



## **Respiratory Virus Panel**

**English**

An indirect immunofluorescence assay for the screening and identification of Adenovirus, Influenza A & B, Parainfluenza type 1, 2 & 3 and RSV.

## Table of Contents

Intended Use	3	Interpretation of Results	22
Introduction	3	Expected Values	24
Assay Principle	7	Limitations of Use	25
Kit Components	8	Performance Characteristics	26
Materials Provided	8	Summary of RVP Procedure	30
Additional Materials Required	10	Interpretation of Symbols	32
Precautions	11	Additional Biotrin Products	33
Safety	11	Bibliography / References	107
Procedural	12		
Storage and Stability	13		
Specimen Collection and Preparation	13		
Assay Procedure	19		

## Intended Use

The Biotrin Respiratory Viral Panel is an in vitro immunofluorescence assay for screening and identification of adenovirus, influenza A, influenza B, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3 and respiratory syncytial virus (RSV) by indirect detection and in cell culture.

## Introduction

Over 200 viruses cause respiratory infection but only seven - adenovirus, influenza A & B, parainfluenza 1, 2 & 3 and respiratory syncytial virus (RSV), are responsible for most of the severe diseases in the very young and immunocompromised host. These viruses are also responsible for significant morbidity in healthy adults during epidemic periods. Nosocomial infections with RSV and influenza, may prove fatal for hospitalised infants and acute care patients.

Early identification of respiratory viruses is essential for effective diagnosis and patient management. The three most common methods of laboratory identification are (a) direct detection, (b) culture confirmation and (c) serology. Of these, direct detection and cell culture confirmation are the standard procedures used by most virology laboratories. The Biotrin Respiratory Virus Panel utilises high quality group-specific and type-specific monoclonal antibodies for direct detection and culture confirmation; providing clear, easy-to-interpret results within 60 minutes.

**Table 1: Seasonality respiratory virus disease**

<b>Virus</b>	<b>Time of Year</b>
<b>Adenovirus</b>	All year
<b>Influenza A</b>	Winter months
<b>Influenza B</b>	Winter months
<b>Parainfluenza 1</b>	All year with peaks in late summer / autumn
<b>Parainfluenza 2</b>	All year with peaks in late summer / autumn
<b>Parainfluenza 3</b>	All year with peaks in late summer / autumn
<b>RSV</b>	Late autumn to early spring

### ***Adenoviruses***

Human Adenoviruses are associated with a wide range of clinical diseases including respiratory, ocular and gastrointestinal tract infections. Infections are particularly common in children and young adults, occurring both sporadically and in outbreaks. In immunocompromised patients severe systemic infections can occur which may be life threatening.

Particular serotypes of adenovirus are associated with the various clinical conditions. Types 15-24 and 37 may lead to ocular disease, ranging from mild conditions such as water borne “swimming pool” conjunctivitis to severe epidemic keratoconjunctivitis. Adenovirus has been associated with 4-15% of all nosocomial cases of viral gastroenteritis in infants; types 40 and 41 are responsible for the majority of these cases.<sup>(1,2)</sup>

Adenovirus is involved in most major types of respiratory disease syndromes. Upper respiratory

diseases caused by adenovirus occur mainly in infants and young children and include colds, pharyngitis and tonsillitis. Adenovirus is also associated with lower respiratory tract infections including bronchitis and bronchiolitis.<sup>(3)</sup> In addition, adenovirus (types 38, 39 and 17) is associated with approximately 5% of acute respiratory disease (ARD) in children and 10% of febrile and childhood pneumonias.<sup>(4)</sup>

Laboratory diagnosis of adenovirus infection plays an important role in effective patient management and the control of outbreaks. Cell culture is the conventional method for the Adenovirus identification and they may be cultured and isolated in a variety of cell lines and identified by a number of methods. Suitable cell lines are Hep-2, HeLa, KB and HEK. The cytopathic effect (CPE) is typically “grape-like” clusters of cells which generally appear within 3 to 10 days. CPE is then confirmed by immunofluorescence, EIA or DNA hybridisation. EM of faeces is also a

standard adenovirus diagnostic method, however this facility is only available in specialised laboratories.<sup>(5,6)</sup>

### ***Influenza A & B***

There are three types of influenza virus; types A, B and C. Influenza A and B are responsible for a highly contagious respiratory disease which occurs during the cold weather months and is often associated with large outbreaks and epidemics. Influenza C rarely results in lower respiratory tract illnesses and is more commonly associated with sporadic upper respiratory tract disease.<sup>(7)</sup>

Influenza virus infection results in abrupt febrile illness and is associated with pharyngitis, laryngitis, croup, bronchitis/ tracheobronchitis as well as bronchitis, influenza and pneumonia. The old and young are partially at risk of severe infection as pulmonary or cardiac complications may result.<sup>(8)</sup>

The classical method for diagnosis of influenza viruses is isolation in PMK, A549 or MDCK cell lines as well as embryonated hen's eggs. CPE appears 3-7 days after inoculation as vacuolation and cell degradation.<sup>(9)</sup>

### ***Parainfluenza 1,2 & 3***

Parainfluenza viruses, combined with RSV are the most important respiratory viral pathogens in infants and children. In older children and adults, illness may be asymptomatic or have symptoms similar to the common cold.

Four types of parainfluenza have been identified. Types 1 and 2 are major causes of croup which is particularly severe in children aged 2-4 years. Parainfluenza 3 may also cause croup but it is more commonly associated with bronchiolitis and pneumonia in infants (most severe infection occurs in children less than 1 year of age). Parainfluenza 4 has been associated with mild upper respiratory tract infections in children and adults.<sup>(7,12)</sup>

Parainfluenza grow well in PMK, LLC-MK2 and HEK cell lines. They are also easily recovered from Vero, A549 and human diploid fibroblasts. CPE appears 4-7 days post inoculation and is observed as an increase in small rounded cells for type 1, syncytial cell formation for type 2 and "stringy edges" for type 3.<sup>(9, 10)</sup>

Confirmation of cell culture has generally been achieved using guinea pig erythrocytes. However, immunofluorescence (IF) with antibodies provide a rapid, inexpensive method capable of type specificity. IF has also been shown to be the best technique for direct detection in respiratory epithelial cells.

### ***Respiratory Syncytial Virus***

RSV is the leading cause of lower respiratory tract infections in infants and younger children. Infection usually results in bronchitis / tracheobronchitis but it may also result in croup, cold and pneumonia. In adults and older children, infection tends to be asymptomatic or expressed

as the "common cold". It is observed in distinct seasonal outbreaks starting in November or December and continuing for approximately 3 months.<sup>(14)</sup>

Direct detection (using IF or EIA) is generally accepted as the method of choice. However, culture confirmation may be used either alone, or as a supplement to direct detection results. For primary virus isolation Hep-2 HeLa are the optimal cell lines, however Vero, LLC-MK2 and CV-1 have also been used. The virus produces a characteristic CPE with syncytium formation and cell destruction. IF is the method of choice as a confirmation immunoreagent.<sup>(15,16)</sup>

### ***Assay Principle***

The **Biotrin Respiratory Virus Panel** utilises an indirect immunofluorescence antibody technique for identifying the 7 major viral respiratory pathogens in infected tissue cultures as well as in direct swab samples. The anti-viral screening reagent is used to confirm the presence of a

respiratory virus. Specific virus identification is then achieved using the anti-adenovirus, anti-influenza A & B, anti-parainfluenza 1, 2 & 3 and anti-RSV monoclonal antibodies.

Fixed patient specimens are incubated with the anti-viral mouse monoclonal antibody on a glass slide. If specific viral antigen, is present a stable complex is formed with the antibody. Following a wash step, FITC labelled goat anti-mouse IgG is added which will bind to the antigen-antibody complex. Any unbound reagent is removed with a further wash step and the specimen is then visualised with the aid of a fluorescence microscope.

A positive reaction is denoted by bright green fluorescence. Uninfected cells appear dull red due to presence of Evan's blue counterstain in the FITC conjugate.

## Kit Components

### Materials Provided

#### 1. Antigen Control Slides:

SLIDE
-------

5 x 8 well antigen control slides (Cat. No. V4RVPS). Each slide consists of a positive control well infected with each of the following: adenovirus, influenza A & B, parainfluenza 1, 2 & 3 and RSV. The negative control well contains uninfected cells.

#### 2. Monoclonal Antibodies\*\*:

CONTROL	+	A
---------	---	---

1 x 1 ml vial containing monoclonal antibodies against adenovirus.

CONTROL	+	IA
---------	---	----

1 x 1 ml vial containing monoclonal antibodies against influenza A.

CONTROL	+	IB
---------	---	----

1 x 1 ml vial containing monoclonal antibodies against influenza B.

CONTROL	+	P1
---------	---	----

1 x 1 ml vial containing monoclonal antibodies against parainfluenza 1.

CONTROL	+	P2
---------	---	----

1 x 1 ml vial containing monoclonal antibodies against parainfluenza 2.

CONTROL	+	P3
---------	---	----

1 x 1 ml vial containing monoclonal antibodies against parainfluenza 3.

CONTROL	+	R
---------	---	---

1 x 1 ml vial containing monoclonal antibodies against RSV.

#### 3. Antiviral Screening Reagent

SCREEN	+
--------	---

1 x 5 ml of pooled monoclonal antibodies directed against: Adenovirus, influenza A & B, parainfluenza 1, 2 & 3 and RSV.

#### 4. Negative Control:

CONTROL	-	IgG
---------	---	-----

1 x 5 ml of non-immune mouse antibody to be used as a negative control.

#### 5. Anti-Mouse IgG FITC Conjugate\*\*:

CONJ	IgG
------	-----

2 x 5 ml of goat anti-mouse IgG antibody conjugate to fluorescein isothiocyanate (FITC).

#### 6. Mounting Media\*\*:

MM
----

1 x 5 ml of Tris-buffer glycerol containing fluorescence enhancer and sodium azide as a preservative.

#### 7. Wash Buffer Concentrate (PBS)\*\*:

BUF	WASH	CONC
-----	------	------

1 sachet of phosphate buffered saline salts which yields 1 litre when dissolved in distilled water. Store in a clean closed container at room temperature.

8. **Tween 20:**

TWEEN

1 x 5 ml of polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) and sodium azide (NaN<sub>3</sub>) concentrate to be diluted 1:100 in PBS.

9. **Product Insert:**

INS

Instructions for use.

**\*\* Sodium azide (present in the conjugate, monoclonal antibodies, wash buffer, and mounting fluid) is a potentially biohazardous material. It can react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. When disposing of these materials, flush with large volumes of water to prevent azide build-up.**

***Additional Materials Required***

- Cell culture for isolation of respiratory viruses: each laboratory must maintain viable stocks of cells at appropriate passage-state that will efficiently allow replication of respiratory viruses from processed patient specimens. These cells must be checked periodically for ability to support growth of respiratory viruses. The cell lines most commonly used are MDCK, LLC-MK2, A549, Hep-2 and diploid fibroblasts (W138, HNF, MRC-5).
- Viral transport medium (VTM), which is non-inhibitory to the respiratory viruses and the tissue culture cells, adenovirus, influenza A & B, parainfluenza 1, 2 & 3 or RSV, used for viral stabilisation. Hank's balanced salt solution with antibiotics and protein stabiliser is a suitable medium.

**Note:** animal sera other than precolostral foetal bovine serum should not be used as a protein stabiliser to avoid interference from inherent antibody.

- Tissue culture maintenance medium. RPMI or Eagles Minimal Essential Medium with the appropriate amount of precolostral foetal bovine serum are suitable for maintenance after virus infection.
- Sterile tissue culture tubes, dram vials or multi-well plates.
- Sterile swabs (cotton or dracon) which are non-inhibitory to respiratory viruses and tissue culture cells.
- Vials for specimen transport and collection.
- Sterile Pasteur pipettes or accurate pipettes and disposable tips.
- Sterile graduated pipettes to deliver 1ml, 5ml and 10ml.
- Fine tipped forceps.
- Sterile glass beads (1-3mm diameter).
- High quality distilled or deionised water.
- Sodium hypochlorite (0.05%) solution.
- Acetone 99.5%

[NOTE: acetone is hygroscopic and should be kept in a tightly sealed container. Acetone contaminated with water may result in a hazy appearance of the substrate in fluorescent assays].

- Glass slides (preferably with 2 and 8 wells for screening and identification) - acetone rinsed and cleaned.
- No. 1 thickness glass coverslips (22 x 50 mm).
- Moist chamber for incubating slides (35-37°C).
- Fluorescence microscope with correct filter combination for FITC (excitation peak = 490nm, emission peak = 520nm).
- Vortex mixer or sonicator.
- Centrifuge.
- Timer
- Wash Bottle
- Incubator with rheostat for temperature regulation (35-37°C)

## Precautions

### Safety

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The kit is intended for use by qualified laboratory staff only.
- Conjugate, monoclonal antibodies, wash buffer and mounting medium contain sodium azide as a preservative. Sodium azide may form potentially explosive metal azides with lead / copper plumbing. For disposal, reagent should be flushed with large volumes of water to prevent azide build up.
- The anti-mouse IgG conjugate contains Evans Blue counterstain which is a potential carcinogen. If skin contact occurs, flush with large volumes of water immediately.
- Acetone is extremely flammable and harmful if swallowed or inhaled. Keep away from heat, sparks, or flames. Avoid breathing vapour. Use adequate ventilation.

- Although control slides have been inactivated, they should be handled and disposed of as with other potentially infectious material.
- Dispose of all clinical specimens, infected or potentially infected material in accordance with Good Laboratory Practice. All such materials should be handled and disposed of as though potentially infectious.
- Do not pipette materials by the mouth and never eat or drink at the laboratory workbench.
- Only experienced personnel should attempt tissue culture procedures.
- Residues of chemicals, preparations and kit components are generally considered as hazardous waste. All such materials should be disposed of in accordance with established safety procedures.
- Wear protective clothing, disposable latex gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.

### Procedural

- Do not use kit or individual reagents past their expiry date.
- Alteration of protocol provided may cause erroneous results.
- Do not mix or substitute reagents from different kit lot numbers.
- Do not substitute reagents from other manufacturers.
- Pooling or diluting of conjugates or monoclonal antibodies may cause erroneous results.
- Avoid leaving reagents above 4°C for prolonged periods.
- Do not expose reagents to bright light during storage or incubation.
- Negative Control (normal mouse antibody) should be tested with each cell culture isolate. Fluorescence indicates a non specific reaction and the test is considered invalid.
- Do not allow slides to dry at any time during the staining procedure.

- If staining multiple specimens on the same slide, care should be taken to avoid cross contamination between samples.
- Always use clean, preferably disposable, glassware for all reagent preparation.

### Storage and Stability

- The kit is stable until the expiry date indicated on the outer box label, provided it is stored at between 2-8°C. Do not freeze or expose to elevated temperatures. Discard any remaining reagents after the kit expiration date.
- The conjugate and monoclonal antibodies are stable for 12 months when stored away from light at 4°C.
- PBS should be stored in a clean, closed container at room temperature.
- During incubation, slides should be protected from light and kept in a humid chamber.
- Acetone is hygroscopic and should be kept in a tightly sealed container.

## **Specimen Collection and Preparation**

Correct sample collection, transport, preparation and storage is essential for successful laboratory diagnosis. The possibility of viral isolation is increased when specimens are collected as soon as possible (3-7 days) after the onset of symptoms. Depending on the type of respiratory syndrome experienced by the patient, several different specimens may be collected.

### ***Specimens of Choice***

#### ***Upper Respiratory Tract Infections***

*Colds* - Nasal washes and aspirates (normally give higher titres) but nasopharyngeal swabs are also acceptable.

*Pharyngitis* - Nasopharyngeal swabs or aspirates should be collected (especially if nasal symptoms are prominent). Throat washings or swabs may be preferable if there is prominent pharyngitis.

*Laryngitis* - Nasopharyngeal swabs or aspirates should be collected.

*Croup/Laryngotracheobronchitis* - Nasopharyngeal aspirates are the preferred specimen.

#### ***Lower Respiratory Tract Infections***

*Bronchitis/tracheobronchitis* - Nasopharyngeal aspirates are the preferred specimen.

*Bronchiolitis* - Nasopharyngeal aspirates are the preferred specimen.

*Pertussis like syndrome* - Nasopharyngeal swabs or aspirates should be collected.

*Influenza/syndrome* - Nasopharyngeal swabs or aspirates should be collected.

*Pneumonia* - Nasopharyngeal swabs or throat swabs are acceptable.

## ***Specimen Collection***

*Nasopharyngeal swabs:* A dry swab should be inserted into one or both nostrils into nasopharyngeal area (a separate swab for each nostril may increase specimen volume). Leave the swab to absorb secretions for a few seconds, rotate gently and remove. Place the swab into 1-2 ml viral transport medium, break off the shaft and seal container tightly.

