

IMAGEN™ Adenovirus

REF

K610011-2.....50 Pruebas

1. INDICACIONES DE USO

La prueba IMAGEN™ Adenovirus es una prueba por inmunofluorescencia directa y cualitativa para la detección del antígeno del adenovirus en especímenes clínicos y para la confirmación de adenovirus en cultivos celulares.

2. RESUMEN

Los adenovirus son virus de ADN desnudo con simetría icosaédrica. La familia Adenoviridae comprende dos géneros, los Mastadenovirus (mamíferos) y Aviadenovirus (aves). Se han identificado no menos de 47 serotipos conocidos de adenovirus humano, siendo caracterizados por hemoaglutinación, neutralización, hibridación de ADN y análisis de endonucleasa de restricción de ADN adenoviral.^{1,2,3,4}

Los adenovirus humanos están vinculados a una amplia gama de enfermedades clínicas tanto en individuos inmunocompetentes como inmunocomprometidos, comprendidas las infecciones del tracto respiratorio, la conjuntiva y el tracto gastrointestinal.^{3,5} Las infecciones son comunes en los niños y pueden producirse tanto en forma esporádica como en brotes.

Aproximadamente el 5% de las enfermedades respiratorias agudas en niños y el 10% de las afecciones febriles y neumonías de la infancia han sido vinculadas a una infección por adenovirus.^{3,6,7}

Las infecciones adenovirales del ojo pueden llevar a una fiebre faringoconjuntival, conjuntivitis folicular o queratoconjuntivitis epidémica.^{3,8}

Los adenovirus de serotipos 40 y 41 están generalmente vinculados a las gastroenteritis virales en lactantes y se ha notificado que causan entre el 4% y el 15% de las infecciones nosocomiales en las unidades pediátricas.^{3,9,10} En pacientes inmunocomprometidos (p. ej., de trasplante o de SIDA) pueden producirse graves infecciones sistémicas potencialmente mortales.³

El diagnóstico de laboratorio de la infección por adenovirus desempeña un papel de importancia en el tratamiento del paciente y permite una gestión y control efectivos de los brotes. Los métodos diagnósticos incluyen la detección directa del virus o de proteínas víricas en especímenes clínicos (por ejemplo, aspirados nasofaríngeos), aislar virus viables en monocapas de cultivo celular inoculadas con especímenes respiratorios, conjuntivales o fecales, y la detección de inmunoglobulinas específicas del adenovirus.^{3,5}

Los adenovirus se pueden aislar de los especímenes clínicos en líneas celulares continuas de origen fundamentalmente epitelial que comprenden las líneas de células HeLa, Hep-2, KB y 293, en las cuales los adenovirus pueden presentar efectos citopáticos característicos.^{3,5}

Se ha utilizado una gama de técnicas para confirmar la identificación de aislados de adenovirus, incluidas las pruebas de neutralización, radioinmunoensayo, hibridación de ADN, microscopio electrónico y tipificación por electroforesis.^{11,12,13,14,15} Estas técnicas pueden resultar complejas, laboriosas y a menudo inadecuadas para el uso de rutina.

Últimamente se han descrito pruebas por inmunofluorescencia indirecta o inmunoensayos enzimáticos (p. ej., adenovirus)

utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de un género, que sirven para la detección directa de adenovirus en especímenes clínicos o en monocapas de cultivos celulares.^{15,16,17}

Las pruebas de inmunofluorescencia que utilizan anticuerpos proponen un método rápido, sensible y específico para la detección directa de los adenovirus en especímenes clínicos tales como los aspirados nasofaríngeos y frotis conjuntivales, o para la confirmación de aislados de adenovirus en monocapas de cultivos celulares.

IMAGEN™ Adenovirus es una prueba por inmunofluorescencia directa para la detección e identificación de serotipos de adenovirus humano en especímenes clínicos o cultivos celulares. La prueba utiliza un anticuerpo monoclonal específico del género para detectar un epítipo de proteínas hexonas de adenovirus, el cual se expresa en todos los serotipos conocidos de adenovirus humano.¹⁸

3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba IMAGEN™ Adenovirus contiene anticuerpo monoclonal conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El reactivo conjugado se une específicamente a un epítipo común a la proteína hexona hallada en todos los serotipos de adenovirus humano. El reactivo se utiliza en una técnica de inmunofluorescencia directa de un solo paso. Los especímenes se incuban con el reactivo del anticuerpo conjugado con el FITC durante 15 minutos; luego se lava el exceso de reactivo con solución salina tamponada con fosfatos (PBS). Las áreas teñidas se montan y observan al microscopio bajo iluminación epifluorescente. Si hay adenovirus presente, se apreciará una fluorescencia característica, intensa y de color verde manzana dentro del citoplasma y/o el núcleo de las células infectadas, la cual contrasta con la tinción de fondo roja de las células no infectadas.

