

D³ Ultra 8™

DFA Respiratory Virus
SCREENING AND IDENTIFICATION KIT

Kit de Screening e Identificación de Virus Respiratorios

Sólo Para Exportación – No para Venta en USA

PARA SU EMPLEO EN DIAGNÓSTICO *IN VITRO*



USO INDICADO

El kit D³ Ultra 8™ DFA Respiratory Virus Screening & Identification Kit de Diagnostic Hybrids, Inc. está indicado para la detección cualitativa e identificación de los virus influenza A, influenza B, virus respiratorio sincicial, metapneumovirus, adenovirus y los virus parainfluenza tipos 1, 2 y 3 en muestras respiratorias, sea por detección directa o método de cultivo celular, por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales fluoresceinados (MAbs).

Se recomienda confirmar mediante cultivo celular las muestras que dieron resultados negativos tras el examen del resultado prueba directa de la muestra. Los resultados negativos no excluyen infecciones por virus respiratorios y no deben tomarse como base exclusiva para el diagnóstico, tratamiento u otras decisiones de manejo del caso.

- Las características de funcionamiento del virus influenza A se establecieron cuando influenza A/H3 y A/H1 eran los virus influenza A predominantes en circulación. Al aparecer otros virus influenza A, las características de funcionamiento pueden variar.
- Si sobre la base de los criterios clínicos y de detección epidemiológica actuales recomendados por las autoridades de salud pública se sospecha que la infección es producida por un virus influenza A nuevo, la recogida de muestras debe realizarse con las precauciones apropiadas de control de infección para nuevos virus influenza virulentos y dichas muestras deben enviarse a los departamentos de salud estatales o locales para ser sometidas a pruebas. En estos casos no debe intentarse el cultivo viral a menos que se disponga de una instalación BSL 3+ para la recepción y cultivo de las muestras.¹

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Con la aparición de nuevos medicamentos antivirales para el tratamiento de la influenza², pruebas más rápidas y sensibles para la detección de virus respiratorios^{3,4} y la creciente necesidad de un uso menos indiscriminado de antibióticos⁵, la detección e identificación temprana del agente viral que produce la infección ha adquirido una importancia sustancialmente mayor. La identificación viral es cada vez más importante para descartar a las bacterias como causantes de las infecciones respiratorias. La identificación del virus ya sea por detección directa del antígeno o por cultivo celular utilizando anticuerpos monoclonales fluorescentes sigue siendo el método estándar en los laboratorios de virología.

Virus influenza

Los virus influenza (familia *Orthomyxoviridae*) contienen un genoma ARN de una sola hebra presente en ocho segmentos separados de ribonucleoproteína. Segmentación del genoma es rara entre los virus y contribuye al desarrollo de nuevas cepas de influenza a través de intercambio de segmentos de genes cuando dos cepas

diferentes de influenza infectan la misma célula. Existen tres tipos de influenza, A, B y C. El tipo A tiene homólogos en aves, caballos, mamíferos marinos y cerdos así como en humanos, mientras que los tipos B y C se conocen fundamentalmente en humanos.

Ante la eventualidad de otra pandemia de influenza A como la registrada en 1918 cuando 25-35 millones de personas murieron en todo el mundo, los Centers for Disease Control (CDC) y la World Health Organization (WHO) mantienen una vigilancia de las cepas de influenza que aparecen y hacen recomendaciones para la producción de vacunas para las cepas adecuadas.

Se estima que la infección por influenza afecta a 120 millones de personas en los EE.UU., Europa y Japón cada año y que en los EE.UU. se estima se producen 75.000 muertes anuales por neumonía provocada por influenza. La neumonía viral primaria o la neumonía derivada de infecciones bacterianas secundarias son las causas primarias de morbilidad asociadas con la infección por influenza.⁶ Las complicaciones tienden a producirse en personas jóvenes, ancianas y en personas que padecen enfermedades cardiopulmonares crónicas.

Las pandemias de influenza A aparecen aproximadamente cada 10 a 30 años mientras que las epidemias anuales suelen ser de cualquiera de influenza A o B; sin embargo, ambos tipos pueden circular simultáneamente. Las infecciones son estacionales, extendiéndose típicamente desde noviembre hasta abril en el hemisferio norte. El período de incubación es de 1 a 3 días con transmisión rápida a través de gotitas aerosolizadas y fómites. La enfermedad se caracteriza por su aparición súbita, fiebre, mialgia, dolor de cabeza y faringitis.

Los virus de influenza A y B se aíslan más comúnmente en cultivos celulares de A549/Mv1Lu mezclas (R-Mix™), A549/MDCK mezclas (R-Mix Too™), células Rhesus MK, células MDCK, células MRC-5 y células A549.⁷

Virus respiratorio sincicial (VRS)

El VRS (familia *Paramyxoviridae*) es un virus encapsulado con un genoma de ARN de hebra simple y polaridad negativa. Las infecciones por VRS producen bronquiolitis y neumonía viral en bebés y el resfriado común en adultos.⁸ El VRS es la causa viral primaria de enfermedad respiratoria de las vías inferiores en bebés y niños de corta edad, registrándose la mortalidad pico por VRS en bebés de 3 a 4 meses. La infección por VRS es normalmente estacional (invierno y principios de primavera) y la epidemia puede durar hasta 5 meses. Presenta dos subtipos principales, A y B: el subtipo B se caracteriza como la cepa asintomática que experimenta la mayoría de la población. La enfermedad clínica más severa involucra cepas del subtipo A con tendencia predominante en la mayoría de los brotes.⁹ Se producen re-infecciones pero tienden a limitarse a infecciones menores del tracto respiratorio superior.¹⁰ El VRS también se considera un problema importante en ciertas poblaciones adultas, incluyendo los ancianos, individuos con enfermedades cardiopulmonares y huéspedes inmunocomprometidos.¹¹

El VRS comúnmente se detecta directamente en células del epitelio nasofaríngeo mediante tinción con reactivos inmunofluorescentes aunque puede aislarse en cultivos celulares de A549/Mv1Lu mezclas (R-Mix), mezclas A549/MDCK (R-Mix Too), células HEp2, células Vero, células LLC-MK2 y células MRC-5.⁷

Metapneumovirus

El metapneumovirus humano (MPVh) es un patógeno respiratorio viral que produce una serie de enfermedades, desde la infección asintomática a la bronquiolitis severa. MPVh fue descrita por primera vez en 2001 por investigadores del Erasmus Medical Center en la Universidad Erasmus en Rotterdam, Países Bajos.¹² Este nuevo virus patógeno humano reconocido fue aislado de muestras respiratorias virales presentado a la cultura durante la temporada de invierno. La mitad de los 28 aislamientos iniciales del MPVh se obtuvieron en

cultivos de muestras de pacientes menores de 1 año y el 96% se aislaron de muestras de niños menores de 6 años. Los estudios de seroprevalencia revelaron que el 25% del total de los niños de 6 a 12 meses a quienes se les hicieron pruebas en el estudio de 2001 tenían anticuerpos detectables del MPVh; para la edad de 5, 100% de los pacientes presentaron indicios de infección pasada. En otro informe originado en Australia¹³ que describe tres casos adicionales de infección por MPVh se sostiene que este virus recientemente descubierto es ubicuo, y es probable que en los próximos años surja información adicional relativa a la patogénesis y epidemiología.¹⁴

El metapneumovirus puede aislarse en cultivos celulares de A549/Mv1Lu mezclas (R-Mix), A549/MDCK mezclas (R-Mix Too), células HEp2, y células A549.⁷

Adenovirus

Los adenovirus (familia *Adenoviridae*) son virus sin encapsulado con ADN de hebra doble. En la actualidad existen 51 serotipos, divididos a su vez en 6 grupos, de A a F. La mayoría de los adenovirus se asocian con infecciones respiratorias y oculares. En general, las infecciones por adenovirus en adultos presentan baja morbilidad con las excepciones de individuos inmunocomprometidos y las que viven en condiciones de hacinamiento en la que puede causar infecciones neumonía atípica. El virus se disemina comúnmente a través de gotitas en aerosol y fómites que infectan las membranas mucosas del ojo, el tracto respiratorio y los intestinos¹⁵. El virus se disemina comúnmente a través de gotitas en aerosol y fómites que infectan las membranas mucosas del ojo, el tracto respiratorio y los intestinos.

Los adenovirus puede aislarse en cultivos células de A549/Mv1Lu mezclas (R-Mix), A549/MDCK mezclas (R-Mix Too), células HEp2, células HEK, células A549 y células MRC-5.⁷

Virus parainfluenza

Los virus parainfluenza (familia *Paramyxoviridae*) son virus encapsulado con un genoma ARN de hebra simple y polaridad negativa. Los cuatro tipos diferentes, de 1 a 4, producen crup y neumonía viral en niños menores de 5 años y enfermedad respiratoria del tracto superior en adultos. La parainfluenza es la segunda causa principal de enfermedad respiratoria del tracto inferior en niños (después del VRS). Los brotes producidos por virus parainfluenza suele ocurrir en años alternados en el otoño (P1 y P2) o a lo largo del año, con mayor actividad en la primavera (P3).¹⁶

Los virus parainfluenza pueden aislarse en cultivos células de A549/Mv1Lu mezclas (R-Mix), A549/MDCK mezclas (R-Mix Too), células Rhesus MK, células MRC-5 y células LLC-MK2. La tripsina es útil en el medio para el recupero de los tipos 1 y 2 pero no del tipo 3.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El kit D³ Ultra 8 DFA (anticuerpo fluorescente directo) Respiratory Virus Screening & Identification Kit de Diagnostic Hybrids, Inc. utiliza anticuerpos monoclonales murinos antígeno-específicos directamente marcados con fluoresceína para la detección e identificación rápida de los virus respiratorios. El kit incluye un DFA Screening Reagent que contiene una mezcla de MAbs murinos dirigidos contra ocho virus respiratorios (virus influenza A, virus influenza B, virus VRS, MPV, adenovirus, virus parainfluenza tipos 1, 2, y 3) más ocho DFA Reagents diferentes, cada uno compuesto de mezclas de MAbs dirigidas contra un solo virus respiratorio. El kit puede usarse para detección de muestra directa o cultivo celular e identificación final del virus.