*Throat swabs:* Moisten a swab in sterile PBS or VTM and rub rigorously on the tonsils and posterior pharynx. Place the swab into 1-2ml of VTM, break off the shaft and seal container tightly.

*Throat wash:* The patient should gargle with 3-5 ml of sterile PBS, which is then collected into a sterile vial containing 1-2ml of VTM and seal tightly.

*Nasal wash:* 2-3ml sterile PBS is flushed into each nostril while the patient holds their head tilted back. The head is then tipped forward and the fluid

collected into a sterile vial containing VTM and seal tightly.

*Nasopharyngeal wash:* 3-7ml of sterile PBS is aspirated into a soft rubber bulb. Place the patient on their side and gently close one nostril with finger pressure. Use the point of the bulb to completely occlude the other side and then squeeze PBS into the nose and aspirate quickly. Secretions are then expelled into a sterile vial containing 1-2ml of VTM and tightly sealed.

*Nasopharyngeal aspirates:* A no. 8 French soft plastic feeding tube is connected through a valve-containing-trap to an electric suction pump apparatus. Introduce the sterile catheter through the nares to the back of the nose. Apply suction intermittently while slowly withdrawing the catheter. The process may be repeated once in each nostril so 0.2-0.8ml of secretion is obtained. The secretion should then be transferred to 1-2ml of VTM and the container sealed tightly.

### ***Specimen Transport and Storage***

All specimens should be transported to the laboratory on ice immediately after collection. Most respiratory viruses are unstable and sensitive to repeated freezing and thawing. Therefore, specimens should be held at 2-8°C prior to inoculation. If specimens cannot be processed within 72 hours, freezing at -70°C or below is recommended. A quick freeze in an acetone/dry ice bath will help maintain viral infectivity. However, freezing specimens greatly reduces the chance of isolation.

### ***Specimen Preparation***

- In order to dislodge cells trapped within the swab fibres, swabs should be rotated while immersed in the transport medium. Swabs should then be discarded into sodium hypochlorite solution.
- For increased cell recovery, add a few sterile glass beads to the specimen and vortex or sonicate (8-12kc/sec) for up to 1 minute.

- Centrifuge the specimen at 2000xg for 10 minutes to remove bacterial contaminants and debris. The supernatant should be used as the inoculum material.

### ***Processing Specimens for Direct Examination***

If specimens are to be used for both direct detection and cell culture confirmation half of the cells should be removed by centrifugation at 300 to 500xg and used with the following procedure. Supernatant and remaining cells from the specimen should be used under the procedure for "Cell Culture Isolation and Fixation," (see page 14).

1. Remove specimen material from original container and place in a 10-15ml sterile centrifuge tube.
2. Add 4ml of sterile PBS to the specimen and mix.
3. Centrifuge specimen at 300-500xg for 10 minutes at 2-8°C.

4. The supernatant is collected to be used for viral isolation procedures.

[NOTE: Refer to "Cell Culture Isolation and Fixation" section for complete instructions. (see page 14)].

5. The cell pellet is washed by adding 4-8ml of PBS and gently resuspending cells.
6. Centrifuge at 300-500xg for 10 minutes at 2-8°C.
7. If mucous is present, it will form a hazy layer above the cell pellet. Carefully remove supernatant and mucous with a sterile Pasteur pipette. If mucous is still present, repeat steps 6-8 until mucous is removed.
8. Resuspend cells in 0.1-0.2ml PBS to make a cloudy suspension. Excessively thick suspensions are difficult to read and do not make high quality slides. Cell suspensions that do not contain enough cells result in a loss of sensitivity. Smears should contain at least two epithelial cells per 250x field.

9. Place one drop of cell suspension onto desired number of wells on pre-cleaned slides. Allow slide to air dry.
10. Fix slides in chilled (2-8°C) acetone for 10 minutes. Do not allow acetone to become contaminated with water and salts. This can produce hazy staining.
11. Allow slides to air dry after fixation. The slides should be stained as soon as possible. If storage is necessary, place slides in desiccated container at -20°C. Slides kept at -20°C will keep for up to one year. Slides must be stored in air-tight containers to prevent moisture penetration.
12. Proceed to "Specimen Screening" section, (see page 15).

### ***Cell Culture Isolation and Fixation***

1. Examine the cell cultures immediately prior to inoculation to ensure good cell viability and morphology.

2. Remove old medium from cell culture using a sterile pipette and refeed the monolayer with culture maintenance medium. Add at least 2ml of fresh medium to glass culture tubes (16x125mm) or add at least 1ml of medium to dram vials.

3. Add 0.2-0.5ml of the specimen to each culture vessel and incubate for 60 minutes at 35-37°C. It is recommended that specimens are inoculated in duplicate.

[NOTE: viral adsorption of the specimen and/or low speed centrifugation may enhance isolation of some viruses and CPE may appear as early as 48 hours].

4. To ensure infection sensitivity and appropriate CPE, a representative (commercial) virus strain should be used to inoculate the cell line. After the inoculation period, cover the cells with fresh maintenance media and incubate in a stationary position at 35-37°C.

5. The culture medium should be renewed every 3 to 4 days to enhance CPE formation.

6. Examine the cells on a daily basis for CPE.

7. When CPE is observed, fix the cells (as follows) in preparation for staining confirmation.

8. Aspirate the culture medium using a sterile pipette and store in a sterile tube. (Subculturing can be carried out from this medium if the cell culture is destroyed during staining).

9. Rinse the cells gently 3 times with 1-2ml volumes of Hank's balanced salt solution. Discard rinses into sodium hypochlorite solution.

10. Add one tenth the culture volume of trypsin (0.05%) Sodium – EDTA (0.53mM) and leave to stand for 30 seconds.

11. Gently tap the culture vessel to loosen the cells.

12. Add sufficient fresh medium to return to the original cell culture volume.

13. Centrifuge the cell suspension at 200-500xg for 7-10minutes.

14. Resuspend the cell pellet in several drops of sterile PBS to give a relatively heavy suspension (approx.  $2 \times 10^6$  cells/ml).

15. Spot the cell suspension onto at least one screening (2 wells) and one identification slide (8 wells) and dry in a convection oven (30-35°C) or air dry rapidly at room temperature.

[NOTE: 5 mm diameter wells are recommended]

16. Fix the slides in chilled acetone (2-4°C) for 10 minutes and air dry completely.

17. Store unused slides with desiccant at -20°C.

### Assay Procedure

#### Reagent Preparation

Preparation of Wash Buffer (PBST):

1. Dissolve the contents of the PBS sachet in 990ml of distilled water.
2. To 495ml of this solution, add 5ml of Tween 20/sodium azide (100x concentrate) and mix thoroughly.

[Note: the remaining PBS solution should be discarded].

3. Transfer to a clean labelled storage container and seal cap tightly.

All remaining reagents are **ready-to use** and are at working dilution.

BIOTRIN Respirator y Virus Panel	NEG	AD	IA	IB
	P1	P2	P3	RSV

Figure 1: Sample antigen control slide

#### Specimen Screening

1. Remove specimen slides (2 wells) and one antigen control slide from storage and allow them to equilibrate to room temperature.

2. Add 1 drop (40µl) of anti-viral screening reagent to one well of the specimen screening slide and each antigen control well of the antigen control slide. [NOTE: the anti-viral screening reagent is used to determine the presence of adenovirus, influenza A, influenza B, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3 or RSV].
3. Add 1 drop (40µl) of normal mouse antibody to a second well of the specimen screening slide and to the negative well of the antigen control slide. [NOTE: this negative control allows detection of any non specific fluorescence].
4. Incubate the specimen and control slides for 30 minutes at 37°C in a humid chamber.
5. Rinse slides thoroughly with Wash Buffer for 10-15 seconds. Shake off any excess wash buffer from the slides and dry between the wells.

6. Add 1 drop (40µl) of anti-mouse IgG FITC conjugate to each well on the specimen and control slides.
7. Incubate the specimen and control slides for 30 minutes at 37°C in a humid chamber.
8. Rinse slides thoroughly with Wash Buffer solution for 10-15 seconds. Shake off any excess wash buffer from the slides and dry between the wells.
9. Mount the slides with no. 1 coverslips and mounting media. Remove excess mounting media from the slides.
10. Examine the slides under a fluorescence microscope at 100-200x. Detailed examination can then be carried out at 400x. [NOTE: the control slide should be examined first for appropriate staining].
11. If screening slides are negative, they should be reported as "no virus observed". Proceed to step 12 for all specimens that are positive.

### ***Virus Identification***

1. Remove the identification slides (8 wells) corresponding to each positive specimen and an antigen control slide from storage. Allow slides to equilibrate to room temperature.
2. Add 1 drop (40µl) of each monoclonal antibody to each well on the specimen identification slide.
3. Add 1 drop (40µl) of each monoclonal antibody to the corresponding well on the antigen control slide.
4. Add 1 drop (40µl) of Negative Control to a separate well on the specimen identification slide and to the negative well of the antigen control slide.
5. Incubate the specimen and control slides for 30 minutes at 37°C in a humid chamber.
6. Rinse slides thoroughly with wash buffer for 10-15 seconds. Shake off any excess wash buffer from the slides and dry between wells.

7. Add 1 drop (40µl) of anti-mouse IgG FITC conjugate to each well on the specimen and control slides.
8. Incubate the specimen and control slides for 30 minutes at 37°C in a humid chamber.
9. Rinse slides thoroughly with wash buffer for 10-15 seconds. Shake off any excess wash buffer from the slides and dry between the wells.
10. Mount the slides with no. 1 coverslips and glycerol mounting media. Remove excess mounting media from the slides.  
[NOTE: slides may be stored in the dark, in an air tight box at 2-8°C for 24 hours without significant loss of fluorescence. However, immediate observation after staining is recommended. For longer storage, slides should be held in an air tight box at -20°C or lower].

## Interpretation of Results

Typical staining patterns exhibited by the infecting virus are described below. The type of staining seen on the slide will be dependent on the virus/viruses present and reflects its growth pattern.

### *Adenovirus*

Bright green fluorescence is nuclear, cytoplasmic, or both. Nuclear staining is uniformly bright with little definition. Cytoplasmic staining is often punctuate.

### *Influenza A and B*

Bright green fluorescence is nuclear, cytoplasmic, or both. Nuclear staining is uniformly bright with little definition. Cytoplasmic staining is often punctuate with large inclusions.

### *Parainfluenza 1, 2, and 3*

Bright green fluorescence is confined to the cytoplasm. Cytoplasmic staining is punctuate with irregular inclusions.

### *Respiratory Syncytial Virus*

Bright green fluorescence is seen in the cytoplasm and associated with syncytia. Cytoplasmic staining is punctuate with small inclusions.

### *Negative Cells*

Cells stain with a dull red in the cytoplasm and a deep maroon almost black in the nucleus. Staining of these cells is due to the presence of Evans Blue counterstain.

It is recommended that negative cells are examined first to establish if there is any background fluorescence present.

A sample is considered positive for a virus if at least 2 or more bright green fluorescent cells are observed per field at 400x magnification.

The positive control should show cells exhibiting fluorescence of the nucleus, cytoplasm or both, depending on the stage of growth. The negative control should show a dull red staining due to the presence of Evans Blue counterstain.

[NOTE: Fluorescent staining of cell fragments should be ignored; this may occur due to the trapping of the conjugate in such debris. If the screening slide shows a positive result and the identification slide shows no positive result, the test should be repeated to confirm results].

## Expected Values

Isolation and identification results will vary depending on geographic location, age of population, time of year (some viruses are seasonal), socio-economic status, specimen handling and the type of detection system used.

For the period September to July (1991-1992) the following detection rates were obtained: \*

Respiratory Virus	Detection rates (sample no.)	Detection rates (%)
Adenovirus	43/646	6.7%
Influenza A	11/646	1.7%
Influenza B	4/646	0.6%
Parainfluenza 1	11/646	1.7%
Parainfluenza 2	5/646	0.8%
Parainfluenza 3	28/646	4.3%
RSV	66/646	10.2%

\*Settings for the evaluations included hospitals, children's hospitals, universities, and reference laboratories in the USA.

## Limitations of Use

- Positive and negative controls should be tested with each specimen and must give the appropriate staining for the test to be valid. [NOTE: additional control slides are available - Cat No: V4RVPS (5 per pack)].
- A negative result does not preclude the presence of adenovirus, influenza A & B, parainfluenza 1, 2 & 3, or RSV. Results should be interpreted in conjunction with patient related clinical information and other diagnostic procedures. Failure to detect virus may be the result of factors such as improper specimen collection or handling, improper culture techniques or the use of an inappropriate cell line or temperature during isolation. All negative results should be reported as "no virus observed".

- The monoclonal antibodies in this kit are group specific for adenovirus and RSV; therefore, they cannot be used for type differentiation.

*Staphylococcus aureus* contaminated samples may exhibit dull yellow-green fluorescence due to the presence of large amounts of protein A. The fluorescence is a result of non-specific binding of protein A to antibody F<sub>c</sub> fragments.

## Performance Characteristics

- Clinical Comparison of Cell Culture Confirmation*

The following results were obtained when cell culture confirmation was carried out on respiratory samples (a total of 646 specimens were tested):

MONOCLONAL ANTIBODIES:	Adeno	RSV	Inf. A	Inf. B	Para 1	Para 2	Para 3
Total Positive	43	66	11	4	11	5	28
Sensitivity %	97.7	100	100	100	100	100	100
Specificity %	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value (+) %	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value (-) %	99.8	100	100	100	100	100	100

The following results were obtained when cell culture confirmation was carried out on frozen respiratory samples (a total of 151 specimens were tested):

MONOCLONAL ANTIBODIES:	Adeno	RSV	Inf. A	Inf. B	Para 1	Para 2	Para 3
Total Positive	7	3	30	36	33	5	16
Sensitivity %	100	100	100	100	100	100	100
Specificity %	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value (+) %	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value (-) %	100	100	100	100	100	100	100

- Cross Reactivity

The following results were obtained from viral and bacterial detection studies with each monoclonal antibody.

MONOCLONAL ANTIBODIES:	Adeno	RSV	Inf. A	Inf. B	Para 1	Para 2	Para 3
Adenoviruses	+	-	-	-	-	-	-
Coronaviruses	-	-	-	-	-	-	-
Coxsackievirus	-	-	-	-	-	-	-
Echoviruses	-	-	-	-	-	-	-
Herpes viruses	-	-	-	-	-	-	-
Influenza virus Type A	-	-	+	-	-	-	-
Influenza virus Type B	-	-	-	+	-	-	-
Measles virus	-	-	-	-	-	-	-
Mumps virus	-	-	-	-	-	-	-
Parainfluenza Type 1	-	-	-	-	+	-	-
Parainfluenza Type 2	-	-	-	-	-	+	-
Parainfluenza Type 3	-	-	-	-	-	-	+
Rhinoviruses	-	-	-	-	-	-	-
Simian virus	-	-	-	-	-	-	-

RSV	-	+	-	-	-	-	-
Acholeplasma laidlawii	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella pertussis	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	-	-	-	-	-
Branhamella catarrhalis	-	-	-	-	-	-	-
Chlamydia trachomatis	-	-	-	-	-	-	-
Corynebacterium diphtheriae	-	-	-	-	-	-	-
Legionella micdadei	-	-	-	-	-	-	-
Legionella pneumophila	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium avium	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium intracellulare	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium tuberculosis	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma fermentans	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma hominis	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma orale	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae	-	-	-	-	-	-	-
Neisseria meningitidis	-	-	-	-	-	-	-
Ureaplasma urealyticum	-	-	-	-	-	-	-

Host Cell Controls	All monoclonal antibodies tested negative against the following cell controls
Adenovirus	pHEK, HEp-2, NCI-H292, RD, HLF, HeLa, & A549 cell controls
Polyomaviruses	PMK cell control
Enteroviruses	RD & HLF cell controls
Paramyxoviruses	HEp-2, Vero, & PMK cell controls

## Summary of Respiratory Virus Panel Procedure

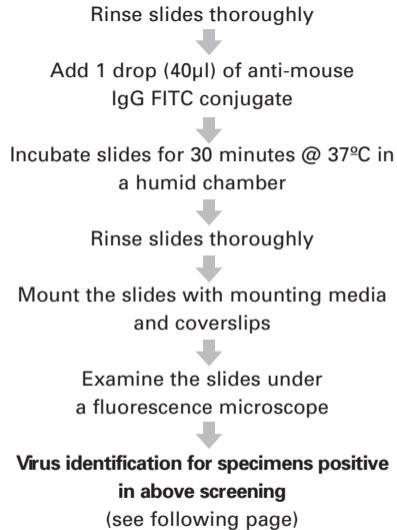
Important Note: Please read the entire product instruction leaflet before starting the assay. This summary is for quick reference only.