Atribuciones

El anticuerpo monoclonal usado en esta prueba se origina en la Division of Microbiological Reagents and Quality Control, Central Public Health Laboratory, Colindale, Londres, Reino Unido.

4. DEFINICIONES

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



Número de Catálogo



Consulte las instrucciones de uso



N

Contenido suficiente para <n> ensayos



Fabricante



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Fecha de caducidad



Código de lote




Límite de temperatura

5. REACTIVOS SUMINISTRADOS



50

– Cada kit contiene materiales suficientes para 50

especímenes directos o preparados de cultivo celular.  - La vida útil del kit es la indicada en el rótulo de la caja exterior.

5.1. REACTIVO IMAGEN™ ADENOVIRUS



POSITIVE CONTROL SLIDE

Instrucciones de uso.

2 portaobjetos de 1 pocillo c/u para control positivo, que contienen células epiteliales humanas (Hep-2) fijadas con acetona e infectadas por adenovirus.

Un frasco de cada uno de los siguientes:

MOUNTING FLUID

3mL de medio de montaje. El medio de montaje contiene un inhibidor de la fotodecoloración en una solución de glicerol (pH 10,0).

1,4mL de reactivo IMAGEN™ Adenovirus. El reactivo contiene anticuerpo monoclonal murino purificado, específico de un epítipo común sobre la proteína hexona del adenovirus y conjugada con el FITC. El conjugado se prepara en una solución tampón estabilizada de proteína (pH 7,5) que contiene contratinción azul de Evans y azida sódica 15mmol/L como conservante.

5.2. PREPARACIÓN, ALMACENAMIENTO Y REUTILIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL KIT

Para optimizar la eficacia del kit, es importante almacenar los componentes del kit no utilizados conforme a las siguientes instrucciones:

5.2.1 PORTAOBJETOS DE CONTROL POSITIVO - POSITIVE CONTROL SLIDE

Los portaobjetos de control positivo vienen cada uno en una bolsa de laminado sellada y llena de nitrógeno. Almacene los portaobjetos que no haya usado a una temperatura de 2 a 8°C. Deje reposar el portaobjeto durante 5 minutos a temperatura ambiente (entre 15 y 30°C) antes de abrir el envase.

Tiña el portaobjeto inmediatamente después de abrirlo.

5.2.2 MEDIO DE MONTAJE - MOUNTING FLUID

Listo para el uso. Almacene el medio de montaje a una temperatura de 2 a 8°C. Deje reposar el medio de montaje durante 5 minutos a temperatura ambiente (entre 15 y 30°C) antes de usarlo.

5.2.3 REACTIVO - REAGENT

Listo para el uso. Almacene el reactivo que no haya usado en la oscuridad, a una temperatura de 2 a 8°C. Deje reposar el reactivo durante 5 minutos a temperatura ambiente (entre 15 y 30°C) antes de usarlo.

6. REACTIVOS ADICIONALES

6.1. REACTIVOS

Acetona fresca (para fijación).

Solución salina tamponada con fosfatos (PBS) de pH 7,5 para lavar los especímenes teñidos y para la preparación de especímenes.

6.2. ACCESORIOS

Los productos que siguen son para el uso conjunto con IMAGEN™ Adenovirus. Para más información, contacte con el distribuidor local.

Su local distribuidor puede proveerle portaobjetos para microscopio recubiertos de Teflón, con un único pocillo de 6mm de diámetro (100 portaobjetos por caja, número de catálogo **REF** S611430-6).

Portaobjeto de control positivo (número de catálogo **REF** S611330-2).

7. EQUIPOS

Se requieren los siguientes equipos:

Pipeta de precisión y puntas desechables para servir 25µL.

Baño de lavado.

Cubreobjetos adecuado para cubrir un pocillo de diámetro 6mm.

Aceite de inmersión no fluorescente.

Microscopio por epifluorescencia con sistema de filtros para FITC (longitud de onda de excitación máxima 490nm, longitud de onda de emisión media 520nm) y aumento x200–x500.

Incubador a 37°C.

Centrifugadora de baja velocidad.

Para especímenes directos

Hisopos estériles.

Extractor de moco (sólo para especímenes nasofaríngeos).

Para confirmación de cultivos

Hisopos estériles, medio de transporte viral (VTM) y un recipiente adecuado para la recogida, transporte y cultivo de adenovirus.

Líneas de células recomendadas para cultivar y aislar adenovirus.

8. PRECAUCIONES



- Para uso diagnóstico *in vitro*. Toda persona que realice un ensayo con este producto debe estar capacitada para usarlo y tener experiencia en materia de procedimientos de laboratorio.

