



D³
 DFA Cytomegalovirus
 IMMEDIATE EARLY
 ANTIGEN IDENTIFICATION KIT

Para uso en la detección cualitativa y la identificación de los antígenos tempranos de citomegalovirus CMV (IEA) en cultivos celulares por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales fluoresceinados (MAbs).

PARA SU USO EN DIAGNOSTICO *IN VITRO*



USO INDICADO

El D³ DFA Cytomegalovirus Immediate Early Antigen Identification Kit de Diagnostic Hybrids, Inc. está indicado para uso en la detección cualitativa y la identificación de los antígenos tempranos de citomegalovirus CMV (IEA) en cultivos celulares por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales fluoresceinados (MAbs).

Este producto no está destinado para ser utilizado en las pruebas de sangre o plasma los donantes y no está diseñada para su uso en la detección directa de CMV en muestras clínicas

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El CMV es miembro del grupo de los herpesvirus, que incluye los tipos 1 y 2 del virus *herpes simplex*, el virus *varicela-zoster* (causante de la varicela) y el virus *Epstein-Barr* (que causa la mononucleosis infecciosa). El CMV se encuentra de manera universal en todas las localizaciones geográficas y en todos los grupos socioeconómicos e infecta entre un 50% y un 85% de los adultos de los Estados Unidos antes de llegar a los 40 años.^{1,2,3} CMV también es el virus que se transmite con más frecuencia a los fetos.^{1,4,5,6} La infección por CMV está más extendida en los países en desarrollo y en áreas con pobres condiciones socioeconómicas. Para la mayoría de las personas sanas que son infectadas por el CMV existen pocos síntomas y ninguna consecuencia para la salud a largo plazo. Algunas personas pueden sufrir síntomas similares a los de la mononucleosis, con fiebre prolongada y hepatitis leve. Una vez que la persona ha sido infectada, el virus estará vivo, aunque habitualmente quedará latente en esa persona de por vida. Muy raramente se padece la enfermedad de forma recurrente excepto en casos en que el sistema inmunológico está deprimido a consecuencia de una medicación o enfermedad. Así pues, para la gran mayoría de la población la infección por CMV no es un problema serio. Aún así, la infección por CMV es importante para determinados grupos de alto riesgo. Las principales áreas de preocupación son (1) el riesgo de infección para el feto durante el embarazo (congénita - la Enfermedad de Inclusión Citomegálica (CID) incluye síntomas como ictericia, erupciones petequiales transitorias, hepatoesplenomegalia, neumonitis, microcefalia y corioretinitis: retraso psicomotor, ceguera y pérdida auditiva a lo largo de la vida; perinatal – adquirida durante el parto como consecuencia de contacto con el virus en el canal del parto o durante el amamantamiento; postnatal - adquirida por contacto con personas que están diseminando virus),^{1,2,3} (2) el riesgo de infección para personas que trabajan con niños (mujeres en edad reproductiva que no han sido previamente infectadas por CMV),¹ y (3) el riesgo de infección de la persona inmunocomprometida, como por ejemplo receptores de trasplantes de órganos y personas

infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).^{6,7,8,9,10,11} El CMV infeccioso puede ser exudado en los fluidos corporales de cualquier persona previamente infectada y, por tanto, se puede encontrar en orina, saliva, sangre, lágrimas, semen y leche materna.^{6,12} La exudación del virus puede ocurrir intermitentemente, sin producir señales detectables y sin provocar síntomas.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El D³ DFA Cytomegalovirus Immediate Early Antigen Identification Kit emplea una mezcla de CMV antígeno-específicos y MAbs murinos directamente marcados con fluoresceína para la detección rápida de CMV-IEA en cultivo celular.

Las muestras clínicas se inoculan en monocapas de células cultivadas adecuadas. Estas células se fijan en acetona 1 a 4 días después de la inoculación. El CMV-IEA DFA Reagent se añade a las células para detectar la presencia de antígenos CMV-IEA. Tras la incubación durante 15 a 30 minutos de 35°C a 37°C, las células teñidas se lavan con la solución tampón fosfato salino diluido (1X PBS) y utilizando el medio de montaje (Mounting Fluid) suministrado y preparado para el análisis. Los portaobjetos o pocillos se examinan bajo un microscopio de fluorescencia equipado con la combinación correcta de filtros para Isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una amplificación de 200X a 400X. Las células infectadas por CMV presentarán núcleos brillantes de fluorescencia de color verde-manzana que se distinguirán de las células no infectadas contra-teñidas que presentan fluorescencia roja de Azul de Evans.

REACTIVOS Y MATERIALES PROPORCIONADOS

El D³ DFA Kit de identificación antígenos tempranos de citomegalovirus contiene lo siguiente:

Reactivo DFA de la CMV-IEA

10 mL

Un frasco gotero conteniendo una mezcla de dos anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos tempranos de CMV (pp 72). Los anticuerpos monoclonales son ambos IgG1 (k) isotipo. La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como conservante.

Portas de control del Antígeno del CMV-IEA

5 portaobjetos

Cinco (5) portaobjetos control empaquetados individualmente, cada uno con dos pocillos, uno con células positivas y el otro con células negativas para el CMV. En ambos casos las células proceden de cultivos celulares. Cada portaobjeto está indicado para una sola tinción.

Solución de PBS Concentrado 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).

Aceite de montaje

7 mL

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

***Nota:** Una gota de reactivo varía entre 40 y 60 µl, dependiendo de la presión y la temperatura de la solución. Por tanto, a continuación se indica el número de exámenes/pruebas por kit según el tipo de procedimiento.