Las células que se someterán a pruebas, derivadas de una muestra clínica o de cultivo celular, se fijan en acetona. Se añade el DFA Screening Reagent a las células para determinar la presencia de antígenos virales. Tras la incubación entre 35°C y 37°C, las células teñidas se aclaran con la Wash Solution diluida. Se añade una gota del Mounting Fluid suministrado y se coloca un cubreobjetos sobre las células preparadas. Las células se

observan bajo un microscopio de fluorescencia. Las células infectadas por el virus se teñirán con fluorescencia verde-manzana específica viral cuando son teñidas con el DFA Screening Reagent mientras que las células no infectadas no contendrán fluorescencia sino que se teñirán color rojo con la contra-tinción Azul de Evans. Si la muestra contiene células fluorescentes, el virus particular es identificado con los DFA Reagents separados en nuevos preparados celulares separados.

Si en el examen de una muestra directa teñida no se encuentran células teñidas fluorescentes y todas las células tiñen rojo por el Azul de Evans, se recomienda cultivar y teñir la muestra usando el DFA Screening Reagent. Si se observan células fluorescentes, la identificación del virus se determina como se describe más arriba. Las preparaciones celulares se fijan en acetona. Los DFA Reagents individuales se añaden a las preparaciones celulares. Tras la incubación entre 35°C y 37°C, las células teñidas se aclaran con la Wash Solution diluida. Se añade una gota del Mounting Fluid suministrado y se coloca un cubreobjetos sobre las células teñidas. Las células se examinan bajo un microscopio de fluorescencia para detectar la presencia de fluorescencia verde-manzana viral específica. El virus respiratorio desconocido luego se identifica e informa.

REACTIVOS -CONTENIDO DEL KIT

El D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening & ID Kit contiene lo siguiente:

D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening Reagent **10 mL**

(Reactivo de Detección DFA del Virus Respiratorio) Un frasco gotero conteniendo una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos respiratorios virales del virus influenza A, virus influenza B, virus respiratorio sincial, metapneumovirus, adenovirus, y virus parainfluenza tipos 1, 2 y 3. La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como conservante.

Influenza A DFA Reagent **2 mL**

(Reactivo DFA de la Influenza A) Un frasco gotero conteniendo anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos producido por células infectadas por el virus influenza A (cepa Texas 1/77, H3N2). La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como conservante.

Influenza B DFA Reagent **2 mL**

(Reactivo DFA de la Influenza B) Un frasco gotero conteniendo anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos producido por células infectadas por el virus influenza B (Hong Kong 5/72). La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como conservante.

RSV DFA Reagent **2 mL**

(Reactivo DFA del VRS) Un frasco gotero conteniendo anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos producido por células infectadas por el virus respiratorio sincial (cepa Long). La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como conservante.

Metapneumovirus DFA Reagent **2 mL**

(Reactivo DFA del Metapneumovirus) Un frasco gotero conteniendo anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos producido por células infectadas por metapneumovirus. La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como conservante.

Adenovirus DFA Reagent**2 mL**

(Reactivo DFA del Adenovirus) Un frasco gotero conteniendo anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos producido por células infectadas por adenovirus (Cepa tipo 3-GB y cepa tipo 6-amígdala 99). La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como conservante.

Parainfluenza 1 DFA Reagent**2 mL**

(Reactivo DFA de la Parainfluenza 1) Un frasco gotero conteniendo anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos producido por células infectadas por virus parainfluenza tipo 1 (cepa VP-1). La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como conservante.

Parainfluenza 2 DFA Reagent**2 mL**

(Reactivo DFA de la Parainfluenza 2) Un frasco gotero conteniendo anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos producido por células infectadas por virus parainfluenza tipo 2 (cepa Greer). La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como conservante.

Parainfluenza 3 DFA Reagent**2 mL**

(Reactivo DFA de la Parainfluenza 3) Un frasco gotero conteniendo anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos producido por células infectadas por virus parainfluenza tipo 3 (cepa C243). La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como conservante.

Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent**10 mL**

(Reactivo DFA de Gammaglobulina normal de ratón) Un frasco gotero conteniendo una mezcla de gammaglobulina murina que demostró no ser reactiva con ninguno de los virus respiratorios enumerados. La solución acuosa tamponada y estabilizada contiene Azul de Evans como contra-tinción y azida sódica al 0,1% como conservante.

Respiratory Virus Antigen Control Slides**5 portas**

(Portas de control del Antígeno del Virus Respiratorio) Cinco portaobjetos control empacados individualmente conteniendo pocillos con células control positivas y negativas derivadas de cultivo celular. Cada pocillo positiva es identificada en cuanto a las células presentes infectadas por el virus, p.ej., virus influenza A, virus influenza B, virus respiratorio sincicial, adenovirus, virus parainfluenza tipos 1, 2, y 3. El pocillo negativo contiene las células no infectadas. Cada portaobjeto está indicado para una sola tinción.

hMPV Antigen Control Slides**5 portas**

(Portas de control del Antígeno del hMPV) Cinco portaobjetos control empacados individualmente conteniendo pocillos con células control positivas y negativas derivadas de cultivo celular. El pocillo positiva contiene células infectadas por metapneumovirus. El pocillo negativo contiene las células no infectadas. Cada portaobjeto está indicado para una sola tinción.

40X Wash Solution Concentrate**25 mL**

(Solución de lavado Concentrada 40X) Un frasco conteniendo un concentrado de 40X consistente de Tween 20 y 4% de azida sódica (0,1% de azida sódica tras la dilución a 1X utilizando agua desmineralizada) en tampón fosfato salino 40X.

Mounting Fluid**15 mL**

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

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. 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.
2. Cultivo celular para aislamiento de virus respiratorios. Las líneas celulares sugeridas incluyen las células LLC-MK2, HEp-2, A549, R-Mix y R-Mix Too MixedCells™, y las células renales primarias de mono Rhesus, todas las cuales están disponibles en Quidel.
3. Control de virus vivos de la cultura controles positivos: Cepas conocidas de los 8 virus respiratorios para uso en la monitorización de cultivos celulares y procedimientos de tinción. Dichas cepas de virus control pueden obtenerse en Quidel.
4. Cubreobjetos (22 x 50 mm) para Antigen Control Slides y para portaobjetos con la muestra.
5. Universal Transport Medium. Disponible en Quidel.
6. R-Mix Refeed Medium (para usar con R-Mix y R-Mix Too MixedCells) u otro medio de realimentación estándar. Disponible en Quidel.
7. Acetona grado reactivo (>99% pura) refrigerada entre 2°C y 8°C para fijación de portaobjetos con la muestra directa, shell-vials y los preparados de células cultivadas.
NOTA 1: 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.
NOTA 2: 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).
8. Pipetas graduadas estériles: 10 mL, 5 mL, y 1 mL.
9. Pipetas Pasteur estériles u de otra transferencia pipetas.
Precaución: No se debe utilizar solventes como la acetona con pipetas de transferencia de polietileno.
10. Fórceps de punta fina.
11. Estéril filtro de jeringa de 0.45-mL
12. Estéril jeringa de 3-mL
13. Frasco de lavado de 200 mL.
14. Aguja cardadora de punta curva (para retirar el cubreobjetos desde un shell-vial para la parte de tipificación del procedimiento); 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.
15. Solución de hipoclorito de sodio (dilución final de 1:10 de lejía de uso doméstico).
16. Cámara húmeda (p.ej., plato de Petri cubierto con una toalla de papel húmeda colocada en el fondo).
17. Portaobjetos de vidrio para microscopio.
18. Portaobjetos multi-pocillo de vidrio para microscopio limpiado con acetona (portaobjetos enmascarados de 2 y de 8 pocillos).
19. Blotters para los portaobjetos multi-pocillo de vidrio para microscopio: Blotters absorbentes de 2 y 8 pocillos, usados para absorber el exceso de líquido de la máscara e impedir la propagación del líquido o de las células teñidas de un pocillo a otra.
20. Estéril, de nylon flocado o poliéster hisopos, no inhibidor para los virus y los cultivos celulares.
21. Incubador, 35°C a 37°C (5% CO₂ o no CO₂, dependiendo del formato de cultivo celular usado).
22. Centrifuga con rotor de cestillas de movimiento libre.
23. Agua desmineralizada para la dilución de la 40X Wash Solution Concentrate (consultar artículo IV.C.) y de la acetona de grado reactivo para uso en placas multi-pocillo de poliestireno (consultar Nota 2).
24. PBS, estéril para uso en el aclarado y suspensión de células.
25. 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.
26. Recipiente de lavado: Vaso, frasco de lavado o jarra Coplin para el lavado de portaobjetos.
27. Recipiente de fijado: Jarra Coplin, o diapositiva plato titular de polietileno para uso en la fijación de células sobre los portaobjetos.

28. Microscopio de luz invertida con magnificación de 40X a 100X: Utilizarse para analizar las monocapas 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 seguro^{17,18,19} 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.
- Nunca pipetee reactivos o muestras clínicas con la boca; evite todo contacto de las muestras clínicas con piel lastimada.
- Evite salpicaduras y la generación de aerosoles con las muestras clínicas.
- Utilice técnica aséptica y equipos y materiales estériles para todos los procedimientos de cultivo de tejidos.
- La acetona, reactivo requerido para la prueba pero no suministrado en el kit, es un solvente orgánico inflamable y volátil. Úsela en una zona bien ventilada y manténgala alejada de llamas u otras fuentes de ignición.
- 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.
- Los DFA Reagents se suministran en concentración de trabajo. Cualquier dilución de los DFA Reagents reducirá su sensibilidad.
- Los reactivos deben usarse antes de su fecha de caducidad.
- Cada Antigen Control Slide debe usarse una sola vez. No vuelva a usar un Control Slide.
- La contaminación microbiana de los DFA Reagents puede producir una reducción de su sensibilidad.
- Conserve la 1X Wash Solution y el PBS (tampón fosfato salino) en un recipiente limpio para evitar la contaminación.
- El equipo de vidrio reutilizable debe lavarse y aclararse bien para quitarle todos los detergentes.