8.1. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

8.1.1 El reactivo IMAGEN™ Adenovirus contiene azida sódica <0.1%, la cual es tóxica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre, formando azidas metálicas explosivas. Siempre que deseche productos que contienen azida, abra el grifo y deje que salga abundante agua para despejar las cañerías.

8.1.2 Se ha demostrado que los adenovirus en el portaobjeto de control positivo son no infecciosos en un cultivo celular; sin embargo, el portaobjeto se debe manipular y desechar como si fuera infeccioso en potencia.

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

8.1.4 Se debe tener cuidado al usar el medio de montaje, ya que puede irritar la piel. Si entra en contacto con la piel, debe lavarse con agua.

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

8.1.6 No pipetee los materiales con la boca.

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

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

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

8.2. PRECAUCIONES TÉCNICAS

8.2.1 No use los componentes pasada la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. No mezcle ni intercambie lotes diferentes de reactivos.

8.2.2 Los reactivos se suministran con concentraciones de trabajo fijas. La eficacia de la prueba será afectada negativamente si los reactivos se modifican o almacenan en condiciones distintas a las explicadas en el apartado 5.

8.2.3 Prepare una nueva tanda de solución salina tamponada con fosfatos (PBS), suficiente para el trabajo del día.

8.2.4 Es necesario lavar con PBS. Si usa cualquier otra solución de lavado, tal como agua del grifo o agua destilada, puede invalidar los resultados de la prueba.

8.2.5 Evite la contaminación microbiana de los reactivos.

8.2.6 No congele los reactivos.

9. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE ESPÉCIMENES¹⁹

La recogida y preparación de especímenes es de fundamental importancia para el diagnóstico del adenovirus por los métodos de inmunofluorescencia y cultivo celular. Los especímenes se deben tomar del sitio de la infección durante el momento de máxima liberación de virus, de modo que contengan la mayor cantidad posible de material infectado. Deben prepararse de manera que se conserven células intactas libres de moco adherido, etc., para la microscopía directa de los especímenes, o de forma que se preserve la viabilidad de los virus en los especímenes a ser cultivados.

9.1. ESPÉCIMENES CLÍNICOS

9.1.1 Especímenes oftálmicos

Recogida

Aplique anestesia local al ojo, y luego exponga la conjuntiva superior y la inferior. Utilice un hisopo con punta de dacrón o de algodón para frotar energicamente las superficies conjuntivales superior e inferior, girando el hisopo durante el proceso de toma de la muestra para asegurar que se muestrea toda la superficie conjuntival.

Preparación de portaobjetos

Haga rodar el hisopo con la muestra, aplicando una ligera presión, dentro del área del pocillo de 6mm en el portaobjeto para microscopio. Verifique que se usa toda la punta del hisopo para preparar el portaobjeto. Permita que el espécimen se seque bien al aire, a temperatura ambiente (15-30°C) y luego fíjelo en acetona fresca durante 10 minutos. Permita que el portaobjeto se seque al aire. Si el espécimen no se tiñe inmediatamente, almacénelo a 4°C durante toda la noche.

9.1.2 Aspirados/secreciones nasofaríngeos

Recogida

Recoja especímenes de la región nasofaríngea en un extractor de moco usando un tubo de alimentación de calibre 8. Mantenga el extractor de moco y el tubo a entre 2 y 8°C, y envíelos lo antes posible al laboratorio para su procesamiento.

Separación de células

De ser necesario, agregue 2mL de solución salina tamponada con fosfatos (PBS) a la muestra antes de centrifugar, a fin de reducir la viscosidad y diluir el moco. Centrifugue el extractor de moco a temperatura ambiente (15-30°C) durante 10 minutos a 380g.

Retire el sobrenadante, el cual se puede usar para cultivo celular. Resuspenda el precipitado de células en 2mL de PBS y pipetee delicadamente las células hacia arriba y abajo con una pipeta de gran calibre, o mezcle suavemente con un vórtex hasta que se disuelva el moco y se libere el material celular. Evite el pipeteo o la aplicación de vórtex excesivamente enérgicos, para evitar dañar las células. Cuando se haya obtenido una suspensión uniforme, agregue más PBS según sea necesario. Pipetee o aplique la máquina vórtex luego de añadir el PBS adicional, a fin de seguir lavando las células. Retire y deseche los elementos visibles de moco que todavía queden. El moco sobrante se debe quitar, ya que impide la penetración adecuada del reactivo y puede causar fluorescencia no específica.

Si todas las secreciones quedan en el tubo de alimentación y al extractor de moco no llega nada, elimine por lavado todas las secreciones del tubo usando PBS. La mejor manera de lograrlo es insertando una pipeta Pasteur en el extremo del tubo que estaba conectado al extractor de moco. Aspire el fluido correspondiente al tubo y expúlselo repetidamente, hasta que se desalojen las secreciones adheridas a la pared del tubo. Pipetee la suspensión hacia arriba y hacia abajo, hasta que el moco se haya disuelto adecuadamente.

