



<p>Key Code TSMX7852A www.oxid.com/ifu</p>	<p>US 1 855 2360 190 ROW +31 20 794 7071</p>
<p>Europe +800 135 79 135 CA 1 855 805 8539</p>	<p>US 1 855 2360 190 ROW +31 20 794 7071</p>

IMAGEN Respiratory Screen

REF K612011-2	Σ 100	ES
----------------------------	--------------	-----------

1. INDICACIONES DE USO

IMAGEN™ Respiratory Screen es una prueba de inmunofluorescencia indirecta cualitativa para la detección presunta del virus respiratorio sincitial (VRS), el virus de la influenza A y la influenza B, los virus de la parainfluenza 1, 2 y 3 y el adenovirus en especímenes respiratorios (aspirados nasofaríngeos) y en cultivos celulares. El ensayo no puede diferenciar entre un virus y otro. Los distintos virus se deben identificar y confirmar posteriormente usando para ello reactivos basados en anticuerpos monoclonales etiquetados con FITC, como los de la gama IMAGEN, o bien, por otros métodos. Los resultados del espécimen respiratorio directo se deben confirmar por cultivo celular.

2. RESUMEN

Las infecciones respiratorias de origen vírico están asociadas a brotes importantes de enfermedades respiratorias por todo el planeta que tienen un impacto significativo sobre la salud a escala mundial^{1,2,3}. Los virus causan enfermedades en todos los grupos de edad, pero las infecciones son más graves en los segmentos de población que componen los lactantes, los ancianos y las personas inmunocomprometidas, y desembocan en la hospitalización de los pacientes⁴. Los brotes nosocomiales se pueden producir en las plantas de pediatría y geriatría dando lugar a que se prolongue la hospitalización y el tratamiento del paciente, además de un aumento de la morbilidad y la mortalidad^{5,6}. Las infecciones por virus respiratorios en lactantes pueden causar obstrucción de las vías respiratorias y dar lugar a disnea.

Los principales virus responsables de infecciones en el tracto respiratorio inferior son el VRS, los virus de la influenza A y B, los virus de la parainfluenza 1, 2 y 3 y los adenovirus. Las tasas de prevalencia esperadas de cada uno de los virus se detallan (indicando referencias) en la Sección 13, Valores esperados.

El VRS y los virus de la parainfluenza se presentan asociados a estaciones del año y son causas principales de enfermedades en el tracto respiratorio inferior de lactantes y niños pequeños. Con frecuencia causan bronquiolitis, crup, bronquitis y, a veces, neumonía^{7,8,9}.

Los virus de la influenza A y de la influenza B provocan epidemias estacionales, de escala mundial, de enfermedades respiratorias en adultos y niños con un amplio espectro morboso, que va desde síntomas leves en el tracto respiratorio superior a neumonía grave^{10,11}. La neumonía aguda en pacientes ancianos e inmunocomprometidos puede ser una amenaza mortal, sobre todo cuando se presenta asociada a infecciones microbianas secundarias.

Las infecciones por adenovirus están asociadas a enfermedades respiratorias, oculares y entéricas¹². Se ha indicado que los adenovirus son responsables del 5% de las enfermedades respiratorias agudas en niños de menos de 4 años y son una causa común de faringitis en niños pequeños¹³.

El diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias de origen vírico facilita mucho el tratamiento de los pacientes, la prevención y control de brotes e influye en el uso de los tratamientos antivirales, sobre todo cuando se trata de infecciones víricas por VRS y de influenza A^{3,14,15,16}.

Los métodos usados para el diagnóstico de las infecciones víricas respiratorias agudas incluyen someter a pruebas directas especímenes tales como aspirados nasofaríngeos por inmunofluorescencia o por inmunoensayo enzimático para detectar proteínas víricas, aislar e identificar los virus en cultivos celulares monocapa o en la detección de la respuesta inmune por técnicas serológicas.

Las pruebas de inmunofluorescencia como IMAGEN Respiratory Syncytial Virus e IMAGEN Influenza A and B virus son ahora de amplio uso para la detección directa de las proteínas de los virus respiratorios en preparaciones de células procedentes de aspirados nasofaríngeos o de cultivos celulares monocapa^{17,18}. Las pruebas de inmunofluorescencia que utilizan anticuerpos monoclonales específicos son rápidas y permiten supervisar la calidad del espécimen^{7,17}. Los cultivos celulares mejorados por centrifugación (“shell-vials”) acelera el aislamiento de virus respiratorios en cultivos celulares y, cuando se utilizan junto con pruebas de inmunofluorescencia, permiten el diagnóstico rápido de infecciones respiratorias haciendo uso de estos cultivos celulares¹⁹.

En cualquier población circulan muy diversos virus respiratorios simultáneamente, provocando infecciones que exhiben una sintomatología clínica similar. La prevalencia de especímenes con resultado positivo para virus respiratorios variará según demografía de la población, la estación del año y el tipo de especímenes y el momento en que se recogieron éstos a lo largo de la evolución de la infección. La prueba de cribaje por inmunofluorescencia de virus respiratorios suministra un método rápido y con efectividad de costes para detectar la infección por virus respiratorio. A continuación, los distintos virus se pueden identificar y confirmar usando anticuerpos monoclonales monoespecíficos etiquetados con FITC.

IMAGEN Respiratory Screen es una prueba por inmunofluorescencia indirecta para la detección de virus respiratorios, incluido el virus respiratorio sincitial, los virus de la influenza A y de la influenza B, virus de la parainfluenza 1, 2 y 3 y el adenovirus en especímenes clínicos y en cultivos celulares monocapa. La presencia de un virus respiratorio viene indicada porque el resultado del cribaje es positivo. Cualquier virus presente se puede identificar por inmunofluorescencia directa usando reactivos basados en anticuerpos monoclonales conjugados con FITC específicos de virus respiratorios individuales (véase las Secciones 6.1 y 11.4).

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La prueba IMAGEN Respiratory Screen contiene una agrupación de anticuerpos monoclonales cada uno de los cuales tiene especificidad para el VRS, el virus de la influenza A y de la influenza B, los virus de la parainfluenza 1, 2 y 3 o el adenovirus. El reactivo de cribaje de anticuerpos agrupados se usó en una técnica de tinción por inmunofluorescencia indirecta de dos pasos. El reactivo de control negativo suministrado se usa para supervisar la especificidad de la tinción. Los especímenes se tiñen con reactivo de cribaje y/o con reactivo de control

negativo durante 15 minutos. A continuación, el exceso de reactivo no ligado se elimina por lavado con solución salina

REF	Catalogue Number
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device
	Consult Instructions for Use (IFU)
	Temperature Limitations (Storage temp.)
	Contains sufficient for <N> tests
LOT	Batch Code (Lot Number)
	Use By (Expiration Date)
	Manufactured by

tamponada con fosfatos (PBS). Luego los especímenes se tiñen con conjugado FITC secundario durante 15 minutos. El exceso de reactivo no ligado se elimina por lavado con PBS. Las zonas teñidas se montan y se ven al microscopio utilizando iluminación epifluorescente. El resultado positivo viene indicado por la presencia de fluorescencia intracelular verde manzana característica en el interior de las células infectadas, lo que contrasta con la tinción de fondo de las células no infectadas. El virus respiratorio presente puede identificarse específicamente usando reactivos IMAGEN (véase la Sección 11.4).

Agradecimientos

Los anticuerpos monoclonales usados en esta prueba tuvieron su origen en:

The Department of Respiratory and Enteric Viruses, Public Health Services, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA

The Institute for Research on Animal Diseases, Compton, Berkshire, UK

Department for Health and Human Services, Public Health Services, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA

Division of Microbiological Reagents and Quality Control, Central Public Health Laboratory, Colindale, London, UK

Washington Research Foundation, Washington, USA

Aunque algunos anticuerpos monoclonales usados en este dispositivo de prueba tuvieron su origen en los Centers for Disease Control (CDC), no se debe interpretar que la prueba haya recibido respaldo alguno por los CDC o por el Department of Health and Human Services de los EE.UU.