- No exponga los DFA Reagents 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 LA SOLUCIÓN DE LAVADO 1X

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

INSTRUCCIONES DE CONSERVACIÓN

Tabla 1. Condiciones de Almacenaje de Los Componentes Del Kit

Respiratory Virus DFA Screening Reagent	Almacenar entre 2°C y 8°C en la oscuridad.
Influenza A DFA Reagent	
Influenza B DFA Reagent	
RSV DFA Reagent	
Metapneumovirus DFA Reagent	
Adenovirus DFA Reagent	
Parainfluenza 1 DFA Reagent	
Parainfluenza 2 DFA Reagent	
Parainfluenza 3 DFA Reagent	
Mounting Fluid	
Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent	
Respiratory Virus Antigen Control Slides	Almacenar entre 2°C y 8°C.
hMPV Antigen Control Slides	
40X Wash Solution 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 Wash Solution	Almacenar a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C).

Estabilidad

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

Deseche la 1X Wash Solution 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 los virus respiratorios. 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.²⁰

Recogida De La Muestra²¹

Los aspirados y lavados que contengan secreciones del epitelio nasofaríngeo son las mejores muestras para un análisis directo, ya que contienen un gran número de células epiteliales.

Los aspirados se pueden recoger empleando un tubo estéril de alimentación para bebés de #8 de polietileno blando acoplado a un aparato de aspiración desechable conectado a un dispositivo de succión. Los lavados se pueden recoger inspirando y aspirando 1-2 mL de salina en la fosa nasal del paciente, mientras éste está en posición supina.

Los aspirados y lavados se deben diluir en volúmenes iguales de medio de transporte dentro de un tubo centrífugo, con varias perlas de vidrio estériles. A menudo los hisopos de la nariz, garganta y zonas nasofaríngeas no contienen un número suficiente de células epiteliales en columna que permitan la detección directa de la muestra de los virus respiratorios.

Transporte y almacenamiento de la muestra

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

Las muestras deben transportarse al laboratorio entre 2°C y 8°C. Esta temperatura se puede alcanzar mediante el uso de paquetes de frío, el hielo húmedo, espuma refrigerante, u otros refrigerantes.²² 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 2 días antes de realizar las pruebas. Si se requiere más tiempo de almacenamiento, las muestras deben congelarse a -70°C o menos.

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

PROCEDIMIENTO

Comentarios y Precauciones Preliminares

- Cumpla con los volúmenes y tiempos recomendados en el siguiente procedimiento para asegurar la obtención de resultados exactos.

- Para escobillones para muestra recibidos en medio de transporte con bolas de vidrio, agite vigorosamente con vórtex durante unos 15 segundos para disociar las células adheridas. Para escobillones no recibidos en medio de transporte, transfíralos a un tubo de medio de transferencia conteniendo bolas de vidrio y agite vigorosamente con vórtex durante unos 15 segundos para disociar las células adheridas.
- 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 los DFA Reagents 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. (*CONSULTE LA SECCIÓN ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.*)
- No deje secar las monocapas antes de fijar; esto puede conducir a un alto teñido del fondo y menor sensibilidad.
- No permita que la DFA Reagents 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 la fluorescencia:
 - ▶ La fuente de luz de activación tiene una vida finita y al envejecer, su calidad disminuye, lo que resulta en una intensidad menor de fluorescencia de los DFA Reagents.
 - ▶ 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.
- Varios artefactos fluorescentes pueden observarse en las monocapas celulares:
 - ▶ Detritos celulares, pelusa, etc. pueden absorber no específicamente los DFA Reagents, con el resultado de una fluorescencia de alta intensidad. Los artefactos de tinción no tienen la apariencia de una célula completa y normalmente no parecen estar en el plano de la monocapa.
 - ▶ 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 es atrapado 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 controlada.

- ▶ Fluorescencia no específica producida por la adsorción de DFA Reagents atrapados por la extracción inadecuada de moco de las muestras directas.
- ▶ La fluorescencia atrapada por leucocitos y monocitos puede producirse en muestras directas. Asimismo, los glóbulos rojos en la muestra pueden dejar una bruma verde en la muestra.
- ▶ La fluorescencia de grado bajo debida al lavado insuficiente con DFA Reagents residuales 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.

Preparación de la muestra²¹

Para las recomendaciones sobre procesamiento de muestras, consulte CLSI Approved Viral Culture Guidelines.²⁰

1. Agite con vórtex vigorosamente la muestra durante 10 a 15 segundos.
2. Centrifugue a 400 a 600xg durante 5 a 10 minutos.
3. Recoja y aparte el sobrenadante para el aislamiento viral. (Lea el paso VI.D.10 más abajo.)
4. Añada 5 mL de PBS y agite vigorosamente con vórtex durante 10 a 15 segundos.
5. Centrifugue a 400 a 600xg durante 5 a 10 minutos.
6. Extraiga el sobrenadante y la capa de moco arriba del pellet celular, cuidando de no perturbarlo.
7. Repita los pasos 4 a 6 hasta que haya removido completamente la capa de moco.

NOTA: Es importante quitar todo el moco porque puede producir fluorescencia no específica.
8. Añada 0,5 a 1 mL de PBS.
9. Mezcle la suspensión pipeteando hacia arriba y hacia abajo para volver a suspender el pellet celular, formando una suspensión ligeramente turbia. Esta suspensión celular se utilizará para la Prueba directa de la muestra (Lea la Sección más abajo)

NOTA: La calidad de la preparación del portaobjetos es dependiente de la concentración de células en la suspensión; demasiadas células dificultan la lectura del resultado y demasiado pocas reducen la sensibilidad del procedimiento. Las muestras también pueden centrifugarse si lo que se prefiere es una monocapa.
10. Para uso en Prueba de cultivo celular (TUBE CULTURE, SHELL-VIAL AND MULTI-WELL PLATE), añada el sobrenadante que se reservó en el Paso 3, anterior, a la suspensión celular que queda después de la Prueba directa de la muestra. Añada unas pocas bolas de vidrio estériles al tubo y agite con vórtex durante unos 15 segundos para romper las células y liberar cualquier virus. Repita este paso con cada muestra.

Prueba Directa de la Muestra

- ▶ Coloque (spot) 25 µl de la suspensión celular preparada²³ en 2 pocillos de un portaobjetos de 2 pocillos y en las 8 pocillos de uno de 8 pocillos. Repita este paso con cada muestra.
- ▶ Deje secar completamente los pocillos al aire.
- ▶ Fije las células a los portaobjetos usando frescos, refrigerados 100% acetona durante 5 a 10 minutos entre 20°C y 25°C.

Precaución: La acetona es volátil e inflamable; manténgala alejada de las llamas.
- ▶ Retire los portaobjetos del fijativo y déjelos secar al aire.
- ▶ Añada una gota del DFA Screening Reagent para cubrir completamente las células secas y fijadas en un pocillo de cada uno de los portaobjetos de 2 pocillos.
- ▶ Además, a cada una de los pocillos de un fresco Respiratory Virus Antigen Control Slide (Porta de control del Antígeno del Virus Respiratorio) y un fresco hMPV Antigen Control Slide (Porta de control del Antígeno del hMPV) añada una gota del DFA Screening Reagent. Los Antigen Control Slides deben teñirse solamente una vez, ya que contiene pocillos individuales de células virales infectadas y no infectadas.

- ▶ Añada una gota del Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent para cubrir completamente las células secas y fijadas en el otro pocillo de cada uno de los portaobjetos de 2 pocillos.
- ▶ Coloque los portaobjetos en una cámara cubierta y humidificado, entre 35°C y 37°C durante 15 a 30 minutos.
- ▶ Enjuague las células teñidas con 1X Wash Solution. Para sólo unos pocos portaobjetos, esto puede hacerse con un vaso de 1X Wash Solution. Para muchos portaobjetos, una placa portaobjetos con capacidad para 10 a 20 portaobjetos puede colocarse en su recipiente de 1X Wash Solution. Para un enjuague efectivo, hunda y levante el(los) portaobjetos como mínimo cuatro veces.
- ▶ Deseche el lavado utilizado y repita el paso de lavado con nueva 1X Wash Solution.
- ▶ Enjuague las células teñidas con agua desmineralizada. Para sólo unos pocos portaobjetos, esto puede hacerse con un vaso de agua desmineralizada. Para muchos portaobjetos, una placa portaobjetos con capacidad para 10 a 20 portaobjetos puede colocarse en su recipiente de con agua desmineralizada. Para un enjuague efectivo, hunda y levante el(los) portaobjetos como mínimo cuatro veces.
- ▶ Absorba suavemente el exceso de agua desmineralizada.
- ▶ Añada una gotita de Mounting Fluid a cada pocillo con células y cubra los pocillos con el cubreobjetos.
- ▶ Examine las células teñidas y montadas usando un microscopio de fluorescencia con aumentos de entre 200X y 400X. (*MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA*).
- ▶ Consulte la Sección, *INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS*.
- ▶ Si el resultado es positivo para el virus respiratorio, el procedimiento de tinción puede repetirse usando los portaobjetos con muestras reservados de 8 pocillos para identificar qué virus respiratorio puede estar presente.
 - ▶ Añada una gota de cada DFA Reagent de virus individual a su correspondiente pocillo en el portaobjetos con las muestras de 8 pocillos. Añada el Metapneumovirus DFA Reagent al pocillo rotulado 'Neg'.
 - ▶ Para el Respiratory Virus Antigen Control Slide, añada una gota de cada DFA Reagent de virus individual a su correspondiente pocillo rotulada.
 - ▶ Para el hMPV Antigen Control Slide añada una gota del Metapneumovirus DFA Reagent a cada pocillo.
NOTA: Tiña los Antigen Control Slides una sola vez. No vuelva a teñirlos.
 - ▶ Continúe con los pasos 8 a 15, anteriores.