Preparación de portaobjetos

Una vez finalizado el proceso de separación de células, centrifugue la suspensión celular resultante a temperatura ambiente (15-30°C) durante 10 minutos a 380g y deseche el sobrenadante. Resuspenda el precipitado de células en PBS suficiente como para diluir el moco que queda, pero manteniendo una elevada densidad de células. Coloque 25µl del precipitado de células resuspendido en el área del pocillo del portaobjeto. Permita que el espécimen se seque bien al aire, a temperatura ambiente (15-30°C) y luego fije en acetona fresca a temperatura ambiente (15-30°C) durante 10 minutos. Si el espécimen no se tiñe inmediatamente, almacénelo a 4°C durante toda la noche o congélelo a –20°C para un almacenamiento más prolongado.

9.2. CULTIVO DE CÉLULAS

Inoculación de cultivos de células

Los especímenes recogidos para el diagnóstico de infecciones adenovirales deben inocularse en las líneas celulares que se utilizan habitualmente en el laboratorio, conforme a los métodos de laboratorio establecidos. Los cultivos de células deben examinarse con frecuencia por si aparece el efecto citopático (CPE), y también se deben realizar periódicamente pruebas de hemadsorción. Los cultivos con un resultado positivo de hemadsorción o los cultivos de células que presenten CPE pueden recogerse y ensayarse para determinar la presencia de adenovirus.

Preparación de portaobjetos

Si se observa hemadsorción o CPE indicativos de una infección de adenovirus, se debe recoger la monocapa de cultivo celular cuando estén afectadas al menos el 50% de las células.

Introduzca las células en el medio de cultivo líquido raspando la lámina de células con una pipeta estéril.

Deposite las células usando una máquina centrifugadora a 200g durante 10 minutos a temperatura ambiente (15-30°C) y quite el sobrenadante.

Lave las células resuspendiendo el precipitado celular en PBS (véase el apartado 8.2) y repita la centrifugación. Quite el sobrenadante y resuspenda el precipitado celular en un pequeño

volumen de PBS fresco, a fin de mantener una densidad de células elevada.

Coloque alícuotas de 25mL de la suspensión de células en pocillos separados de los portaobjetos. Permita que se seque bien al aire y luego fije en acetona fresca a temperatura ambiente (15-30°C) durante 10 minutos. Si el espécimen no se tiñe inmediatamente, almacénelo a 4°C durante toda la noche o congélelo a –20°C para un almacenamiento más prolongado.

10. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

CONSULTE EL APARTADO 8.2 PRECAUCIONES TÉCNICAS ANTES DE REALIZAR EL PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.

10.1. AGREGADO DE REACTIVO

Agregue 25µL de reactivo a cada uno de los pocillos de 6mm. Asegúrese de que el reactivo abarca toda el área del pocillo.

10.2. PRIMERA INCUBACIÓN

Incuba los portaobjetos con reactivo en una **cámara húmeda** durante **15 minutos a 37°C**. **NO** permita que el reactivo se seque sobre el espécimen ya que ello haría aparecer una tinción no específica.

10.3. LAVADO DEL PORTAOBJETO

Lave el exceso de reactivo con solución salina tamponada con fosfatos (PBS), y luego lave el portaobjeto cuidadosamente en un baño con agitación que contenga PBS durante 5 minutos. Deje escurrir el PBS y permita que el portaobjeto se seque al aire a temperatura ambiente (15-30°C).

10.4. AGREGADO DE MEDIO DE MONTAJE

Agregue una gota de medio de montaje IMAGEN™ Adenovirus al centro de cada pocillo y coloque un cubreobjetos sobre el medio de montaje y el espécimen, asegurando que no queden burbujas de aire atrapadas.

10.5. LECTURA DEL PORTAOBJETO

Examine toda el área del pocillo que contiene el espécimen teñido usando microscopía por epifluorescencia. La fluorescencia, según se describe en el apartado 11, debe ser visible con un aumento de entre x200 y x500. (Los mejores resultados se obtienen examinando los portaobjetos inmediatamente después de la tinción, pero se pueden guardar hasta 24 horas en la oscuridad, a entre 2 y 8°C).

11. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA

11.1. CONTROLES

11.1.1 Portaobjeto de control positivo

Una vez teñido y observado como se describe en el apartado 10, el portaobjeto de control positivo debe presentar células con fluorescencia intracelular, nuclear y/o citoplásmica, de color verde manzana, con un fondo de material con contratinción roja. Estas células son algo más grandes que las células epiteliales conjuntivales o respiratorias, pero presentan una fluorescencia similar - intracelular, nuclear y/o citoplásmica - cuando están infectadas por adenovirus. Use portaobjetos de control positivo para verificar que el procedimiento de tinción se ha realizado de forma satisfactoria.