### Specimen Screening

Add 1 drop (40µl) of anti-viral screening reagent to one well of the specimen screening slide and each antigen control well of the antigen control slide

Add 1 drop (40µl) of normal mouse antibody to a second well of the specimen screening slide and to the negative well of the antigen control slide

Incubate for 30 minutes @ 37°C in a humid chamber



## Summary of Respiratory Virus Panel Procedure

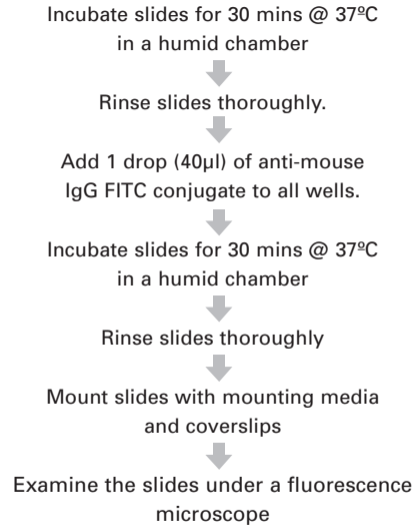
Important Note: Please read the entire product instruction leaflet before starting the assay. This summary is for quick reference only.

### Virus Identification

Add 1 drop (40µl) of each monoclonal antibody to each well on the specimen identification slide.

Add 1 drop (40µl) of each monoclonal antibody to the corresponding well on the antigen control slide.

Add 1 drop (40µl) of normal mouse antibody to a separate well on the specimen identification slide and to the negative well of the antigen control slide.



## Interpretation of Symbols


*In-vitro* diagnostic medical device 

Batch code 

Catalogue Number 

Temperature limitation 

Use by end of 

Manufacturer 

Biohazardous 

## Additional Biotrin Products

Cat #:	Description	Assay Format
V3HHV6	Human Herpesvirus 6 IgG IFA	4 x 10 well slide
V17HHV6	Human Herpesvirus 6 IgM IFA	4 x 10 well slide
V15HHV6	Human Herpesvirus 6 IgG EIA	96 well EIA
V18HHV8	Human Herpesvirus 8 IgG IFA	6 x 10 well slide
V19HHV8	Human Herpesvirus 8 IgG EIA	96 well EIA
V119IF	Parvo IgG & IgM IFA	6 x 10 well slide
V519IG	Parvo IgG EIA	96 well EIA
V619IM	Parvo IgM EIA	96 well EIA
V519IGAUT	Parvo IgG EIA Automate	96 well EIA
V619IMAUT	Parvo IgM EIA Automate	96 well EIA
*V519IGUS	Parvo IgG EIA	96 well EIA
*V619IMUS	Parvo IgM EIA	96 well EIA

\* FDA Cleared Parvovirus B19 Assays



## **Panel zum Nachweis respiratorischer Viren**

**Deutsch**

Indirekter Immunfluoreszenztest zum Screenen auf und zur Identifizierung von Adenovirus, Influenza A & B, Parainfluenza Typ 1, 2 & 3 und RSV.

<b>Inhalt</b>			
Verwendungszweck	37	Interpretation der Ergebnisse	60
Einleitung	37	Referenzwerte	62
Testprinzip	42	Einschränkungen des Tests	63
Bestandteile des Kits	43	Leistungsdaten des Tests	64
Mitgelieferte Materialien	43	Kurzübersicht über das Testverfahren	68
Zusätzlich erforderliche Materialien	45	Interpretation der Symbole	70
Vorsichtsmaßnahmen	47	Weitere Produkte von Biotrin	71
Sicherheit	47	Literatur	107
Allgemeines zur Testdurchführung	48		
Lagerung und Stabilität	49		
Probenentnahme und Vorbereitung	50		
Testdurchführung	57		

## Verwendungszweck

Das Biotrin Panel zum Nachweis respiratorischer Viren ist ein in vitro Immunfluoreszenztest zum Screening auf und zur Identifizierung von den nachfolgend genannten Viren durch indirekten Nachweis und in Zellkultur: Adenovirus, Influenzavirus A, Influenzavirus B, Parainfluenzavirus 1, Parainfluenzavirus 2, Parainfluenzavirus 3 und RSV (Respiratory Syncytial Virus).

## Einleitung

Von den über 2000 Viren, die eine Infektion der Atemwege auslösen, sind nur sieben – das Adenovirus, die Influenzaviren A & B, die Parainfluenzaviren 1, 2 & 3 und das Respiratory Syncytial Virus (RSV) - für die meisten schweren Erkrankungen bei sehr jungen sowie bei immun geschwächten Patienten verantwortlich. Diese Viren sind auch für die enorme Erkrankungsrate bei gesunden Erwachsenen während Epidemien verantwortlich. Nosokomiale Infektionen mit RSV

und Influenza können sich für Säuglinge und pflegebedürftige Patienten tödlich erweisen.

Ein frühzeitiger Nachweis der respiratorischen Viren ist für die Diagnose und eine effektive Behandlung der Patienten essentiell. Zu den drei gängigsten Labor-Methoden zur Virusidentifikation gehören: (a) der direkte Nachweis, (b) der Virusnachweis durch Kultivierung in Zellkultur und (c) die Serologie. Von diesen Dreien sind der direkte Nachweis und die Bestätigung durch Anlegung einer Zellkultur die Standardverfahren, die in den meisten virologischen Labors zur Anwendung kommen. Das Nachweispanel für respiratorische Viren von Biotrin verwendet gruppen- und typspezifische monoklonale Antikörper höchster Qualität für den direkten Virusnachweis und dessen Bestätigung in Kultur und liefert innerhalb von 60 Minuten eindeutige und problemlos zu interpretierende Ergebnisse.

**Tabelle 1: Erkrankungen mit respiratorischen Viren in Abhängigkeit von der Jahreszeit**

Virus	Jahreszeit
Adenovirus	Das ganze Jahr über
Influenza A	Wintermonate
Influenza B	Wintermonate
Parainfluenza 1	Das ganze Jahr über, mit Spitzen im Spätsommer / Herbst
Parainfluenza 2	Das ganze Jahr über, mit Spitzen im Spätsommer / Herbst
Parainfluenza 3	Das ganze Jahr über, mit Spitzen im Spätsommer / Herbst
RSV	Vom Spätherbst bis ins Frühjahr hinein

## Adenoviren

Humane Adenoviren sind mit einer breiten Palette an klinischen Erkrankungen assoziiert, u.a. Infektionen des Respirationstrakts, des Okularbereichs und des Gastrointestinaltrakts. Die Infektionen treten besonders häufig bei Kindern und jungen Erwachsenen auf, und zwar sowohl sporadisch als auch in Form von Massenausbrüchen. Bei immun geschwächten Patienten kann es zu schweren systemischen Infektionen kommen, die lebensbedrohend sein können.

Bestimmte serologisch unterscheidbare Adenovirus-Typen sind mit verschiedenen klinischen Krankheitsbildern verknüpft. So führen die Typen 15-24 und 37 vorwiegend zu Augeninfektionen, die sich von leichten Erkrankungen wie der so genannten "Schwimmbad-Konjunktivitis" bis hin zu einer massiven epidemischen Keratokonjunktivitis erstrecken. Für 4-15% aller nosokomialen

virusbedingten Gastroenteritiden bei Kleinkindern sind Adenoviren verantwortlich; in den meisten dieser Fälle handelt es sich um die Typen 40 und 41.<sup>(1,2)</sup>

Das Adenovirus ist an den meisten klinisch bedeutsamen Atemwegserkrankungen beteiligt. Eine durch Adenoviren verursachte Erkrankung der oberen Atemwege tritt hauptsächlich bei Kleinkindern und Kindern auf und äußert sich in Form von Erkältungen, Rachenkatarrh (Pharyngitis) und Mandelentzündungen (Tonsillitis). Auch Infektionen des unteren Respirationstrakts wie Bronchitis und Bronchiolitis sind mit Adenoviren assoziiert.<sup>(3)</sup> Weiterhin ist das Adenovirus (Typen 38, 39 und 17) für etwa 5% der akuten respiratorischen Erkrankungen (ARE) bei Kindern und 10% der fieberhaft verlaufenden bzw. in der Kindheit vorkommenden Pneumonien verantwortlich.<sup>(4)</sup>

Die Labordiagnose von Adenovirusinfektionen spielt eine wichtige Rolle bei der wirksamen Behandlung der Patienten sowie der Kontrolle von Krankheitsausbrüchen. Eine traditionelle Methode ist die Virusidentifizierung in Zellkultur; das Adenovirus lässt sich in verschiedenen Zelllinien kultivieren und isolieren und mittels zahlreicher Methoden identifizieren. Zu den geeigneten Zelllinien zählen Hep-2, HeLa, KB und HEK. Der zytopathische Effekt (CPE) äußert sich in typischerweise "traubenförmigen" Zellclustern, die in der Regel innerhalb von 3 bis 10 Tagen auftreten; er wird dann mit Hilfe der Immunfluoreszenz, einem EIA oder über DNA-Hybridisierung bestätigt. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Fäkalien ist zwar ebenfalls eine Standardmethode in der Adenovirus-Diagnostik, ist aber nur spezialisierten Laboratorien möglich.<sup>(5,6)</sup>

### **Influenza A & B**

Es gibt drei Typen an Influenzaviren, nämlich die Typen A, B und C. Influenza A und B sind für die extrem ansteckenden Atemwegsinfektionen verantwortlich, die während der Kaltwettermonate auftreten und häufig mit massiven Krankheitsausbrüchen und Epidemien einhergehen. Influenza C führt nur selten zu Infektionen der unteren Atemwege und ist normalerweise nur mit sporadischen Erkrankungen der oberen Atemwege assoziiert.<sup>(7)</sup>

Influenzavirus-Infektionen bedingen eine plötzliche fieberhafte Erkrankung, die von Pharyngitis, Laryngitis, Krupp, Bronchitis/Tracheobronchitis wie auch von einer Bronchitis, Influenza und Pneumonie begleitet sein kann. Das Risiko einer schweren Infektion ist bei alten und sehr jungen Menschen besonders hoch, da sich bei ihnen Lungen- und Herzkomplikationen ergeben können.<sup>(8)</sup>

Die klassische Diagnose der Influenzaviren besteht in ihrer Isolierung aus PMK-, A549- oder MDCK-Zelllinien als auch aus embryonalen Hühnereiern. Der CPE tritt 3 bis 7 Tage nach der Inokulation in Form von Vakuolenbildung und Zellabbau ein.<sup>(9)</sup>

### **Parainfluenza 1, 2 & 3**

Parainfluenzaviren gehören mit dem RSV zu den wichtigsten viralen Pathogenen, die den Respirationstrakt von Säuglingen und Kleinkindern befallen. Bei älteren Kindern und Erwachsenen verläuft die Infektion oft asymptomatisch oder zeigt Symptome, die einer gewöhnlichen Erkältung ähneln.

Vier Serotypen der Parainfluenzaviren sind identifiziert, von denen die Typen 1 und 2 als Haupterreger von Krupp gelten, das bei Kindern zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr besonders schwer verläuft. Parainfluenza 3 kann zwar auch Krupp auslösen, ist aber wesentlich häufiger mit einer Bronchiolitis und Pneumonie bei

Kleinkindern assoziiert (schwere Infektionen treten bei Säuglingen unter 1 Jahr auf). Parainfluenza 4 wurde mit leichten Infektionen der oberen Atemwege bei Kindern und Erwachsenen in Verbindung gebracht.<sup>(7,12)</sup>

Parainfluenzaviren wachsen in den Zelllinien PMK, LLC-MK2 und HEK gut. Sie lassen sich auch leicht aus Vero-, A549- und humanen diploiden Fibroblasten isolieren. Der zytopathische Effekt tritt 4 bis 7 Tage nach der Inokulation auf: Bei Typ 1 lässt sich eine Zunahme kleiner abgerundeter Zellen beobachten, bei Typ 2 die Bildung von Synzytienzellen und bei Typ 3 "ausgefranzte Ränder".<sup>(9, 10)</sup>

Zur Bestätigung der Zellkulturergebnisse werden im allgemeinen Meerschweinchen-Erythrozyten herangezogen. Auf der anderen Seite stellt der

Immunfluoreszenztest (IFT) mit Antikörpern eine rasche und kostengünstige Methode dar, die zudem typspezifisch ist. Der IFT ist außerdem die beste Methode zum direkten Virusnachweis in Epithelzellen des Respirationstrakts.

### **RSV (Respiratory Syncytial Virus)**

Das RSV ist der Haupterreger von Infektionen der unteren Atemwege bei Säuglingen und Kleinkindern. In der Regel verursacht die Infektion eine Bronchitis/ Tracheobronchitis, kann allerdings auch zu Krupp, Erkältung und Pneumonie führen. Bei Erwachsenen und älteren Kindern verläuft die Infektion eher asymptomatisch oder macht sich in Form einer "gewöhnlichen Erkältung" bemerkbar. Sie lässt sich in einzelnen jahreszeitlichen Ausbrüchen beobachten, die im November oder Dezember starten und dann etwa 3 Monate andauern. <sup>(14)</sup>

Der direkte Nachweis (mit IFT oder EIA) gilt als Methode der Wahl. Eine Bestätigung durch Anlegen einer Zellkultur kann allerdings auch entweder allein oder in Kombination mit den Ergebnissen des direkten Nachweises genutzt werden. Zur primären Virusisolierung sind Hep-2 HeLa-Zelllinien optimal, Vero-, LLC-MK2- und CV-1-Zellen eignen sich jedoch auch. Das Virus produziert einen charakteristischen zytopathischen Effekt mit Synzytienbildung und Zellabbau. Als bestätigendes Immunreagenz ist die IF die Methode der Wahl. <sup>(15,16)</sup>

### **Testprinzip**

Das **Biotrin Panel zum Nachweis respiratorischer Viren** nutzt eine indirekte Immunfluoreszenz-Antikörpertechnik zur Identifizierung der 7 Pathogene, die für eine virale Infektion des Respirationstrakts hauptsächlich verantwortlich sind, in infizierten Gewebekulturen sowie in direkten Abstrichproben. Das für das

antivirale Screening eingesetzte Reagenz soll die Anwesenheit eines respiratorischen Virus bestätigen; die spezifische Virusidentifizierung erfolgt dann mit monoklonalen Antikörpern gegen Adenovirus, Influenza A & B, Parainfluenza 1, 2 & 3 bzw. RSV.

Für den Nachweis werden auf Glasobjektträger fixierte Patientenproben mit dem jeweiligen antiviralen monoklonalen Mausantikörper inkubiert. Enthält die Probe spezifische Virusantigene, bilden diese mit dem Maus-Antikörper stabile Komplexe. Nach einem Waschschrift wird FITC-markierter gegen Maus-IgG gerichteter Ziegenantikörper zugegeben, der an den vorhandenen Antigen/Antikörper-Komplex bindet. Nach einem weiteren Waschschrift, in dem jegliches ungebundene Reagenz entfernt wird, wird der Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Bei einer positiven Reaktion zeigt sich eine leuchtend grüne Fluoreszenz. Nicht infizierte Zellen erscheinen aufgrund der Gegenfärbung des FITC-Konjugats mit Evan's Blau in einem matten Rot.

### **Bestandteile des Kits**

#### **Mitgelieferte Materialien**

#### **1 Objektträger zur Antigenkontrolle:**

##### **OBJEKTTRÄGER**

5 Objektträger mit je 8 Auftragsstellen (Wells) zur Antigenkontrolle (Kat. Nr. V4RVPS). Auf jedem der Objektträger dienen 7 Auftragsstellen der Positivkontrolle, eine der Negativkontrolle. Für die Positivkontrolle sind die Zellen in den Wells mit jeweils einem der folgenden Viren infiziert: Adenovirus, Influenza A & B, Parainfluenza 1, 2 & 3 und RSV. Die Negativkontrolle besteht aus uninfizierten Zellen.

2. **Monoklonale Antikörper\*\*:**

KONTROLLE + A

1 x 1ml monoklonale Antikörpermischung die sich gegen Adenovirus richtet.

KONTROLLE + IA

1 x 1ml monoklonale Antikörpermischung die sich gegen Influenza A richtet.

KONTROLLE + IB

1 x 1ml monoklonale Antikörpermischung die sich gegen Influenza B richtet.

KONTROLLE + P1

1 x 1ml monoklonale Antikörpermischung die sich gegen Parainfluenza 1 richtet.

KONTROLLE + P2

1 x 1ml monoklonale Antikörpermischung die sich gegen Parainfluenza 2 richtet.

KONTROLLE + P3

1 x 1ml monoklonale Antikörpermischung die sich gegen Parainfluenza 3 richtet.

KONTROLLE + R

1 x 1ml monoklonale Antikörpermischung die sich gegen RSV richtet.