Tipo de procedimiento	Número de exámenes por reactivo DFA anti-IEA del CMV, 10 ml
Tubos shell-vial, pruebas:	De 40 a 60
	<i>Suposiciones: 4 gotas, debido a que unos 0,200 ml cubren totalmente cada tubo shell-vial.</i>
Placas multipocillo, pruebas:	Placa de 24 pocillos: De 40 a 60
	<i>Suposiciones: 4 gotas, debido a que unos 0,200 ml cubren totalmente cada uno de los 24 pocillos.</i>

Tipo de procedimiento	Número de exámenes por reactivo DFA anti-IEA del CMV, 10 ml
	<i>Placa de 48 pocillos: De 50 a 80</i>
	<i>Suposiciones: 3 gotas, debido a que unos 0,150 ml cubren totalmente cada uno de los 48 pocillos.</i>
Acúmulo celular, pruebas: <i>(obtenido mediante raspado de tubo de vidrio de fondo redondo)</i>	200
	<i>Suposiciones: 1 gota, debido a que una gota de volumen promedio de unos 0,050 ml cubre 1 pocillo (5 mm) de un portaobjetos de 2 pocillos.</i>

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 del CMV de CMV según el método del laboratorio de elección. Las líneas celulares sugeridas incluyen H&V-Mix™ MixedCells™, prepucio de recién nacido humano, MRC-5.⁶ Todos disponibles en Quidel. Los ejemplos de métodos de aislamiento del CMV incluye:
 - ▶ Shell-vials, con cubreobjetos de vidrio, conteniendo monocapas de una línea celular preparada comercialmente o propagada por el usuario.
 - ▶ Placas multi-pocillos (en tamaños de 24 o 48 pocillos), conteniendo monocapas de una línea celular preparada comercialmente o propagada por el usuario.
- Control de virus vivos de la cultura controles positivos: Cepas conocidas de concentración de CMV para uso en la monitorización de cultivos celulares y procedimientos de tinción. Dichas cepas de virus control pueden obtenerse en Quidel.
- Cubreobjetos (22 x 50 mm) para Antigen Control Slides y para portaobjetos con la muestra.
- Universal Transport Medium. Disponible en Quidel.
- Medio de realimentación de cultivo tisular (Medio esencial mínimo de Eagle con suero fetal bovino al 2%, 25 mM HEPES, y antibióticos). Disponible en Quidel.
- Acetona grado reactivo (>99% pura) refrigerada entre 2°C y 8°C para fijación de Antigen Control Slides, 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, 1 ml.
- Pipetas Pasteur estériles u de 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 humidificado (p.ej., plato de Petri cubierto con una toalla de papel húmeda colocada en el fondo).
- Portaobjetos de vidrio para microscopio.
- Portaobjetos multi-pocillo de vidrio para microscopio limpiado con acetona.

- Papeles secantes para portaobjetos multi-pocillos de vidrio para microscopio, usados para absorber el exceso de líquido de la superficie e impedir la propagación del líquido o de las células teñidas de un pocillo a otro.
- 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.^{16,17,18}
- Agua desmineralizada para la dilución de 40X PBS Concentrate y de la acetona de grado reactivo para uso en placas multi-pocillo de poliestireno.
- Unidad aspiradora: Aspiradora de vacío con trampa desinfectante que contienen suficiente lejía de uso doméstico (5%) que la concentración no disminuyó en más de 10-veces, ya que se diluye con 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 analizar las monocapas de células antes de la inoculación y el examen de la toxicidad, la confluencia y para efectos citopáticos (CPE).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para su empleo en diagnóstico *in vitro*.
- Ningún método de prueba conocido puede ofrecer una garantía total de ausencia de agentes infecciosos; en consecuencia, todos los derivados de sangre humana, los reactivos y muestras humanas deben manejarse como capaces de transmisión de enfermedades infecciosas. Se recomienda manejar los reactivos y muestras humanas de acuerdo con la norma OSHA Standard on Bloodborne Pathogens.
 - El aislamiento de cultivo celular puede ser potencialmente peligroso. El personal que trabaja con cultivos celulares debe recibir formación adecuada en técnicas de manejo seguro¹⁴ y tener experiencia en cultivos celulares antes de intentar este procedimiento.
 - Todos los procedimientos deben realizarse de acuerdo con la CDC 5th Edition Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 2007, y CLSI Approved Guideline M29-A, Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue.
- Todas las muestras y materiales utilizados para procesarlos deben considerarse potencialmente infecciosos y manejarse de manera de prevenir la infección del personal de laboratorio.
 - ▶ 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.
- 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.
- 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%.
 - ▶ Azida sódica se considera venenosa. Si se ingiere el concentrado de PBS 40X, buscar inmediatamente asistencia médica.
 - ▶ 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.
- La contra-tinción Azul de Evans es potencialmente carcinogénica. Si se produce contacto con la piel, lávela con agua inmediatamente.
- El CMV-IEA DFA Reagent se suministran en concentración de trabajo. Cualquier dilución del DFA Reagent reducirá su sensibilidad.
- Los reactivos deben usarse antes de su fecha de caducidad.
- Cada CMV Antigen Control Slide debe usarse una sola vez. No vuelva a usar un Control Slide.
- La contaminación microbiana del CMV-IEA Reagent puede producir una reducción de su sensibilidad.
- Conserve la 1X PBS en un recipiente limpio para evitar la contaminación.
- 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.
- El equipo de vidrio reutilizable debe lavarse y aclararse bien para quitarle todos los detergentes.
- No exponga el CMV-IEA DFA Reagent a la luz fuerte durante la tinción o la conservación.
- 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 Solución de 1X PBS

- 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 volver a disolver los cristales, luego 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 Solución de Acetona 80%

- Añada 20 ml de agua destilada o desionizada a un recipiente de 100 ml.
- Lentamente añada 80 ml de acetona al recipiente y mezcle por inversión.
- Etiquete el recipiente indicando su contenido, la fecha de dilución y las iniciales del técnico, y almacene la Solución de Acetona a temperatura ambiente.

Instrucciones de conservación

Tabla 1. Condiciones de almacenaje de los componentes del kit

CMV-IEA DFA Reagent	Almacenar entre 2°C to 8°C en la oscuridad.
Mounting Fluid	
CMV 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 Solución	Almacenar a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C).

Estabilidad

El reactivo 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 del CMV-IEA DFA Reagent debe mantenerse al mínimo.

Deseche le 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 CMV. 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.¹⁵

Transporte y almacenamiento de la muestra

Para conseguir una recuperación óptima del virus, se recomienda el envío rápido de la muestra. Idealmente, el tiempo de transporte de la muestra no debe exceder de cuatro horas. 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 ser procesadas y analizadas tan pronto como sea posible y se almacena 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.

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.

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.

- Cuando tiña con reactivos fluorescentes y examine las células microscópicamente para detectar 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 e intensa.
- Lleve el CMV-IEA Reagent a temperatura ambiente (20°C a 25°C) antes del uso, e inmediatamente retórnalos 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 una buena práctica para guardar el medio retirado de la monocapas hasta después de la tinción se han obtenido resultados. Si hay cualquier cuestión relativa a la muestra los resultados, el medio se puede transmitir a otra y se incuba monocapa para el período de tiempo apropiado para repetir la prueba.
- Cuando se utiliza 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.
- No deje secar las monocapas antes de fijar; esto puede conducir a un alto teñido del fondo y menor sensibilidad.
- No permita que el DFA Reagent para secar en el monocapas; esto puede conducir a un fondo alto.