11.1.2 Control negativo

Si se necesita un control negativo, se recomienda el uso de células no infectadas e intactas del tipo usado para cultivar y aislar el adenovirus. Prepare y fije las células según se describe en el apartado 9.2, y tíñalas como se indica en el apartado 10.

11.2. ESPÉCIMENES CLÍNICOS

11.2.1 Presencia de células infectadas por adenovirus

Se aprecia fluorescencia de color verde manzana intracelular, nuclear y/o granular citoplásmica en células epiteliales conjuntivas o respiratorias infectadas por adenovirus.

Las células no infectadas se tiñen de rojo por la contratinción azul de Evans.

11.2.2 Interpretación de los resultados

Se obtiene un diagnóstico positivo cuando una o más de las células del espécimen, fijado y teñido, presentan la pauta de fluorescencia descrita en el apartado 11.2.1.

Se obtiene un diagnóstico negativo cuando los especímenes, fijados y teñidos, no presentan fluorescencia ante el reactivo.

En el caso de los aspirados nasofaríngeos o los especímenes oftálmicos, deberá observar no menos de 20 células respiratorias o epiteliales de la conjuntiva para considerar negativo el resultado. Vea el apartado 11.2.3 para el caso de un número insuficiente de células.

11.2.3 Células insuficientes

Si no hay suficientes células en el portaobjeto deberá centrifugar el resto del espécimen clínico a 380g durante 10 minutos a temperatura ambiente (15-30°C). Resuspenda las células en un volumen menor de PBS antes de redistribuirlas (25µL) por el área del pocillo. Como alternativa, puede solicitar la repetición de la toma de espécimen clínico.

11.3. CONFIRMACIÓN DE CULTIVO CELULAR

11.3.1 Presencia de células infectadas por adenovirus

Las células infectadas presentarán una fluorescencia verde manzana intracelular, nuclear y/o citoplásmica, y deben registrarse como adenovirus positivas.

Las células no infectadas aparecerán contrateñidas de rojo por la contratinción azul de Evans.

11.3.2 Interpretación de los resultados

Se realiza un diagnóstico positivo cuando al menos una célula fijada y teñida presenta, luego de la tinción, la pauta de fluorescencia descrita en el apartado 11.3.1.

Deberá observar en el pocillo del portaobjeto no menos de 50 células no infectadas del cultivo celular bajo estudio para poder considerar negativo el resultado. Vea el apartado 11.3.3 para el caso de un número insuficiente de células.

11.3.3 Células insuficientes

Si no hay suficientes células en la preparación en el portaobjeto, deberá centrifugar el resto del espécimen clínico a 200g durante 10 minutos a temperatura ambiente (15-30°C). Resuspenda en un volumen menor de PBS antes de redistribuir (25µL) por el área del pocillo.

Como alternativa, deberá reinocular un nuevo espécimen en las monocapas celulares frescas, y luego repetir el cultivo celular.

12. LÍMITES DE EFICACIA

12.1. Utilice sólo el medio de montaje provisto con la prueba IMAGEN™ Adenovirus.

12.2. El aspecto visual de la imagen fluorescente obtenida puede variar en función del tipo de microscopio y la fuente luminosa utilizados.

- 12.3. Se recomienda usar 25µL de reactivo para cubrir el área de un pocillo de 6mm. Un volumen más reducido que el anterior puede dificultar la cobertura de la zona de espécimen y podría reducir la sensibilidad.
- 12.4. Todos los reactivos se suministran con concentraciones de trabajo fijas. La eficacia de la prueba se puede ver afectada por cualquier modificación de los reactivos, o si no las almacena en las condiciones recomendadas en el apartado 5.
- 12.5. La ausencia de detección del adenovirus cuando está presente puede deberse a varios factores, tales como una recogida inadecuada, toma de muestras y/o manipulación incorrectas, defecto del cultivo celular, etc. Un resultado negativo no descarta la posibilidad de que haya infección por adenovirus.
- 12.6. La presencia de adenovirus en las secreciones nasofaríngeas no descarta necesariamente la posibilidad de una infección por otros patógenos. Todos los resultados positivos deben interpretarse con precaución, ya que el adenovirus puede presentar latencia y recrudescencia. Puede producirse liberación de virus asintomática hasta 18 meses después de la infección.²⁰ Los resultados de la prueba deben interpretarse en conjunto con la información obtenida en los estudios epidemiológicos, el diagnóstico clínico del paciente y otros procedimientos diagnósticos.
- 12.7. Los resultados de las pruebas deben interpretarse en conjunto con la información obtenida en los estudios epidemiológicos, la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos diagnósticos.