Prueba de Cultivo Celular – Cultivo en Tubo

1. Examine la correcta morfología de las monocapas antes de la inoculación.
2. aspire el medio de mantenimiento de las monocapas y añada 0,2 a 0,4 mL de cada muestra preparada a cada una de las líneas celulares utilizadas por el cultivo del virus respiratorio.
3. Coloque los tubos a un ángulo suficiente para cubrir las monocapas con el inóculo y permitir que la adsorción del virus se produzca durante 1 hora entre 35°C y 37°C.
4. Tras la adsorción, añada 2 mL del medio de realimentación apropiado.
5. Incube los tubos entre 35°C y 37°C en un tambor a rodillo entre 1 y 3 rpm. Examine las monocapas diariamente para detectar indicios de toxicidad o CPE (efectos citopáticos) virales o hacer la prueba de hemadsorción.
6. Cuando las monocapas están lista para la tinción, extraiga el medio por aspiración y enjuague ligeramente la monocapa dos veces con 1 a 2 mL de PBS.
7. Añada 0,5 mL de PBS al tubo y prepare una suspensión de las células raspando la monocapa con una pipeta y rompiendo los agregados celulares por pipeteando la PBS arriba y hacia abajo, varias veces.
8. Prepare puntos (spots) celulares usando unos 25 µl de la suspensión en cada pocillo de un portaobjetos de 2 pocillos y uno de 8 pocillos. Repita este paso con cada muestra.
9. Deje secar completamente los pocillos al aire.
10. Fije las células a los portaobjetos con frescos, refrigerados 100% acetona. Deje reposar de 5 a 10 minutos, entre 20°C y 25°C.

Precaución: La acetona es volátil e inflamable; manténgala alejada de las llamas.

11. Retire los portaobjetos del fijativo y déjelos secar al aire.
12. Añada una gota del DFA Screening Reagent para cubrir completamente las células secas y fijadas en un pocillo de cada uno de los portaobjetos de 2 pocillos.
13. Además, a cada una de los pocillos de un fresco Respiratory Virus Antigen Control Slide, añada una gota del DFA Screening Reagent. Un Antigen Control Slide debe teñirse solamente una vez, ya que contiene pocillos individuales de células virales infectadas y no infectadas.
14. Coloque los portaobjetos en una cámara cubierta entre 35°C y 37°C durante 15 a 30 minutos.
15. Enjuague las células teñidas con 1X Wash Solution. Para sólo unos pocos portaobjetos, esto puede hacerse con un vaso de 1X Wash Solution. Para muchos portaobjetos, una placa portaobjetos con capacidad para 10 a 20 portaobjetos puede colocarse en su recipiente de 1X Wash Solution. Para un enjuague efectivo, hunda y levante el(los) portaobjetos como mínimo cuatro veces.
16. Deseche el lavado utilizado y repita el paso de lavado con nueva 1X Wash Solution.
17. Enjuague las células teñidas con agua desmineralizada. Para sólo unos pocos portaobjetos, esto puede hacerse con un vaso de agua desmineralizada. Para muchos portaobjetos, una placa portaobjetos con capacidad para 10 a 20 portaobjetos puede colocarse en su recipiente de con agua desmineralizada. Para un enjuague efectivo, hunda y levante el (los) portaobjetos como mínimo cuatro veces.
18. Extraiga el agua desmineralizada por aspiración.
19. Absorba suavemente el exceso de líquido.
20. Añada una gotita de Mounting Fluid a cada pocillo con células y cubra los pocillos con el cubreobjetos.
21. Examine las células teñidas y montadas usando un microscopio de fluorescencia con aumentos de entre 200X y 400X. (Consulte la Sección '*Microscopía de Inmunofluorescencia*').
22. Consulte la Sección *INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS*.
23. Si el resultado es positivo para el virus respiratorio, el procedimiento de tinción puede repetirse usando los portaobjetos con muestras reservados de 8 pocillos para identificar qué virus respiratorio puede estar presente.
 - ▶ Añada una gota de cada DFA Reagent de virus individual a su correspondiente pocillo en el portaobjetos con las muestras de 8 pocillos. Añada el Metapneumovirus DFA Reagent al pocillo rotulada 'Neg'.
 - ▶ Para el Respiratory Virus Antigen Control Slide, añada una gota de cada DFA Reagent de virus individual a su correspondiente pocillo rotulada.
 - ▶ Para el hMPV Antigen Control Slide añada una gota del Metapneumovirus DFA Reagent a cada pocillo. **NOTA:** Tiña los Antigen Control Slides una sola vez. No vuelva a teñirlos.
 - ▶ Continúe con los pasos 14 a 21, anteriores.

Prueba de cultivo celular – Shell-vial

1. Calcule el número de shell-vials necesarias para el protocolo de tinción a utilizar (este protocolo de tinción requiere 3 shell-vials):
 - ▶ Un shell-vial que se requiere para cada día la cultura se proyectarán con el DFA Screening Reagent (p.ej., una tinción a las 16 a 24 horas, y nuevamente a las 48 a 72 horas, requiere 2 shell-vials).
 - ▶ Se requiere una shell-vial adicional a para preparar portaobjetos de 8 pocillos utilizados para identificar los virus de los cribados (screens) positivos.
2. Examine la correcta morfología de las monocapas antes de la inoculación.
3. Aspire el medio de mantenimiento de las monocapas y añada 1 mL del medio de realimentación apropiado a cada shell-vial.
4. Añada 0,2 a 0,4 mL de la muestra preparada a cada shell-vial.
5. Centrifugue las shell-vials a 700xg durante 1 hora de 20°C a 25°C.
6. Coloque los shell-vials con tapón en un incubador entre 35°C y 37°C.
7. Cuando una monocapa esté lista para la tinción usando el DFA Screening Reagent, retire el medio y añada 1 mL de PBS.
8. Mezclar por rotación y luego aspire.

9. Repita este lavado con 1 mL adicional de PBS y luego aspire.
10. Añada 1 mL de frescos, refrigerados 100% acetona y deje reposar de 5 a 10 minutos entre 20°C y 25°C.
Precaución: La acetona es volátil e inflamable; manténgala alejada de las llamas.
11. Extraiga el fijativo por aspiración.
12. Añada 0,5 mL del PBS para humedecer la monocapa.
13. Mezclar por rotación y luego aspire completamente.
14. Añada 4 gotas del DFA Screening Reagent a las monocapas fijadas de las muestras del paciente y de control, y incline a un lado y a otro para **asegurar una cobertura completa** de la monocapa por el Reagent.
15. Coloque los shell-vials con tapón en un incubador entre 35°C y 37°C durante 15 a 30 minutos.
16. Aspire el DFA Screening Reagent de las monocapas.
17. Añada 1 mL de 1X Wash Solution.
18. Retire la 1X Wash Solution por aspiración, repita el paso de lavado y vuelva a retirar por aspiración.
19. Añada 1 mL de agua desmineralizada.
20. Extraiga el agua desmineralizada por aspiración.
21. Levante el cubreobjetos desde el fondo del shell-vial con una aguja de punta curva en un tambor de jeringa. Tomándolo con un fórceps de punta fina, transfíralo, con la monocapa hacia abajo, a una gotita de Mounting Fluid en un portaobjetos de microscopio estándar.
22. Examine las monocapas teñidas usando un microscopio de fluorescencia con aumentos de entre 200X y 400X. (Consulte la Sección *MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA*).
23. Consulte la Sección *INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS*.
24. Si el resultado es positivo para el virus respiratorio, procese un cultivo replicado reservado como una suspensión celular y colóquelo (spot) en un portaobjetos con las muestras de 8 pocillos a fin de identificar qué virus respiratorio puede estar presente (consulte la Sección *Prueba de Cultivo Celular – Cultivo en Tubo*, pasos 6 a 11, para el procedimiento de preparación de un portaobjetos con la muestra), luego:
 - ▶ Añada una gota de cada DFA Reagent de virus individual a su correspondiente pocillo en el portaobjetos con las muestras de 8 pocillos. Añada el Metapneumovirus DFA Reagent a la pocillo rotulada 'Neg'.
 - ▶ Para el Respiratory Virus Antigen Control Slide, añada una gota de cada DFA Reagent de virus individual a su correspondiente pocillo rotulada.
 - ▶ Para el hMPV Antigen Control Slide añada una gota del Metapneumovirus DFA Reagent a cada pocillo.
NOTA: Tiña los Antigen Control Slides una sola vez. No vuelva a teñirlos.
 - ▶ Continúe con *Prueba de Cultivo Celular – Cultivo en Tubo*, los pasos 14 a 21, anteriores.

Prueba de Cultivo Celular – Placa multi-pocillos

1. Calcule el número de pocillos necesarias para el protocolo de tinción a utilizar (este protocolo de tinción requiere 3 pocillos):
 - ▶ Un pocillo que se requiere para cada día la cultura se proyectarán con el DFA Screening Reagent (p.ej., una tinción a las 16 a 24 horas, y nuevamente a las 48 a 72 horas, requiere 2 pocillos).
 - ▶ Se requiere una pocillo adicional apara preparar portaobjetos de 8 pocillos utilizados para identificar los virus de los cribados (screens) positivos.
 - ▶ Se recomienda que cada pocillo replicado esté en una placa multi-pocillos diferente. Esto permite que cada placa sea procesada en el día apropiado.
2. Examine la correcta morfología de las monocapas antes de la inoculación.
3. 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.
4. Añada 0,2 a 0,4 mL de la muestra preparada al pocillo que corresponde de una placa multi-pocillos.
5. Centrifugue las placas multi-pocillos a 700xg durante 1 hora de 20°C a 25°C.
6. Coloque las placas multi-pocillos tapadas en un incubador entre 35°C y 37°C con una atmósfera humidificada, de CO₂ al 5%.