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 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 del DFA Reagent.
 - ▶ 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 pueden observarse en las monocapas celulares:
 - ▶ Detritos celulares, pelusa, etc. pueden absorber no específicamente la DFA Reagent, con el resultado de una fluorescencia de alta intensidad. Los artefactos de tinción se pueden identificar por su morfología, p.ej., no tienen la apariencia de una célula completa y normalmente no parecen estar en el plano de la monocapa como las otras células se.
 - ▶ Un bajo grado, de color amarillo-verde fluorescente a veces puede ser visto, especialmente en las zonas que se han amontonado células o están cerca de los agujeros en la monocapa de células. En ambos casos, la difusión de la DFA Reagent atrapado es retrasados durante el paso de lavado, lo que resulta en la fluorescencia inespecífica.
 - ▶ 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 bien controlada.
 - ▶ La fluorescencia de grado bajo debida al lavado insuficiente con DFA Reagent residual que quedaron en la monocapa celular.

- Durante la prueba, proteja de la luz a las monocapas teñidas tanto como sea posible.
 - ▶ La decoloración o desvanecimiento 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 en un microscopio de fluorescencia durante un período prolongado.

Prueba de cultivo celular – Shell-Vial

1. Generalmente se recomienda que las muestras se inoculen en un mínimo de dos shell-vials que contengan tipos de células iguales o diferentes que son adecuadas para CMV.
2. Un shell-vial debe ser teñido al día siguiente de la inoculación, si es negativo se debe teñir el otro shell-vial 2- o 3-días después de la inoculación.
3. Examine la correcta morfología de las monocapas antes de la inoculación.
4. Aspire el medio de mantenimiento y añada 1 ml del medio de realimentación apropiado a cada shell-vial.
5. Añada 0,2 a 0,4 ml de la muestra preparada a cada shell-vial.
6. Centrifugue las shell-vials a 700xg durante 1 hora de 20°C a 25°C.
7. Coloque los shell-vials con tapón en un incubador entre 35°C y 37°C.
8. Cuando una monocapa esté lista para la tinción con el CMV-IEA DFA Reagent, retire el medio y añada 1 ml de 1X PBS.
9. Mezclar por rotación y luego aspire.
10. Repita este lavado con 1 ml adicional de 1X PBS y luego aspire.
11. Añada 1 ml de frescos, refrigerados 100% acetona y deje reposar de 5 a 10 minutos entre 20°C y 25°C. la acetona
Precaución: La acetona es volátil e inflamable; manténgala alejada de las llamas.
12. Deseche la acetona en un recipiente apto para residuos biológicos peligrosos.
13. Añada 0,5 ml del 1X PBS para humedecer la monocapa.
14. Mezclar por rotación y luego aspire completamente.
15. Añada 4 gotas del CMV-IEA DFA Reagent a las respectivas monocapas fijadas de muestras del paciente y muestras control respectivas. Incline a un lado y a otro para **asegurar una cobertura completa** de la monocapa por el Reagent.
16. Coloque los shell-vials con tapón en un incubador entre 35°C y 37°C durante 15 a 30 minutos.
17. Aspire el CMV-IEA DFA Reagent de las monocapas.
18. Añada 1 ml de 1X PBS.
19. Retire la 1X PBS por aspiración, repita el paso de lavado y vuelva a retirar por aspiración.
20. Añada 0,5 a 1 ml de agua desmineralizada.
21. Extraiga el agua desmineralizada por aspiración.
22. Levante el cubreobjetos desde el fondo del shell-vial, agarrándolo con las pinzas de punta fina; luego transfíralo, con el lado de la monocapa hacia abajo, sobre una pequeña gota de Mounting Fluid en un portaobjetos marcado.
23. Examine las monocapas teñidas usando un microscopio de fluorescencia con aumentos de entre 200X y 400X. (Consulte la Sección 'Microscopía de Inmunofluorescencia').
24. Consulte la Sección 'Interpretación de Resultados'.

Prueba de cultivo celular – Placa multi-pocillos

1. Generalmente se recomienda que las muestras se inoculen en un mínimo de dos pocillos que contengan tipos de células iguales o diferentes que son adecuadas para CMV. Se recomienda que cada pocillo de duplicado se encuentre en placas multipocillos diferentes. Esto permite que cada placa se procese en el día apropiado.
2. Un pocillo debe ser teñido al día siguiente de la inoculación; si es negativo se debe teñir el otro pocillo 2 o 3 días después de la inoculación.

3. Examine la correcta morfología de las monocapas antes de la inoculación.
4. 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.
5. Añada 0,2 a 0,4 ml de la muestra preparada al pocillo que corresponde de una placa multi-pocillos.
6. Centrifugue las placas multi-pocillos a 700xg durante 1 hora de 20°C a 25°C.
7. Coloque las placas multi-pocillos tapadas en un incubador entre 35°C y 37°C con una atmósfera humidificada, de CO₂ al 5%.
8. Cuando una monocapa esté lista para la tinción, retire el medio por aspiración y añada 1 ml de 1X PBS.
9. Mezclar por rotación y luego aspire.
10. Repita este lavado con 1 ml adicional de 1X PBS y luego aspire.
11. Añada 1 ml de acetona acuosa al 80% y deje reposar durante 5 a 10 minutos de 20°C a 25°C.
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.
Precaución: La acetona es volátil e inflamable; manténgala alejada de las llamas.
12. Extraiga el fijativo por aspiración.
13. Añada 0,5 ml del 1X PBS para humedecer la monocapa.
14. Mezclar por rotación y luego aspire completamente.
15. Añada 4 gotas del CMV-IEA DFA Reagent a las monocapas fijadas de muestras del paciente y muestras control en cada monocapa de la placa multi-pocillos de 24 pocillos; añada 3 gotas del CMV-IEA DFA Reagent a las monocapas fijadas de muestras del paciente y muestras control en cada monocapa de la placa multi-pocillos de 48 pocillos. Inclina a un lado y a otro para **asegurar una cobertura completa** de la monocapa por el Reagent.
16. Añadir 4 gotas del reactivo de CMV-AIE DFA a las monocapas fijo de paciente y muestra de control en monocapa placa cada 24-así, añadir 3 gotas de Reactivo del CMV-AIE DFA a las monocapas fijo de pacientes y muestras de control en cada uno de 48 - así placa de una sola capa.
17. Coloque la placa multi-pocillos tapada en un incubador humidificado entre 35°C y 37°C durante 15 a 30 minutos.
18. Aspire el CMV-IEA DFA Reagent de las monocapas.
19. Añada 1 ml de 1X PBS para lavar y mezclar.
20. Retire la 1X PBS por aspiración, repita el paso de lavado y vuelva a retirar por aspiración
21. Añada 1 ml de agua desmineralizada.
22. Extraiga el agua desmineralizada por aspiración.
23. Añada 3 gotas de Mounting Fluid a cada monocapa, luego tape la placa.
24. Examine las monocapas teñidas usando un microscopio de fluorescencia con aumentos de entre 200X y 400X. (Sección 'Microscopía de Inmunofluorescencia').
25. Consulte la Sección 'Interpretación de Resultados'.