3. **Antivirales Screening-Reagenz**

SCREENING +

1 x 5 ml monoklonale Antikörpermischung, die sich gegen Adenovirus, Influenza A & B, Parainfluenza 1, 2 & 3 und RSV richtet.

4. **Negativkontrolle:**

KONTROLLE - 1gG

1 x 5 ml unspezifischer Mausantikörper zur Negativkontrolle.

5. **Anti-Maus-IgG FITC-Konjugat\*\*:**

KONJ 1gG

2 x 5 ml gegen Maus-IgG gerichteter Ziegenantikörper, konjugiert an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC).

6. **Einbettungsmedium\*\*:**

EM

1 x 5 ml Tris-gepufferter Glycerinpuffer, der einen Fluoreszenzverstärker enthält und Natriumazid als Konservierungsmittel.

7. **Waschpuffer-Konzentrat (PBS)\*\*:**

PUF WASCH KONZ

1 Beutel mit Phosphat-gepufferten Kochsalzen, die bei Lösung in destilliertem Wasser 1 Liter Waschlösung ergeben. In einem sauberen, geschlossenen Behälter bei Raumtemperatur lagern.

8. **Tween 20**

TWEEN

1 x 5 ml Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat (Tween 20) und Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)-Konzentrat, das 1:100 in PBS verdünnt werden muss.

10. **Packungsbeilage:**

PB

Gebrauchsanweisung.

\*\* Natriumazid (in Konjugat, monoklonalen Antikörpern, Waschpuffer und dem Einbettungsmedium enthalten) ist potentiell biogefährlich. Es kann mit Blei- oder Kupferrohrleitungen zu explosiven Metallaziden reagieren. Bei der Beseitigung azidhaltiger Lösungen sollte deshalb mit viel Wasser nachgespült werden, um eine Ablagerung zu verhindern.

**Zusätzlich erforderliche Materialien**

- Zellkultur zur Isolierung der respiratorischen Viren: Jedes Labor muss funktionsfähige Zellbestände in geeignetem Passagestatus aufbewahren, die eine effiziente Replikation der aus den Patientenproben gewonnenen

respiratorischen Viren erlauben. Diese Zellen müssen regelmäßig darauf überprüft werden, ob sie das Wachstum respiratorischer Viren fördern und sich für deren Anzucht eignen. Zu den gängigsten Zelllinien gehören: MDCK, LLC-MK2, A549, Hep-2 und diploide Fibroblasten (W138, HNF, MRC-5).

- Virales Transportmedium (VTM), das weder auf die respiratorischen Viren (Adenovirus, Influenza A & B, Parainfluenza 1, 2 & 3 und RSV) noch die Zellen der Gewebekultur inhibitorisch wirkt und zur Virusstabilisierung beiträgt. Ein geeignetes Medium ist die gepufferte Salzlösung nach Hank (Hank's balanced salt solution) mit Antibiotika und Proteinstabilisatoren. [HINWEIS: als Proteinstabilisator sollte ausschließlich präkolostrales fötales Rinderserum eingesetzt werden; andere Tierseren könnten störende Antikörper enthalten].

- Medium zur Pflege der Gewebekultur. RPMI oder EMEM (Eagles Minimal Essential Medium) mit der geeigneten Menge an präkolostrales fötales Rinder-serum ist für die Zellpflege nach Virusinfektion geeignet.
- Sterile Röhrchen, Dram-Fläschchen (1 Dram ca. 3,7 ml) oder Mikrotiterplatten für die Zellkultur.
- Steriles Abstrichbesteck (Watte oder Kunststoff), das keine inhibitorische Wirkung auf respiratorische Viren und die Zellkulturzellen hat.
- Fläschchen für Proben transport und Entnahme.
- Sterile Pasteurpipetten oder Pipetten mit Einmal-Spitzen zum exakten Pipettieren der erforderlichen Volumina.
- Sterile Pipetten zur exakten Abgabe von 1ml, 5ml und 10ml.
- Spitze Pinzette.
- Sterile Glasperlen (1-3 mm Durchmesser).

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser höchster Qualität.
- Natriumhypochlorit-Lösung (0,05%).
- Aceton 99,5%  
[HINWEIS: Aceton ist hygroskopisch und sollte in einem fest verschlossenen Behälter aufbewahrt werden. Mit Wasser kontaminiertes Aceton kann zu einem trüben Erscheinungsbild des Substrats im Fluoreszenztest führen].
- Glasobjektträger (vorzugsweise mit 2 und 8 Wells für Screening und Identifizierung) - mit Aceton gespült und gereinigt.
- Deckgläschen der Dicke Nr. 1 (22 x 50 mm).
- Feuchtkammer zur Inkubation der Objektträger (35-37°C).
- Fluoreszenzmikroskop mit der richtigen Filterkombination für FITC (Anregungswellenlänge = 490nm, Emissionswellenlänge = 520nm).
- Vortexer oder Ultraschallbad.
- Zentrifuge.

- Stoppuhr
- Waschflasche
- Inkubator mit Rheostat zur Temperaturregulation (35 - 37°C)

### Vorsichtsmaßnahmen

#### Sicherheit

- Nur zur in vitro-Diagnostik.
- Dieser Test darf nur von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.
- Konjugat, monoklonale Antikörper, Waschpuffer und Einbettmedium enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei-/Kupferrohrleitungen potentielle explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung der Reagenzien sollte deshalb mit viel Wasser nachgespült werden.
- Das anti-Maus-IgG-Konjugat enthält zur Gegenfärbung der Zellen Evans-Blau, das als potentiell kanzerogen gilt. Bei Hautkontakt betroffene Stellen sofort mit großen Mengen an Wasser abwaschen.

- Aceton ist extrem entzündlich und beim Verschlucken oder Einatmen gesundheitsschädlich. Halten Sie es von Wärmequellen, Funken und Flammen fern. Vermeiden Sie das Einatmen der Dämpfe. Sorgen Sie für adäquate Belüftung der Laborräume.
- Obgleich die Proben auf den Kontroll-Objektträgern inaktiviert wurden, sollten sie wie anderes potentiell infektiöses Material behandelt und entsorgt werden.
- Alle klinischen Proben, infizierten oder potentiell infizierten Materialien sollten nach den Regeln der "Guten Laborpraxis" (GLP) beseitigt werden. Sie sind alle als potentiell infektiös zu handhaben und zu entsorgen.
- Es darf niemals mit dem Mund pipettiert werden; Essen und Trinken ist in Laborräumen nicht gestattet.
- Nur erfahrenes Laborpersonal sollte mit den Zellkulturen arbeiten.

- Reste an Chemikalien oder an Präparations- bzw. Kitbestandteilen sind grundsätzlich als biologisch gefährlicher Abfall anzusehen. Alle derartigen Materialien sollten in Übereinstimmung mit den geltenden Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Während dem Umgang mit den Proben und der Durchführung des Tests müssen Schutzkleidung, Einweg-Latexhandschuhe und Schutzbrille getragen werden. Nach der Testdurchführung müssen die Hände gründlich gewaschen werden.

#### **Allgemeines zur Testdurchführung**

- Der Kit oder einzelne Reagenzien daraus dürfen nach Ablauf des angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Abweichungen vom mitgelieferten Protokoll zur Testdurchführung können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

- Die aktiven Komponenten einer Charge dieses Kits sind als Einheit optimiert. Die Komponenten verschiedener Chargen dürfen nicht vermischt werden.
- Es dürfen keine Reagenzien gegen Reagenzien anderer Hersteller ausgetauscht werden.
- Eine Vereinigung oder Verdünnung der Konjugate oder monoklonalen Antikörper kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Reagenzien dürfen nicht über längere Zeiträume über +4°C aufbewahrt werden.
- Die Reagenzien dürfen während der Lagerung oder Inkubation keinem hellen Licht ausgesetzt werden.
- Die Negativkontrolle (normaler Mausantikörper) sollte mit jedem Zellkulturisolat mitgetestet werden, da eine eventuell auftretende Fluoreszenz auf eine unspezifische Reaktion hinweist und den Test somit als ungültig wertet.

- Die Objektträger dürfen zu keinem Zeitpunkt des Färbeprozesses austrocknen.
- Falls mehrere Proben auf dem gleichen Objektträger angefärbt werden, muss darauf geachtet werden, dass keine Kreuzkontamination zwischen den Auftragsfeldern auftreten kann.
- Es dürfen nur saubere Glasgeräte (möglichst Einwegmaterial) für die Reagenz Vorbereitung verwendet werden.

#### **Lagerung und Stabilität**

- Der Kit ist bei Lagerung zwischen +2 bis +8°C bis zu dem auf dem äußeren Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nicht einfrieren oder bei höheren Temperaturen lagern. Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums verwerfen.
- Das Konjugat und die monoklonalen Antikörper sind bei lichtgeschützter Lagerung bei +4°C 12 Monate stabil.

- PBS sollte in einem sauberen, verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur gelagert werden.
- Die Objektträger sollten vor Licht geschützt in einer Feuchtkammer inkubiert werden.
- Aceton ist hygroskopisch und sollte deshalb in einem fest verschlossenen Behälter aufbewahrt werden.

### **Probenentnahme und Vorbereitung**

Ein korrektes Vorgehen bei Probenentnahme, Transport, Vorbereitung und Lagerung ist für eine erfolgreiche Labordiagnose essentiell. Die Wahrscheinlichkeit, Viren isolieren zu können, ist umso höher, je früher nach Auftreten der ersten Symptome (3-7 Tage) die Proben entnommen wurde. Abhängig von der Art des respiratorischen Syndroms, unter dem der Patient leidet, können mehrere unterschiedliche Probenarten gesammelt werden.

### ***Probenmaterial der Wahl***

#### ***Bei Infektionen des oberen Respirationstrakts***

##### *Erkältung*

Nasenspülungen und Aspiate (ergeben normalerweise höhere Titer), aber auch nasopharyngeale Abstriche sind akzeptabel.

##### *Pharyngitis*

Nasopharyngeale Abstriche oder Aspiate sollten gesammelt werden (insbesondere, wenn die nasalen Symptome prominent sind). Rachenspülungen oder Abstriche sind vorzuziehen, wenn die Pharyngitis das Hauptsymptom ist.

##### *Laryngitis*

Nasopharyngeale Abstriche oder Aspiate

##### *Krupp/Laryngotracheobronchitis*

Nasopharyngeale Aspiate sind das bevorzugte Material.

### ***Bei Infektionen des unteren Respirationstrakts***

#### *Bronchitis/Tracheobronchitis*

Nasopharyngeale Aspiate sind das bevorzugte Material.

#### *Bronchiolitis*

Nasopharyngeale Aspiate sind das bevorzugte Material.

#### *Pertussis-ähnl. Syndrom*

Nasopharyngeale Abstriche oder Aspiate sollten gesammelt werden.

#### *Influenza Syndrom Pneumonie*

Nasopharyngeale Abstriche oder Aspiate sollten gesammelt werden. Nasopharyngeale Abstriche oder Rachenabstriche sind akzeptabel.

### ***Probenentnahme***

*Nasopharyngealer Abstrich:* Ein trockener Abstrichtupfer (Wattestäbchen) sollte in ein bzw. beide Nasenlöcher im nasopharyngealen Bereich eingeführt werden (jeweils ein Wattestäbchen pro Nasenloch kann eventuell das Probenvolumen erhöhen). Lassen Sie das Wattestäbchen für ein paar Sekunden zur Sekretaufnahme im Nasenloch, drehen Sie es vorsichtig und ziehen Sie es wieder heraus. Geben Sie das Wattestäbchen dann in 1-2 ml virales Transportmedium (VTM), brechen Sie den Schaft ab und verschließen Sie den Behälter fest.

*Rachenabstrich:* Feuchten Sie ein Wattestäbchen in sterilem PBS-Puffer oder VTM an und reiben Sie damit kräftig über die Tonsillen und den hinteren Rachenraum. Geben Sie das Wattestäbchen dann in 1-2 ml virales Transportmedium (VTM), brechen Sie den Schaft ab und verschließen Sie den Behälter fest.

**Rachenspülung:** Der Patient soll mit 3-5 ml sterilem PBS gurgeln, die Flüssigkeit wird dann in einem sterilen Fläschchen mit 1-2 ml VTM gesammelt und fest verschlossen.

**Nasenspülung:** Bei in den Nacken zurückgelegtem Kopf werden dem Patienten in jedes Nasenloch 2-3 ml sterile PBS-Lösung gespült. Dann wird der Kopf wieder nach vorn gekippt und die Flüssigkeit in einem sterilen Fläschchen, das VTM enthält, gesammelt und anschließend fest verschlossen.

**Nasopharyngeale Spülung:** Saugen Sie 3-7 ml sterilen PBS-Puffer in einen weichen Gummiballon. Legen Sie den Patienten auf die Seite und drücken Sie ein Nasenloch sanft mit dem Finger zu. Verschließen Sie dann das andere Nasenloch mit der Spitze des Ballons und drücken Sie den PBS-Puffer kurz in die Nase und saugen ihn wieder ab. Die Sekrete werden in einem sterilen Fläschchen, das bereits 1-2 ml VTM enthält, aufgefangen und das Fläschchen fest verschlossen.

**Nasopharyngeale Aspiration:** Ein French-Ernährungsschlauch Nr. 8 aus weichem Kunststoff wird über eine mit einem Ventil ausgestattete Falle mit einer elektrischen Saugpumpe verbunden. Führen Sie einen sterilen Katheter durch die Nasenlöcher weit in die Nase ein. Saugen Sie dann mit Unterbrechungen Flüssigkeit an, während denen Sie den Katheter langsam zurückziehen. Dies kann pro Nasenloch einmal wiederholt werden, bis etwa 0,2 bis 0,8 ml Sekret gewonnen wurden. Das Sekret sollte dann in einen Behälter mit 1-2 ml VTM überführt und der Behälter fest verschlossen werden.

#### **Probentransport und -lagerung**

Alle Proben sollten unmittelbar nach der Entnahme auf Eis zu dem Labor transportiert werden. Die meisten respiratorischen Viren sind instabil und reagieren äußerst empfindlich auf wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Deshalb sollten die Proben bis zur Inokulation bei +2 bis +8°C aufbewahrt werden. Proben, die nicht

innerhalb von 72 Stunden nach Gewinnung weiterverarbeitet werden können, sollten bei -70°C oder tiefer eingefroren werden. Ein rasches Einfrieren in Aceton/Trockeneis trägt dazu bei, die Infektiosität zu erhalten. Allerdings lassen sich eingefrorene Proben nicht so gut isolieren.

#### **Vorbereitung der Proben**

- Um auch die in den Fasern des Wattestäbchens versteckten Zellen für die Untersuchung zu erhalten, sollten die Wattestäbchen im Transportmedium kräftig rotiert werden. Die Wattestäbchen können dann in Natriumhypochlorit-Lösung entsorgt werden.
- Geben Sie für eine erhöhte Zellwiederfindung ein paar sterile Glasperlen zu der Probe und vortexen oder beschallen (8-12 kc/sec) Sie dieses Gemisch bis zu 1 Minute.
- Zentrifugieren Sie die Probe dann 10 Minuten bei 2000xg, um auf diese Weise bakterielle

Kontaminationen und Zellbruchstücke abzutrennen. Zur Inokulation wird der Überstand verwendet.

#### **Aufbereitung der Proben für die direkte Untersuchung**

Falls Probenmaterial sowohl dem direkten Nachweis als auch der Zellkultur-Bestätigung zugeführt werden soll, sollte die Hälfte der Zellen mittels Zentrifugation bei 300 bis 500xg abgetrennt und wie unten beschrieben weiterverarbeitet werden.

Mit dem Überstand und den restlichen Zellen des Probenmaterials sollte wie unter "*Isolierung der Viren aus Zellkultur und Fixierung*" beschrieben (siehe Seite 14) verfahren werden.