7. Cuando una monocapa esté lista para la tinción usando el DFA Screening Reagent, retire el medio por aspiración y añada 1 mL de PBS.
8. Mezclar por rotación y luego aspire.
9. Repita este lavado con 1 mL adicional de PBS y luego aspire.
10. 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.
11. Extraiga el fijativo por aspiración.
12. Añada 0,5 mL del PBS para humedecer la monocapa.
13. Mezclar por rotación y luego aspire completamente.
14. Añada 4 gotas del DFA Screening Reagent a las monocapas fijadas de las muestras del paciente y de control en cada monocapa de la placa multi-pocillos de 24 pocillos, añada 3 gotas del DFA Screening Reagent a las monocapas fijadas de las muestras del paciente y de control en cada monocapa de la placa de 48 pocillos. Incline a un lado y a otro para **asegurar una cobertura completa** de la monocapa por el Reagent.
15. Coloque la placa multi-pocillos tapada en un incubador humidificado entre 35°C y 37°C durante 15 a 30 minutos.
16. Aspire el DFA Screening Reagent de las monocapas.
17. Añada 1 mL de 1X Wash Solution para lavar y mezclar.
18. Retire la 1X Wash Solution por aspiración, repita el paso de lavado y vuelva a retirar por aspiración.
19. Añada 1 mL de agua desmineralizada.
20. Extraiga el agua desmineralizada por aspiración.
21. Añada 2 a 3 gotas de Mounting Fluid a cada monocapa, luego tape la placa.
22. Examine las monocapas teñidas usando un microscopio de fluorescencia con aumentos de entre 200X y 400X. (Consulte la Sección *MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA*).
23. Consulte la Sección *INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS*.
24. Si el resultado es positivo para el virus respiratorio, procese un cultivo replicado reservado como una suspensión celular y colóquelo (spot) en un portaobjetos con las muestras de 8 pocillos a fin de identificar qué virus respiratorio puede estar presente (consulte la Sección pasos 6 a 11, para el procedimiento de preparación de un portaobjetos con la muestra), luego:
 - ▶ Añada una gota de cada DFA Reagent de virus individual a su correspondiente pocillo en el portaobjetos con las muestras de 8 pocillos. Añada el Metapneumovirus DFA Reagent a la pocillo rotulada 'Neg'.
 - ▶ Para el Respiratory Virus Antigen Control Slide, añada una gota de cada DFA Reagent de virus individual a su correspondiente pocillo rotulada.
 - ▶ Para el hMPV Antigen Control Slide añada una gota del Metapneumovirus DFA Reagent a cada pocillo.
NOTA: Tiña los Antigen Control Slides una sola vez. No vuelva a teñirlos.
 - ▶ Continúe con *Prueba de Cultivo Celular – Cultivo en Tubo*, los pasos 14 a 21, anteriores.

CONTROL DE CALIDAD

Reactivos

- Un fresco Respiratory Virus Antigen Control Slide y un fresco hMPV Antigen Control Slide deben teñirse cada vez que se realiza el procedimiento de tinción para asegurar el correcto rendimiento de la prueba.
- Los pocillos positivos mostrarán múltiples células infectadas de fluorescencia verde manzana brillante 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 la fluorescencia apropiada a los resultados de las muestras. Los Antigen Control Slides también puede ayudar a interpretar las muestras de los pacientes.

- El Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent se utiliza para excluir aquellos casos raros en que hay presencia de células de pacientes que específicamente no obligar la porción Fc de la gammaglobulina de ratón en muestras directas, lo que podría conducir a un resultado falso positivo.

Cultivo Celular

- 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 virus inoculado deben incluirse cada vez que se use un nuevo lote de cultivo celular.
- Las no células infectadas monocapa de cada lote debe teñirán para que sirva como control negativo. Las condiciones adversas de conservación o los procedimientos de manipulación también se reflejarán en el control negativo.
- Si los cultivos de control no tienen un rendimiento correcto, los resultados se consideran no válidos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Examen de las Muestras y los Controles

- Examine primero los controles para asegurar el correcto rendimiento de la prueba antes de examinar las muestras de los pacientes.
- Una reacción positiva 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.

Patrón de Tinción Fluorescente de las Células Infectadas por virus Respiratorios

A continuación se describen los patrones fluorescentes típicos que deben usarse como guía para identificar virus específicos. Advierta que la identificación viral específica requiere la demostración de la tinción característica de MAb.

El patrón "típico" de tinción de fluorescencia verde manzana para cada virus es el siguiente:

- **Virus influenza, tipos A y B:** La fluorescencia es citoplásmica, nuclear o ambas. La tinción citoplásmica suele ser punteada con grandes inclusiones mientras que la nuclear tiene un brillo uniforme.
- **Virus respiratorio sincicial:** La fluorescencia es citoplásmica y punteada con pequeñas inclusiones en la sincicia.
- **Adenovirus:** La fluorescencia es citoplásmica y punteada o nuclear brillante o ambas.
- **Virus parainfluenza 1, 2, y 3:** La fluorescencia es citoplásmica y punteada con inclusiones irregulares. Los tipos 2 y 3 producen la formación de sincicia.
- **Metapneumovirus:** La fluorescencia es citoplásmica y punteada con pequeñas inclusiones en la sincicia.

En una serie de estudios se ha reportado coinfección con más de un virus presente en la muestra. La presencia de múltiples virus se indica cuando más de una pocillo del portaobjetos de 8 tiene células fluorescentes. La identificación de los virus se basa en los DFA Reagents del virus individual que muestra fluorescencia. En ese caso, debe reportarse como "... y... detectado por prueba directa de la muestra". o "... y ... aislado mediante cultivo celular".

RESULTADOS DE LA PRUEBA DIRECTA DE LA MUESTRA

Evaluación de la Adecuación de la Muestra

- **Cada muestra de paciente teñida** debe ser revisada para detectar la presencia de células epiteliales columnares (células más altas que anchas). La calidad de la muestra con respecto al número de células epiteliales en la muestra puede evaluarse mediante el examen de diferentes campos usando un aumento de 200X.
- **Una muestra satisfactoria** debe tener al menos 2 células epiteliales columnares por campo. Un resultado negativo se indica por la ausencia de fluorescencia en una muestra mínima de 20 células epiteliales columnares.
- **Una muestra inadecuada** se indica por menos de 20 células epiteliales columnares presentes en la muestra, en cuyo caso, la prueba se considera como no válida. Debe obtener y realizar la prueba de una nueva muestra o iniciar un cultivo celular para el aislamiento viral con la muestra restante.

Informe de los Resultados de la Tinción de una Muestra Directa

- La totalidad del punto (spot) celular debe examinarse para detectar células fluorescentes verde manzana infectadas por virus.
- Una muestra satisfactoria con **células no fluorescentes observadas** debe informarse como "No se detectaron por prueba directa de la muestra antígenos virales de influenza A, influenza B, virus respiratorio sincicial, metapneumovirus, adenovirus, virus parainfluenza tipo 1, parainfluenza tipo 2, o parainfluenza tipo 3 ". Sin embargo, dichos resultados negativos deben confirmarse con cultivo celular.
- Las muestras negativas por prueba directa de la muestra pero con resultados de cultivo positivos deben reportarse como "...aislados por cultivo celular", donde '...' es el virus apropiado, p.ej., influenza A, influenza B, metapneumovirus, adenovirus, virus respiratorio sincicial, virus parainfluenza tipo 1, 2, o 3 (consultar Sección '*Resultados del Aislamiento / Confirmación del Cultivo*', más abajo).
- Si se encuentran células fluorescentes verde manzana, la identificación del (de los) virus puede basarse en los DFA Reagents individuales. El DFA Reagent del virus individual que arroja células fluorescentes representa la identificación del virus respiratorio. En ese caso, debe reportarse como "... detectado por prueba directa de la muestra", donde '...' es el virus correcto, p.ej., influenza A, influenza B, metapneumovirus, adenovirus, virus respiratorio sincicial, virus parainfluenza tipo 1, 2, o 3.

RESULTADOS DEL AISLAMIENTO/CONFIRMACIÓN DEL CULTIVO

- La totalidad del punto (spot) celular o monocapa de células debe examinarse para detectar células fluorescentes verde manzana infectada por virus. Si **no se encuentran células fluorescentes**, los resultados deben reportarse como, "No se aislaron virus influenza A, influenza B, virus respiratorio sincicial, metapneumovirus, adenovirus, virus parainfluenza tipo 1, parainfluenza tipo 2, o parainfluenza tipo 3 en cultivo celular".
- Si se encuentran células fluorescentes verde manzana, la identificación del (de los) virus puede basarse en los DFA Reagents individuales (de acuerdo con la *PROCEDIMIENTO*). En tales casos, la identificación del (de los) antígeno(s) viral(es) debe reportarse como "___ aislado en cultivo celular", donde '___' es el virus correcto, p.ej., virus influenza A, virus influenza B, virus respiratorio sincicial, metapneumovirus, adenovirus, virus parainfluenza tipo 1, virus parainfluenza tipo 2, o virus parainfluenza tipo 3.

LÍMITES DEL PROCEDIMIENTO

- La recogida, conservación y transporte inapropiados de muestras puede producir resultados falsos negativos en el cultivo.²⁴
- No se han establecido las características de rendimiento del ensayo para la tinción de muestra directa en muestras distintas de las respiratorias. Es responsabilidad del usuario establecer el rendimiento del ensayo en el caso de muestras que no sean respiratorias.
- Los tiempos de incubación o las temperaturas distintas de las citadas en las instrucciones para la prueba puede dar resultados erróneos.
- La detección de virus variará enormemente dependiendo de la calidad de la muestra y de la manipulación subsiguiente. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección viral. 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.
- Los anticuerpos monoclonales utilizados en este kit provienen de hibridomas creadas utilizando células infectadas virales como inmunógeno. Los antígenos virales específicos detectados por los anticuerpos son indeterminados.
- 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.
- Los anticuerpos monoclonales usados en este kit no son específicos del grupo y en consecuencia no pueden usarse para diferenciar distintos tipos de adenovirus y VRS.
- Los antígenos virales detectados en algunas muestras directas pueden provenir de virus no viables y no pueden aislarse por cultivo. Esto se aplica particularmente a VRS conocido por su inestabilidad y pérdida de viabilidad.
- Una muestra **directa** negativa debe inocularse en un cultivo celular apropiado e incubarse para aislar e identificar cualquier virus respiratorio que pueda estar presente en la muestra.
- Un resultado negativo de una muestra directa o cultivada no descarta la presencia de virus.
- El rendimiento del kit únicamente puede asegurarse cuando los componentes usados en el ensayo son los suministrados por Quidel.
- La conservación prolongada de los DFA Reagents 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* aparece como pequeños (~1 diámetro micrón) puntos brillantes. Los resultados de los cultivos celulares con contaminación bacteriana deben interpretarse, por lo tanto, con precaución.

