



MINISTERIO DE SALUD

**Instituto Nacional de Salud**

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA  
VIGILANCIA BASADA EN LABORATORIO DE  
INFLUENZA Y OTROS VIRUS  
RESPIRATORIOS**

1ra edición

**2007**

## INDICE

INTRODUCCION

ANTECEDENTES

I. OBJETIVOS

II. PROCEDIMIENTOS GENERALES

III. METODOLOGIA PARA LA OBTENCION DE MUESTRAS

IV. TRANSPORTE DE MUESTRAS

V. REGISTRO DE MUESTRAS

VI. METODOLOGIA DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

VII. INFORME DE RESULTADOS

VIII. BIOSEGURIDAD

ANEXOS

## **INTRODUCCIÓN**

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) son más frecuentes y severas en las edades extremas de la vida, siendo más afectados los menores de 5 años seguidos por los ancianos. Las IRAs en los menores de cinco años ocupan el primer lugar en la demanda de atención de los servicios de salud del Perú, con 4-6 episodios por año, y en determinadas regiones, las neumonías constituyen la primera causa de muerte en niños menores de un año.

Los virus pueden producir IRAs de vías respiratorias altas (rinovirus, coronavirus), mientras que otros pueden producir IRAs de vías respiratorias bajas (adenovirus, virus sincicial respiratorio, virus influenza y parainfluenza), de severidad variable dependiendo de distintos factores del huésped como: edad, inmunosupresión, antecedentes de enfermedades crónicas, tabaquismo, entre otros.

La Influenza es una enfermedad aguda respiratoria, sujeta a vigilancia internacional por la OMS; su importancia radica en su potencial epidémico, dado por su alta contagiosidad, su variabilidad antigénica y su posibilidad de intercambio genético entre los virus humanos y de ciertas especies de animales. La vigilancia de influenza y otros virus respiratorios permite la identificación oportuna y monitoreo del virus circulante y sus variantes, lo cual es esencial para la planificación de actividades de prevención y respuesta local, regional y nacional.

Por otro lado, la detección y caracterización temprana de estos virus permite actualizar la vacuna anualmente con los subtipos circulantes ese año en esa región y por esta razón, la OMS ha establecido una Red Mundial de Vigilancia de virus influenza que permita obtener información para la elaboración anual de la vacuna apropiada para el hemisferio norte y sur, y estar alertas en caso de epidemias y/o una nueva pandemia.

## **ANTECEDENTES**

El Instituto Nacional de Salud se constituye en el centro de referencia Nacional para el diagnóstico de influenza y otros virus respiratorios. Desde el año 1999, nuestro país participa en la vigilancia mundial de la influenza de la OMS y se remite información virtual a la OMS mediante el sistema de notificación FluNet. Asimismo, envía cepas de virus aislados y tipificados al CDC de Atlanta para contribuir en la formulación anual de la vacuna contra influenza del Hemisferio Sur (Septiembre) y del Hemisferio Norte (Febrero).

En el país, 15 Laboratorios de Referencia Regional: Ancash, Arequipa, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huancavelica, Junín, Lambayeque, Lima V, Piura, Puno, San Martín, Tacna, Tumbes y Ucayali realizan diagnóstico de influenza y otros virus respiratorios mediante inmunofluorescencia indirecta (Anexo 1) y envían la información de sus resultados semanalmente al Instituto Nacional de Salud; también envían muestras de casos de Influenza para su tipificación.

El Instituto Nacional de Salud está estandarizando técnicas moleculares (PCR) para el diagnóstico de Influenza A/H1, A/H3, A/H5 y B; asimismo, en el marco de su política de transferencia tecnológica y para mejorar la capacidad de diagnóstico de influenza en la Red de Laboratorios del país, se implementarán estas técnicas moleculares en 3 laboratorios del país: Cusco, Piura y San Martín, los cuales representan puntos estratégicos para la vigilancia en el país.