13. VALORES ESPERADOS

Los miembros de los distintos subgéneros de adenovirus presentan tropismos de órganos claramente diferenciados. Sin embargo, las enfermedades se manifiestan fundamentalmente como infecciones respiratorias, oculares y entéricas. La tasa de aislamiento positiva variará en función de la prueba empleada, la calidad de la recogida de espécimen, de la edad de la población analizada, y de si las poblaciones bajo estudio están sometidas a hacinamiento.

La frecuencia de aislamiento está influida por la gravedad de las enfermedades relacionadas con el virus, y también por la tendencia de las cepas virales a provocar infecciones persistentes con liberación de virus infecciosos durante periodos prolongados.

Los adenovirus son responsables del 5% de las infecciones respiratorias agudas en niños menores de 4 años, y representan el 10% de las infecciones respiratorias con ingreso hospitalario en este grupo etario.^{3,6,7} La cistitis hemorrágica aguda en los niños puede ser causada por los adenovirus. Los adenovirus entéricos están implicados en entre el 4% y el 15% de todas las hospitalizaciones de niños por gastroenteritis, prevaleciendo con mayor frecuencia en niños menores de 3 años.^{3,11,12}

Las infecciones oculares por adenovirus (queratoconjuntivitis epidémica y conjuntivitis de las piscinas) pueden producirse en cualquier grupo etario, así como también la infección por adenovirus en pacientes inmunosuprimidos.^{3,8}

En los adultos se han aislado adenovirus en el cuello (uterino) y en lesiones del pene así como en infecciones respiratorias agudas, en particular entre militares.

14. CARACTERÍSTICAS DE TINCIÓN ESPECÍFICAS

14.1. ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO MONOCLONAL CON SEROTIPOS DE ADENOVIRUS

Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal utilizado en esta prueba reacciona con un epítipo específico de un género de proteína hexona de adenovirus presente en todos los serotipos humanos.

14.2. ESTUDIOS CLÍNICOS

La prueba IMAGEN™ Adenovirus ha sido evaluada en dos centros de ensayos clínicos para el uso directo en secreciones nasofaríngeas recogidas de niños y adultos hospitalizados con síntomas de infección respiratoria. La prueba también se ha evaluado en un importante centro de oftalmología con especímenes conjuntivales de pacientes que presentaban conjuntivitis. Tres centros de ensayos evaluaron la capacidad de la prueba IMAGEN™ Adenovirus para detectar adenovirus en cultivos celulares.

Los centros de ensayos probaron directamente 474 especímenes respiratorios clínicos y 179 especímenes conjuntivales, y además 296 especímenes para confirmación de cultivo. Las pruebas estándar de especímenes directos fueron cultivos celulares con o sin inmunofluorescencia indirecta; para la confirmación de cultivo, las pruebas estándar fueron la fluorescencia de anticuerpo policlonal o la neutralización específica.

Para todos los cálculos se supone que las pruebas estándar fueron sensibles y específicas en un 100%. La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos se calcularon como se describió anteriormente.²¹

14.3. EFICACIA CLÍNICA

14.3.1 Especímenes directos

Secreciones nasofaríngeas

Los especímenes clínicos frescos se analizaron durante el invierno (boreal) de 1988 a 1989; también se probaron especímenes almacenados (congelados) que se habían recogido entre 1978 y 1988. Los dos centros compararon la prueba IMAGEN™ Adenovirus con métodos de referencia. Se consideró positivo un resultado del método de referencia si el cultivo celular o la inmunofluorescencia indirecta resultaban positivos. Esto permitió que la presencia de virus inviables se detectara por fluorescencia, y la de virus libres de células se detectara mediante cultivo celular. La prueba IMAGEN™ Adenovirus consideró positivo un espécimen cuando podía observarse fluorescencia en una o más células epiteliales (vea el apartado 11.2).

La tabla 14.1 muestra los resultados del reactivo de prueba IMAGEN™ Adenovirus. La incidencia global de adenovirus en estas poblaciones fue del 9,1% (43 de 474). Los resultados presentaron correlación con las pruebas estándar en 468 casos (98,7%). La sensibilidad de la prueba IMAGEN™ Adenovirus fue del 86,0% (37 de 43) y la especificidad del 100% (431 de 431). Los valores predictivos para los resultados positivos y negativos fueron del 100% (37 de 37) y del 98,6% (431 de 437) respectivamente.