4. DEFINICIONES

En la información del producto se han utilizado los siguientes símbolos.

5. REACTIVOS SUMINISTRADOS

 100 – Cada kit contiene materiales suficientes para analizar 100 especímenes directos o preparaciones de cultivos celulares.

La vida útil del kit se indica en la etiqueta de la caja exterior.

5.1. REACTIVO DE IMAGEN RESPIRATORY SCREEN

	Instrucciones de uso.
	Placas de control positivo y negativo combinado, de 5 x 14 pocillos. Cada placa se compone de 7 pocillos que contienen células fijadas con acetona e infectadas por VRS (cepa clínica a partir de un espécimen clínico), virus de la influenza A (cepa CDC V7-002) o de la influenza B (cepa CDC V4-004), virus de la parainfluenza 1, 2 y 3 (cepas CDC V6-004, CDC V7-003 y CDC V5-003, respectivamente) y adenovirus (cepa CDC V5-002), un pocillo específico para cada virus, y 7 pocillos fijados con acetona que contienen células no infectadas (pocillos de control negativo).

Un frasco de cada uno de los compuestos siguientes, a menos que se indique otra cosa:

MOUNTING FLUID	Medio de montaje, 3 x 3mL. El medio de montaje contiene un inhibidor del fotodecoloración en glicerol (pH 10,0).
-----------------------	--

SCREENING REAGENT	Reactivo para cribaje, 4,4mL. El reactivo se compone de anticuerpos monoclonales agrupados de ratón, purificados, específicos del VRS, los virus de la influenza A y de la influenza B, virus de la parainfluenza 1, 2 y 3 y el adenovirus. El reactivo se prepara en solución tamponada de proteína estabilizada que contiene azida sódica en concentración 15mmol/L como conservante.
--------------------------	---

Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales usados en el reactivo IMAGEN Respiratory Screen screening reactivan con los epítopos conservados de las proteínas virales presentes en los virus respectivos, tal y como se detalla a continuación:

Virus monoclonal	Especificidad del anticuerpo
Virus respiratorio sincitial	Nucleoproteína y proteína de fusión
Virus de la influenza A	Nucleoproteína y proteína base
Virus de la influenza B	Nucleoproteína y proteína de hemaglutinina
Virus de la parainfluenza 1	Proteína de fusión
Virus de la parainfluenza 2	Proteína de hemaglutinina
Virus de la parainfluenza 3	Proteína de hemaglutinina
Adenovirus	Proteína hexon*

* Se ha mostrado que este anticuerpo monoclonal detecta todas las cepas de adenovirus asociadas comúnmente a infecciones del tracto respiratorio. Las cepas sometidas a prueba fueron las de adenovirus 1 - 41 inclusive.

CONTROL	Reactivo de control negativo, 2,6mL. El reactivo se compone de anticuerpos monoclonales de ratón agrupados sin actividad antiviral. El reactivo se prepara en solución tamponada de proteína estabilizada que contiene azida sódica en concentración 15mmol/L como conservante.
----------------	---

FITC CONJUGATE	Anticuerpo antirratón conjugado con FITC, 2 x 3,5mL. El reactivo se compone de un fragmento F(ab') ₂ conjugado con FITC de inmunoglobulinas de conejo antirratón, diluidas en una solución PBS, tinte azul de Evans como contratinción y 15mmol/L de azida sódica como conservante.
-----------------------	--

PREPARACIÓN, ALMACENAMIENTO Y REUTILIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL KIT

Para garantizar un rendimiento óptimo del kit es importante garantizar que se almacenen todos los componentes no usados conforme a las instrucciones siguientes:

5.2. PLACAS DE CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO – POSITIVE AND NEGATIVE CONTROL SLIDE

Las placas se suministran en bolsas de lámina metálica selladas, con nitrógeno. Almacene las placas no usadas a una temperatura de 2-8°C. La placa se debe dejar durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-30°C) antes de abrirla.

Tiña la placa inmediatamente después de abrir.

5.3. MEDIO DE MONTAJE – MOUNTING FLUID

Listo para su uso. Almacene el medio de montaje no usado a una temperatura de 2-8°C. El medio de montaje se debe dejar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 5 minutos antes de usarlo.

5.4. REACTIVO DE CRIBAJE – SCREENING REAGENT

Listo para su uso. Almacene el reactivo de cribaje no usado a una temperatura de 2-8°C. El reactivo se debe dejar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 5 minutos antes de usarlo.

5.5. REACTIVO DE CONTROL NEGATIVO – CONTROL

Listo para su uso. Almacene el reactivo de control negativo no usado a una temperatura de 2-8°C. El reactivo se debe dejar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 5 minutos antes de usarlo.

5.6. REACTIVO ANTIRRATÓN CONJUGADO CON FITC – FITC CONJUGATE

Listo para su uso. Almacene el reactivo antirratón conjugado con FITC no usado en la oscuridad a una temperatura de 2-8°C. El reactivo se debe dejar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 5 minutos antes de usarlo.

6. REACTIVOS Y EQUIPO ADICIONAL NECESARIO

6.1. REACTIVOS

Acetona recién preparada (para la fijación).

Solución PBS a pH 7,5 para lavar especímenes teñidos y para preparar los especímenes.

Reactivos IMAGEN para confirmar los resultados de cribaje positivos, reactivos que están disponibles en su distribuidor o filial de Oxoid:

IMAGEN Adenovirus	No de catálogo K610011-2
IMAGEN Respiratory Syncytial Virus (RSV)	No de catálogo K610211-2
IMAGEN Parainfluenza Virus Types 1,2,3 (Typing)	No de catálogo K610411-2
IMAGEN Influenza A and B Virus	No de catálogo K610511-2

6.2. ACCESORIOS Y EQUIPO

Los productos siguientes están destinados a su uso junto con IMAGEN Respiratory Screen. Contacte con la local el distribuidor de para obtener más información.

Portaobjetos de microscopio, de vidrio recubierto de teflón, con pocillos de diámetro 6mm (100 portaobjetos por caja) disponibles en su distribuidor (No de catálogo S611430-6).

IMAGEN Respiratory Screen Positive and Negative Control Slides (No de referencia S612130-2).

7. EQUIPO

Se necesita el equipo siguiente:

Pipetas de precisión y puntas desechables para suministrar 20 y 25µL

Baño de lavado

Cubreobjetos adecuados para cubrir bien pocillos únicos de 6mm de diámetro o bien placas de 14 pocillos

Aceite de inmersión fluorescente

Microscopio de epifluorescencia con sistema de filtro para FITC (longitud de onda de máxima excitación, 490nm; longitud de onda de la emisión promedio, 520nm) y x200-x500 aumentos

Incubación a 37°C

Centrifugadora de baja velocidad

Para especímenes directos

Extractor de moco (muestras nasofaríngeas solamente).

Para confirmar los cultivos

Torundas estériles, medio de transporte vírico (VTM) y un contenedor adecuado para recoger, transportar y cultivar el VRS, el virus de la influenza A y de la influenza B, los virus de la parainfluenza 1, 2 y 3 y el adenovirus.

Líneas celulares recomendadas para cultivo y asilamiento del VRS, el virus de la influenza A y de la influenza B, los virus de la parainfluenza 1, 2 y 3 y el adenovirus.

8. PRECAUCIONES

IVD - Para uso diagnóstico *in vitro*. Toda persona que realice un ensayo con este producto debe haber recibido formación acerca de su uso y tener experiencia suficiente en procedimientos de laboratorio.