Control de calidad

Cultivo celular (opcional)¹⁹

- Los controles virales positivos y negativos deben correrse con cada nueva tanda de células para confirmar su rendimiento en el cultivo de virus específicos.
- Para asegurar la sensibilidad viral, las monocapas control con CMV inoculado deben incluirse cada vez que se use un nuevo lote de cultivo celular.
- Además, se debe teñir una monocapa sin inocular de cada lote que servirá como un control negativo. Las malas condiciones de almacenamiento o manipulación, se reflejarán también en el control negativo.
- Si los cultivos de control no tienen un rendimiento correcto, los resultados se consideran no válidos.

Reactivos

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

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 el CMV es aquella en la que se observa una fluorescencia verde manzana brillante en las células infectadas.
- La fluorescencia de las células no infectadas será de un rojo apagado debido a la contra-tinción de 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 del aislamiento/confirmación del cultivo

- Una reacción positiva es aquella en la que fluorescente brillante color verde manzana los núcleos, se observa en las células infectadas.
- Examine todo el punto celular o la monocapa celular para identificar células fluorescentes específicas del citomegalovirus. Si no detecta células fluorescentes, informe así: "No detectado citomegalovirus."
- Si se hallaron células fluorescentes en la monocapa teñida con CMV mostrando un patrón de tinción esperado, informe el resultado como: "Citomegalovirus aislado por cultivo celular".

LÍMITES DEL PROCEDIMIENTO

- La recogida, conservación y transporte inapropiados de muestras puede producir resultados falsos negativos en el cultivo.²⁰
- Los tiempos de incubación o las temperaturas distintas de las citadas en las instrucciones para la prueba puede dar resultados erróneos.
- La detección de CMV variará enormemente dependiendo de la calidad de la muestra y de la manipulación subsiguiente. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección CMV. Los resultados de la prueba deben interpretarse conjuntamente con la información disponible de estudios epidemiológicos, la evaluación clínica del paciente y de otros procedimientos diagnósticos.
- No se han establecido los efectos de la terapia antiviral sobre el rendimiento de este kit.

- Dado que los anticuerpos monoclonales han sido preparados utilizando cepas de virus 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 rendimiento de este kit únicamente puede asegurarse cuando los componentes usados en el ensayo son los suministrados por Quidel.
- La conservación prolongada del CMV-IEA 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 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* 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

Los estudios clínicos descritos en la Sección X ('Características de rendimiento específico') emplearon únicamente muestras recogidas y cultivadas para detectar la presencia de CMV.

Las fuentes de las muestras y la positividad con el dispositivo de comparación se describen más abajo (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de todas las fuentes de las muestras por sitio de estudio

Sitio de Estudio	Total de las muestras	Sangre	Fluido corporal	Genital	G.I. – Superior	G.I. – Inferior	Resp. – Superior	Resp. – Inferior	Piel/Lesiones	Tejido	Orina	Desconocida
1	314	45	16	1	4	12	10	131	1	21	73	0
2	293	0	0	0	0	0	271	15	0	6	1	0
3	128	11	8	0	4	4	13	62	2	0	23	1
4	291	72	16	0	7	0	30	95	1	12	58	0
Total	1026	128	40	1	15	16	324	303	4	39	155	1

Sangre: sangre, capa leucoplaquetaria (Buffy coat)

Fluidos Corporales: fluido, líquido amniótico, líquido cerebroespinal (CSF/CF), líquido pericárdico, pleural

Genital: genital

G.I. – superior: gastrointestinal (superior), boca, esofágico, etc.

G.I. – inferior: gastrointestinal (inferior), estómago, colon, sigmoides, intestino, heces, pleura

Resp. – superior: respiratorio (superior), nasal (NS), aspirados nasofaríngeos (NP), garganta, ventanas nasales

Resp. – inferior: respiratorio (inferior), pulmón, lóbulos, bronquial, lavado broncoalveolar (BAL), lavado bronquial (BW), cepillados, aspirados traqueales (TA), esputo

Piel/Lesiones: abdomen, conjuntiva

Tejido: biopsia (BX), hígado, corazón, nódulos linfáticos, cerebro, médula ósea,

Orina: orin

Desconocido: el investigador no ha podido especificar la fuente

La información demográfica por edad y género de las muestras cultivadas están tabuladas a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Demográficos por edad y género

Franja de edad	Masculino	Femenino	Género no informado	Total
0 a 1m	0 / 37	3 / 17	0 / 0	3 / 54
>1m a 2a	31 / 176	33 / 151	0 / 0	64 / 327
>2 a 12a	6 / 34	2 / 31	0 / 0	8 / 65
>12 a 21a	0 / 12	0 / 9	0 / 0	0 / 21
22 a 30a	0 / 14	0 / 21	0 / 0	0 / 35
31 a 40a	3 / 48	1 / 49	0 / 0	4 / 97
41 a 50a	5 / 43	4 / 38	0 / 0	9 / 81
51 a 60a	5 / 63	1 / 31	0 / 0	6 / 94
>60a	6 / 110	4 / 105	0 / 0	10 / 215
Edad no informada	0 / 14	0 / 4	0 / 19	0 / 37
Total	56 / 551	48 / 456	0 / 19	104 / 1026

NOTA: Valores son # positivo/Total

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO ESPECÍFICAS

En total se cultivaron y tiñeron mil sesenta (1060) muestras con uno de dos métodos de comparación y el D³ DFA Cytomegalovirus Immediate Early Antigen Identification Kit. Las metodologías de cultivo concordaban con las recomendaciones de CLSI, M41-A. Se cultivó y tiñó una combinación de muestras frescas (532) y de archivo (528). Un total de 34 muestras fueron excluidas del análisis final, lo cual resultó en 1026 resultados reportados. Los motivos de exclusión fueron toxicidad de la muestra en cultivo celular (29), contaminación bacteriana en cultivo celular (1), fluorescencia no específica detectada que impedía la interpretación (2), y muestras no aceptables (2). Estas evaluaciones se llevaron a cabo en tres laboratorios externos localizados en los Estados Unidos y en el laboratorio virológico interno de Diagnostic Hybrids, Inc.