Mediante RM 230-2005/MINSA (22/03/2005) se emitió la Directiva N° 057-MINSA/OGE-V.01: “Vigilancia centinela de la influenza y otros virus respiratorios”, con el objetivo de reforzar la vigilancia epidemiológica de la influenza y otros virus respiratorios y para lo cual cada DIRESA establece su centro centinela de acuerdo a determinados criterios. En Lima, se han establecido como Centros Centinelas: Hospital Nacional Docente San Bartolomé, Hospital Nacional Cayetano Heredia, Hospital Maria Auxiliadora y Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión.

Por otro lado, desde el año 2002 el Naval Medical Research Center Detachment (NMRCD) está realizando un protocolo de Vigilancia de Patógenos Virales Respiratorios Emergentes en América del Sur y en nuestro país tiene centros de vigilancia centinela en 10 departamentos; por lo cual se propone que estos centros colaboren proporcionando las muestras necesarias para la vigilancia centinela de la influenza y otros virus respiratorios en nuestro país.

## I. OBJETIVOS

- Identificar oportunamente la actividad de los virus: influenza A y B, virus parainfluenza 1, 2 y 3, virus sincicial respiratorio y adenovirus en nuestro país.
- Aislar e identificar las cepas de virus influenza circulante en nuestro país
- Determinar la estacionalidad de la circulación de virus respiratorios.

## II. PROCEDIMIENTOS GENERALES

En cada nivel de la red de vigilancia laboratorial se realizarán los siguientes procedimientos:

### Centro Centinela Local

- Identificación del caso de síndrome gripal según los criterios establecidos en la Directiva N° 057-MINSA/OGE-V.01:
  - Inicio súbito
  - Fiebre  $\geq 38^{\circ}\text{C}$
  - Tos o dolor de garganta

Puede acompañarse de síntomas sistémicos como: mialgias, postración, cefalea o malestar general

- Notificación del caso mediante ficha clínica (ver anexo 1).
- Obtención de muestra de hisopado nasal y faríngeo\*.

(\*) En los centros centinelas del NMRCD se tomará doble muestra de hisopado faríngeo, uno de los cuales deberá ser enviado inmediatamente al Laboratorio Centinela Regional manteniendo la cadena de frío ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ).

### Laboratorio Centinela Regional

- Procesamiento de las muestras mediante técnica inmunofluorescencia indirecta en  $< 48$  horas.
- Información de los resultados a través del NET LAB.
- Envío mensual de las muestras positivas al INS en hielo seco.
- Envío mensual del 10% de las muestras negativas al INS en hielo seco

## **Laboratorio de Referencia Nacional**

- Aislamiento y caracterización del virus de la influenza de las muestras positivas
- Información de los resultados a través del NET LAB
- Envío semestral de cepas de influenza tipificadas al CDC de Atlanta para evaluación de concordancia y aportar en la formulación anual de la vacuna de Influenza
- Notificación de los resultados a la OPS/OMS a través de la FLU NET

### **III. METODOLOGIA PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Las muestras para inmunofluorescencia indirecta (IFI) y aislamiento viral deben obtenerse dentro de las primeras 72 horas del inicio de los síntomas clínicos, durante la etapa febril; al transcurrir más tiempo disminuye notablemente tanto la posibilidad de detectar antígeno viral como la de recuperar virus en cultivos celulares

#### **TIPO DE MUESTRA**

Las muestras de elección para la detección de antígenos por su alto contenido en células es el aspirado nasofaríngeo, pero también se pueden utilizar el hisopado nasal y faríngeo combinado.

Por indicación clínica, se puede efectuar un procedimiento invasivo para el diagnóstico de infecciones virales del tracto respiratorio inferior como: aspirado transtraqueal, lavado broncoalveolar y biopsia de pulmón

- **HISOPADO NASAL Y FARINGEO COMBINADO:**

Con un hisopo de poliéster o dacrón, hisopar profundamente la mucosa nasal y retirarlo realizando movimientos rotatorios, luego proceder a introducir el hisopo en el tubo con medio de transporte, romper el mango del hisopo apoyándose en el borde del tubo y descartar el pedazo restante; con otro hisopo de poliéster o dacrón, hisopar ambas amígdalas y la faringe luego introducir el hisopo en el mismo tubo. Rotular y enviar al Laboratorio Centinela Regional en cadena de frío.