8.1. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

8.1.1 Los reactivos de IMAGEN Respiratory Screen contiene <0.1% de azida sódica, que es venenosa. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre, formando acumulaciones de azidas metálicas explosivas. Deseche siempre los materiales que contengan azidas dejando que salga gran cantidad de agua por el grifo.

8.1.2 Los antígenos víricos de las placas de control han demostrados su carencia de infecciosidad en cultivo celular; sin embargo, la placa se debe manipular y desechar como si fuera potencialmente infecciosa.

8.1.3 El reactivo contiene el tinte azul de Evans. Aunque su concentración es tan baja que el producto no se puede clasificar como cancerígeno, debe evitarse el contacto con la piel.

8.1.4 Se debe tener cuidado cuando se use medio de montaje ya que puede causar irritación de la piel. Se debe lavar la piel si se produce contacto con el agua.

8.1.5 No se aplique cosméticos, beba, coma, ni almacene o prepare alimentos dentro del área de trabajo designada.

8.1.6 No pipetee los materiales con la boca.

8.1.7 Lleve guantes desechables cuando manipule especímenes clínicos y cultivos víricos y lávese siempre las manos después de trabajar con materiales infecciosos.

8.1.8 Deseche todos los especímenes clínicos con arreglo a la legislación local.

8.1.9 Los usuarios profesionales pueden solicitar una hoja de datos sobre seguridad.

8.2. PRECAUCIONES TÉCNICAS

8.2.1 No se deben utilizar los componentes después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas. No mezcle ni intercambie lotes diferentes de reactivos.

8.2.2 Los reactivos se proporcionan a concentraciones de trabajo fijas. El rendimiento de la prueba se puede ver afectado negativamente si se modifican los reactivos, o si se almacenan en condiciones distintas a las indicadas en la Sección 5.

8.2.3 Prepare la solución PBS nueva que se necesite para el uso del día.

8.2.4 Es necesario lavar con PBS. Usar otras soluciones de lavado, como agua del grifo o agua destilada, pondrá en peligro los resultados de la prueba.

8.2.5 Evite la contaminación microbiana de los reactivos.

8.2.6 Los reactivos no se deben congelar.

9. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE ESPÉCIMENES

La recogida y preparación de especímenes es de importancia fundamental en el diagnóstico de la infección por virus respiratorio sincitial por inmunofluorescencia directa y usando métodos de cultivo celular. Los especímenes se deben recoger del punto de infección durante el tiempo de máximo desprendimiento viral de manera que contengan tanto material infectado como sea posible y se preparen de tal manera que conserven bien las células intactas libres de modo adherente, etc., si se trata de especímenes para microscopía directa, o que conserven la viabilidad de los virus cuando se trate de especímenes destinados al cultivo.

9.1. ASPIRADOS Y SECRECIONES NASOFARÍNGEAS

Recogida

Recoja especímenes de la región nasofaríngea en el extractor de moco a través de un tubo de aspiración de calibre 8. El extractor de moco y el tubo se deben transportar lo más pronto que sea posible, se deben mantener a 2-8°C y se envía al laboratorio para su procesamiento. Es necesario aplicar técnicas de separación celular para la tinción de inmunofluorescencia directa. El espécimen y el material sobrenadante procedente de técnicas de separación celular se puede usar para la inoculación de cultivos víricos.

Separación celular

Si es necesario, añada 2mL de solución PBS al espécimen antes de la centrifugación con el fin de reducir la viscosidad y diluir el moco. Centrifugue el extractor de moco a temperatura ambiente (15-30°C) durante 10 minutos a 380g. Retire el sobrenadante, que se puede usar para cultivo celular. Resuspenda el residuo celular en 2mL de PBS y haga subir y bajar las células por la pipeta suavemente usando para ello una pipeta gruesa, o realice un vórtex suave, hasta que se libere el mucus y el material celular. Evite pipetear y crear vórtices con fuerza, para evitar que se dañen las células. Cuando se obtenga una suspensión suave, añada más PBS según necesidad, pipetee o cree vórtices tras la adición del PBS suplementario con el fin de lavar más las células. Elimine y descarte cualquier punto de moco visible que haya quedado al llegar a este punto. El exceso de moco se debe eliminar ya que impedirá la penetración adecuada del reactivo y puede dar lugar a una fluorescencia inespecífica.

Si todas las secreciones quedan en el tubo de aspiración y ninguna llega al extractor de moco, sáquelas todas del tubo para transferirlas al PBS. Esto se logra mejor insertando una pipeta Pasteur en el extremo del tubo que se fijó al extractor de moco. Aspire el líquido adecuado al tubo y expúlselo repetidas veces hasta que las secreciones que se adhieren a la pared del tubo se hayan desprendido. Haga ascender y descender la suspensión por la pipeta hasta que el moco se haya disgregado de manera adecuada.

Preparación de las placas

Tras terminar el proceso de separación, centrifugue la suspensión celular resultante a temperatura ambiente (15-30°C) durante 10 minutos a 380g y descarte el sobrenadante. Resuspenda el depósito celular en PBS suficiente para diluir el moco restante, a la vez que se mantiene una elevada densidad celular. Coloque 25µL de residuo celular resuspendido en la zona del pocillo de la placa.

NOTA: es importante preparar pocillos por duplicado de cada espécimen que se vaya probar usando IMAGEN Respiratory Screen, un pocillo para el reactivo de cribaje y otro para el reactivo de control negativo (consulte la Sección 10.8).

Deje que el espécimen se seque al aire por completo, a temperatura ambiente (15-30°C) y fije con acetona recién preparada, a temperatura ambiente (15-30°C), durante 10 minutos. Si no se tiñe el espécimen inmediatamente, almacene los cortes a 4°C durante toda la noche o congela a –20°C durante períodos de almacenamiento más prolongado.

NOTA: para las pruebas de seguimiento destinadas a la identificación de un virus específico, se necesita una placa adicional que contenga al menos 8 pocillos por espécimen (consulte la Sección 11.4).

9.2. INOCULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Inoculación de cultivos celulares

Los especímenes recolectados para diagnosticar infecciones por VRS, el virus de la influenza A y el de la influenza B y el virus de la parainfluenza 1, 2 y 3 se deben inocular en líneas celulares usadas de manera rutinaria en laboratorio conforme a métodos de laboratorio bien establecidos. Los cultivos celulares se deben examinar periódicamente para comprobar la aparición del efecto citopático (ECP) y se deben realizar pruebas de hemadsorción a intervalos regulares. Cualquier cultivo positivo para hemadsorción o cualquier cultivo celular que muestre ECP se debe recoger y probar para determinar si están presentes el VRS, el virus de la influenza A y de la influenza B, los virus de la parainfluenza 1, 2 y 3 y el adenovirus.

Preparación de las placas

Rasque la capa de células en medio de cultivo líquido usando una pipeta estéril. Deposite las células por centrifugación a 200g durante 10 minutos, a temperatura ambiente (15-30°C) y retire el sobrenadante.

Lave las células resuspendiendo el depósito celular en PBS (consulte la Sección 6.1) y repita la centrifugación. Retire el sobrenadante y resuspenda el depósito celular en un pequeño volumen (250µL por tubo de cultivo) de PBS recién preparado para mantener una alta densidad celular.

Coloque alícuotas de 25µL de la suspensión celular en un número apropiado de pocillos individuales en las placas. Deje que se seque al aire por completo y fije en acetona recién preparada durante 10 minutos a temperatura ambiente (15-30°C). Si no se tiñe el espécimen inmediatamente, almacene a 4°C durante toda la noche o congele a –20°C durante períodos de almacenamiento más prolongado.

NOTA: es importante preparar pocillos por duplicado, por cada espécimen que se vaya probar usando IMAGEN Respiratory Screen: un pocillo para el reactivo de cribaje y otro para el reactivo de control negativo (consulte la Sección 10.8).

NOTA: para las pruebas de seguimiento destinadas a la identificación de un virus específico, se necesita una placa adicional que contenga al menos 8 pocillos por espécimen (consulte la Sección 11.4).

10. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

CONSULTE LA SECCIÓN 8.2 PRECAUCIONES TÉCNICAS ANTES DE EJECUTAR EL PROCEDIMIENTO DE PRUEBA.

10.1. ADICIÓN DEL REACTIVO DE CRIBAJE Y DEL REACTIVO DE CONTROL NEGATIVO

Por cada espécimen se necesitan dos pocillos de preparación celular fijada. A un pocillo de la placa de prueba añada 25µL de

reactivo de cribaje y al otro pocillo añádale 25µL de reactivo de control negativo. Añada 20µL del reactivo de cribaje a la placa de control, a cada pocillo. Asegúrese de que los reactivos cubren todo el área de cada pocillo.

10.2. PRIMERA INCUBACIÓN

Incube placas con reactivo en una **cámara húmeda** durante **15 minutos**, a **37°C**. **No permita** que el reactivo se seque sobre el espécimen, ya que esto puede causar la aparición de tinción inespecífica.

10.3. LAVADO DE LA PLACA

Utilice una botella de plástico para enjuagarlo suavemente con una solución PBS. No aplique directamente el chorro de PBS a los pocillos. Incline el portaobjetos hacia abajo y aplique el chorro de PBS al portaobjetos sobre los pocillos, dejando que la solución PBS salga por el extremo inferior del portaobjetos. Lave con cuidado el portaobjetos en un baño con agitación que contenga PBS durante 5 minutos. Drene la solución PBS y deje que el portaobjetos se seque al aire a temperatura ambiente (de 15 a30 °C).

10.4. ADICIÓN DE CONJUGADO CON FITC ANTIRRATÓN

Añada 25µL de reactivo FITC a cada pocillo con espécimen y añada 20µL de reactivo FITC a cada pocillo de la placa de control. Asegúrese de que el reactivo cubre todo el área de cada pocillo. Cuando utilice placas de control cuyos micropocillos tengan un diámetro inferior a 6mm, se recomienda utilizar 20µL de reactivo.

10.5. SEGUNDA INCUBACIÓN

Incube placas con reactivo FITC en una **cámara húmeda** durante **15 minutos**, a **37°C**. **No permita** que el reactivo se seque sobre el espécimen, ya que esto puede causar la aparición de tinción inespecífica.

10.6. LAVADO DE LA PLACA

Utilice una botella de plástico para enjuagarlo suavemente con una solución PBS. No aplique directamente el chorro de PBS a los pocillos. Incline el portaobjetos hacia abajo y aplique el chorro de PBS al portaobjetos sobre los pocillos, dejando que la solución PBS salga por el extremo inferior del portaobjetos. Lave con cuidado el portaobjetos en un baño con agitación que contenga PBS durante 5 minutos. Drene la solución PBS y deje que el portaobjetos se seque al aire a temperatura ambiente (de 15 a30 °C).

10.7. ADICIÓN DE MEDIO DE MONTAJE

Añada una gota de medio de montaje al centro de cada pocillo y coloque el cubreobjetos sobre el medio de montaje y sobre el espécimen, asegurándose de que no quedan burbujas atrapadas.

10.8. LECTURA DE LA PLACA

Examine todas las áreas del pocillo que contienen espécimen teñido, usando un microscopio de epifluorescencia. La fluorescencia, tal y como se describe en la Sección 11, debe ser visible a x200-x500 aumentos. (Para obtener los mejores resultados, examine las placas inmediatamente después de la tinción, si bien se pueden almacenar a 2-8°C, en la oscuridad, durante 24 horas como máximo).

Si se obtiene resultados positivos en el cribaje (consulte la Sección 11.2), se puede realizar la identificación específica del virus presente en una preparación adicional de 8 pocillos (consulte la Sección 11) usando los distintos reactivos de inmunofluorescencia directa IMAGEN que se indican en la Sección 6.1.

11. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA

11.1. CONTROLES

11.1.1 Pocillos positivos de la placa de control

Cuando se tiñen y se examinan en la manera descrita en la Sección 10, los pocillos positivos de la placa de control deberían mostrar células con fluorescencia citoplásmica y/o nuclear de color verde manzana que contraste con un fondo de material contrateñido en rojo. Se deben utilizar placas de control positivo para comprobar que se ha realizado satisfactoriamente el procedimiento de tinción.

11.1.2 Pocillos negativos de la placa de control

Cuando se tiñen y se observan tal y como se describe en la Sección 10, los pocillos negativos de la placa de control no deben mostrar fluorescencia intracelular de color verde manzana. Sólo debe ser visible la contratinción roja de fondo.

11.2. ESPÉCIMENES CLÍNICOS

11.2.1 Apariencia de las células infectadas por virus

Las células infectadas teñidas demostrarán fluorescencia citoplásmica y/o nuclear de color verde-manzana. Las células no infectadas se tiñen de rojo con la contratinción azul de Evans.

11.2.2 Interpretación

Se realiza un diagnóstico positivo cuando una o más células del espécimen fijado y teñido muestra el patrón de fluorescencia típico descrito en la Sección 11.2.1.

Se realiza un diagnóstico negativo cuando los especímenes fijados, teñidos, no exhiben fluorescencia con el reactivo de cribaje.

Cuando se trata de especímenes de aspirado nasofaríngeo teñidos directamente, se deben observar al menos 20 células del epitelio respiratorio (columnar) en cada pocillo de la placa para que se pueda indicar resultado negativo. Vea la Sección 11.2.3 si está presente un número de células insuficiente.

11.2.3 Número de células insuficiente

Si no es suficiente el número de células presentes en la placa, el resto del espécimen clínico se debe centrifugar a 380g durante 10 minutos a temperatura ambiente (15-30°C). Resuspenda en un volumen menor (aproximadamente 50µL) de PBS antes de proceder a la redistribución (25µL) en cada área de pocillo. Como alternativa se debe solicitar una réplica del espécimen clínico.

11.2.4 Control de calidad

Se debe teñir y debe examinar cada vez que se utilicen reactivos IMAGEN Respiratory Screen una placa de control positivo y negativo.

Las placas de control que se suministran en el kit sirven como control adecuado para determinar el funcionamiento correcto de la técnica de tinción y la reactividad del reactivo con células infectadas por el VRS, de la influenza A y de la influenza B, el virus de la parainfluenza 1, 2 ó 3 y adenovirus.

11.2.5 Informe de los resultados

Se recomiendan las directrices siguientes para informar de los resultados:

Resultado positivo tal y como se define en 11.2.2:

Presuntamente positivos para uno o más de los siguientes virus: VRS, virus de la influenza A y de la influenza B, virus de la parainfluenza 1, 2 ó 3 y adenovirus. Debe seguir el aislamiento en cultivo y la identificación específica. Para lo referente a la identificación específica, consulte la Sección 11.4

Resultado negativo tal y como se define en 11.2.2:

Presuntamente negativo para VRS, virus de la influenza A y de la influenza B, virus de la parainfluenza 1, 2 ó 3 y adenovirus. Debe seguir la confirmación por cultivo

11.3. CONFIRMACIÓN POR CULTIVO CELULAR

11.3.1 Apariencia de las células infectadas por virus

Las células infectadas demostrarán una fluorescencia verde manzana intracelular, nuclear y/o citoplásmica y se deben registrar como positivas. Las células no infectadas se contrateñirán de rojo con la contratinción azul de Evans.

11.3.2 Interpretación de los resultados

El diagnóstico positivo se realiza cuando, tras la tinción, al menos una célula fijada y teñida muestra el patrón de fluorescencia descrito en la Sección 11.3.1.

Se indica resultado negativo cuando los especímenes fijados, teñidos, no exhiben fluorescencia con el reactivo de cribaje.