Se calculó el Porcentaje de Coincidencia entre D³ DFA Cytomegalovirus Immediate Early Antigen Identification Kit (D³ CMV-IEA ID Kit) y los Métodos de Comparación para todas las muestras anteriormente analizadas. (Véase la Tabla 4 a continuación).

Tabla 4. Comparación global de la D³ CMV-IEA ID Kit con Kits comparador

		Dispositivo comparador	
		+	-
D ³ CMV-IEA ID Kit	+	100	4
	-	4	918
		Total: 1026	

Coincidencia de porcentaje positivo^a (CPP) = 96.1% (100/104)

95% CI^b CPP = 90.5, 98.5

Coincidencia de porcentaje negativo^c (CPN) = 99.6% (918/922)

95% CI CPN = 98.9, 99.8

^aEn la Coincidencia de Porcentaje positivo" o CPP, los valores se calcularon {[el Número total de resultados Positivos en coincidencia con las Métodos 'Sujeto' y 'Comparador'] dividido entre {[el Número total de resultados Positivos en coincidencia con las Métodos 'Sujeto' y 'Comparador'] más el {[el Número de Resultados Positivos por 'Comparador', pero Negativo por el Sujeto]}} multiplicado por 100%.

“95% CI” se refiere al 95% de los Intervalos de Confianza, que se calcularon de acuerdo a la Dispositivo Exacta (Clopper, C. y S. Pearson, Biometrika 26: 404-413, 1934). En la Coincidencia de Porcentaje Negativo" o CPN, los valores se calcularon {[el Número total de resultados Negativos en coincidencia con las Métodos ‘Sujeto’ y ‘Comparador’] divididos entre {[el Número total de resultados Negativos en coincidencia con las Métodos ‘Sujeto’ y ‘Comparador’] más el {[Número de Resultados Negativos por ‘Comparador’, pero Positivo por el Sujeto]}} multiplicado por 100%.

Estudio del Sitio 1

El estudio del sitio 1 recogió y cultivó un total de 314 muestras frescas durante agosto de 2006. Ninguna muestra fue excluida del análisis final.

El protocolo de cultivo utilizado en este sitio fue el siguiente: se inocularon doscientos microlitros (200 µl) de cada muestra a pocillos individuales de cuatro placas multipocillo MRC-5 de 48 pocillos. Las placas inoculadas fueron centrifugadas a 700xg durante 60 minutos e incubadas a 35°C y 37°C. Se tiñó un conjunto de placas el 2º día postinoculación de acuerdo con la documentación correspondiente al producto (1 placa, dispositivo comparador y 1 placa, dispositivo del sujeto). El conjunto de placas restante se tiñó el 4º día postinoculación de acuerdo con la documentación correspondiente al producto (1 placa, dispositivo comparador y 1 placa, dispositivo del sujeto). En la Tabla 5 se resumen los resultados de este muestreo.

Tabla 5. Estudio del Sitio 1 – Comparación de D³ CMV-IEA ID Kit con Kits comparador

		Dispositivo comparador	
		+	-
D ³ CMV-IEA ID Kit	+	16	1
	-	1	296
		Total: 314	
		CPP = 94.1% (16/17)	
		95% CI CPP = 73.0, 98.9	
		CPN = 99.7% (296/297)	
		95% CI CPN = 98.1, 99.9	

Estudio del Sitio 2

El estudio del sitio 2 cultivó un total de 300 muestras (72 muestras frescas y 228 de archivo) desde el 31 de agosto al 8 de noviembre de 2006. Las muestras de archivo fueron recogidas de junio de 2005 a septiembre de 2006. Éstas fueron almacenadas a -70°C hasta su recultivo para el presente estudio. Las muestras no fueron seleccionadas para el presente estudio en base a resultados de cultivos anteriores. De las 228 muestras de archivo, siete fueron excluidas del análisis final. En la Tabla 6 se expone el criterio de exclusión de las muestras.

Tabla 6. Sitio de Estudio 2 – Exclusión especímenes / muestra

Criterios de exclusión – Tóxico para los cultivos celulares	7
---	---

El protocolo de cultivo utilizado en este sitio fue el siguiente: se inocularon doscientos microlitros (200 µl) de cada muestra a cuatro shell-vials MRC-5. Los shell-vials inoculados fueron centrifugados a 700xg durante 60 minutos e incubados a 35°C y 37°C. Se tiñó un conjunto de shell-vials el 1º día postinoculación de acuerdo con la documentación correspondiente al producto (1 shell-vial, dispositivo comparador y 1 shell-vial, dispositivo del sujeto). El conjunto de viales restante se tiñó el 2º día postinoculación de acuerdo con la documentación

correspondiente al producto (1 shell-vial, dispositivo comparador y 1 shell-vial, dispositivo del sujeto). Los resultados de estas pruebas se resumen en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Site 2 – Estudio del Sitio 2 – Comparación de D³ CMV-IEA ID Kit con Kits comparador (especímenes congelados)

Congelados	Dispositivo comparador		
	+	-	
D ³ CMV-IEA ID Kit	+	65	3
	-	0	153
			Total: 221

CPP = 100% (65/65)
 95% CI CPP = 94.4, 100
 CPN = 98.1% (153/156)
 95% CI CPN = 94.5, 99.3

Tabla 8. Site 2 – Estudio del Sitio 2 – Comparación de D³ CMV-IEA ID Kit con Kits comparador (especímenes fresco)

Fresco	Dispositivo comparador		
	+	-	
D ³ CMV-IEA ID Kit	+	4	0
	-	0	68
			Total: 72

CPP = 100% (4/4)
 95% CI CPP = 51.0, 100
 CPN = 100% (68/68)
 95% CI CPN = 94.7, 100

Estudio del Sitio 3

El estudio del sitio 3 realizó pruebas sobre muestras de febrero de 2007 a mayo de 2007. Se cultivó un total de 146 muestras frescas. De estas 146 muestras, 18 fueron excluidas del análisis final. En la Tabla 9 se expone el criterio de exclusión de las muestras.