- **ASPIRADO NASOFARINGEO:**

Aspirar las secreciones nasofaríngeas con una sonda naso-gástrica conectada a una bomba de vacío o jeringa. Introducir la sonda en una fosa nasal hasta la parte posterior de la faringe paralelamente al paladar. Activar la bomba de vacío y retirarla suavemente. Realizar el mismo proceso en la otra fosa nasal, con la misma sonda. Lavar la sonda con 2-3 ml del medio de transporte para descargar el contenido en un tubo cónico. Rotular y enviar al Laboratorio Centinela Regional en cadena de frío.

El éxito del diagnóstico virológico depende de la calidad de la muestra, de las condiciones de su almacenamiento y envío, antes de ser procesada en el laboratorio

#### IV. TRANSPORTE DE MUESTRAS

Las muestras de influenza estacional corresponden a sustancias infecciosas de categoría B, estas muestras se envasan en crioviales para ser enviados al Laboratorio Centinela Regional o al Instituto Nacional de Salud.

##### **Transporte de muestras del Centro Centinela Local al Laboratorio Centinela Regional**

El Centro Centinela Local entregará en un **periodo máximo de 24 horas**, las muestras obtenidas al Laboratorio Centinela Regional en cadena de frío (2-8° C) y el embalaje ha utilizar comprenderá tres elementos (Anexo 5):

- Un envase primario: criovial 4.5-5.0 ml
- Un envase secundario: bolsa plástica
- Un envase exterior: cooler con refrigerantes o hielo

Los recipientes primarios (criovial) envueltos en parafilm® se colocarán en un embalaje o envase secundario (bolsa plástica) de forma tal que, en las condiciones normales de transporte, no puedan romperse, perforarse ni dejar escapar su contenido al embalaje o envase secundario (cooler).

##### **Transporte de muestras del Laboratorio Centinela Regional al Instituto Nacional de Salud**

El Laboratorio Centinela Regional separará el sobrenadante de todas las muestras positivas y el 10% de las muestras negativas en un criovial de 2.0 ml que será conservado en congelación a -70° C. **Mensualmente** estas muestras serán enviadas al Instituto Nacional de Salud congeladas en hielo seco y el embalaje ha utilizar comprenderá cuatro elementos (Anexo 6):

- Un envase primario: criovial 2.0 ml
- Un envase secundario: bolsa plástica
- Un primer envase exterior: caja de EPS tecnopor® con hielo seco
- Un segundo envase exterior: caja de cartón

Los recipientes primarios (criovial) envueltos en parafilm® se colocarán en un embalaje o envase secundario (bolsa plástica), los cuales a su vez se deben sujetar dentro de los embalajes o envases exteriores con material amortiguador que tenga propiedades absorbentes para proteger en caso de derrame.

El envase o embalaje exterior que contiene el hielo seco (caja de EPS tecnopor®), deberá permanecer cerrado pero no en forma hermética para facilitar la salida del dióxido de carbono y prevenir una acumulación de gas, cuya presión pudiera romper los embalajes o envases internos; y se debe adherir un rótulo con la indicación “**hielo seco**”.

Finalmente, el embalaje o envase anterior debe ir dentro de una caja de cartón, sellada con cinta de embalaje y con una etiqueta que indique lo siguiente:

- Nombre, dirección y teléfono del Laboratorio de Referencia Regional remitente
- Nombre, dirección y teléfono del Instituto Nacional de Salud con atención al Laboratorio de Virus Respiratorios.