Para que se pueda indicar resultado negativo, al menos 50 células no infectadas del cultivo celular que se está sometiendo a prueba deben ser visibles dentro de cada área de pocillo. Consulte la Sección 11.3.4 si está presente un número de células insuficiente.

11.3.3 Informe de los resultados

Se recomienda seguir las directrices siguientes para informar de los resultados.

Resultado positivo tal y como se define en 11.3.2:

Positivo para uno o más de los siguientes virus: VRS, virus de la influenza A y de la influenza B, virus de la parainfluenza 1, 2 ó 3 y adenovirus. Identificación específica que se debe seguir. Para lo referente a la identificación específica, consulte la Sección 11.4.

Negativo tal y como se define en 11.3.2:

Negativo para VRS, virus de la influenza A y de la influenza B, virus de la parainfluenza 1, 2 ó 3 y adenovirus.

11.3.4 Número de células insufiente

Si no es suficiente el número de células presentes en la placa, el resto del espécimen clínico se debe centrifugar a 200g durante 10 minutos a temperatura ambiente (15-30°C). Resuspenda en un volumen menor (aproximadamente 50µL) de PBS antes de proceder a la redistribución (25µL) en cada área de pocillo.

Como alternativa, se debe reinocular una réplica del espécimen en monocapas celulares recientes y se debe repetir el cultivo de virus.

11.4. IDENTIFICACIÓN ESPECÍFICA DEL VIRUS RESPIRATORIO

La identificación específica del virus respiratorio se debe realizar confirmando los resultados positivos haciendo uso de inmunofluorescencia directa mediante IMAGEN (consulte la Sección 6.1, para la preparación de los cortes consulte la Sección 9).

12. LIMITACIONES DE LA EFICACIA

12.1. Uso exclusivamente el medio de montaje suministrado.

12.2. Aunque los anticuerpos monoclonales usados en esta prueba se han creado frente a cepas prototipo y se han seleccionado según su reactividad frente al epítopo conservado, puede que no detecten cepas víricas que han sufrido variación antigénica en la estructura del epítopo diana o de la nueva del virus.

12.3. El reactivo de cribaje y el reactivo de control negativo pueden teñir inespecíficamente cepas de *Staphylococcus aureus* que contengan proteína A. Esto se debe a la interacción no inmune de la proteína A con la región Fc de los anticuerpos monoclonales, una observación de la que se ha informado con otros ensayos monoclonales y policlonales basados en fluorescencia²⁰.

12.4. La apariencia visual de la imagen de fluorescencia obtenida puede variar debido al tipo de microscopio y a la fuente de luz usada.

12.5. Se recomienda utilizar 25µL de reactivo para cubrir un área de pocillo de 6mm de diámetro. Una reducción de este volumen puede provocar que sea dificultoso cubrir el área de espécimen y puede reducir la sensibilidad.

12.6. Todos los reactivos se proporcionan a concentraciones de trabajo fijas. La eficacia de la prueba puede verse afectada si se modifican los reactivos por cualquier método o no se almacenan en las condiciones recomendadas que se señalan en la Sección 5.

12.7. IMAGEN Respiratory Screen no se puede utilizar para identificar específicamente para identificar virus respiratorios. Para la identificación positiva se deben someter a más pruebas los especímenes positivos usando los distintos reactivos IMAGEN de inmunofluorescencia directa (consulte la Sección 6).

12.8. Si no se consigue detectar un virus por pruebas directas o por cultivo celular la confirmación puede ser resultado de factores como la recolección del espécimen en un momento inadecuado de la enfermedad, el muestro y/ o manejo incorrecto del espécimen, el fracaso del cultivo celular, etc. Obtener un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección vírica.

12.9. Los resultados de las pruebas se deben interpretar conjuntamente con la información disponible de estudios epidemiológicos, diagnósticos clínicos del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.

12.10. Debido a la naturaleza del proceso de fabricación del portaobjetos de control, es posible que se mezcle el material (es decir, que se encuentren algunas células positivas en el pocillo negativo). El portaobjetos seguirá funcionando como método de control adecuado para determinar si la técnica de tinción y la reactividad del reactivo son correctas con RSV, virus de la gripe A y B, virus paragripal 1, 2 o 3 y adenovirus en células infectadas.

13. VALORES ESPERADOS

El índice de detección de virus respiratorios viene influida por factores geográficos, climáticos y estacionales así como por factores demográficos como la sobrepoblación, el nivel socioeconómico y el estado nutricional. Además, los factores de calidad del espécimen como el tipo de espécimen probado, el tiempo de recolección del espécimen durante el curso de la infección, la manipulación y almacenamiento de estos dichos especímenes y los procesos usados para preparar los frotis pueden influir todos ellos en el éxito de la prueba de diagnóstico por técnicas de detección directa.

En general, los virus respiratorios pueden aparecer en todo el planeta y pueden causar infecciones esporádicas, pequeños brotes, epidemias o pandemias ocasionales con la aparición de nuevas variantes antigénicas de los virus. Independientemente de la aparición estacional de la infección de virus respiratorios, es posible que en el transcurso de una estación puedan no aislarse o detectarse virus como los de la parainfluenza tipos 1 y 2, y de la influenza B debido a las bajas tasas de prevalencia.

El **virus respiratorio sincitial** está asociado en ciertas estaciones del año a brotes significativos de infecciones del tracto respiratorio superior o inferior. Los lactantes, durante sus primeros seis meses de vida, y todos los grupos inmunocomprometidos, son los que tienen más riesgo. Aproximadamente el 50% de los lactantes sufren infección por el VRS durante su primer año de vida²¹. El VRS puede estar detrás del 20% del total de infecciones en el tracto respiratorio durante una estación con enfermedades respiratorias²¹.

Los **virus de la influenza A** o de **la influenza B** pueden causar

brotes infecciosos. Las tasas de infección por influenza A están influenciadas principalmente por el estado inmune de una población, en asociación con las cepas en circulación. Cuando se logra una alta proporción de inmunidad, la influenza puede suponer el 15% de las infecciones del tracto respiratorio pero con la emergencia de nuevas cepas frente a las cuales existe poca o nula inmunidad natural, la influenza puede suponer más del 50% de todas las infecciones del tracto respiratorio²².

Con la influenza B, las tasas más elevadas de afección se suelen encontrar entre los niños en edad escolar²³.

Los **adenovirus** pueden ser responsables del 5% de las infecciones respiratorias agudas en niños de edad inferior a los 4 años y el 10% de todas las infecciones respiratorias en niños hospitalizados¹². Los adenovirus son responsables a veces de pequeñas epidemias localizadas de enfermedad respiratoria aguda en adultos jóvenes, especialmente los que viven en situaciones de confinamiento.

Las infecciones por **virus de la parainfluenza** suponen hasta el 20% de las infecciones del tracto respiratorio, en niños de entre 2 y 4 años de edad que pueden sufrir síntomas graves, incluida la laringobroncotraqueitis (crup)²⁴. Los brotes de infección, especialmente con virus de la parainfluenza 3, se pueden producir en niños y adultos de más edad. Más del 90% de los lactantes quedan infectados por el virus de la parainfluenza y son comunes las reinfecciones sintomáticas⁸. Se pueden producir brotes infecciosos debidos al virus del parainfluenza 3 durante los meses de primavera y verano.

La detección directa de los virus respiratorios en las células del epitelio respiratorio suministra una información diagnóstica rápida, con relevancia clínica, cuando tanto la viabilidad del virus como la ausencia de instalaciones para el cultivo de virus son limitaciones de cara a lograr un diagnóstico correcto.

Durante el invierno de 1994-1995 los tres hospitales que realizaban la evaluación clínica registraron las tasas de prevalencia siguientes.