1. Probenmaterial aus dem ursprüngliche Behälter entnehmen und in ein steriles 10-15ml-Zentrifugenröhrchen überführen.

2. Zu der Probe 4ml sterilen PBS-Puffer zugeben und mischen.
3. Probe 10 Minuten bei +2 bis +8°C bei 300-500xg zentrifugieren.
4. Der Überstand wird für die Isolierung der Viren gesammelt.  
[HINWEIS: Siehe Abschnitt "*Isolierung der Viren aus Zellkultur und Fixierung*" für die vollständige Vorgehensweise. (siehe Seite 14)].
5. Das Zellpellet wird gewaschen und dafür in 4-8ml PBS vorsichtig resuspendiert.
6. Resuspendiertes Pellet 10 Minuten bei +2 bis +8°C bei 300-500xg zentrifugieren.
7. Falls muköses Material vorhanden ist, bildet dies eine trübe Schicht auf dem Zellpellet. Überstand und eventuell vorhandenes muköses Material vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abnehmen. Sollte immer noch muköses Material sichtbar sein, müssen die Schritte 6-8 so oft wiederholt werden, bis jegliches muköse Material entfernt ist.
8. Zellen in 0,1 bis 0,2 ml PBS resuspendieren, um eine wolkige Suspension zu erhalten. Zu dicke Suspensionen lassen sich schlecht auswerten und liefern keine hochwertigen Objektträger. Zellsuspensionen, die nicht genügend Zellen enthalten, führen zu einer verminderte Testempfindlichkeit. Zellausstriche sollten mindestens zwei Epithelialzellen pro 250x-Feld enthalten.
9. Je einen Tropfen der Zellsuspension auf die gewünschte Anzahl an Auftragsflächen (Wells) auf vorher gereinigte Objektträger geben. Die Objektträger sollten an der Luft trocknen können.
10. Objektträger 10 Minuten in abgekühltem (+2 bis +8°C) Aceton fixieren. Das Aceton darf nicht mit Wasser und Salzen in Berührung kommen, da dies zu einer trüben Färbung führen kann.
11. Objektträger nach der Fixierung an der Luft trocknen lassen. Sie sollten dann möglichst

schnell gefärbt werden. Ist eine Aufbewahrung erforderlich, Objektträger in einem Exsikkator oder einem Behälter mit Trocknungsmittel bei -20°C lagern. Bei -20°C können Objektträger bis zu einem Jahr aufbewahrt werden; die Behälter müssen allerdings luftdicht sein und dürfen kein Eindringen von Feuchtigkeit zulassen.

12. Fahren Sie beim Abschnitt "Proben-Screening" (siehe Seite 15) fort.

### **Isolierung der Viren aus Zellkultur und Fixierung**

1. Untersuchen Sie die Zellkultur unmittelbar vor der Inokulation, um sicher zu stellen, dass die Viabilität und Morphologie der Zellen in Ordnung ist.
2. Entfernen Sie mit einer sterilen Pipette das alte Medium von den Zellen und versorgen Sie den Monolayer mit frischem Kulturerhaltungsmedium. Geben Sie mindestens 2 ml frisches Medium in Glas-Kulturröhrchen (16x125 mm) bzw. mindestens 1 ml in Dram-Fläschchen.

3. Dann in jedes Kulturgefäß 0,2 bis 0,5 ml Probe geben und 60 Minuten bei +35 bis +37°C inkubieren. Es wird empfohlen, die Inokulation in zwei Testansätzen parallel durchzuführen.  
[HINWEIS: virale Adsorption der Probe und/oder Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit können bei einigen Viren die Isolierung beschleunigen, ein CPE kann bereits nach 48 Stunden sichtbar sein].
4. Um eine bestimmte Infektionsempfindlichkeit und einen entsprechenden CPE zu gewährleisten, sollte die Inokulation der Zelllinie zur Kontrolle mit einem repräsentativen (kommerziellen) Virusstamm erfolgen. Nach der Inokulation Zellen mit frischem Erhaltungsmedium bedecken und, ohne sie weiter zu bewegen, bei +35 bis +37°C inkubieren.
5. Das Kulturmedium sollte alle 3 bis 4 Tage erneuert werden, um die CPE-Bildung zu beschleunigen.

6. Zellen täglich auf die Ausbildung eines zytopathischen Effektes untersuchen.
7. Sobald ein CPE zu beobachten ist, Zellen (wie nachfolgend beschrieben) zur Vorbereitung auf das Färbeverfahren fixieren.
8. Kulturmedium mit einer sterilen Pipette absaugen und in einem sterilen Röhrchen aufheben. (Falls die Zellkultur während der Färberprozedur Schaden nehmen sollte, kann mit diesem Medium eine Subkultur angelegt werden.)
9. Zellen vorsichtig 3x mit 1 bis 2 ml gepufferter Salzlösung nach Hank spülen; Spülflüssigkeit in Natriumhypochlorit-Lösung entsorgen.
10. Zu den Zellen ein Zehntel des Kulturvolumens an Trypsin (0,05%) Natrium-EDTA (0,53mM) zugeben und 30 Sekunden stehen lassen.
11. Vorsichtig gegen das Kulturgefäß klopfen, um die Zellen von den Wänden zu lösen.
12. Ausreichend frisches Medium zugeben, um wieder das ursprüngliche Volumen der Zellkultur zu erhalten.
13. Zellsuspension 7 bis 10 Minuten bei 200-500xg zentrifugieren.
14. Zellpellet in einigen Tropfen steriler PBS-Lösung resuspendieren; die Suspension sollte recht dick sein (ungefähr  $2 \times 10^6$  Zellen/ml).
15. Zellsuspension auf mindestens einen Objektträger zum Screenen (2 Wells) und einen Objektträger zur Virusidentifizierung (8 Wells) tropfen und in einem Konvektionsofen (+30 bis +35°C) oder bei Raumtemperatur an der Luft rasch trocknen lassen.  
[HINWEIS: Die Wells sollten einen Durchmesser von 5 mm haben].
16. Objektträger 10 Minuten in abgekühltem (+2 bis +4°C) Aceton fixieren und an der Luft komplett trocknen lassen.
17. Nicht verwendete Objektträger mit Trocknungsmittel bei -20°C lagern.

## Testdurchführung

### Vorbereitung der Reagenzien

Herstellung des Waschpuffers (PBST):

1. Inhalt des PBS-Beutels in 990 ml destilliertem Wasser lösen.
2. Zu 495 ml dieser Lösung 5ml Tween 20/Natriumazid (100x-Konzentrat) zugeben und kräftig mischen.  
Hinweis: Die restliche PBS-Lösung sollte verworfen werden.
3. Lösung in einen sauberen, beschrifteten Behälter überführen und diesen fest verschließen.

Alle anderen Reagenzien sind **gebrauchsfertig** und in Arbeitsverdünnung.





BIOTRIN Respirato- risches Virus Panel	NEG	AD	IA	IB
				
	P1	P2	P3	RSV

Abbildung 1: Objektträger für die Antigenkontrolle

## Proben-Screening

1. Objektträger mit Patientenprobe (2 Wells) und einen Objektträger zur Antigenkontrolle aus der Lagerhaltung nehmen und auf Raumtemperatur kommen lassen.
2. Je 1 Tropfen (40µl) des antiviralen Screening-Reagenzes in ein Well des Objektträgers zum Probenscreening geben und in die insgesamt 7 Wells des Objektträgers zur positiven Antigenkontrolle.  
[HINWEIS: Mit dem anti-viralen Screening-Reagenz werden die Anwesenheit von Adenovirus (AD), Influenza A (IA), Influenza B (IB), Parainfluenza 1 (P1), Parainfluenza 2 (P2), Parainfluenza 3 (P3) und RSV bestimmt].
3. 1 Tropfen (40µl) normalen Mausantikörper in das zweite Well des Objekt-trägers zum Proben-Screening und in das Well des Antigenkontroll-Objektträgers mit der Negativkontrolle (NEG) geben.

[HINWEIS: Die Negativkontrolle ermöglicht den Nachweis jeglicher unspezifischen Fluoreszenz].

4. Proben- und Kontroll-Objektträger 30 Minuten bei +37°C in einer feuchten Kammer inkubieren.
5. Objektträger 10-15 Sekunden lang gründlich mit Waschpuffer abspülen, überflüssigen Waschpuffer abschütteln und Objektträger um die Wells herum trocknen.
6. In jedes Well sowohl des Proben- als auch des Kontroll-Objektträgers je 1 Tropfen (40µl) anti-Maus-IgG FITC-Konjugat geben.
7. Objektträger 30 Minuten bei +37°C in einer feuchten Kammer inkubieren.
8. Objektträger 10-15 Sekunden lang gründlich mit Waschpuffer abspülen, überflüssigen Waschpuffer abschütteln und Objektträger um die Wells herum trocknen.

9. Objektträger mit Einbettungsmedium und Deckgläschen Nr. 1 abdecken; überschüssiges Einbettungsmedium von den Objektträgern entfernen.

10. Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer 100-200fachen Vergrößerung auswerten. Für eine umfassendere Untersuchung kann eine 400fache Vergrößerung gewählt werden.

[HINWEIS: Der Kontrollobjektträger sollte zuerst untersucht werden, um die sachgerechte Färbung zu bestätigen].

11. Sind die für das Screening vorgesehenen Objektträger negativ, sollten sie mit "kein Virus beobachtet" befundet werden. Fahren Sie bei allen positiven Proben mit Schritt 12 fort.

### ***Virus-Identifizierung***

1. Für jede positive Probe den korrespondierenden Objektträger mit dieser Probe zur Virusidentifizierung (8 Wells) sowie einen Objektträger zur Antigenkontrolle aus der Lagerhaltung nehmen und auf Raumtemperatur kommen lassen.
2. Von jedem monoklonalen Antikörper 1 Tropfen (40µl) in jeweils ein Well auf dem Objektträger mit den Patientenproben zur Virusidentifizierung geben.
3. Parallel dazu auf den Objektträger zur Antigenkontrolle in die Wells zur Positivkontrolle jeweils 1 Tropfen (40µl) des korrespondierenden monoklonalen Antikörpers geben.
4. Dann jeweils 1 Tropfen (40µl) der Negativkontrolle in das 8. Well des Objektträgers mit den Patientenproben und in das Negativkontroll-Well des Kontrollobjektträgers geben.

5. Proben- und Kontroll-Objektträger 30 Minuten bei +37°C in einer Feuchtkammer inkubieren.

6. Objektträger 10-15 Sekunden lang gründlich mit Waschpuffer abspülen, überflüssigen Waschpuffer abschütteln und Objektträger um die Wells herum trocknen.

7. In jedes Well des Proben- als auch Kontroll-Objektträgers 1 Tropfen (40µl) anti-Maus-IgG FITC-Konjugat geben.

8. Proben- und Kontroll-Objektträger 30 Minuten bei +37°C in einer Feuchtkammer inkubieren.

9. Objektträger 10-15 Sekunden lang gründlich mit Waschpuffer abspülen, überflüssigen Waschpuffer abschütteln und Objektträger um die Wells herum trocknen.

10. Objektträger mit Deckgläschen Nr. 1 und Glycerin-Einbettungsmedium abdecken; überschüssiges Einbettungsmedium von den Objektträgern entfernen.

[HINWEIS: Die Objektträger können ohne wesentliche Einbußen in der Fluoreszenz bis zu 24 Stunden in einem luftdicht verschlossenen Behälter bei +2 bis +8°C im Dunkeln aufbewahrt werden. Allerdings wird eine Auswertung in unmittelbarem Anschluss an die Färbung empfohlen. Bei längerer Aufbewahrung sollten die Objektträger in einem luftdicht verschlossenen Behälter bei -20°C oder tiefer gelagert werden].

### **Interpretation der Ergebnisse**

Die typischen Färbemuster, die sich bei Virusinfektion zeigen, sind im Folgenden beschrieben. Die Färbung auf dem Objektträger ist abhängig von dem/n in der Probe vorhandenen Virus/en und spiegelt deren Wachstum(smuster) wider.

#### *Adenovirus*

Leuchtend grüne Fluoreszenz im Kernbereich,

Zytoplasma oder beidem. Im Kernbereich ist die Färbung gleichmäßig hell mit wenig definierten Bereichen, im Zytoplasma ist sie häufig punktuell.

#### *Influenza A und B*

Leuchtend grüne Fluoreszenz im Kernbereich, Zytoplasma oder beidem. Im Kernbereich ist die Färbung gleichmäßig hell mit wenig definierten Bereichen. Die zytoplasmatische Färbung ist häufig punktuell mit großen Einlagerungen.

#### *Parainfluenza 1, 2 und 3*

Die leuchtend grüne Fluoreszenz ist auf das Zytoplasma begrenzt; die Färbung ist punktuell und weist unregelmäßige Einlagerungen auf.

#### *Respiratory Syncytial Virus*

Eine leuchtend grüne Fluoreszenz ist im Zytoplasma sichtbar und mit den Syncytiumzellen assoziiert. Die zytoplasmatische Färbung ist punktuell mit kleinen Einschlüssen.

#### *Negative Zellen*

Negative Zellen zeigen eine matte Rotfärbung im Zytoplasma und eine tiefe kastanienbraune bis schwarze Färbung des Kerns. Die Färbung dieser Zellen ist auf die Gegenfärbung mit Evans-Blau zurückzuführen.

Es empfiehlt sich, die negativen Zellen zuerst zu untersuchen, um die Anwesenheit bzw. den Grad der Hintergrundfluoreszenz feststellen zu können.

Eine Probe gilt als positiv für ein Virus, wenn bei einer 400fachen Vergrößerung pro Feld mindestens 2 oder mehr leuchtend grün fluoreszierende Zellen sichtbar sind.

Die Positivkontrolle sollte Zellen zeigen, die abhängig vom Wachstumsstadium im Kern, im Zytoplasma oder beidem fluoreszieren. Die Negativkontrolle sollte aufgrund der Evans-Blau-Gegenfärbung eine matte Rotfärbung zeigen.

[HINWEIS: Eine Fluoreszenzfärbung von Zellfragmenten sollte ignoriert werden, da dies durch Konjugateinschlüsse in solchen Bruchstücken zustande kommen kann.

Falls der Objektträger zum Screenen der Proben ein positives Ergebnis zeigt, der Objektträger zur weiteren Identifizierung des Virus aber keine positive Reaktion zeigt, sollte der Test zur Bestätigung der Ergebnisse wiederholt werden].

## Referenzwerte

Die Ergebnisse der Virusisolierung und Identifizierung können in Abhängigkeit von der geographischen Lage, dem Alter der Bevölkerung, der Jahreszeit (manche Viren treten jahreszeitlich bedingt häufiger auf), dem sozioökonomischen Status, aber auch der Probenhandhabung und des verwendeten Nachweissystems variieren.

Im Zeitraum zwischen September 1991 und Juli 1992 wurden die verschiedenen respiratorischen Viren mit folgender Häufigkeit nachgewiesen: \*

Respiratorisches Virus	Nachweisrate (Probenanzahl)	Nachweisrate (%)
Adenovirus	43/646	6,7%
Influenza A	11/646	1,7%
Influenza B	4/646	0,6%
Parainfluenza 1	11/646	1,7%
Parainfluenza 2	5/646	0,8%
Parainfluenza 3	28/646	4,3%
RSV	66/646	10,2%

\*Die Proben für diese Auswertung stammten aus US-amerikanischen Krankenhäusern, Kinderkrankenhäusern, Universitäten und Referenzlabors.

## Einschränkungen des Tests

- Positiv- und Negativkontrollen sollten mit jeder Probe mitgetestet werden und müssen die entsprechende Färbung aufweisen, damit der Test gültig ist. [HINWEIS: Zusätzliche Kontrollobjektträger sind verfügbar – Kat Nr.: V4RVPS (5 Stück pro Packung)]
- Ein negatives Testergebnis schließt die Anwesenheit von Adenovirus, Influenza A & B, Parainfluenza 1, 2 & 3 oder RSV nicht aus. Die Testergebnisse dürfen nur in Verbindung mit verwandten klinischen Daten des Patienten und weiteren labormedizinischen Befunden interpretiert werden. Ein Scheitern des Virusnachweises kann durch verschiedene Faktoren wie unsachgemäße Probengewinnung oder Handhabung, ein fehlerhaftes Anlegen der Zellkultur oder die

Verwendung einer ungeeigneten Zelllinie oder Temperatur während der Isolierung bedingt sein. Alle negativen Ergebnisse sollten als "kein Virus beobachtet" dokumentiert werden.

- Die monoklonalen Antikörper in diesem Kit sind für Adenovirus und RSV gruppenspezifisch; sie können deshalb nicht zur Typ-Differenzierung eingesetzt werden.
- Mit *Staphylococcus aureus* kontaminierte Proben können aufgrund der Anwesenheit großer Mengen an Protein A eine matte gelb-grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Fluoreszenz kommt durch eine unspezifische Bindung von Protein A an Antikörper-Fc-Fragmente zustande.

## Leistungsdaten des Tests

- Klinischer Vergleich der Zellkulturbestätigung

Bei der Zellkulturbestätigung von respiratorischen Proben (getestet wurden insgesamt 646 Proben) wurden folgende Ergebnisse erzielt:

MONOKLONALE ANTIKÖRPER:	Adeno	RSV	Inf. A	Inf. B	Para 1	Para 2	Para 3
Insgesamt Positiv	43	66	11	4	11	5	28
Sensitivität %	97,7	100	100	100	100	100	100
Spezifität %	100	100	100	100	100	100	100
Prognostischer Wert (+) %	100	100	100	100	100	100	100
Prognostischer Wert (-) %	99,8	100	100	100	100	100	100

Folgende Ergebnisse wurden bei der Zellkulturbestätigung eingefrorener respiratorischer Proben (getestet wurden insgesamt 151 Proben) erzielt:

MONOKLONALE ANTIKÖRPER:	Adeno	RSV	Inf. A	Inf. B	Para 1	Para 2	Para 3
Insgesamt Positiv	7	3	30	36	33	5	16
Sensitivität %	100	100	100	100	100	100	100
Spezifität %	100	100	100	100	100	100	100
Prognostischer Wert (+) %	100	100	100	100	100	100	100
Prognostischer Wert (-) %	100	100	100	100	100	100	100

- Kreuzreaktivität

Die folgenden Ergebnisse stammen aus Studien, in denen die einzelnen monoklonalen Antikörper zum Nachweis verschiedener Viren und Bakterien eingesetzt wurden.