Las muestras para IFI deben ser transportadas al Laboratorio Centinela Regional en cadena de frío (2-8°C) y las muestras para aislamiento viral deben ser conservadas a -70°C y enviadas al Instituto Nacional de Salud en hielo seco

## V. REGISTRO DE MUESTRAS

El Laboratorio Centinela Regional recibirá y registrará la muestra en el sistema NETLAB, para lo cual deberá seguir los siguientes procedimientos:

### Paso 1: Codificar la muestra

El Laboratorio Centinela Regional contará con etiquetas de códigos de barras impresas, las cuales deberán ser adheridas al recipiente que contenga la muestra y la ficha correspondiente. Se debe asegurar que tanto la ficha como el envase tengan etiquetas del mismo código.

### Paso 2: Recibir la muestra

- En el menú de opciones (parte izquierda de la pantalla), hacer clic en la opción **“Recibir muestra”**
- En la ventana que aparecerá en la parte derecha, en el campo **“código muestra”** se deberá ingresar el código de la muestra que figura en la etiqueta de códigos de barra, manualmente o con la lectora de códigos de barra.
- En el campo **“empaque”** se deberá seleccionar el tipo de empaque en el que vino la muestra según la evaluación de la conformidad del contenedor externo y la muestra enviada (**“adecuada”, “inadecuada”, “derramada” o “insuficiente”**).
- En el campo **“temperatura”** se deberá seleccionar la temperatura con la que vino el empaque conteniendo las muestras.
- Luego de ingresar los datos se debe presionar el botón **“Guardar”** para que la información quede registrada en el sistema.

Nota: El Laboratorio Centinela Regional para este procedimiento deberá obviar el llenado del campo **“estado”**, el cual por defecto tiene el valor **“conforme”**

### Paso 3: Registrar muestra

- En el menú de opciones (parte izquierda de la pantalla), hacer clic en la opción **“Registrar muestra”**.
- En la ventana que aparecerá en la parte derecha, en el campo **“código muestra”** se deberá ingresar el código de la muestra que figura en la etiqueta de códigos de barra, manualmente o con la lectora de códigos de barra.
- El llenado del campo **“tipo paciente”** se obviará para este procedimiento, el cual por defecto tiene el valor **“humano”**
- En el campo **“enfermedad”** se deberá seleccionar **“Virus Respiratorios”**.
- En el campo **“tipo muestra”** se deberá seleccionar **“Hisopado faríngeo”**
- En el campo **“laboratorio”** se deberá seleccionar la opción **“Laboratorio Regional”** correspondiente