Tabla 14.1 Comparación de los resultados de pruebas con IMAGEN™ Adenovirus y con cultivo celular sobre especímenes nasofaríngeos en 2 centros de ensayo

PRUEBA	RESULTADO			
Método de referencia	Neg	Pos	Pos	Neg
IMAGEN™ Adenovirus	Neg	Pos	Neg	Pos
N° de especímenes (474)	431	37	6*	0

- *1) 4 de 6 especímenes tardaron más de 10 días en producir CPE en cultivo. Ello podría indicar un nivel muy bajo de presencia inicial de virus en la muestra.
- 2) 2 de 6 especímenes fueron negativos por IF indirecta.

Especímenes oftálmicos

La prueba IMAGEN™ Adenovirus se evaluó contrastándola con un sistema de cultivo celular establecido. Se recolectaron frotis conjuntivales de 179 pacientes de conjuntivitis atendidos en un hospital de oftalmología. La incidencia de infección por adenovirus en el grupo de la población estudiado era del 19,6% (35 de 179). Se prepararon frotis a partir de hisopos de espécimen en la clínica, colocándose luego los hisopos en un medio de transporte para la evaluación del cultivo celular. La prueba IMAGEN™ Adenovirus consideró positivo un espécimen cuando podía observarse fluorescencia en una o más células epiteliales. Se consideró que un espécimen daba positivo por cultivo celular cuando el efecto citopático característico resultaba confirmado por inmunofluorescencia indirecta. En la Tabla 14.2 se muestran los resultados de este ensayo: de los 179 especímenes probados, se obtuvo el mismo resultado con ambos métodos en 174 especímenes luego de repetir la prueba, obteniéndose una correlación del 97,2%. La sensibilidad y la especificidad del IMAGEN™ Adenovirus fueron del 91,4% (32 de 35) y el 98,6% (142 de 144) respectivamente. Los valores predictivos para los resultados positivos y negativos fueron del 94,1% (32 de 34) y del 97,9% (142 de 145) respectivamente.

Tabla 14.2 Comparación de resultados entre pruebas con IMAGEN™ Adenovirus y con cultivo celular en muestras oftalmológicas humanas

PRUEBA	RESULTADO			
Método de referencia	Neg	Pos	Pos	Neg
IMAGEN™ Adenovirus	Neg	Pos	Neg	Pos
N° de especímenes (179)	142	32	3*	2**

- * No hay material suficiente disponible para volver a analizar un espécimen.
- ** Ambos especímenes se cultivaron durante sólo 2 días.

14.3.2 Confirmación por cultivo celular

Tres centros de ensayos analizaron IMAGEN™ Adenovirus en cultivos celulares de especímenes clínicos. Éstos se compararon con pruebas de inmunofluorescencia indirecta y/o pruebas de neutralización a fin de confirmar los cultivos. Se realizaron aislados en líneas celulares rutinarias, utilizadas para cultivos de adenovirus. Los cultivos celulares se lavaron en PBS antes de ser retirados y aplicados a los portaobjetos. Los portaobjetos se fijaron en acetona y luego se analizaron usando los reactivos de ensayo de IMAGEN™ Adenovirus. En esta evaluación se usaron tanto aislados clínicos frescos como especímenes previamente congelados. En total, se evaluaron 296 cultivos. Los aislados positivos de cultivos celulares se confirmaron por inmunofluorescencia o por pruebas de neutralización.

Los resultados (tabla 14.3) indican que la prueba IMAGEN™ Adenovirus detectó todos los aislados positivos de adenovirus, arrojando una sensibilidad del 100% (162 de 162). La especificidad del reactivo fue del 100% (134 de 134).

Tabla 14.3 Comparación de los resultados de pruebas con IMAGEN™ Adenovirus y con métodos estándar de confirmación de cultivo en 3 centros de ensayo

PRUEBA	RESULTADO			
Confirmación estándar	Neg	Pos	Pos	Neg
IMAGEN™ Adenovirus	Neg	Pos	Neg	Pos
N° de especímenes (296)	134	162	0	0

14.4. REACTIVIDAD CRUZADA

La prueba IMAGEN™ Adenovirus se realizó en preparados de otros virus y organismos cuya presencia es probable en especímenes o cultivos celulares, respiratorios u oftálmicos. Todos los organismos analizados (Tabla 14.4) dieron negativo en la prueba IMAGEN™ Adenovirus.