En un hospital pediátrico de la zona occidental del estado de Nueva York (EE.UU.), se identificó el VRS por inmnofluorescencia directa en los especímenes en el 43,6% (478/1096) de los especímenes respiratorios, el virus de la influenza tipo A se identificó por inmunofluoscencia directa de los especímenes y por aislamiento en cultivo celular en el 3,1% (34/1096) de los especímenes respiratorios, y se identificó la influenza B por inmunofluorescencia directa y por aislamiento en cultivo celular en el 1,1% (12/1096) de los especímenes respiratorios. Se identificó adenovirus por aislamiento en cultivo celular en el 4,4% (39/883) de los especímenes respiratorios y un virus de la parainfluenza, por cultivo celular, en el 2,9% (26/883) de los especímenes respiratorios (incluidos dos especímenes que contenían virus de la parainfluenza 1, 3 que contenían virus de la parainfluenza 2 y 21 con virus de la parainfluenza 3).

En un hospital del nordeste de Reino Unido con variada población de pacientes se identificó el VRS por inmunofluorescencia directa de espécimen en el 49,68% (467/940) de los especímenes respiratorios. El virus de la influenza B se identificó por inmunofluorescencia directa de espécimen o por aislamiento en cultivo celular en un 1,7% (16/940) de los especímenes respiratorios. El adenovirus se identificó por inmunofluorescencia directa de espécimen o por aislamiento en cultivo celular en un 1,17% (11/940) de los especímenes respiratorios. El virus de la parainfluenza tipo 1 se identificó por inmunofluorescencia directa de espécimen o por aislamiento en cultivo celular en un 0,1% (1/940) de los especímenes respiratorios.

En un hospital del nordeste de Reino Unido con variada población de pacientes se identificó el VRS por inmunofluorescencia directa de espécimen en el 10,6% (195/1840) de los especímenes respiratorios. El virus de la influenza B se identificó por inmunofluorescencia directa de espécimen o por aislamiento en cultivo celular en un 3,04% (56/1840) de los especímenes respiratorios. El adenovirus se identificó por aislamiento en cultivo celular en el 1,2% (22/1840) de los especímenes respiratorios y se identificó un virus de la parainfluenza por inmunofluorescencia directa de espécimen en el 1,14% (21/1840) de los especímenes respiratorios. Además de los virus anteriores, se aislaron los siguientes de especímenes respiratorios: Picornavirus 1% (18/1840), citomegalovirus 0,38% (7/1840), rinovirus 1,7% (32/1840), virus del Herpes simple (VHS) tipo 1 en el 1,03% (19/1840) y virus del Herpes simple (VHS) tipo 2 en el 0,5% (1/1840).

14. CARACTERÍSTICAS DE EFICACIA ESPECÍFICAS

14.1. ESTUDIOS CLÍNICOS

IMAGEN Respiratory Screen se evaluó para el uso directo en dos centros de ensayos clínicos del RU: uno situado en el noreste del país y el otro en el sureste, y en un centro de ensayos ubicado en el Estado de Nueva York, EE.UU. Las pruebas se realizaron en especímenes respiratorios recogidos de niños y adultos hospitalizados con síntomas de infección respiratoria. La prueba se evaluó también en cuanto a su eficacia para la detección del antígeno del virus en cultivos celulares inoculados con especímenes respiratorios.

Los especímenes clínicos se recogieron entre la primavera de 1994 y la primavera de 1996 y los centros de ensayo compararon la prueba IMAGEN Respiratory Screen con los métodos estándar usados y con una prueba comercial de inmunofluorescencia directa que incluía un reactivo de cribaje y reactivos para el tipado individual. Se utilizaron especímenes clínicos frescos y especímenes congelados para realizar estas evaluaciones, además de otros congelados y almacenados de 1993-94.

Los centros de ensayo realizaron pruebas directas sobre 343 especímenes y sobre 87 monocapas de cultivo celular para confirmar la presencia de virus. Con los especímenes directos se evaluó IMAGEN Respiratory Screen frente a la prueba de cribaje por inmunofluorescencia indirecta y cultivo de virus. Para los cultivos celulares se evaluó IMAGEN Respiratory Screen frente a una prueba de cribaje por inmunofluorescencia indirecta disponible comercialmente y bien por pruebas de inhibición por hemadsorción, neutralización vírica o bien por inmunofluorescencia directa.

14.2. EFICACIA CLÍNICA

14.2.1 Especímenes directos

Se evaluaron en total 343 aspirados nasofaríngeos (ANF) en tres centros de ensayo. Los especímenes consistían en lo siguiente:

- 144 especímenes positivos para VRS
- 11 especímenes positivos para influenza A
- 5 especímenes positivos para influenza B
- 19 especímenes positivos para el virus de la parainfluenza 1
- 4 especímenes positivos para el virus de la parainfluenza 2
- 26 especímenes positivos para el virus de la parainfluenza 3
- 8 especímenes positivos para adenovirus
- 141 especímenes negativos
- 5 especímenes con coinfecciones:

- 2 coinfecciones de VRS y parainfluenza 1

- 1 coinfección de VRS y adenovirus

- 1 coinfección de adenovirus e influenza B

- 1 coinfección de adenovirus y parainfluenza 3

La Tabla 14.2.1 muestra los resultados de IMAGEN Respiratory Screen y una prueba comercial de cribaje por inmunofluorescencia indirecta en comparación con los obtenidos por aislamiento del virus en especímenes respiratorios directos. Se obtuvo una correlación del 94,1% (317/337) con IMAGEN Respiratory Screen, en la comparación con el método estándar. La sensibilidad de la prueba fue del 96,7% (205/212) comparada con el aislamiento viral.

Tabla 14.2.1 Comparación de IMAGEN Respiratory Screen y de una prueba de cribaje por inmunofluorescencia indirecta, comercial, con aislamiento del virus en los especímenes respiratorios de obtención directa

	IMAGEN Respiratory Screen	Test comercial de inmunofluorescencia indirecta
	+ -	+ -
Aislamiento viral^a	205 7^c	207 5^c
	13^b 112	15^d 110
% de sensibilidad relativa	96,7 (205/212)	97,6 (207/212)
Intervalos de confianza del 95%	(94-99%)	(95-100%)
Especificidad relativa en%	89,6 (112/125)	88,0 (110/125)
Intervalos de confianza del 95%	(83-94%)	(81-93%)
% de correlación	94,1 (317/337)	94,1 (317/337)
Intervalos de confianza del 95%	(91-97%)	(91-97%)

a El aislamiento del virus se realizó en líneas celulares Hep-2, A549, Primary Rhesus Monkey Kidney, MK, HEL, RK13 o G293, y se confirmó por inmunofluorescencia indirecta específica y bien pruebas de inhibición por hemadsorción, neutralización viral o prueba de inmunofluorescencia directa.

b Trece especímenes también dieron resultados positivos, por prueba directa del espécimen, al usar tanto IMAGEN como las pruebas de tipado disponibles comercialmente (consulte la Tabla 14.2.4) incluidos:

VRS	7
Influenza A	3
Parainfluenza 1	1
Adenovirus	2

c Dos especímenes dieron resultado positivo para adenovirus; dos para parainfluenza 2; tres especímenes dieron resultado positivo para parainfluenza 3 (consulte la Tabla 14.2.4).

d Quince especímenes, incluidos trece detallados en la nota al pieb, y otros dos especímenes dieron positivo sólo mediante la inmunofluorescencia indirecta comercial (consulte la Tabla 14.2.4).

e Cinco especímenes dieron resultados negativos con la prueba comercial de inmunofluorescencia indirecta, de ello uno daba negativo para influenza A, dos para el virus de la parainfluenza 2, uno para el virus de la parainfluenza 3 y uno para el adenovirus (consulte la Tabla 14.2.4)

La Tabla 14.2.2 muestra una comparación de IMAGEN Respiratory Screen con una prueba comercial de cribaje por inmunofluorescencia indirecta sobre especímenes nasofaríngeos en cada uno de los centros de ensayo. En los Centros 1 y 2 todos los especímenes probados (con la excepción de 7 especímenes del Centro 2) se habían almacenado congelados. En el Centro 3, 121 especímenes se probaron recién tomados, en las 24 horas siguientes a su recogida y 68 especímenes se probaron tras almacenarlos congelados.