VALORES ESPERADOS

Las infecciones virales respiratorias suelen ser estacionales, donde el virus influenza típicamente se extiende desde noviembre a abril en el hemisferio norte y las infecciones por adenovirus se producen más frecuentemente desde fines del invierno hasta principios del verano. El VRS normalmente también es una infección estacional (de invierno y principios de primavera), con epidemias que duran hasta cinco meses, mientras que los brotes debidos a los virus parainfluenza pueden producirse durante todo el año.

Los estudios clínicos descritos en la Sección ('*Características de Rendimiento Específicas*') se basan en muestras respiratorias recogidas durante los meses del invierno a principios de la primavera de 2007/2008. La Tabla 2 siguiente presenta la prevalencia de los virus respiratorios dentro de la población de muestras recogidas prospectivamente y las células probadas directamente.

Tabla 2. Prevalencia de los Virus Respiratorios Entre la Población en Estudio

Valores previstos	Adeno	Flu A	Flu B	Para 1	Para 2	Para 3	RSV	MPV
Muestras directas (n = 516)	23	71	5	4	1	4	74	12
Predominio	4.5%	13.8%	1.0%	0.8%	0.2%	0.8%	14.3%	2.3%

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO ESPECÍFICAS

Características Clínicas De Funcionamiento

Sitio de Estudio

El estudio consistió en un total de 300 muestras frescas entregadas entre enero y febrero de 2007 al laboratorio para pruebas de virus respiratorios. Los portaobjetos fueron preparados con células lavadas con PBS provenientes de las muestras frescas y fijadas según el procedimiento que se describe en el encarte del producto Comparador (el mismo procedimiento para tanto el Sujeto y el dispositivo Comparador).

Los portaobjetos fueron conservados a -70°C hasta que se realizó la prueba. La preparación de los portaobjetos con las muestras, la fijación en acetona y el congelamiento es una práctica común de laboratorio para realizar la prueba en un momento posterior. Con la fijación en acetona, antes del congelamiento, la morfología celular se mantiene durante el congelamiento y el descongelamiento. La Tabla 3 muestra la distribución de edad de los individuos estudiados en el Sitio 1.

Tabla 3. Sitio 1 – Edad Distribución

Edad	Distribución
0 - 1 m	7
>1 m - 2 a	130
>2 - 12 a	49
>12 - 21 a	16
22 - 30 a	13
31 - 40 a	13
41 - 50 a	20
51 - 60 a	11
61 - 70 a	8
71 - 80 a	9
81 - 90 a	19
91 - 100 a	4
No se información	1
Suma	300

Las tablas siguientes detallan los resultados del Sitio 1:

La Tabla 4 compara los resultados del D³ Ultra 8 Screening Reagent (D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening Reagent) con los del D³ Ultra Screening Reagent (D³ Ultra DFA Respiratory Virus Screening Reagent) para la detección de siete virus respiratorios identificados por el D³ Ultra Screening Reagent en células derivadas de una muestra.

La Tabla 5 compara el D³ Ultra 8 Screening Reagent con los resultados del D³ Metapneumovirus DFA Reagent para la detección de metapneumovirus en células derivadas de una muestra.

Tabla 4. Sitio 1 – Comparativa del D³ Ultra 8 y el D³ Ultra para la Detección de los 7 Virus Respiratorios

Muestras directas (300 Muestras)		D ³ Ultra Screening Reagent	
		Pos	Neg
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	101	0
	Neg	0	199
Coincidencia de porcentaje positivo (CPP) ^a		100% (101/101)	
95% CI ^b - CPP		96.3, 100%	
Coincidencia de porcentaje negativo (CPN) ^c		100% (199/199)	
95% CI- CPN		98.1, 100%	

a "En la Coincidencia de Porcentaje positivo" o CPP, los valores se calcularon {[el Número total de resultados Positivos en coincidencia con las Dispositivos 'Sujeto' y 'Comparator'] divididos entre {[el Número total de resultados Positivos en coincidencia con las Dispositivos 'Sujeto' y 'Comparator'] más el {[el Número de Resultados Positivos por 'Comparator', pero Negativo por el Sujeto]}} multiplicado por 100%.

b "95% CI" se refiere al 95% de los Intervalos de Confianza, que se calcularon de acuerdo a la Prueba Exacta (Clopper, C. y S. Pearson, Biometrika 26: 404-413, 1934).

c En la Coincidencia de Porcentaje Negativo" o CPN, los valores se calcularon {[el Número total de resultados Negativos en coincidencia con las Dispositivos 'Sujeto' y 'Comparator'] divididos entre {[el Número total de resultados Negativos en coincidencia con las Dispositivos 'Sujeto' y 'Comparator'] más el {[Número de Resultados Negativos por 'Comparator', pero Positivo por el Sujeto]}} multiplicado por 100%.

Tabla 5. Sitio 1 – D³ Ultra 8 Identificación de especímenes positivos de MPV

Muestras directas (300 Muestras)		D ³ Metapneumovirus DFA Reagent	
		Pos	Neg
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	5	0
	Neg	0	295
Coincidencia de porcentaje positivo (CPP)		100% (5/5)	
95% CI- CPP		56.6, 100%	
Coincidencia de porcentaje negativo (CPN)		100% (295/295)	
95% CI- CPN		97.1, 100%	

Conclusión del Estudio del Sitio 1

Se detectó una variedad de patógenos respiratorios virales: virus respiratorio sincicial [prevalencia 15% (45/300)], virus influenza A [prevalencia 9% (27/300)], virus influenza B [prevalencia 0,3% (1/300)], metapneumovirus [prevalencia 1,7% (5/300)], adenovirus [prevalencia 7% (21/300)], virus parainfluenza tipo 1 [prevalencia 1% (3/300)] y virus parainfluenza tipo 3 [prevalencia 1,3% (4/300)]. No se detectaron co-infecciones.

La capacidad del D³ Ultra 8 para identificar siete virus en muestras directas se comparó con la del D³ Ultra. El porcentaje de concordancia positiva fue de 100% (95% CI rango de 96,3% a 100%). El porcentaje de concordancia negativa fue de 100% (95% CI rango de 98,1% a 100%). La capacidad del D³ Ultra 8 para identificar metapneumovirus en muestras directas se comparó con la del D³ Metapneumovirus DFA Reagent. El porcentaje de concordancia positiva fue de 100% (95% CI rango de 56,6% a 100%). El porcentaje de concordancia negativa fue de 100% (95% CI rango de 97,1% a 100%).

Para el Sitio 1, los resultados de rendimiento del D³ Ultra 8, comparados con los de los dispositivos Comparador, D³ Ultra y D³ Metapneumovirus DFA Reagent, demuestran que los dispositivos detectan antígenos de virus respiratorios de manera similar y que el añadido de MAb's contra metapneumovirus no impacta adversamente a los demás MAb's para la detección de los demás virus respiratorios encontrados (p.ej.,

virus influenza A, virus influenza B, virus respiratorio sincial, adenovirus y virus parainfluenza tipos 1 y 3). No se observó incremento en fondo con el D³ Ultra 8.

Estudio del Sitio 2

Doscientas sesenta y ocho (268) muestras se procesaron para la prueba directa de la muestra según el procedimiento del encarte del producto D³ Ultra (el mismo procedimiento para tanto el Sujeto y los dispositivos Comparador). Las primeras cuarenta y ocho muestras no se incluyeron en el análisis debido a un tema de procesamiento; las células no se enjuagan suficientemente y no quedaron fijadas en el portaobjetos. Se añadió un paso de enjuague adicional al procedimiento para las 220 muestras restantes; las células quedaron fijadas a los portaobjetos. De estas 220 muestras, 4 tuvieron células insuficientes (<20) presentes para interpretar. Quedó un total de 216 muestras para análisis final.

Doscientas sesenta y ocho (268) muestras se procesaron para pruebas de cultivo celular según el procedimiento del encarte del producto D³ Ultra (el mismo procedimiento para tanto el Sujeto y los dispositivos Comparador). Las muestras fueron procesadas para cultivo celular utilizando R-Mix Too FreshCells en placas de 48/24 multi-pocillos. Trece (13) muestras fueron tóxicas y 1 se contaminó en el cultivo celular. Quedó un total de 252 muestras para análisis final.

La Tabla 6 muestra la distribución de edad de los individuos estudiados en el Sitio 2.

Tabla 6. Sitio 2 – Edad Distribución

Edad	Distribución
0 - 1 m	2
>1 m - 2 a	78
>2 - 12 a	38
>12 - 21 a	35
22 - 30 a	39
31 - 40 a	19
41 - 50 a	19
51 - 60 a	11
61 - 70 a	12
71 - 80 a	7
81 - 90 a	5
>90 a	1
No se información	2
Suma	268

Las tablas siguientes detallan los resultados de la prueba directa de la muestra del Sitio 2:

La Tabla 7 compara los resultados del D³ Ultra 8 Screening Reagent con los del D³ Ultra Screening Reagent para la detección de siete virus respiratorios identificados por el D³ Ultra Screening Reagent en células derivadas de una muestra.

La Tabla 8 compara el D³ Ultra 8 Screening Reagent con los resultados del D³ Metapneumovirus DFA Reagent para la detección de metapneumovirus en células derivadas de una muestra.