Tabla 9. Sitio de Estudio 3 - Exclusión especímenes / muestra

Criterios de exclusión – tóxico para los cultivos celulares	15
Criterios de exclusión – cultivo de células contaminadas	1
Criterios de exclusión – modelo inapropiado	1
Criterios de exclusión – muestra repetir	1
Total	18

El protocolo de cultivo utilizado en este sitio fue el siguiente: se inocularon doscientos microlitros (200 µl) de cada muestra a dos shell-vials MRC-5. Los shell-vials inoculados fueron centrifugados a 700xg durante 60 minutos e incubados a 35°C y 37°C. Se tiñó un conjunto de shell-vials el 2º día postinoculación de acuerdo con

la documentación correspondiente al producto (1 shell-vial, dispositivo comparador y 1 shell-vial, dispositivo del sujeto). Los resultados de este sitio de pruebas se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Site 3 – Estudio del Sitio 3 – Comparación de D³ CMV-IEA ID Kit con Kits comparador (especímenes fresco)

Fresco		Dispositivo comparador	
		+	-
D³ CMV-IEA ID Kit	+	5	0
	-	1	122
Total: 128			

CPP = 83.3% (5/6)

95% CI CPP = 43.6, 97.0

CPN = 100% (122/122)

95% CI CPN = 96.9, 100

Estudio del Sitio 4

El estudio del sitio 4 (laboratorio de virología interno de Diagnostic Hybrids, Inc.) cultivó 300 muestras que fueron recogidas en un laboratorio clínico de referencia en el Este de los Estados Unidos en febrero de 2007. Estas muestras congeladas recogidas de manera prospectiva se almacenaron a -70°C hasta su cultivo para el presente estudio. Las muestras no fueron seleccionadas para este estudio en base a resultados de cultivos anteriores. De estas 300 muestras de archivo, 9 fueron excluidas del análisis final. En la Tabla 11 se expone el criterio de exclusión de las muestras.

Tabla 11. Sitio de Estudio 4 – Exclusión especímenes / muestra

Criterios de exclusión – Tóxico para los cultivos celulares	7
Criterios de exclusión – fluorescencia inespecífica visto, incapaz de interpretar	2
Total	9

El protocolo de cultivo utilizado en este sitio fue el siguiente: se inocularon doscientos microlitros (200 µl) de cada muestra a pocillos individuales de cuatro placas multipocillo MRC-5 de 48 pocillos. Las placas inoculadas fueron centrifugadas a 700xg durante 60 minutos e incubadas a 35°C y 37°C. Se tiñó un conjunto de placas el 1º día postinoculación de acuerdo con la documentación correspondiente al producto (1 placa, dispositivo comparador y 1 placa, dispositivo del sujeto). El conjunto de placas restante se tiñó el 2º día postinoculación de acuerdo con la documentación correspondiente al producto (1 placa, dispositivo comparador y 1 placa, dispositivo del sujeto). En la Tabla 12 se resumen los resultados de este muestreo.

Tabla 12. Site 4 – Estudio del Sitio 4 – Comparación de D³ CMV-IEA ID Kit con Kits comparador (especímenes congelados)

Congelados	Dispositivo comparador	
	+	-
D ³ CMV-IEA ID Kit	+	0
	10	
	2	279
Total: 291		

CPP = 83.3% (10/12)
 95% CI CPP = 55.2, 95.3
 CPN = 100% (279/279)
 95% CI CPN = 98.6, 100

Análisis de Sensibilidad

Se estudió la sensibilidad analítica con la finalidad de demostrar la comparabilidad de la efectividad del D³ CMV-IEA DFA Reagent con la del Dispositivo Comparador. Se utilizó un inóculo de bajo nivel para estudiar la sensibilidad analítica en un sistema de cultivo celular. Este proceso se realizó mediante la inoculación de dos placas de cultivo de 96 pocillos (Hs27) con CMV diluida hasta un valor de 1-TCID₅₀ y su incubación a 37°C durante 48 horas; a continuación, se tiñó una placa en el D³ CMV-IEA DFA Reagent del sujeto y la otra placa se tiñó utilizando el CMV-IEA DFA Reagent del dispositivo comparador. Este ensayo se realizó tres veces, resultando en una media de 35,3 ±2,3 pocillos positivos de un total de 96 pocillos detectados en el caso del sujeto; y una media de 38,3 ±2,1 pocillos positivos de un total de 96 pocillos en el caso del predicado. Una prueba t para datos apareados muestra que estos resultados no son estadísticamente diferentes.

Análisis de Especificidad (Prueba de reactividad cruzada)

Se probó la reactividad cruzada del reactivo DFA de D³ DFA Cytomegalovirus Immediate Early Antigen Identification Kit comparándolo con una gran variedad de células y microorganismos. Se alcanzaron unas condiciones estrictas para la prueba de reactividad cruzada mediante el uso de una elevada concentración de CMV-IEA DFA Reagent y títulos relativamente elevados de microorganismos. Se preparó el DFA Reagent a una concentración de 2x la que se proporciona en el kit. No se detectó reactividad cruzada para 58 cepas de virus ni para 20 tipos de cultivo celular. Se tiñó y examinó la reactividad cruzada de veinticinco (25) cultivos bacterianos, un cultivo de levaduras, tres portaobjetos bacterianos (*Chlamydia spp.*) y uno de protozoo de venta comercial, incluyendo *Staphylococcus aureus*, una bacteria productora de proteína A. La tinción de *S. aureus* adoptó la forma de pequeños puntos de fluorescencia (Sección de Límites del Procedimiento). [Véanse las Tablas 13, 14 y 15 a continuación para los resultados del estudio de reactividad cruzada.]