Tabla 14.2.2 Comparación de IMAGEN Respiratory Screen con una prueba comercial de cribaje por inmunofluorescencia indirecta (Bartels VRK) sobre especímenes respiratorios

	IMAGEN Respiratory + (sureste de RU) n = 74	Test comercial de inmunofluorescencia indirecta	
	Screen	+ -	
Centro 1 de ensayos	49	0	
	-	0 25	
Centro 2 de ensayos	46	0	
	-	4 ^f 30	
Centro 3 de ensayos	126	1^f	
	-	1 ^f 61	

f Un cultivo de espécimen positivo para influenza A que también se tipó tanto en la prueba de espécimen directa como por cultivo, mediante el reactivo IMAGEN Influenza A

g Incluye un espécimen del Centro 2 y un espécimen del Centro 3 registrados como positivo sólo mediante la prueba comercial de cribaje mediante inmunofluorescencia indirecta.

La Tabla 14.2.3 muestra un resume de los datos de tres centros de ensayos donde se compara IMAGEN Respiratory Screen con la prueba comercial de cribaje por inmunofluorescencia indirecta sobre especímenes procedentes de aspirados nasofaríngeos.

Tabla 14.2.3 Resumen de la comparación de IMAGEN Respiratory Screen con una prueba comercial de cribaje por inmunofluorescencia indirecta (Bartels VRK) sobre especímenes respiratorios

	Test comercial de inmunofluorescencia indirecta
	+ -
IMAGEN Respiratory Screen	221 1^f
	5^f 116
Sensibilidad relativa	97,8% (221/226)
Intervalos de confianza del 95%	(95-99%)
Especificidad relativa	99,1% (116/117)
Intervalos de confianza del 95%	(95-100%)
% de correlación	98,3% (337/343)
Intervalos de confianza del 95%	(96-99%)

f Un cultivo de espécimen positivo para influenza A que también se tipó tanto en la prueba de espécimen directa como por cultivo, mediante el reactivo IMAGEN Influenza A

g Incluye un espécimen del Centro 2 y un espécimen del Centro 3 registrados como positivo sólo mediante la prueba comercial de cribaje mediante inmunofluorescencia indirecta.

Tabla 14.2.4 Resultados detallados de los especímenes mencionados en las Tablas 14.2.1 a 14.2.3

Referencia de nota al pie	Espécimen Nº	Resultado del cultivo	Resultado con IMAGEN Screen	Resultado de tipado con IMAGEN	Prueba comercial de cribaje por inmunofluorescencia indirecta	Prueba comercial de tipado por inmunofluorescencia indirecta
B	1	Negativo	Positivo	Adenovirus	Positiva	Adenovirus

B	2	Negativo	Positivo	Adenovirus	Positiva	Negativo
B	3	Negativo	Positivo	Influenza A	Positiva	Influenza A
B	4	Negativo	Positivo	Influenza A	Positiva	Influenza A
B	5	Negativo	?Positivo	Influenza A	Positiva	Influenza A
B	6	Negativo	Positivo	VRS	Positiva	VRS
B	7	Negativo	Positivo	VRS	Positiva	VRS
B	8	Negativo	Positivo	VRS	Positiva	VRS
B	9	Negativo	Positivo	VRS	Positiva	VRS
B	10	Negativo	Positivo	VRS	Positiva	VRS
B	11	Negativo	Positivo	VRS	Positiva	VRS
B	12	Negativo	Positivo	VRS	Equivoca	VRS
B	13	Negativo	Positivo	Parainfluenza 1	Positiva	Parainfluenza 1
C y E	14	Parainfluenza 3	Negativo	Negativo	Negativa	Negativo
C y E	15	Adenovirus 2	Negativo	No probada	Negativa	No probada
C y E	16	Parainfluenza 2	Negativo	I n - diagnosticable	Negativa	?Parainfluenza 2
C y E	17	Parainfluenza 2	Negativo	Negativo	Negativa	I n - diagnosticable
C	18	Parainfluenza 3	Negativo	?Parainfluenza 3	Positiva	?Parainfluenza 3
C	19	Parainfluenza 3	Negativo	Parainfluenza 3	Positiva	Parainfluenza 3
C	20	Adenovirus 4	Negativo	Negativo	Positiva	Adenovirus
D y G	21	Negativo	Negativo	?Influenza A	Positiva	?Influenza A
D y G	22	Negativo	Negativo	Negativo	Positiva	Negativa
E y F	23	Influenza A	Positivo	Influenza A	Negativa	Influenza A

14.2.2 Confirmación por cultivo

Los centros de ensayo probaron IMAGEN Respiratory Screen sobre aislados víricos procedentes de especímenes clínicos y cepas de virus almacenadas. Los especímenes clínicos se recogieron principalmente durante el invierno de 1994-95 y los centros de ensayo compararon la prueba IMAGEN Respiratory Screen con los métodos estándar. El aislamiento del virus se realizó usando células HEP-2, MRC-5 o RMK y los aislados se identificaron y se confirmaron usando inhibición por hemadsorción, neutralización viral o inmunofluorescencia directa.

Se probaron 87 cultivos de los que 7 dieron resultados positivos para el VRS, 10 para la influenza A, 15 para la influenza B, 6 para la parainfluenza 1, 8 para la parainfluenza 2, 5 para la parainfluenza 3, 9 para adenovirus y 27 cultivos dieron resultados negativos.

Tabla 14.2.5 Comparación de IMAGEN Respiratory Screen con aislamiento viral y con la prueba comercial por inmunofluorescencia indirecta (Bartels VRK) para confirmación por cultivo celular

		Test comercial de inmunofluorescencia indirecta		Neutralización viral	
		+	-	+	-
Centro 1 de ensayos (sureste de RU) n = 32	I M A G E N +	17	1*	18	0
	Respiratory Screen -	0	14	0	14
Centro 3 de ensayos (estado de Nueva York, EE.UU) n = 52	I M A G E N +	39	0	39	0
	Respiratory Screen -	0	13	0	13
Oxoid (Ely) Ltd n = 3	I M A G E N +	3	0	3	0
	Respiratory Screen -	0	0	0	0

a Espécimen a partir del cual se aisló VRS y tipado por cultivo

Tabla 14.2.6 Resumen de la comparación de IMAGEN Respiratory Screen con aislamiento viral y con la prueba comercial por inmunofluorescencia indirecta (Bartels VRK) para confirmación por cultivo celular

		Test comercial de inmunofluorescencia indirecta		Neutralización viral	
		+	-	+	-
IMAGEN Respiratory Screen	+	59	1*	60	0
	-	0	27	0	27
% de sensibilidad relativa		100(59/59)		100 (60/60)	
Intervalos de confianza del 95%		(94-100%)		(94-100%)	
Especificidad relativa en%		96,4(27/28)		100 (27/27)	
Intervalos de confianza del 95%		(82-100%)		(87-100%)	
% de correlación		98,9 (86/87)		100 (87/87)	
Intervalos de confianza del 95%		(94-100%)		(96-100%)	

a Espécimen a partir del cual se aisló VRS y tipado por cultivo

14.3. REACTIVIDAD CRUZADA

Los microorganismos enumerados en la Tabla 14.3.1 se probaron en IMAGEN Respiratory Screen y no mostraron reactividad cruzada. Los estudios de reactividad cruzada se realizaron sobre preparaciones de placas de cultivos almacenados o en aislados microbianos recientes.

