número de referencia



Marcado de conformidad de la CE

EC REP

Representante autorizado en la Comunidad Europea

LOT

Código del lote



Fecha de caducidad



Fabricante



Límite de temperatura



Uso previsto

Rx ONLY

Exclusivamente por prescripción facultativa



Consulte la etiqueta electrónica para conocer las instrucciones de uso.



No volver a utilizar

IVD

Para uso diagnóstico *in vitro*

Σ 25 a 40

Contiene cantidad suficiente para 25 a 40 determinaciones

CONT NaN₃

Contenido/Contiene

NaN₃ 4%

Contenido/Contiene