Se probó la reactividad cruzada de cincuenta y ocho (58) cepas de virus. En función del virus particular se inocularon de 140 a 1.400 TCID₅₀ en cultivo shell-vial y se incubaron de 24 a 48 horas, lo cual produjo infección de 1+ a 3+ una vez procesado y teñido con el 2X DFA Reagent de acuerdo con el procedimiento tal y como se detalla en la presente documentación del producto. No se observó reactividad cruzada para los virus citados a continuación (Tabla 13).

Tabla 13 Virus cepas analizadas por reactividad cruzada con D³ CMV-IEA DFA Reagent

Organismo	Cepa o Tipo	Inóculo (TCID ₅₀)	Organismo	Cepa o Tipo	Inóculo (TCID ₅₀)
Adenovirus	Tipo 1	1,400	RSV	Long	1,400
	Tipo 3	1,400		Wash	1,400
	Tipo 5	1,400		9320	1,400
	Tipo 6	1,400	Parainfluenza 1	C-35	1,400
	Tipo 7	1,400	Parainfluenza 2	Greer	1,400
	Tipo 8	1,400	Parainfluenza 3	C 243	1,400
	Tipo 10	1,400	Parainfluenza 4a	M-25	1,400
	Tipo 13	1,400	Parainfluenza 4b	CH19503	1,400
	Tipo 14	1,400	HSV-1	IF	140
	Tipo 31	1,400		MacIntyre	140
Influenza A	Aichi	1,400	HSV-2	MS	140
	Malaya	1,400		Strain G	140
	Hong Kong	1,400	VZV	Webster	140
	Denver	1,400		Ellen	140
	Port Chalmers	1,400		AV92-3	140
	Victoria	1,400	Epstein-Barr	Portaobjetos de venta comercial teñidos. ^d	
	New Jersey	1,400	Rubeola		
	PR	1,400	Mumps		
	WS	1,400	Echovirus	Types 4, 6, 9, 11, 30, 34	Portaobjetos de venta comercial teñidos.
Influenza B	Hong Kong	1,400		Coxsackievirus	
	Maryland	1,400	Poliovirus		
	Mass	1,400			
	Taiwan	1,400			
	GL	1,400			
Russia	1,400				

^d El material de la prueba proviene de portaobjetos preparados comercialmente. Cada pocillo positivo contiene 10 a 50% de células reactivas.

Se probó la reactividad cruzada de veinte (20) tipos de cultivo celular. Los cultivos celulares se prepararon en formato shell-vial. Se tiñeron monocapas confluentes o “cell spots” utilizando el 2X DFA Reagent de acuerdo con el procedimiento especificado en la presente documentación del producto y a continuación se examinó su reactividad cruzada. No se observó reactividad cruzada para las siguientes (Tabla 14).

Tabla 14. Líneas celulares sometidos a pruebas de reactividad cruzada con D³ CMV-IEA DFA Reagent

A549	monocapa	NCI-H292	monocapa
BGMK	monocapa	pCMK	punto (spot) celular
HEp-2	monocapa	pRhMK	punto celular
HFF / Hs27	monocapa	RD	monocapa
LLC-MK2	monocapa	RhMK II	punto celular
McCoy	monocapa	RK (passage 1)	monocapa
MDCK	monocapa	R-Mix	monocapa
MRC-5	monocapa	Vero	punto celular
MRHF	monocapa	Vero 76	punto celular
Mv1Lu	monocapa	WI-38	punto celular

Treinta (30) microorganismos, incluyendo 24 cultivos bacterianos, un micoplasma, una levadura, tres especies de clamidia y una de protozoo en portaobjetos de venta comercial, se tiñeron utilizando el 2X DFA Reagent de acuerdo con el procedimiento detallado en la presente documentación del producto y se probaron para la reactividad cruzada. Todos los microorganismos dieron resultado negativo con la excepción de *Staphylococcus aureus*, que presentó reactividad cruzada con el CMV-IEA DFA Reagent (ver arriba). Las concentraciones de cada organismo bacteriano cultivado mediante DHI para la prueba para la reactividad cruzada fueron determinadas a partir de suspensiones de la bacteria en PBS mediante espectrofotómetro de acuerdo con estándares McFarland de niveles 1,0 y 2,0 (equivalentes aproximadamente a $3,0 \times 10^6$ y $6,0 \times 10^6$ CFU por ml). Los portaobjetos fueron preparados con núcleos de 0,01 ml de las suspensiones para dar lugar a $3,0 \times 10^4$ o bien $6,0 \times 10^4$ por núcleo. Al mismo tiempo se colocó 1 ml de cada suspensión en un plato de agar adecuado para la confirmación de las colonias. De acuerdo con los cultivos confirmados de agar, las concentraciones iniciales de organismos bacterianos en el estudio oscilaron entre $6,4 \times 10^4$ y $2,9 \times 10^7$ CFU. Los resultados de las pruebas se presentan a continuación (Tabla 15).

Tabla 15. Microorganismos probados para la reactividad cruzada con D³ CMV-IEA DFA Reagent

BACTERIA	CMV-IEA DFA Reagent	CFU PROBADAS
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Negativo	$\sim 6 \times 10^7$
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Negativo	9.7×10^5
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Negativo	1.7×10^5
<i>Bordetella pertussis</i>	Negativo	4.6×10^6
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Negativo	2.5×10^6
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	2.6×10^5
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Negativo	5.0×10^5
<i>Haemophilis influenzae type A</i>	Negativo	9.3×10^5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo	6.4×10^6
<i>Legionella pneumophila</i>	Negativo	6.5×10^4
<i>Moraxella cartarrhalis</i>	Negativo	6.4×10^4
<i>Mycoplasma hominis</i>	Negativo	$\sim 6 \times 10^4$
<i>Mycoplasma orale</i>	Negativo	$\sim 6 \times 10^4$
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negativo	$\sim 6 \times 10^4$
<i>Mycoplasma salivarium</i>	Negativo	$\sim 6 \times 10^7$
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Negativo	1.3×10^6
<i>Proteus mirabilis</i>	Negativo	2.1×10^6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	1.0×10^7
<i>Salmonella enteritidis</i>	Negativo	2.5×10^6
<i>Salmonella typhimurium</i>	Negativo	1.8×10^6
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positiva ^e	1.0×10^7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negativo	9.6×10^6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo	8.0×10^5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negativo	2.9×10^7
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Negativo	$\sim 6 \times 10^4$
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Negativo	Portaobjetos de venta comercial teñidos.
<i>Chlamydophila psittaci</i>	Negativo	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Negativo	
LEVADURA		
<i>Candida glabrata</i>	Negativo	8.7×10^6
PROTOZOO		

BACTERIA	CMV-IEA DFA Reagent	CFU PROBADAS
Trichomonas vaginalis	Negativo	Portaobjetos de venta comercial teñidos.