Tabla 14.3.1 Microorganismos probados con IMAGEN Respiratory Screen y que se determinaron como no reactivos

Microorganismo	Fuente
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Depósito de cultivo en caldo NCTC 10116 ²
<i>Bordetella pertussis</i> ¹	Agar chocolate ³
<i>Branhamella catarrhalis</i> ¹	Agar chocolate ³
<i>Candida albicans</i> ¹	Medio fúngico ³
<i>Chlamydia pneumoniae</i> ¹	Preparado comercial ⁴
<i>Chlamydia psittaci</i> ¹	Preparado comercial ⁴
<i>Chlamydia trachomatis</i> A-K, LGV1- LGV3 ¹	Preparado comercial ⁴
<i>Coxsackie virus A9</i>	Preparado comercial ⁵
<i>Coxsackie virus B1, B2, B3, B4, B5</i>	Cepas stock ⁵
<i>Cytomegalovirus</i>	Aislado clínico humano ⁵
<i>Echovirus 9, 11, 19, 22</i>	Aislados clínicos humanos ⁵
<i>Virus de Epstein-Barr</i>	Preparado comercial usado en pruebas serológicas rutinarias ⁵
<i>Virus del herpes simple tipos 1 y 2</i>	Preparado comercial ⁵
<i>Legionella pneumophila</i>	Serogrupo 1. Saco vitelino formalizado. Preparado comercial usado en pruebas serológicas rutinarias ⁴
<i>Mycoplasma arginini</i>	Depósito de cultivo en caldo NCTC 10129 ²
<i>Mycoplasma hominis</i>	Depósito de cultivo en caldo NCTC 10111 ²
<i>Mycoplasma hyorhinus</i>	Depósito de cultivo en caldo NCTC 10130 ²
<i>Mycoplasma orale</i>	Depósito de cultivo en caldo NCTC 10112 ²
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Depósito de cultivo en caldo NCTC 10119 ²
<i>Mycoplasma salivarium</i>	Depósito de cultivo en caldo NCTC 10113 ²
<i>Neisseria cinerea</i> ¹	Agar sangre ³
<i>Neisseria lactamica</i> ¹	Agar sangre ³
<i>Neisseria meningitidis</i> A, B, C ¹	Agar sangre ³
<i>Neisseria perflava</i> ¹	Agar sangre ³
<i>Poliovirus, tipos 1, 2 y 3</i>	Aislados clínicos humanos ⁵
<i>Pneumocystis carinii</i>	Preparado comercial usado en pruebas serológicas rutinarias ⁴
<i>Rhinovirus</i>	Aislado clínico humano ⁵
<i>Streptococcus, grupos A, B, C, D, F y G</i> ¹	Agar columbia ³

1 Datos adquiridos en Oxoid (Ely) Ltd.

2 Los frotis se prepararon a partir de cultivos en caldo de tres días, se centrifugan a 3.000g durante 30 minutos, se lavaron en PBS, se resuspendieron en 100µL de PBS y 15µL de suspensión se añadió a los pocillos de los portaobjetos.

3 Suspensiones lechosas preparadas en PBS a partir de

medio de cultivo, centrifugadas, lavadas, resuspendidas en 1mL de PBS y 20µL de suspensión se añadió a los pocillos de los portaobjetos.

4 Preparaciones comerciales en placas.

5 Frotis preparados a partir de cultivos virales en tubo que mostraban un ECP del 50%, se lavaron, se resuspendieron en 0,2mL de PBS y 15µL de suspensión se añadió a pocillos de portaobjetos.

- BIBLIOGRAFÍA**Palumbo P.E. and Douglas Jr R.G. (1986) Respiratory Tract Infections in S. Spector and G.J. Lancz (ed). Clinical Virology Manual. Elsevier Science Publishing Inc, New York, p 263-282.
- Ray C.G. and Minnich L.L. (1987)** Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 355-357.
- Stansfield S.K. (1987)** Acute respiratory infections in the developing world: strategies for preventing treatment and control. *Pediatric Infectious Disease* **6**: 622-629.
- Gardner P.S., Turk D.C., Aherne W.A., Bird T., Holdaway M.D., Court S.D.M. (1967)** Deaths associated with respiratory tract infection in childhood. *British Medical Journal* **4**: 316-320.
- Mathur U., Bentley D.W., Hall C.B. (1980)** Concurrent respiratory syncytial virus and influenza A infections in the institutionalised elderly and chronically ill. *Ann Intern Med* **1**: 430-431.
- Purkiss D. (1983)** Parainfluenza infections in the elderly 1976-82. *PHLS Communicable Disease Report* **83/19**: 3.
- Zaroukian M.H., Leader I. (1988)** Community-acquired pneumonia and infection with respiratory syncytial virus. *American Journal Medical Science* **295**: 218-222.
- Welliver R. (1982)** Natural history of parainfluenza virus infection in childhood. *Journal of Pediatrics* **101**: 180-187.
- Martin A.J., Gardner P.S., and McQuillin J. (1978)** Epidemiology of respiratory viral infection among paediatric inpatients over a six year period in North East England. *The Lancet* **ii**: 1035-1038.
- Potter C.W. (1990)** Influenza. In Principles and Practice for Clinical Virology (eds A.J. Zuckerman et al). John Wiley and Sons Ltd, Chichester, pp 213-238.
- Murphy B.R. and Webster R.G. (1990)** Orthomyxoviruses in Virology (eds B.N. Fields and D.M. Kriple) Raven Press, New York, pp 1091-11523.
- Wadell G. (1990)** Adenoviruses. In Principles and Practice of Clinical Virology (eds A.J. Zuckerman et al). John Wiley and Sons Ltd. Chapter 4 iv, pp 267-287.
- Horwitz M.S. (1985)** Adenoviral diseases: In Virology (eds B.N. Fields et al). Raven Press, New York, Chapter 24, pp 477-495.
- Shaw M.W., Arden N.H. and Maassab H. (1992)** New aspects of influenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews* **5**: 74-92.
- Galbraith A.W. (1980)** Influenza – Recent developments in prophylaxis and treatment. *British Medical Bulletin* **41**: 381-385.
- Hall C.B., McBride J.T., Gala C.L., Hildreth S.W., Schnabel K.C. (1985)** Ribavirin treatment of respiratory syncytial viral infection in infants with underlying cardiopulmonary disease. *JAMA* **254**: 3047-3051.
- Gardner P.S. and McQuillin J. (1980)** Rapid virus diagnosis: Application of immunofluorescence (2nd Ed) Butterworth, London, pp 92-123.
- Hughes J.H., Mann D.R. and Hamparian V.V. (1988)** Detection of respiratory syncytial virus in clinical specimens by viral culture, direct and indirect immunofluorescence, and enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 588-591.
- Bartholoma N.Y. and Forbes B.A. (1989)** Successful use of shell vial centrifugation and 16 to 18 hour immunofluorescent staining for the detection of Influenza A and B in clinical specimens. *Am J Clin Pathol* **92**: 487-490.
- Krech T., Gerhard-Fsadni D., Hofmann N., Miller S.M. (1985)** Interference of Staphylococcus aureus in the detection of *Chlamydia trachomatis* by monoclonal antibodies. *The Lancet*, 1161-1162.
- Tyeryar F.J. (1983)** Report of a workshop on Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Viruses *Journal of Infectious Diseases* **148**: 588-598.
- Caul E.O. (1986)** Personal communication (on file at Oxoid (Ely) Ltd).
- Chin D.Y., Mosley W.H., Poland J.D., Rush D., Belden E.A., Johnson O. (1963)** Epidemiologic Studies of Type B influenza in 1961-1962. *American Journal of Public Health* **53**: 1068-1074
- McLean, D.M., Bannatyre, R.M. and Givan, K.F. (1967)** Myxovirus dissemination by air. *Canadian medical Association Journal* **89**: 1257-59



X7852A Revisado en marzo de 2017



OXOID Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, UK

Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con su distribuidor local.

Dispone de instrucciones de uso de sustitución y versiones de idiomas alternativos en www.oxoid.com/IFU