MONOKLONALE ANTIKÖRPER:	Adeno	RSV	Inf. A	Inf. B	Para 1	Para 2	Para 3
Adenoviren	+	-	-	-	-	-	-
Coronaviren	-	-	-	-	-	-	-
Coxsackievirus	-	-	-	-	-	-	-
Echoviren	-	-	-	-	-	-	-
Herpesviren	-	-	-	-	-	-	-
Influenzavirus Typ A	-	-	+	-	-	-	-
Influenzavirus Typ B	-	-	-	+	-	-	-
Masernvirus	-	-	-	-	-	-	-
Mumpsvirus	-	-	-	-	-	-	-
Parainfluenza Typ 1	-	-	-	-	+	-	-
Parainfluenza Typ 2	-	-	-	-	-	+	-
Parainfluenza Typ 3	-	-	-	-	-	-	+
Rhinoviren	-	-	-	-	-	-	-
Simian-Virus	-	-	-	-	-	-	-

RSV	-	+	-	-	-	-	-
Acholeplasma laidlawii	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella pertussis	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	-	-	-	-	-
Branhamella catarrhalis	-	-	-	-	-	-	-
Chlamydia trachomatis	-	-	-	-	-	-	-
Corynebacterium diphtheriae	-	-	-	-	-	-	-
Legionella micdadei	-	-	-	-	-	-	-
Legionella pneumophila	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium avium	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium intracellulare	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium tuberculosis	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma fermentans	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma hominis	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma orale	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae	-	-	-	-	-	-	-
Neisseria meningitidis	-	-	-	-	-	-	-
Ureaplasma urealyticum	-	-	-	-	-	-	-

Wirtszellkontrollen	Alle monoklonalen Antikörper wurden gegen folgende Zellkontrollen negativ getestet:
Adenovirus	Zellkontrollen für pHEK, HEp-2, NCI-H292, RD, HLF, HeLa, & A549
Polyomaviren	PMK-Zellkontrolle
Enteroviren	RD- & HLF-Zellkontrollen
Paramyxoviren	HEp-2-, Vero-, & PMK-Zellkontrollen

## Kurzübersicht über das Testverfahren mit dem Respiratorischen Viren-Panel

Wichtiger Hinweis: Lesen Sie bitte vor Beginn der Testdurchführung die gesamte Produktbeschreibung durch. Diese Zusammenfassung dient ausschließlich dem Überblick.

### Proben-Screening

1 Tropfen (40µl) antivirales Screening-Reagenz in ein Well des Objektträgers zum Screenen der Probe und in jedes Antigen-Kontrollwell (mit spezifisch infizierten Zellen) auf dem Objektträger zur Antigenkontrolle geben

1 Tropfen (40µl) normalen Mausantikörper in das zweite Well des Objektträgers zum Screenen der Probe und in das Well zur Negativkontrolle (mit den nicht-infizierten Zellen) auf dem Objektträger zur Antigenkontrolle geben

30 min bei +37°C in einer feuchten Kammer inkubieren

Objektträger gründlich abspülen

1 Tropfen (40µl) anti-Maus-IgG FITC-Konjugat zugeben

Objektträger 30 min bei +37°C in einer feuchten Kammer inkubieren

Objektträger gründlich abspülen

Objektträger mit Einbettungsmedium und Deckgläschen bestücken

Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop auswerten

**Virusidentifizierung in den beim Screenen positiv bewerteten Proben**  
(siehe nächste Seite)

## Kurzübersicht über das Testverfahren mit dem Respiratorischen Viren-Panel

Wichtiger Hinweis: Lesen Sie bitte vor Beginn der Testdurchführung die gesamte Produktbeschreibung durch.

Diese Zusammenfassung dient ausschließlich dem Überblick.

### Virusidentifizierung

1 Tropfen (40µl) von jedem monoklonalen Antikörper in jeweils ein Well auf dem Objektträger zur Probenidentifizierung geben

1 Tropfen (40µl) monoklonalen Antikörper in das korrespondierende Well auf dem Objektträger zur Antigenkontrolle geben

1 Tropfen (40µl) normalen Mausantikörper in ein separates Well auf dem Objektträger zur Probenidentifizierung und in das Negativkontroll-Well auf dem Objektträger zur Antigenkontrolle geben

Objektträger 30 min bei +37°C in einer feuchten Kammer inkubieren

Objektträger gründlich abspülen

In alle Wells 1 Tropfen (40µl) anti-Maus-IgG FITC-Konjugat geben


Objektträger 30 min bei +37°C in einer feuchten Kammer inkubieren

Objektträger gründlich abspülen

Objektträger mit Einbettungsmedium und Deckgläschen bestücken

Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop auswerten


## Interpretation der Symbole

In-vitro Diagnostikum 

Charge 

Katalog Nr. 

Temperaturbegrenzung 

Verwendbar bis 

Hersteller 

Biologische Gefahren 

## Weitere Produkte von Biotrin

Kat.-Nr.:	Produkt	Kit-Format
V3HHV6	Humanes Herpesvirus 6 IgG-IFT	4 x 10 Well-Kit
V17HHV6	Humanes Herpesvirus 6 IgM-IFT	4 x 10 Well-Kit
V15HHV6	Humanes Herpesvirus 6 IgG-EIA	96 Well-EIA
V18HHV8	Humanes Herpesvirus 8 IgG-IFT	6 x 10 Well-Kit
V19HHV8	Humanes Herpesvirus 8 IgG-EIA	96 Well-EIA
V119IF	Parvo IgG- & IgM-IFT	6 x 10 Well-Kit
V519IG	Parvo IgG-EIA	96 Well-EIA
V619IM	Parvo IgM-EIA	96 Well-EIA
V519IGAUT	Parvo IgG-EIA Automatenkit	96 Well-EIA
V619IMAUT	Parvo IgM-EIA Automatenkit	96 Well-EIA
*V519IGUS	Parvo IgG-EIA	96 Well-EIA
*V619IMUS	Parvo IgM-EIA	96 Well-EIA

\* FDA-zugelassene Parvovirus B19-Tests



## **Respiratory Virus Panel**

Teste de imunofluorescência indirecta para pesquisa e identificação de Adenovirus, Influenza A & B, Parainfluenza type 1, 2 & 3 e RSV.

**Português**

## Índice

Finalidade ou Uso	75	Interpretação dos resultados	95
Introdução	75	Valores Esperados	97
Princípio do Teste	80	Limitações de Uso	98
Componentes do kit	81	Características de Performance	99
Materiais Fornecidos	81	Sumário do Procedimento do RVP	103
Materiais necessários, não fornecidos	83	Interpretação dos símbolos	105
Precauções	84	Outros Produtos Biotrin	106
Segurança	84	Bibliografia / Referências	107
Procedimentos	85		
Armazenamento e estabilidade	86		
Colheita da amostra e Preparação	86		
Procedimento do ensaio	92		

## Finalidade ou Uso

O Biotrin Respiratory Viral Panel é um teste de imunofluorescência in vitro, para despiste e identificação de Adenovírus, Influenza A e B, Parainfluenza 1,2 e 3 e RSV por detecção indireta em cultura de células.

## Introdução

Cerca de 200 vírus podem causar infecções respiratórias, porém somente 7 - Adenovírus, Influenza A e B, Parainfluenza 1,2 e 3 e RSV - são responsáveis pelas doenças mais severas em crianças e pacientes imunosuprimidos. Essas viroses também são responsáveis por uma morbidade significativa em adultos saudáveis durante períodos epidêmicos. A infecção nosocomial com RSV e influenza, pode ser fatal em crianças hospitalizadas e pacientes agudos.

A identificação precoce de viroses respiratórias é essencial para um diagnóstico efectivo e cuidados com o paciente. Os três métodos laboratoriais mais comuns para identificação são: (a) detecção directa, (b) confirmação por cultura e (c) serologia. Desses, a detecção directa e a cultura em células são os métodos padrão utilizados em muitos laboratórios de virologia. O kit Biotrin Respiratory Virus Panel utiliza anticorpos monoclonais grupo-específico e tipo-específico de alta qualidade para detecção directa e confirmação de cultura; fornecendo resultados claros, de fácil interpretação em apenas 60 minutos.

**Tabela I. Sazonalidade das doenças respiratórias a vírus**

<b>Vírus</b>	<b>Época do ano</b>
Adenovírus	Ano todo
Influenza A	Meses de inverno
Influenza B	Meses de inverno
Parainfluenza 1	Ano todo com picos no verão/outono
Parainfluenza 2	Ano todo com picos no verão/outono
Parainfluenza 3	Ano todo com picos no verão/outono
RSV	Final do outono e início da primavera

## **Adenovirus**

Os Adenovirus Humkanos estão associados a um grande número de doenças incluindo infecções do tracto respiratório, ocular e gastrointestinal. Estas infecções são particularmente comuns em crianças e jovens, ocorrendo tanto esporadicamente como em surtos. Em doentes imunosuprimidos podem ocorrer infecções sistémicas graves, as quais podem provocar a morte.

Em particular, alguns serotipos de adenovirus estão associados com várias situações clínicas. Os tipos 15-24 e 37 podem originar doenças nos olhos, variando desde simples conjuntivites até complicadas queratoconjuntivites. O Adenovirus está associado a 4-15% de todos os casos de gastroenterites virais nosocomiais, em crianças; Os tipos 40 e 41 são responsáveis pela maior parte destes casos.<sup>(1,2)</sup>

O Adenovirus está envolvido na maior parte dos síndromas respiratórios. Doenças do tracto respiratório superior causadas por Adenovirus ocorrem essencialmente em bebés e crianças, nomeadamente constipações, faringites, e tosse. O Adenovirus está também associado a infecções do tracto respiratório inferior incluindo bronquite e bronquiolite.<sup>(3)</sup> O Adenovirus (tipos 38, 39 e 17) está associado a cerca de 5% das doenças respiratórias agudas (ARD) em crianças e 10% das pneumonias febris e infantis.<sup>(4)</sup>

O diagnóstico laboratorial da infecção por Adenovirus desempenha um papel importante na gestão dos pacientes e no controlo dos surtos. A cultura de células é o método convencional para a identificação de Adenovirus, podendo ser cultivados e isolados numa variedade de linhas celulares, e identificados por diferentes métodos.

Linhas celulares indicadas são Hep-2, HeLa, KB e HEK. O efeito citopático (CPE) é tipicamente um agrupamento de células em “cacho de uva”, as quais geralmente aparecem entre os 3 e os 10 dias. CPE é então confirmado por imunofluorescência, EIA ou hibridização de DNA. A ME das fezes é também um método standard de diagnóstico, no entanto só está disponível em alguns laboratórios especializados. <sup>(5,6)</sup>

## **Influenza A & B**

Existem três tipos de vírus influenza; tipos A, B e C. Influenza A e B são responsáveis por uma doença respiratória altamente contagiosa que ocorre durante os meses frios no inverno, e que está muitas vezes associada a grandes surtos e epidemias. A influenza C raramente dá origem a doenças do tracto respiratório e está mais associada a infecções esporádicas do tracto respiratório superior.<sup>(7)</sup>

A infecção por vírus influenza dá origem a doença febril abrupta e está associada a faringite, laringite, bronquite / traqueobronquite, e ainda a pneumonia. Velhos e jovens estão parcialmente em risco de infecções graves com possibilidade de complicações ao nível pulmonar e cardíaco.<sup>(8)</sup> O método clássico para diagnóstico dos vírus de influenza, é o isolamento em linhas celulares PMK, A549 or MDCK. CPE aparece entre os 3-7 dias após inoculação como vacuolação e degradação celular.<sup>(9)</sup>

## **Parainfluenza 1,2 & 3**

Os vírus Parainfluenza, combinados com RSV são os principais patógenos virais em crianças e bebés. Em crianças com mais idade e em adultos, a doença pode ser assintomática ou ter sintomas similares a uma constipação.

Foram identificados quatro tipos de parainfluenza. Os tipos 1 e 2 são os principais causadores de anginas, as quais são particularmente graves em crianças com idades entre os 2 e 4 anos. A parainfluenza 3 pode também causar anginas, no entanto, é mais associada a bronquiolite e pneumonia em crianças (as infecções mais graves ocorrem em crianças com menos de 1 ano de idade). A parainfluenza 4 está associada a infecções pouco severas do tracto respiratório superior, em crianças e em adultos.<sup>(7,12)</sup>

A parainfluenza cresce em linhas celulares PMK, LLC-MK2 and HEK. São também facilmente recuperadas em Vero, A549 e em fibroblastos diploides humanos. CPE aparece entre os 4-7 dias após inoculação e é observado como um aumento em pequenas células redondas para o tipo 1, formação sincicial de células para o tipo 2, e “stringy edges” para o tipo 3.<sup>(9, 10)</sup>

A confirmação da cultura celular é geralmente conseguida utilizando eritrócitos de cobaio. No entanto, imunofluorescência (IF) com anticorpos é um método rápido e barato, capaz de especificar o tipo. Demonstrou-se que a IF é a melhor técnica para a detecção directa em células respiratórias epiteliais.

## **Respiratory Syncytial Virus**

O RSV é a principal causa de infecções do tracto respiratório inferior em crianças e jovens. A infecção provoca bronquite / traqueobronquite mas também pode dar origem a anginas, constipação e pneumonia. Em adultos e crianças com mais idade, a infecção tende a ser assintomática ou a exprimir-se com uma simples constipação. Tem surtos sazonais começando em Novembro ou Dezembro e continuando por aproximadamente 3 meses.<sup>(14)</sup>

A detecção directa (usando IF ou EIA) é geralmente aceite como método de escolha. No entanto, a confirmação por cultura pode ser utilizada tanto isoladamente como meio complementar dos resultados da detecção directa. Para o isolamento primário do vírus, as linhas celulares Hep-2 HeLa são ótimas, no entanto, Vero, LLC-MK2 e CV-1 têm também sido utilizadas. O vírus produz um CPE característico com formação sincitium e destruição celular. A IF é o método de escolha como imunoreagente de confirmação.<sup>(15,16)</sup>

### Princípio do teste

O kit Biotrin Painel de Vírus Respiratório utiliza a técnica de imunofluorescência indirecta para identificação dos 7 maiores vírus respiratórios patogénicos em culturas de células infectadas assim como em amostras directas. Um reagente de triagem anti-viral é utilizado para confirmar a presença do vírus respiratório. A identificação do

vírus específico é então demonstrado utilizando-se anticorpos monoclonais anti-adenovírus, anti-influenza A e B, anti-parainfluenza 1,2 e 3 e anti-RSV.

As amostras fixadas são incubadas com anticorpo monoclonal de rato anti-viral na lâmina de vidro. Se o antígeno viral específico estiver presente na amostra, um complexo estável é formado com o anticorpo. Após a etapa de lavagem o conjugado anti-IgG de rato é adicionado ligando-se ao complexo antígeno-anticorpo. Qualquer reagente não ligado é removido por lavagens e a amostra é visualizada através de um microscópio de fluorescência.

Uma reacção positiva é caracterizada por uma fluorescência verde brilhante. As células não infectadas apresentam-se vermelhas devido ao corante de contraste Azul de Evans presente no conjugado FITC.

## Componentes do kit

### Materiais fornecidos

#### 1. Lâminas de antígeno controlo:

##### LÂMINA

5 lâminas de antígenos controle com 8 poços cada (Cat. No. V4RVPS). Cada lâmina consiste num controlo positivo infectado por: adenovírus, influenza A e B, parainfluenza 1,2 e 3 e RSV. O poço de controlo negativo contém células não infectadas.

#### 2. Anticorpos monoclonais\*\*:

##### CONTROLLO + A

1 x 1ml contendo anticorpos monoclonais anti adenovirus.

##### CONTROLLO + IA

1 x 1ml contendo anticorpos monoclonais anti influenza A.

##### CONTROLLO + IB

1 x 1ml contendo anticorpos monoclonais anti influenza B.

##### CONTROLLO + P1

1 x 1ml contendo anticorpos monoclonais anti parainfluenza 1.

##### CONTROLLO + P2

1 x 1ml contendo anticorpos monoclonais anti parainfluenza 2.