^e La tinción de *S. aureus* apareció como pequeños puntos de la fluorescencia, mientras que todas las otras culturas fueron negativas. Esto se hará constar en el etiquetado en la sección "Limitaciones del ensayo": la una proteína producida por la bacteria *Staphylococcus aureus*, se une la porción Fc de algunos de los marcado con fluoresceína anticuerpos monoclonales utilizados en este kit. Tal unión se puede distinguir a partir de antígenos virales vinculante sobre la base de la morfología, es decir, la fluorescencia de *S. aureus* con destino aparece como pequeñas (~ 1 micras de diámetro), los puntos brillantes. Los resultados de los cultivos celulares con la contaminación bacteriana debe, por tanto, deben interpretarse con cautela."

DECLARACION DE GARANTIA

Estos productos estan garantizados para funcionar como se ha descrito en su etiquetado y en la bibliografía de Quidel, si se utilizan conforme a sus instrucciones. NO EXISTE NINGUNA GARANTÍA MÁS ALLÁ DE LA QUE SE HA EXPRESADO Y QUIDEL NO SE HACE CARGO DE CUALQUIER GARANTÍA IMPLICITA DE COMERCIALIZACIÓN O GARANTÍA DE IDONEIDAD PARA CUALQUIER FIN PARTICULAR. La única obligación de Quidel y la única razón del comprador para incumplir esta garantía será la reparación o sustitución de los productos, decisión que tomará Quidel.

ASISTENCIA

Para hacer un pedido u obtener servicio técnico, comuníquese con un representante de Quidel al 800.874.1517 (en los Estados Unidos) o al 858.552.1100 (fuera de los Estados Unidos), de lunes a viernes, de 8:00 a. M. A 5:00 p. M., hora de la costa este. También pueden realizarse pedidos por fax al 740.592.9820. Para solicitar asistencia por correo electrónico, envíe un correo electrónico a customerservice@quidel.com o a technicalsupport@quidel.com.

Para obtener asistencia fuera de los Estados Unidos, comuníquese con su distribuidor local. Puede obtener información adicional sobre Quidel, nuestros productos y nuestros distribuidores en el sitio web: quidel.com.

REFERENCIAS

- Melish, M.E., and J.B. Hanshaw. 1973. Congenital cytomegalovirus infection: Developmental progress of infants detected by routine screening. *Am. J. Dis. Child.* 126:190-194.
- Stagno, S., R.F. Pass, D.W. Reynolds, M.A. Moore, A. J. Nahmias, and C.A. Alford. 1980. Comparative study of diagnostic procedures for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr.* 65:251-257.
- Stagno, S., D.W. Reynolds, E. Huang, S.D. Thames, R.J. Smith and C.A. Alford. 1977. Congenital cytomegalovirus infection: occurrence in an immune population. *N. Eng. J. Med.* 269:1254-1258.
- Berenberg, W., and G.A. Nankervis. 1970. Long-term follow-up of cytomegalic inclusion disease of infancy. *Pediatrics* 46:403-410.
- Umetsu, M., Y. Chiba, K. Horino, S. Chiba, and T. Nakao. 1975. Cytomegalovirus-mononucleosis in a newborn infant. *Arch. Dis. Child.* 50:396-398.
- Reynolds, D.W., S. Stagno, and C.A. Alford. 1979. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. pp. 399-439. In E.H. Lennette and N.J. Schmidt (eds), *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*, 5th ed. Public Health, Washington D.C.
- Betts, R.F., R.B. Freeman, R.G. Douglas, and T.E. Talley. 1977. Clinical manifestations of renal allograft derived primary cytomegalovirus infection. *Am. J. Dis. Child.* 131:759-763.
- Ho, M., S. Suwansirikul, J.M. Dowling, L. A. Youngblood, and J.A. Armstrong. 1975. The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *N. Eng. J. Med.* 293:1109-1112.
- Peterson, P.K., H.H. Balfour, S.C. Marker, D.S. Fryd, R.J. Howard, and R.L. Simmons. 1980. Cytomegalovirus disease in renal allograft recipients: a prospective study of the clinical features, risk factors, and impact on renal transplantation. *Medicine* 59:283-300.

10. Simmons, R.L., C. Lopez, and H. Balfour Jr. 1974. Clinical correlation in renal transplant recipients. *Ann. Surg.* 180:623-632.
11. Spencer, E. S. 1974. Clinical aspects of cytomegalovirus infection in kidney-graft recipients. *Scand. J. Infect. Dis.* 6:315-323.
12. Jordan, M C., W.E. Rousseau, G.R. Noble, J.A. Stewart, and T.D. Y. Chin. 1973. Association of cervical cytomegalovirus with venereal disease. *N. Eng. J. Med.* 288:932-934.
13. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational safety and health standards, bloodborne pathogens.
14. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, 5th edition, 2007, CDC-NIH manual. [<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbll5/bmbll5toc.htm>]
15. 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, Sections 6.1-6.3.
16. Gleaves, C. A., T. F. Smith, E.A. Shuster, and G.R. Pearson. 1985. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 21:217-221.
17. Gleaves, C.A., T.F. Smith, E.A. Shuster, and G.R. Pearson. 1984. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J. Clin. Microbiol.* 19:917-919.
18. Paya, C.V., A.D. Wold, D.M. Istrup, and T.F. Smith. 1988. Evaluation of number of shell vial cell cultures per clinical specimen for rapid diagnosis of cytomegalovirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 26:198-200.
19. NCCLS Document C24-A, 1991. "Internal Quality Control Testing: Principles and Definitions". Approved Guidelines. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA
20. Leland, Diane S. (1996). *Clinical Virology*, published by W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

REF

01-070000 – D³ DFA Cytomegalovirus Immediate Early Antigen 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

PI3080002ES00 (07/19)

GLOSSARIO

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

R_x ONLY

Solo con receta médica



Consulte las instrucciones de uso



No reutilizar

IVD

Para diagnósticos *in vitro*



40 to 60

Contiene una cantidad suficiente para
40 a 60 determinaciones

CONT NaN₃

Contenido / Contiene

NaN₃ 4%

Contiene 4% de azide sodia al puro