Tabla 7. Sitio 2 – Comparación del D³ Ultra 8 y del D³ Ultra para la Detección de 7 Virus Respiratorios

Muestras directas (216 Muestras)		D ³ Ultra Screening Reagent*	
		Pos	Neg
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	80	0
	Neg	0	136
Coincidencia de porcentaje positivo (CPP)		100% (80/80)	
95% CI- CPP		95.4, 100%	
Coincidencia de porcentaje negativo (CPN)		100% (136/136)	
95% CI- CPN		97.3, 100%	
*R-PE y FITC positivos combinados			

Tabla 8. Sitio 2 – D³ Ultra 8 Identificación de Especímenes Positivos de Metapneumovirus

Muestras directas (216 Muestras)		D ³ Metapneumovirus DFA Reagent	
		Pos	Neg
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	7	0
	Neg	0	209
Coincidencia de porcentaje positivo (CPP)		100% (7/7)	
95% CI- CPP		64.6, 100%	
Coincidencia de porcentaje negativo (CPN)		100% (209/209)	
95% CI- CPN		98.2, 100%	

Conclusión del Estudio de muestra directa del Sitio 2

Se detectó una variedad de patógenos respiratorios virales: virus respiratorio sincicial [prevalencia 13,4% (29/216)], virus influenza A [prevalencia 20,4% (44/216)], virus influenza B [prevalencia 1,9% (4/216)], metapneumovirus [prevalencia 3,2% (7/216)], adenovirus [prevalencia 0,9% (2/216)], virus parainfluenza tipo 1 [prevalencia 0,5% (1/216)] y virus parainfluenza tipo 2 [prevalencia 0,5% (1/216)]. Hubo una coinfección del virus influenza A + virus parainfluenza tipo 1.

La capacidad del D³ Ultra 8 para identificar siete virus en muestras directas se comparó con la del D³ Ultra. El porcentaje de concordancia positiva fue de 100% (95% CI rango de 95,4% a 100%). El porcentaje de concordancia negativa fue de 100% (95% CI rango de 97,3% a 100%). La capacidad del D³ Ultra 8 para identificar metapneumovirus en muestras directas se comparó con la del D³ Metapneumovirus DFA Reagent. El porcentaje de concordancia positiva fue de 100% (95% CI rango de 64,6% a 100%). El porcentaje de concordancia negativa fue de 100% (95% CI rango de 98,2% a 100%).

Para el Sitio 2, los resultados de rendimiento del D³ Ultra 8, comparados con los de los dispositivos Comparador, D³ Ultra y D³ Metapneumovirus DFA Reagent, demuestran que los dispositivos detectan antígenos de virus respiratorios de muestra directa de manera similar y que el añadido de MAbs contra metapneumovirus no impacta adversamente a los demás MAbs para la detección de los demás virus respiratorios encontrados (p.ej., virus influenza A, virus influenza B, virus respiratorio sincicial, adenovirus y virus parainfluenza tipos 1 y 3). No se observó incremento en fondo con el D³ Ultra 8.

Las tablas siguientes detallan de cultivo celular los resultados del Sitio 2:

La Tabla 9 compara los resultados del D³ Ultra 8 Screening Reagent con los del D³ Ultra Screening Reagent para la detección de siete virus respiratorios identificados por el D³ Ultra Screening Reagent en células derivadas de cultivo.

La Tabla 10 compara el D³ Ultra 8 Screening Reagent con los resultados del D³ Metapneumovirus DFA Reagent para la detección de metapneumovirus en células derivadas de un cultivo.

Tabla 9. Sitio 2 – Comparación del D³ Ultra 8 y el D³ Ultra para la Detección de 7 Virus Respiratorios

Cultivo Celular (252 Muestras)		D ³ Ultra Screening Reagent	
		Pos	Neg
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	119	0
	Neg	0	133
Coincidencia de porcentaje positivo (CPP)		100% (119/119)	
95% CI- CPP		96.9,100%	
Coincidencia de porcentaje negativo (CPN)		100% (133/133)	
95% CI- CPN		97.2,100%	

Tabla 10. Sitio 2 – D³ Ultra 8 Identificación de Especímenes Positivos de Metapneumovirus

Cultivo Celular (252 Muestras)		D ³ Metapneumovirus DFA Reagent	
		Pos	Neg
D ³ Ultra 8 Screening Reagent	Pos	7	0
	Neg	0	245
Coincidencia de porcentaje positivo (CPP)		100% (7/7)	
95% CI- CPP		64.6, 100%	
Coincidencia de porcentaje negativo (CPN)		100% (245/245)	
95% CI- CPN		98.5, 100%	

Conclusión de la Confirmación del Cultivo del Estudio del Sitio 2

Se aisló una variedad de patógenos respiratorios virales: virus respiratorio sincial [prevalencia 16,7% (42/252)], virus influenza A [prevalencia 24,6% (62/252)], virus influenza B [prevalencia 4% (10/252)], metapneumovirus [prevalencia 2,8% (7/252)], adenovirus [prevalencia 1,6% (2/252)], virus parainfluenza tipo 2 [prevalencia 0,4% (1/252)]. Hubo dos co-infecciones, a saber: dos (2) virus influenza A + virus respiratorio sincial.

La capacidad del D³ Ultra 8 para identificar siete virus en células derivadas de un cultivo se comparó con la del D³ Ultra. El porcentaje de concordancia positiva fue de 100% (95% CI rango de 96,9% a 100%). El porcentaje de concordancia negativa fue de 100% (95% CI rango de 97,2% a 100%). La capacidad del D³ Ultra 8 para identificar metapneumovirus en células derivadas de un cultivo se comparó con la del D³ Metapneumovirus DFA Reagent. El porcentaje de concordancia positiva fue de 100% (95% CI rango de 64,6% a 100%). El porcentaje de concordancia negativa fue de 100% (95% CI rango de 98,5% a 100%).

Para el Sitio 2, los resultados de rendimiento del D³ Ultra 8, comparados con los de los dispositivos Comparador, D³ Ultra y D³ Metapneumovirus DFA Reagent, demuestran que los dispositivos detectan antígenos de virus respiratorios de cultivo de manera similar y que el añadido de MABs contra metapneumovirus no impacta adversamente a los demás MABs para la detección de los demás virus respiratorios encontrados (p.ej., virus influenza A, virus influenza B, virus respiratorio sincicial, adenovirus y virus parainfluenza tipos 1 y 3). No se observó incremento en fondo con el D³ Ultra 8.

Características de Rendimiento Analítico

Prueba de Reactividad Cruzada

Diagnostic Hybrids, Inc. D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening & Identification Kit DFA Reagents fueron sometidos a pruebas de reactividad cruzada contra una amplia variedad de células y microorganismos. No se observó reactividad cruzada para 21 tipos celulares huéspedes o para 62 cepas virales (cultivadas y procesadas para tinción). Veinticinco (25) cepas bacterianas, una levadura, tres *Chlamydia sp.* y un protozoo fueron evaluados para reactividad cruzada incluyendo *Staphylococcus aureus*, una bacteria productora de proteína A. La tinción de *S. aureus* apareció como puntos pequeños de fluorescencia mientras que todos los otros cultivos bacterianos fueron negativos. [Consultar la Tabla 11 para los resultados del estudio de reactividad cruzada. La tabla indica qué organismos fueron reactivos con cuál DFA Reagent.]

Se lograron condiciones rigurosas para las pruebas de reactividad cruzada usando altas concentraciones de DFA Reagents y altos títulos de microorganismos. Los DFA Reagents (p.ej., anticuerpos monoclonales fluoresceinados directamente) se prepararon a 1,5X la concentración que se suministra en el kit. Cada uno de los virus sometidos a prueba fue preparado como monocapas de células infectadas (250 células infectadas inoculadas en un shell-vial de la cultura y se incubadas durante 24 a 48 horas, a ceder un 3+ al 4+ de infección), y procesadas y teñidas con 1,5X de DFA Reagents según el procedimiento detallado en el insertar producto. Las cepas bacterianas fueron cultivadas, procesadas como suspensiones, luego colocadas (spotted) en portaobjetos de microscopio (dando > 150 bacterias por campo de microscopio de 400X), luego teñidas con 1,5X DFA Reagents según el procedimiento detallado en el insertar producto. Los cultivos celulares se tiñeron como monocapas confluentes.

Tabla 11. Resultados del Estudio de Reacciones Cruzadas

Organismo	Cepa o tipo	D ³ Ultra 8 Respiratory Screening Reagent a concentrado 1.5X	TCID ₅₀ /Soruce/ o CFU
Línea celular	A549	-	monocapa
	BGMK	-	monocapa
	CV-1	-	cell spot
	HEp-2	-	monocapa
	Hs27 (HFF)	-	monocapa
	LLC-MK2	-	monocapa
	McCoy	-	monocapa
	MRC-5	-	monocapa
	MRHF	-	monocapa
	Mv1Lu	-	monocapa
	NCI-H292	-	cell spot
	pAGMK	-	cell spot
	pCMK	-	cell spot

Organismo	Cepa o tipo	D ³ Ultra 8 Respiratory Screening Reagent a concentrado 1.5X	TCID ₅₀ /Sorcel/ o CFU
Línea celular	pRhMK	-	monocapa
	pRhMK II	-	monocapa
	pRK	-	cell spot
	RD	-	cell spot
	R-Mix™	-	monocapa
	R-Mix Too™	-	monocapa
	Vero	-	cell spot
	WI-38	-	monocapa
Adenovirus	Tipo 1	+	714 TCID ₅₀
	Tipo 3	+	714 TCID ₅₀
	Tipo 5	+	714 TCID ₅₀
	Tipo 6	+	714 TCID ₅₀
	Tipo 7	+	714 TCID ₅₀
	Tipo 10	+	714 TCID ₅₀
	Tipo 13	+	714 TCID ₅₀
	Tipo 14	+	714 TCID ₅₀
	Tipo 18	+	714 TCID ₅₀
	Tipo 31	+	714 TCID ₅₀
	Tipo 40	+	714 TCID ₅₀
Tipo 41	+	714 TCID ₅₀	
Influenza A	Mexico/4108/2009 (H1N1) from CDC*	+	714 TCID ₅₀
	California/07/2009 (H1N1) from CDC*	+	714 TCID ₅₀
	Aichi (H3N2)	+	714 TCID ₅₀
	Mal (H1N1)	+	714 TCID ₅₀
	Hong Kong (H3N2)	+	714 TCID ₅₀
	Denver (H1N1)	+	714 TCID ₅₀
	Port Chalmers (H3N2)	+	714 TCID ₅₀
	Victoria (H3N2)	+	714 TCID ₅₀
	New Jersey (H _{sw} N1)	+	714 TCID ₅₀
	WS (H1N1)	+	714 TCID ₅₀
	PR (H1N1)	+	714 TCID ₅₀
Influenza B	Hong Kong	+	714 TCID ₅₀
	Maryland	+	714 TCID ₅₀
	Mass	+	714 TCID ₅₀
	GL	+	714 TCID ₅₀
	Taiwan	+	714 TCID ₅₀
	Russia	+	714 TCID ₅₀
VRS	Long	+	714 TCID ₅₀
	Wash	+	714 TCID ₅₀
	9320	+	714 TCID ₅₀