##### CONTROLLO + P3

1 x 1ml contendo anticorpos monoclonais anti parainfluenza 3.

##### CONTROLLO + R

1 x 1ml contendo anticorpos monoclonais anti RSU.

#### 3. Reagente de Triagem Viral

##### TRIAGEM +

1 x 5 ml de um conjunto de anticorpos monoclonais anti: adenovírus, influenza A e B, parainfluenza 1,2 e 3 e RSV

4. **Controlo Negativo:**

CONTROLO - IgG

1 x 5 ml anticorpos de rato não imune, para ser utilizado como controlo negativo.

5. **Conjugado Anti-Rato IgG FITC \*\*:**

CONJ IgG

2 x 5 ml de anticorpos de cabra anti-IgG de rato conjugados com isocianato de fluoresceína (FITC).

6. **Meio de Montagem\*\*:**

MM

1 x 5 ml de Tampão Tris - glicerol contendo intensificador de fluorescência e azida de sódio como preservativo.

7. **Tampão de Lavagem Concentrado (PBS)\*\*:**

BUF WASH CONC

1 saqueta de tampão fosfato salino em pó. A reconstituir com 1 litro de água

destilada. Guardar num recipiente limpo e fechado, à temperatura ambiente.

8. **Tween 20:**

TWEEN

1 x 5 ml de Tween 20 contendo azida sódica, concentrado para diluir 1:100 em PBS.

13. **Instruções:**

INS

Instruções de uso.

\*\* Azido de Sódio (presente no conjugado, anticorpos monoclonais, tampão de lavagem, e meio de montagem) é um material potencialmente perigoso. Pode reagir com chumbo ou cobre, originado azidos metálicos potencialmente explosivos. Quando descartar estes produtos, deitar água de forma abundante, para prevenir a formação destes compostos.

**Materiais necessários, não fornecidos**

- Cultura de células para isolamento dos vírus respiratórios: cada laboratório deve manter um "stock" de células num estado apropriado, que permita replicação eficaz dos vírus respiratórios a partir de amostras processadas. Estas células têm que ser verificadas periodicamente para capacidade de suportar o crescimento dos vírus respiratórios. As linhagens de células mais utilizadas são: MDCK, LLC-MK2, A549, HEp-2 e fibroblastos diplóides (W138, HNF, MRC-5).
- Meio de transporte para vírus (VTM) que não seja inibidor das células de cultura de tecidos, adenovírus, influenza A e B, parainfluenza 1,2 e 3 e RSV. Solução de sal balanceada de Hank contendo antibióticos e proteínas estabilizadoras é um meio satisfatório. [NOTA: outros soros de animais que não soro fetal bovino pré-colostral não devem ser utilizados como estabilizador de proteínas para evitar a interferência de anticorpos inerentes].

- Meio de manutenção da cultura de tecido. RPMI ou Meio Essencial mínimo de Eagles com quantidade adequada de soro fetal bovino pré-colostral são adequados para a manutenção após infecção viral.
- Tubos de cultura de células estéreis, microplacas
- Zaragatoas estéreis (algodão ou dracon) que não sejam inibidoras dos vírus respiratórios e células de cultura de tecidos.
- Frascos para transporte e coleta das amostras
- Pipetas Pasteur estéreis ou pipetas de precisão e pontas descartáveis.
- Pinças de pontas finas.
- Pipetas graduadas para 1ml, 5 ml e 10 ml
- Placas de vidro estéreis (1-3 mm de diâmetro)
- Água deionizada e destilada de alta qualidade
- Hipoclorito de sódio (0,05%)
- Acetona 99,5% [Nota: a acetone é higroscópica e deve ser armazenada em frasco fechado.

- Acetona contaminada com água pode provocar uma aparência turva do substrato nos testes de fluorescência]
- Lâminas de vidro (de preferência com 2 e 8 poços para triagem e identificação) lavada com acetona e limpa.
- Lamelas nº . 1 (22x50mm)
- Câmara húmida para incubação das lâminas (35-37°C)
- Microscópio fluorescente com filtro apropriado para FITC [pico de excitação 490 nm, pico de emissão 520 nm)
- Vortex
- Centrífuga
- Cronómetro
- Frasco de lavagem
- Incubadora com reostato para regulação da temperatura (35-37°C)

## **Precauções**

### **Segurança**

- Somente para uso diagnóstico in vitro.
- Este kit destina-se a uso por pessoal qualificado de laboratório.
- Alguns reagentes contêm azida sódica como conservante, que se acumulado, pode formar componentes explosivos em tubos de cobre ou chumbo. Deitar muita água quando descartar estes materiais
- O conjugado anti-IgG contém Azul de Evans que é potencialmente carcinogénico. Se ocorrer um contacto com a pele, lavar com grandes volumes de água.
- A acetona é extremamente inflamável e provoca lesões graves se engolida ou inalada. Afastar de fontes de calor, faíscas, ou chamas. Usar ventilação adequada.
- Apesar das lâminas de antigénio controle terem sido inactivadas, devem ser

- descartadas como sendo agentes infecciosos.
- Descartar as amostras clínicas, material infectado ou potencialmente infectado de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais. Todos esses materiais devem ser manipulados e descartados de acordo com os procedimentos de segurança estabelecidos.
- Não pipetar materiais com a boca e nunca comer ou beber na bancada de trabalho do laboratório
- Somente pessoal com experiência devem trabalhar em procedimentos de cultura de células.
- Resíduos de químicos, preparações e componentes do kit são geralmente consideradas como materiais contaminantes e infecciosos. Todos estes materiais devem ser descartados em conformidade com as normas de segurança definidas.
- Usar material e roupa de protecção, luvas descartáveis em latex, e protecção de olhos,

quando manusear amostras e executar o ensaio. Lavar muito bem as mãos quando terminar.

### **Procedimentos**

- Não usar os kits ou qualquer de seus componentes com o prazo de validade expirado.
- A alteração do protocolo fornecido pode originar resultados erróneos.
- Não misturar ou substituir reagentes de diferentes lotes numéricos.
- Não substituir reagentes de outros fabricantes
- Pool ou diluição do conjugado ou anticorpos monoclonais podem causar resultados erróneos.
- Evitar deixar os reagentes fora de 4°C por longos períodos
- Evitar deixar os reagentes expostos a luz solar durante o armazenamento ou a incubação

- O controle negativo (anticorpo de camundongo normal) deve ser testado a cada isolado para cultura. A presença de fluorescência indica uma reação inespecífica e o teste é considerado inválido
- Evitar que as lâminas sequem durante as etapas do procedimento.
- Quando corar múltiplas amostras em uma lâmina evitar contaminação cruzada entre elas.
- Sempre usar material de vidro limpo e preferencialmente descartáveis para a preparação dos reagentes.

### **Armazenamento e estabilidade**

- O kit é estável até a data de validade impressa na etiqueta da caixa desde que armazenado a 2-8°C. Não congelar ou expor a elevadas temperaturas. Descartar qualquer resto de reagentes após expiração da data de validade.

- O conjugado e os anticorpos monoclonais são estáveis por 12 meses quando armazenados ao abrigo da luz a 4 °C
- O PBS deve ser armazenado em um fresco limpo, fechado à temperatura ambiente
- Durante a incubação, as lâminas devem ser protegidas da luz e deixadas em câmara húmida
- A acetona é higroscópica e deve ser armazenada em um frasco bem fechado.

### **Colheita das Amostras e Preparação**

A coleta correta das amostras e a preparação é essencial para o sucesso do diagnóstico laboratorial. A possibilidade de um isolamento viral é maior quando a amostra é colhida tão logo que apareçam os primeiros sintomas (3-7 dias). Dependendo do tipo de síndrome respiratória presente no paciente, diferentes amostras podem ser colhidas.

### ***Escolha das Amostras***

#### Infecções do trato respiratório superior

##### *Resfriado:*

lavado nasal e aspirados (normalmente possuem altos títulos) mas swab nasofaríngeo também é aceitável.

##### *Faringite:*

zaragatoa nasofaríngea ou aspirados podem ser colhidos (especialmente se os sintomas nasais forem proeminentes). Lavado de garganta ou zaragatoas podem ser preferenciais se a faringite for proeminente.

##### *Laringite:*

zaragatoa nasofaríngea ou aspirados podem ser colhidos.

##### *Crup/laringotraqueobronquite:*

aspirado nasofaríngeo é a amostra de preferência.

#### Infecções do trato respiratório inferior

##### *Bronquite / traqueobronquite:*

aspirado nasofaríngeo é a amostra de preferência.

##### *Bronqueolite:*

aspirado nasofaríngeo é a amostra de preferência

##### *Pertussis como síndrome:*

zaragatoa ou aspirado nasofaríngeo pode ser colhido

##### *Síndrome Influenza:*

zaragatoa ou aspirado nasofaríngeo pode ser colhido

##### *Pneumonia:*

zaragatoa nasofaríngeo ou de garganta podem ser colhido

### ***Colheita da amostra***

Zaragatoas nasofaríngeas:

Uma zaragatoa seca pode ser introduzida dentro de uma ou das duas narinas até a zona nasofaríngea (uma zaragatoa para cada narina pode aumentar o volume da amostra). Deixar que a zaragatoa absorva as secreções durante alguns segundos, rodar com cuidado e retirar. Colocar a zaragatoa em 1 a 2 ml de meio de transporte viral, partir a haste e selar o tubo.

#### *Zaragatoas da garganta:*

Humedecer uma zaragatoa em PBS estéril ou VTM e esfregar com cuidado nas amígdalas e na parte posterior da faringe. Colocar a zaragatoa em 1 a 2 ml de VTM e selar o tubo.

#### *Lavados da garganta:*

O paciente deverá gargarejar com 3 a 5 ml de PBS, os quais são recolhidos para um contentor estéril contendo 1 a 2 ml de VTM, e selar.

#### *Lavados nasais:*

Passar 2-3ml de PBS estéril em cada narina enquanto o paciente tem a cabeça inclinada para trás. O paciente endireita a cabeça e o lavado é recolhido num contentor estéril contendo VTM, e selar.

#### *Lavado nasofaríngeo:*

Aspirar 3-7ml de PBS estéril para um “bolbo” de borracha. Colocar o paciente de lado e com cuidado tapar uma das narinas com o dedo. Utilizar a ponta do bolbo de forma a tapar toda a outra narina e espremer o PBS para dentro do nariz e aspirar logo de seguida. As secreções são depois expelidas para um contentor estéril contendo 1 a 2 ml de VTM, e selar.

#### *Aspirados Nasofaríngeos:*

Um tubo plástico de alimentação no. 8 French é ligado através de uma válvula a um bomba eléctrica de sucção. Introduzir o cateter estéril através das narinas até à parte de trás do nariz. Aplicar sucção intermitentemente à medida que vai retirando o cateter. O processo pode ser repetido uma vez em cada narina de forma a que se obtenham 0,2 –0.8 ml de secreção. A secreção assim obtida é transferida para um contentor com 1 a 2 ml de VTM, e selar.

#### ***Transporte e armazenamento das amostras***

Todas as amostras devem ser transportadas para o laboratório imediatamente, em gelo, após a colheita. Muitos vírus respiratórios são instáveis e sensíveis a repetidos congelamentos e descongelamentos. Portanto, as amostras devem permanecer a 2-8°C antes da inoculação. Se as amostras não puderem ser processadas dentro de 72 horas, recomenda-se congelar a -70°C ou menos. Um congelamento rápido em acetona em banho de gelo seco ajuda a manter a infectividade viral. Entretanto, amostras congeladas reduzem muito a chance de isolamento.

#### ***Preparação das amostras***

- Para separar as células presas nas fibras da zaragatoa, a mesma deve ser rodada enquanto é imersa no meio. As zaragatoas devem ser descartadas em solução de hipoclorito de sódio.
- Para aumentar a recuperação das células,

adicionar um pouco de pérolas de vidro à amostra e misturar em vortex ( 8-12 kc/Seg) por 1 minuto.

- Centrifugar a 2000g por 10 minutos para remover as bactérias contaminantes e resíduos. O sobrenadante deve ser utilizado como material de inoculação.

#### ***Processamento das amostra para exame direto***

Se as amostras forem ser utilizadas para exame directo e cultura de células, metade das células devem ser removidas por centrifugação a 300 a 500g e utilizadas com o procedimento a seguir. O sobrenadante e as células remanescentes da amostra devem ser utilizadas no procedimento “Isolamento e Fixação de cultura de células”.

1. Remover o material do recipiente original e colocar em um tubo de centrífuga estéril de 10-15ml.

2. Adicionar 4 ml de Tampão Fosfato salina e misturar.
3. Centrifugar a 300-500g por 10 minutos a 2-8°C
4. O sobrenadante é recolhido para ser utilizado nos procedimentos de isolamento  
[Nota: Ver o ítem "Isolamento e Fixação de cultura de células" para instruções completas].
5. O centrifugado é lavado com PBS por adição de 4-8 ml de PBS e ressuspensão cuidadosa das células.
6. Centrifugar a 300-500g por 10 minutos a 2-8°C
7. Se houver presença de muco, ele formará uma camada sobre o centrifugado. Retirar com cuidado com uma pipeta Pasteur. Se ainda houver presença de muco, repetir as etapas 6-8 até que todo o muco seja removido.
8. Ressuspender as células em 0,1-0,2 ml de PBS até formar uma suspensão turva. Suspensão

- excessivamente densa é difícil de ler e não produz lâminas de qualidade. Suspensão de células com material insuficiente resulta em baixa sensibilidade. O esfregaço deve conter no mínimo 2 células epiteliais por campo de 250x .
9. Colocar uma gota da suspensão no poço designado da lâmina. Deixar a lâmina secar ao ar.
  10. Fixar as lâminas em acetona (2-8°C) por 10 minutos.
  11. Deixar as lâminas secarem ao ar após a fixação. Elas devem ser coradas assim que possível. Se for necessário armazenar, colocar as lâminas em recipiente dessecante a < -20°C. As lâminas assim armazenadas podem ser guardadas por 1 ano. As lâminas devem se guardadas em recipientes com retirada de ar para prevenir a penetração de humidade.
  12. Proceder para a secção "Triagem da amostra" (ver página 15).

### ***Cultura de células Isolamento e Fixação***

1. Examinar as culturas de células imediatamente antes de inocular para garantir uma boa viabilidade celular e morfologia.
2. Remover o meio antigo da cultura de células utilizando uma pipeta estéril e recolocar a camada retirada com o meio de manutenção. Adicionar no mínimo 2 ml de meio fresco aos tubos de cultura ou 1 ml de meio aos frascos.
3. Adicionar 0,2-0,5 ml de amostra a cada fresco e incubar por 60 minutos a 35-37°C. Recomenda-se que as amostras sejam inoculadas em duplicado.
4. Para garantir a sensibilidade da infecção e CPE apropriado, uma estirpe de vírus representativa (comercial) pode ser utilizada para inocular a linhagem de células. Após o período de inoculação, cobrir as células com o meio de manutenção fresco e incubar em repouso a 35-37°C.

5. O meio de cultura deve ser renovado a cada 3 a 4 dias para aumentar a formação de CPE.
6. Examinar as células diariamente para CPE
7. Quando a CPE for observada, fixar as células (como a seguir) na preparação para a confirmação da coloração.
8. Aspirar o meio de cultura utilizando uma pipeta estéril e colocar em um tubo estéril.
9. Lavar as células 3 vezes com 1-2 ml de solução de Hank. Descartar os lavados em solução de hipoclorito de sódio.
10. Adicionar 1/10 do volume da cultura de tripsina (0,05%) sódica-EDTA (0,53 mM) e deixar em repouso por 30 segundos.
11. Gentilmente balançar o fresco para soltar as células.
12. Adicionar meio fresco suficiente para retornar ao volume original.

13. Centrifugar a 200-500g por 7-10 minutos
14. Ressuspender o centrifugado com algumas gotas de PBS estéril para ter uma suspensão relativamente densa (aprox.  $2 \times 10^6$  cel/ml).
15. Colocar a suspensão de células em no mínimo uma lâmina para triagem (contendo 2 cavidades) e uma lâmina para identificação (contendo 8 poços) e deixar secar a 30-35°C ou em corrente de ar a temperatura ambiente. [Note: recomenda-se poços de 5 mm de diâmetro].
16. Fixar as lâminas em acetona (2-4°C) por 10 minutos e secar completamente
17. Armazenar as lâminas não utilizadas com dessecante a -20°C.

### Procedimento do Ensaio

#### • Preparação dos reagentes

##### *Preparação do Tampão de Lavagem (PBST):*

1. Dissolver o conteúdo da saqueta de PBS em 990 ml de água destilada
2. A 495 ml dessa solução adicionar 5 ml de Tween 20/azida de sódio (100x conc.) e misturar [Note: a solução de PBS restante deve ser descartada].
3. Transferir para um contentor limpo, identificado e bem fechado

Todos os demais reagentes estão pronto para uso e na diluição de trabalho.