Tabla 14.4 Organismos analizados por IMAGEN™ Adenovirus que no reaccionaron

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Mycoplasma hyorhinus</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Mycoplasma orale</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria cinerea</i>
<i>Coxsackie virus</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
<i>Echovirus</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Epstein-Barr virus</i>	<i>Neisseria meningitidis A, B, C & D</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Herpes simplex virus</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Influenza virus A & B</i>	<i>Neisseria pharyngis</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Parainfluenza virus types 1,2,3 & 4b</i>
<i>Measles virus</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>
<i>Mumps virus</i>	<i>Polio virus types 1 & 2</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Respiratory syncytial virus</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Rhinovirus</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Mycoplasma arginini</i>	<i>Streptococcus gps A,B,C,D,F,G</i>
<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Varicella zoster virus</i>

15. REFERENCES/REFERENZEN

1. Frankl, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., and Brown, F. (1992) Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology Supplement 2, Spurger Velacy, New York, pp 140-144.
2. Rosen, L. (1960) Haemagglutination inhibition technique for typing adenoviruses. *American Journal of Hygiene* **71**, 120-128
3. Wadell, G. (1990) Adenoviruses. In Principles and Practice of Clinical Virology (eds A.J. Zuckerman et al) John Wiley and Sons Ltd, Chapter 4 iv, pp 267-287.
4. Albert, M.J. (1986) Enteric Adenoviruses. *Archives of Virology* **88**, 1-17.
5. Horwitz, M.S. (1985) Adenoviral diseases in "Virology", Raven Press, New York (eds B.N. Fields et al) pp 477-495.
6. Mallett, R., Ribierre, M., Bonnenfant, F., Labruno, B., and Reyrole, L. (1966) Les pneumopathies graves à adenovirus. *Arch. FR. Pediatr* **23**: 1057-1073.
7. Pacini, D.L., Collier, A.M., and Henderson, F.W. (1987) Adenovirus Infections and Respiratory Illnesses in Group Day Care. *Journal of Infectious Diseases* **156**, No 6: 920-927.

8. **Ford, E., Nelson, K.E., and Warren, D. (1987)**
Epidemiology of Epidemic Keratoconjunctivitis.
Epidemiological Reviews **9**: 244-261.

9. **Madeley, C.R. (1986)**
The emerging role of adenovirus as inducers of gastroenteritis.
Pediatric Infectious Diseases **5**: 563-574.

10. **Uhnoo, I., Wadell, G., Svensson, L., and Johansson, M.E. (1984)**
Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children.
Journal of Clinical Microbiology **20**: 365-372.

11. **Miller, S.E., (1986)**
Detection and identification of viruses by electron microscopy.
Journal of Electron Microscopy Technique **4**: 265-301.

12. **Darougar, S., Walpita, P., Thaker, U., Viswalingham, N., and Wishart, M.S. (1984)**
Rapid culture test for adenovirus isolation.
British Journal of Ophthalmology **68**: 405-408.

13. **Kidd, A.H., Harley, E.H., and Erasmus, M.J. (1985)**
Specific detection and typing of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens by dot-blot hybridization.
J. Clinical Microbiology **22**: 934-939.

14. **Gomes, S.A., Nascimento, J.P., Siquera, M.M., Krawczuk, M.M., Pereira, H-G., and Russel W.C. (1985)**
In situ hybridization and biotinylated DNA probes: a rapid diagnostic kit for adenovirus upper respiratory infections.
Journal of Virological Methods **12**: 105-110.

15. **Lehtomaki, K., Julkunen I., Sandelin, K., Salonen, J., Virtanen, M., Ranki, M, and Hovi, T. (1986)**
Rapid diagnosis of respiratory adenovirus infections in young adult men.
Journal Clinical Microbiology **24**: 108-111.

16. **Pereira, H.G., Azeredo, R.S., Leite, J.P.G., Andrade, Z.P., and De Castro, L. (1985)**
A combined enzyme immunoassay for Rotavirus and Adenovirus.
Journal of Virological Methods **10**: 21-28.

17. **August, M. J., and Warford, A.L. (1987)**
Evaluation of a commercial monoclonal antibody for detection of adenovirus antigen.
Journal of Clinical Microbiology **25**, No 11: 2233-2235

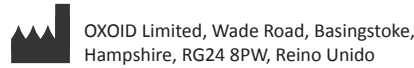
18. **Cepko, C.L., Whetstone, C.A. and Sharp, P.A. (1983)**
Adenovirus hexon monoclonal antibody that is group specific and potentially useful as a diagnostic reagent.
Journal of Clinical Microbiology **17**: 360-364.

19. **Gardner, P.S. and McQuillen, J. (1980)**
Rapid virus diagnosis. Application of immunofluorescence (2nd Ed).
Butterworth, London, Chapter 5, 92-109.

20. **Greenburg, S.B. and Krilov, L. (1986)**
Laboratory diagnosis of viral respiratory disease.
Cumitech. No 21. ASM. Drew, W.L. and Rubin, S.J., editors.

21. **Galen, R.S. (1982)**
Application of the predictive value model in the analysis of test effectiveness. In Clinics in Laboratory Medicine. Symposium on Test Selection Strategies.
Volume 2. W. B. Saunders Company, pp 685-699.

IFU X7846, revisado Marzo 2013



Para cualquier pregunta, por favor, contacte con la el distribuidor local .