Organismo	Cepa o tipo	D ³ Ultra 8 Respiratory Screening Reagent a concentrado 1.5X	TCID ₅₀ /Sorcel/ o CFU
Parainfluenza 1	C-35	+	714 TCID ₅₀
Parainfluenza 2	Greer	+	714 TCID ₅₀
Parainfluenza 3	C 243	+	714 TCID ₅₀
Parainfluenza 4a	M-25	-	714 TCID ₅₀
Parainfluenza 4b	CH19503	-	714 TCID ₅₀
Metapneumovirus	Subgroup A1	+	714 TCID ₅₀
	Subgroup A2	+	714 TCID ₅₀
	Subgroup B1	+	714 TCID ₅₀
	Subgroup B2	+	714 TCID ₅₀
HSV-1	1F	-	71 TCID ₅₀
	MacIntyre9	-	71 TCID ₅₀
HSV-2	MS	-	71 TCID ₅₀
	Strain G	-	71 TCID ₅₀
CMV	Towne	-	714 TCID ₅₀
	Davis	-	714 TCID ₅₀
	AD169	-	714 TCID ₅₀
Varicella-zoster	Webster	-	71 TCID ₅₀
	Ellen	-	71 TCID ₅₀
Echovirus	4	-	Porta control
	6	-	Porta control
	9	-	Porta control
	11	-	Porta control
	30	-	Porta control
	34	-	Porta control
Coxsackievirus	B1	-	Porta control
	B2	-	Porta control
	B3	-	Porta control
	B4	-	Porta control
	B5	-	Porta control
	B6	-	Porta control
Paperas	Bion	-	Porta control
Rubéola (sarampión)	Bion	-	Porta control
Bacteria	<i>Acholeplasma laidlawi</i>	-	~1.0x10 ⁷ CFU
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	9.7x10 ⁵ CFU
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	1.8x10 ⁵ CFU
	<i>Bordetella pertussis</i>	-	4.7x10 ⁶ CFU
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	2.5x10 ⁶ CFU
	<i>Escherichia coli</i>	-	2.6x10 ⁵ CFU
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	5.0x10 ⁵ CFU

Organismo	Cepa o tipo	D ³ Ultra 8 Respiratory Screening Reagent a concentrado 1.5X	TCID ₅₀ /Sorce/ o CFU
	<i>Haemophilis influenzae</i> Tipo A	-	9.3x10 ⁵ CFU
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	6.4x10 ⁶ CFU
	<i>Legionella pneumophila</i>	-	6.5x10 ⁴ CFU
	<i>Moraxella cartarrhalis</i>	-	6.4x10 ⁴ CFU
	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	~1.0x10 ⁴ CFU
	<i>Mycoplasma orale</i>	-	~1.0x10 ⁴ CFU
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	~1.0x10 ⁴ CFU
	<i>Mycoplasma salivarium</i>	-	~1.0x10 ⁷ CFU
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	1.3x10 ⁶ CFU
	<i>Proteus mirabilis</i>	-	2.1x10 ⁶ CFU
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1.0x10 ⁷ CFU
	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	2.5x10 ⁶ CFU
	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	1.8x10 ⁶ CFU
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+ ^d	1.0x10 ⁷ CFU
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	9.6x10 ⁶ CFU
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	8.0x10 ⁵ CFU
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	2.9x10 ⁷ CFU
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	~1.0x10 ⁴ CFU
Chlamydia sp.	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Porta control
	<i>Chlamydophila psittaci</i>	-	Porta control
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	Porta control
Yeast	<i>Candida glabrata</i>	-	8.7x10 ⁶ CFU
Protozoa	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	Porta control
<p>^d La tinción de <i>S. aureus</i> apareció como puntos pequeños de fluorescencia mientras que todos los otros cultivos bacterianos fueron negativos. Esto se observó en el etiquetado, en la sección " Límites Del Procedimiento". La proteína A producida por la bacteria, <i>Staphylococcus aureus</i>, se ligará a las porciones Fc de algunos de los anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína utilizados en este kit.</p> <p>*Aunque esta prueba ha sido para la detección de 2009 virus de influenza H1N1 en dos cepas cultivadas, las características de funcionamiento de este dispositivo con muestras clínicas que son positivos para el virus H1N1 de la gripe de 2009 no han sido establecidas. La D³ DFA Ultra virus respiratorio Detección y kit de identificación puede distinguir entre los virus de la influenza A y B, pero no pueden diferenciar los subtipos de la gripe.</p>			

ASISTENCIA

Si tiene preguntas relacionadas con el uso de este producto, póngase en contacto con el Apoyo Técnico de Quidel en el 1.800.874.1517 (en EE. UU.) o en technicalsupport@quidel.com.

Desde fuera de EE. UU., póngase en contacto con su distribuidor local o con uno de los centros de Apoyo técnico listados a continuación. También puede ponerse en contacto a través de quidel.com.

BIBLIOGRAFÍA

1. FDA Guidance Document: In Vitro Diagnostic Devices to Detect Influenza A Viruses: Labeling and Regulatory Path; Issued 4/10/2006.
2. Englund, J.A., (2002). Antiviral therapy of influenza. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, **13**(2):120-128.
3. Patel, N., Hartwig, R., Kauffmann, L. and Evans, M. (2000). Rapid influenza A and B culture 20-hour detection using R-Mix: A new gold standard. Presented at The Sixteenth Annual Clinical Virology Symposium, April 30-May 3, Clearwater Beach, FL.
4. Rodriguez, W.J., Schwartz, R.H. and Thorne, M.M. (2002). Evaluation of diagnostic tests for influenza in a pediatric practice. *Pediatr. Inf. Dis. J.*, **3**:193-6.
5. Gould, I.M. (2002). Antibiotic Policies and control of resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **15**(4):395-400.
6. Bischofberger, N., Webster, R.G. and Laver, G. (1999). Disarming Flu Viruses. *Scientific American*, January.
7. Wiedbrauk, D.L. and Johnston, S.L.G. (1993). Chapter 17, Influenza Virus. In: *Manual of Clinical Virology*. New York, Raven Press, 127-140.
8. Fete, T.J., Noyes, B. (1996). Common (but not always considered) viral infections of the lower respiratory tract. *Pediatr. Ann.*, **25**(10), 577-584.
9. Hall, C.B. (1981). Respiratory Syncytial Virus. In: Feigin, R. D., Cherry, J.D., eds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, Phila., W.B. Saunders, 1247-1267.
10. Hall, C.B., Hall, W.J., Gala, C.L., McGill, F.B., Leddy, J.P. (1984). Longterm prospective study in children after Respiratory Syncytial Virus infection. *J. Pediatr.*, **105**:358-364.
11. Falsey, Ann R. and Walsh, E.E. (2000). Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults. *Clinical Microbiology Reviews* **13**(3):371-384.
12. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. 2001 *Nat Med* **7**:719-24.
13. Nissen MD, Siebert DJ, Mackay 1M, Sloots TP, Withers SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. *Med J Aust* **2002**; 176:188.
14. Kahn, Jeffrey S. Epidemiology of human metapneumovirus. 2006 *Clin Microbiol Rev.* **19**(3):546-557.
15. Foy, H.M. (1997). Adenoviruses. In: Evans, A., Kaslow, R., eds. *Viral Infections in Humans: Epidemiology and Control*. 4th ed., New York, Plenum, 119-138.
16. Easton, A.J., Eglin, R.P. (1989). Epidemiology of Parainfluenza virus type 3 in England and Wales over a 10 year period. *Epidemiol. Infect.*, **102**:531-535.
17. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (BMBL), 5th edition, 2007, CDC-NIH manual. <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/bmbl5toc.htm>
18. *Biosafety Manual*, 3rd edition, 2004. World Health Organization [Manual may be available in additional languages; refer to WHO web page http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/]
19. *Laboratory Biosafety Guidelines*, 3rd edition, 2004. Published by authority of the Minister of Health, Population and Public Health Branch, Centre for Emergency Preparedness and Response [Guideline is available in French or English; refer to web page <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/lbg-ldmbl-04/index.html>]
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Viral Culture; Approved Guidelines*. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA 2006.
21. Isenberg, Henry D. (1992). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, published by American Society for Microbiology, Washington DC, pg. 8.2.3.
22. 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.
23. Isenberg, Henry D., 2004. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, published by American Society for Microbiology, Washington DC, 10.7.1 – 10.7.10.

24. Leland, Diane S. (1996). *Clinical Virology*, published by W.B. Saunders, Philadelphia, PA.



I-01-110000 – D³ Ultra 8 DFA Respiratory Virus Screening & Identification Kit



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

PI3120001ES00 (05/19)

GLOSARIO

REF

Número del catálogo



Marca CE de conformidad

EC REP

Representante autorizado
en la Comunidad Europea

LOT

Código de lote



Fecha de caducidad



Fabricante



Limites de temperatura



Indicaciones



Consulte las instrucciones de uso



No reutilizar

IVD

Para diagnósticos *in vitro*



160 to 250

Contiene una cantidad suficiente para
160 a 250 determinaciones

CONT NaN₃

Contenido / Contiene

NaN₃ 4%

Contiene 4% de azide sodia al puro