BIOTRIN Painel do Vírus Respiratório	NEG	AD	IA	IB
	P1	P2	P3	RSV

Figura 1. Lâmina de antígenos controle

#### • Triagem das amostras

1. Retirar a lâmina de amostra (com 2 poços) e uma de antígenos controle da embalagem e deixar equilibrar a temperatura ambiente
2. Adicionar 1 gota (40µl) do reagente de triagem anti-viral a um poço da lâmina de amostra e a cada poço de antígeno controle da lâmina controle [Note: o reagente de triagem anti-viral é utilizado para determinar a presença de adenovírus, influenza A e B, parainfluenza 1,2 e 3 ou RSV].
3. Adicionar 1 gota (40µl) de anticorpo de rato normal ao segundo poço da lâmina de amostra e ao poço do controle negativo da lâmina de controle. [Note: o controle negativo permite a detecção de qualquer fluorescência inespecífica].
4. Incubar as lâminas por 30 minutos a 37°C em câmara húmida.
5. Lavar as lâminas com Tampão de lavagem por 10-15 segundos. Retirar o excesso de tampão

das lâminas e secar entre os poços.

6. Adicionar 1 gota (40µl) de conjugado anti-IgG a cada poço das lâminas de amostra e controle
7. Incubar as lâminas por 30 minutos a 37°C em câmara húmida
8. Lavar as lâminas com Tampão de lavagem por 10-15 segundos. Retirar o excesso de tampão das lâminas e secar entre os poços.
9. Montar as lâminas utilizando as lamelas e o meio de montagem. Remover o excesso de meio das lâminas.
10. Examinar as lâminas em microscópio de fluorescência a 100-200x. Detalhes podem ser vistos a 400x. [Note: a lâmina controle deve ser examinada primeiro para verificação da correcta coloração].
11. Se a lâmina da amostra for negativa ela deve ser reportada como "não foram observados vírus". Proceder a etapa 12 para todas as amostras positivas.

## Identificação do vírus

1. Retirar da embalagem uma lâmina de identificação (8 poços) correspondente a cada amostra positiva e uma lâmina de antígenos controle. Deixar as lâminas atingirem a temperatura ambiente.
2. Adicionar 1 gota (40µl) de cada anticorpo monoclonal a cada poço correspondente da lâmina controle.
3. Adicionar 1 gota (40µl) de cada anticorpo monoclonal a cada poço correspondente da lâmina da amostra
4. Adicionar 1 gota (40µl) do Controle Negativo ao poço correspondente da lâmina controle
5. Incubar as lâminas por 30 minutos a 37°C em câmara húmida
6. Lavar as lâminas com Tampão de lavagem por 10-15 segundos. Retirar o excesso de tampão das lâminas secar entre os poços.

7. Adicionar 1 gota (40µl) de conjugado anti-IgG a cada poço das lâminas de amostra e controle
8. Incubar as lâminas por 30 minutos a 37°C em câmara húmida
9. Lavar as lâminas com Tampão de lavagem por 10-15 segundos. Retirar o excesso de tampão das lâminas e secar entre as cavidades.
10. Montar as lâminas utilizando as lamelas e o meio de montagem. Remover o excesso de meio das lâminas.[Nota: as lâminas podem ser armazenadas ao abrigo da luz, em recipiente à vácuo a 2-8°C por até 24 horas sem perda significativa de fluorescência. Entretanto, a observação imediatamente após a coloração é recomendada. Para períodos de armazenamento mais longos, as lâminas devem ficar a - 20°C em recipiente à vácuo].

## Interpretação dos Resultados

O padrão de coloração típico exibido para os vírus infecciosos está descrito abaixo. O tipo de coloração dependerá do vírus presente e reflecte o seu tipo de crescimento.

### *Adenovirus*

Fluorescência verde brilhante no núcleo, citoplasma ou em ambos. A coloração nuclear é uniformemente brilhante com pouca definição. A coloração citoplasmática é geralmente pontual.

### *Influenza A and B*

Fluorescência verde brilhante no núcleo, citoplasma ou em ambos. A coloração nuclear é uniformemente brilhante com pouca definição. A coloração citoplasmática é geralmente pontual com grandes inclusões.

### *Parainfluenza 1, 2, and 3*

Fluorescência verde brilhante somente no citoplasma. A coloração citoplasmática é geralmente pontual com inclusões irregulares.

### *Respiratory Syncytial Virus*

Fluorescência verde brilhante no citoplasma. A coloração citoplasmática é geralmente pontual com pequenas inclusões.

### *Células Negativas*

As células coradas apresentam-se avermelhadas no citoplasma e castanho quase preto no núcleo. A coloração dessas células é devido a presença do contraste Azul de Evans.

Recomenda-se que as células negativas sejam examinadas primeiro para estabelecer se não há presença de coloração de fundo fluorescente.

A amostra é considerada positiva para presença de vírus se forem observadas pelo menos 2 células ou mais com fluorescência verde brilhante em campo observado a 400x

O controle positivo deve apresentar células com fluorescência no núcleo, citoplasma ou em ambos, dependendo do estágio de crescimento. O controle negativo deve apresentar células vermelhas.

[Note: coloração fluorescente de fragmentos de células deve ser ignorada; isto pode ocorrer devido à ligação do conjugado a esses resíduos. Se a lâmina de triagem apresenta um resultado positivo e a lâmina de identificação um resultado negativo o teste deve ser repetido para confirmação].

## Valores Esperados

Os valores de isolamento e identificação variam dependendo da localização geográfica, idade da população, tempo do ano, factores sócio económicos, manipulação da amostra e tipo de sistema de detecção utilizado.

Para o período de setembro a julho (91-92) os seguintes dados foram obtidos\*:

Virus respiratório	Deteção (amostra no)	Porcentagem de deteção
Adenovirus	43/646	6.7%
Influenza A	11/646	1.7%
Influenza B	4/646	0.6%
Parainfluenza 1	11/646	1.7%
Parainfluenza 2	5/646	0.8%
Parainfluenza 3	28/646	4.3%
RSV	66/646	10.2%

\*As definições para as avaliações incluíram hospitais, hospitais pediátricos, universidades, e laboratórios de referência nos EUA.

## Limitações de Uso

- Os controlos Positivo e Negativo devem ser testados com cada amostra e devem dar a coloração apropriada para que o teste seja considerado válido. [NOTA: laminas de controlo adicionais estão disponíveis – Cat No: V4RVPS (5 por embalagem)].
- Um resultado negativo não exclui a presença dos vírus adenovírus, influenza A e B, parainfluenza 1,2 e 3 e RSV. Os resultados devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas do paciente e outros procedimentos de diagnóstico. Falha na detecção do vírus pode ser resultado de factores como colheita imprópria da amostra, técnica de cultura incorrecta ou uso de uma linhagem de células inadequada ou temperatura durante o isolamento. Todos os resultados negativos devem se reportados como “não foram observados vírus”.

- Os anticorpos monoclonais deste kit são grupo-específicos para adenovírus e RSV e portanto, não devem ser utilizados para diferenciação de tipo.

**Amostras contaminadas por Staphylococcus aureus podem apresentar fluorescência amarelo-esverdeado devido a presença de grandes quantidades de Proteína A. A fluorescência é resultado da ligação não-específica da proteína A aos fragmentos Fc dos anticorpos.**

## Características de Performance

- Comparação clínica da confirmação por Cultura Celular*

Os seguintes resultados foram obtidos quando a confirmação por cultura celular foi executada em amostras respiratórias (foram testados um total de 646 amostras):

ANTICORPO MONOCLONAL:	Adeno	RSV	Inf. A	Inf. B	Para 1	Para 2	Para 3
Total Positive	43	66	11	4	11	5	28
Sensitivity %	97.7	100	100	100	100	100	100
Specificity %	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value (+) %	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value (-) %	99.8	100	100	100	100	100	100

Os seguintes resultados foram obtidos quando a confirmação por cultura celular foi executada em amostras respiratórias congeladas (foram testados um total de 151 amostras):

ANTICORPO MONOCLONAL:	Adeno	RSV	Inf. A	Inf. B	Para 1	Para 2	Para 3
Total Positive	7	3	30	36	33	5	16
Sensitivity %	100	100	100	100	100	100	100
Specificity %	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value (+) %	100	100	100	100	100	100	100
Predictive Value (-) %	100	100	100	100	100	100	100

- *Reacções cruzadas*

Os resultados seguintes foram obtidos a partir de estudos de detecção viral e bacteriana com cada anticorpo monoclonal.

ANTICORPOS MONOCLONAIS:	Adeno	RSV	Influ A	Influ B	Para 1	Para 2	Para 3
Adenoviruses	+	-	-	-	-	-	-
Coronaviruses	-	-	-	-	-	-	-
Coxsackievirus	-	-	-	-	-	-	-
Echoviruses	-	-	-	-	-	-	-
Herpes viruses	-	-	-	-	-	-	-
Influenza virus Type A	-	-	+	-	-	-	-
Influenza virus Type B	-	-	-	+	-	-	-
Measles virus	-	-	-	-	-	-	-
Mumps virus	-	-	-	-	-	-	-
Parainfluenza Type 1	-	-	-	-	+	-	-
Parainfluenza Type 2	-	-	-	-	-	+	-
Parainfluenza Type 3	-	-	-	-	-	-	+
Rhinoviruses	-	-	-	-	-	-	-
Simian virus	-	-	-	-	-	-	-

RSV	-	+	-	-	-	-	-
Acholeplasma laidlawii	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella bronchiseptica	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella pertussis	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella parapertussis	-	-	-	-	-	-	-
Branhamella catarrhalis	-	-	-	-	-	-	-
Chlamydia trachomatis	-	-	-	-	-	-	-
Corynebacterium diptheriae	-	-	-	-	-	-	-
Legionella micdadei	-	-	-	-	-	-	-
Legionella pneumophila	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium avium	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium intracellulare	-	-	-	-	-	-	-
Mycobacterium tuberculosis	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma fermentans	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma hominis	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma orale	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae	-	-	-	-	-	-	-
Neisseria meningitidis	-	-	-	-	-	-	-
Ureaplasma urealyticum	-	-	-	-	-	-	-

Host Cell Controls	Todos os anticorpos monoclonais apresentam resultados negativos para as seguintes células de controlo
Adenovirus	pHEK, HEp-2, NCI-H292, RD, HLF, HeLa, & A549 cell controls
Polyomaviruses	PMK cell control
Enteroviruses	RD & HLF cell controls
Paramyxoviruses	HEp-2, Vero, & PMK cell controls

## Sumário do Procedimento do Respiratory Virus Panel

Nota Importante: Por favor leia a informação técnica completa antes de iniciar o ensaio. Este sumário é apenas um guia rápido.

### "Screening" do Virus

Adicionar 1 gota (40µl) de reagente de despiste anti-viral a um poço da lâmina de despiste de amostra e a cada poço de controlo de antigénio da lâmina de controlo de antigénio.

Adicionar 1 gota (40µl) de anticorpo normal de rato a um poço separado na lamina de identificação de amostra e ao poço negativo da lâmina de controlo de antigénio.

Incubar as Lâminas durante 30 mins @37°C em câmara húmida

Lavar as lâminas abundantemente.

Add 1 drop (40µl) of anti-mouse IgG FITC conjugate

Incubar as Lâminas durante 30 mins @37°C em câmara húmida

Lavar as lâminas abundantemente.

Montar as Lâminas com meio de montagem e lamelas

Examinar as lâminas num microscópio de fluorescência

Identificação do Virus para amostras positivas no despiste acima (ver página seguinte)

## Sumário do Procedimento do Respiratory Virus Panel

Nota Importante: Por favor leia a informação técnica completa antes de iniciar o ensaio. Este sumário é apenas um guia rápido.

### Identificação do Virus

Adicionar 1 gota (40µl) de cada anticorpo monoclonal a cada poço na lamina de identificação da amostra.



Adicionar 1 gota (40µl) de cada anticorpo monoclonal ao poço correspondente na lamina de controlo de antigénio.



Adicionar 1 gota (40µl) de anticorpo normal de rato a um poço separado na lamina de identificação de amostra e ao poço negativo da lâmina de controlo de antigénio.



Incubar as Lâminas durante 30 mins @ 37°C em câmara húmida



Lavar as lâminas abundantemente.



Adicionar 1 gota (40µl) de Conjugado FITC IgG anti rato aos poços.



Incubar as Lâminas durante 30 mins @ 37°C em câmara húmida



Lavar as lâminas abundantemente




Montar as Lâminas com meio de montagem e lamelas



Examinar as lâminas num microscópio de fluorescência

## Interpretação dos Símbolos

Dispositivo medico para diagnóstico In-vitro 

Código de Lote 

Código do produto 

Limite de Temperatura 

Utilizar até 

Fabricante 

Potencialmente Infeccioso 

## Outros Produtos Biotrin

Código #:	Descrição	Formato do teste
V3HHV6	Human Herpesvirus 6 IgG IFA	4 x 10 well slide
V17HHV6	Human Herpesvirus 6 IgM IFA	4 x 10 well slide
V15HHV6	Human Herpesvirus 6 IgG EIA	96 well EIA
V18HHV8	Human Herpesvirus 8 IgG IFA	6 x 10 well slide
V19HHV8	Human Herpesvirus 8 IgG EIA	96 well EIA
V119IF	Parvo IgG & IgM IFA	6 x 10 well slide
V519IG	Parvo IgG EIA	96 well EIA
V619IM	Parvo IgM EIA	96 well EIA
V519IGAUT	Parvo IgG EIA Automate	96 well EIA
V619IMAUT	Parvo IgM EIA Automate	96 well EIA
*V519IGUS	Parvo IgG EIA	96 well EIA
*V619IMUS	Parvo IgM EIA	96 well EIA

\* FDA Cleared Parvovirus B19 Assays

## References / Literatur / Referências

1. **Wadell, G.** (1987) Adenoviruses. In principles and practice of clinical virology (Eds. Zuckerman et al) John Wiley and Sons Ltd.
2. **Horowitz, M.S.** (1985) Adenovirus diseases. In Virology 9. (Eds. Fields B.N. et al.) Raven Press New York pp 477-495.
3. **Hierholzer, J.** Adenoviruses. Ch. 86 In : Manual of Clinical Microbiology. 5th Ed. (Eds Balows et al). ASM Washington D.C. pp 896.
4. **Bell J. et al** (1955) Pharyngoconjunctival fever. Epidemiological studies of a recently recognised disease entity. JAMA 175, pp1083-1092.
5. **Kasel, J** (1980) Adenoviruses Ch. 9 In : Viral Rickettsial and Chlamydial Infections. American Publ. Health Assos. (Eds. Lennett, E. and Schmidt, N.)
6. **Cooney, MK.** (1985) Adenoviruses. In Manual of Clinical Microbiology, 4th Ed. (Eds. Lennett, E. et al) American Society for Microbiology, Washington.
7. **Harmon M.W. and Kendal A.P.** Influenza Viruses. Ch. 81 In : Manual of Clinical Microbiology. 5th Ed. (Eds Balows et al). ASM Washington pp868.
8. **Glezen WP, Paredes A, Taber LH.** Influenza in children. Relationship to other respiratory agents. JAMA 1980; 243: 1345-1349.

9. **Frank, A.L et al** (1979) Comparison of different tissue cultures for isolation and quantitation of influenza and parainfluenza viruses. *J. Clin. Microbiol.* 10
10. **McIntosh, K and Chancock, R.M.** (1990) Parainfluenza viruses. Ch 35 In *Fields Virology Vol. 1* (Eds Fields B.N and Knipes D.M). Raven Press New York, p 963.
11. **McIntosh, K and Chancock, R.M.** (1990) Respiratory syncytial virus. Ch 38 In *Fields Virology Vol. 1* (Eds Fields B.N and Knipes D.M). Raven Press New York, p 1045.
12. **Zinsser Microbiology.** (Eds. Joklik W.K. et al) 19th Edn. Appleton & Lange.
13. **Gardner, P.S. and McQuillin** (1980) *Rapid Virus Diagnosis- applications of immunofluorescence.* 2nd Ed. Butterworth and Co. Ltd. London.
14. **Ahulwalia, G et al.** (1987) comparison of nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal swab specimens for respiratory syncytial virus diagnosis by cell culture, indirect immunofluorescence assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol* 25:763-767.
15. **Chernesky, M.A et al** (1982) *Laboratory diagnosis of viral infections.* Coordinating Ed. Drew E.L. American Society for Microbiology, Washington.
16. **Hall, C.B.** (1985) Acute laryngotracheobronchitis and croup p. 360-364 in *Principles and practice of infectious diseases.* (Eds. Mandell G et al.). Wiley and Sons, Inc. New York.