- Después de seleccionar los campos *“enfermedad”* y *“tipo de muestra”*, se activará las opciones del campo *“prueba”*, y se deberá seleccionar con un check la opción *“inmunofluorescencia indirecta”*
- En la sección **“DATOS DEL PACIENTE”**, primero se debe realizar una búsqueda del paciente para ver si ya existe en la base de datos del sistema y, de esa forma, evitar la duplicidad de pacientes. Para ello, en el campo **“ap paterno”** se deberá ingresar el apellido paterno del paciente a buscar, si se desea se puede ingresar el apellido paterno y el nombre para que la búsqueda sea más exacta (también se puede ingresar parte del apellido, por ejemplo, las 3 primeras letras para evitar el problema de nombres mal ingresados). Luego se debe hacer clic en la imagen de la lupa (campo **“buscar paciente”**), al hacer esto se abrirá una ventana nueva (ventana pop-up) con un listado de los pacientes que coincidan con los datos ingresados. Si el paciente requerido se encuentra en dicha lista entonces se deberá hacer clic en la palabra *“seleccionar”* correspondiente a dicho paciente, ubicada en la parte izquierda del listado. Al hacer esto, los datos del paciente se cargarán en la ventana principal de ingreso de datos del paciente (nombres, fecha de nacimiento, edad, sexo, número de DNI, teléfono, e-mail, etc). En caso que el paciente no se encuentre en el listado se deberá cerrar la ventana pop-up y registrar los datos del paciente en los campos respectivos.
- En la sección **“DATOS DE LA MUESTRA”**, en el campo **“número oficio”** se deberá ingresar el número de documento con el que es entregada la muestra o en caso contrario se puede dejar en blanco este campo). En el campo **“fecha obtención muestra”** se deberá ingresar la fecha de obtención de la muestra. El llenado del campo **“fecha recepción ins”** se obviará para este procedimiento. En el campo **“fecha recepción lab regional”** se deberá ingresar la fecha en que la muestra llega al Laboratorio Centinela Regional. En el campo **“motivo muestra”** se deberá seleccionar *“Vigilancia”*.
- En la sección **“DATOS DEL ESTABLECIMIENTO DE ORIGEN”** se deberá buscar el establecimiento de origen de la muestra. El proceso de búsqueda es similar a la de pacientes. Se deberá escribir el nombre (completo o parte) del establecimiento a buscar. Luego se debe hacer clic en la imagen de la lupa (campo **“establecimiento”**), al hacer esto se abrirá una ventana nueva (ventana pop-up) con un listado de los establecimientos que coincidan con los datos ingresados. Una vez encontrado el dato deseado se deberá hacer clic en la palabra *“seleccionar”* correspondiente a dicho establecimiento, ubicada en la parte izquierda del listado. Al hacer esto, los datos del establecimiento se cargarán en la ventana principal de ingreso de datos (establecimiento, DISA, departamento, e-mail, etc)
- Al seleccionar el establecimiento de origen, automáticamente se cargan los datos en la sección **“DATOS DEL ESTABLECIMIENTO DE ENVÍO”** con los datos del establecimiento de origen. En caso el establecimiento de envío sea diferente al de origen se puede modificar siguiendo el procedimiento de búsqueda anterior.
- En la sección **“DATOS DEL MÉDICO”** se deberá buscar al médico que firma la ficha de la muestra respectiva. El proceso de búsqueda es similar a las explicadas anteriormente. Este campo puede ser dejado en blanco.

- Finalmente, se deberá presionar el botón **“guardar”** para que la información ingresada quede registrada en el sistema. Si los datos han sido grabados correctamente aparecerá un aviso en color azul en la parte superior de la pantalla indicando que la muestra ha sido grabada satisfactoriamente.

## VI. METODOLOGIA DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Es una técnica de tinción indirecta de anticuerpo fluorescente para la identificación de virus en cultivos de tejido infectado y en muestras preparadas de de hisopados nasal y faríngeo combinado. Consta de dos reactivos inmunológicos, un anticuerpo monoclonal antiviral de ratón sin conjugar que se aplica a células fijas y se une al antígeno viral en cuestión, si está presente en el sustrato celular; luego se añade una inmunoglobulina anti-ratón conjugada con fluoresceína isotiocianato (FITC) y se observa en microscopio de epifluorescencia a 570 nm. El uso de anticuerpos monoclonales maximiza la especificidad. Una reacción positiva es aquella en la cual se observa una fluoresceína brillante de color verde manzana y la células no infectadas se contratiñen con azul de Evans.

### MATERIALES

- Láminas portaobjetos para IFI con 12 pozos (c/ pozo 5-6 mm)
- Kit IFI para determinación de virus respiratorios
- Laminillas cubreobjetos 24 x 60 mm.
- Crioviales estériles de 2ml
- Crioviales estériles de 4.5 ml
- Pipetas Pasteur o de transferencia
- Tips con capacidad para 100 ul
- Tampón Fosfato Salino (PBS) pH 7.2 y 7.6.
- Caldo triptosa fosfato o Solución de Hanks, como medio de transporte
- Antibiótico - antimicótico (solución 100 x) x 100 ml Sigma - A 9909
- Hisopos estériles de dacrón con mango de plástico
- Acetona Q.P. (químicamente pura)

La acetona es un compuesto higroscópico que se usa como fijador y su mezcla con agua y PBS puede causar una apariencia turbia en los ensayos de fluorescencia. Se debe asegurar que el recipiente de la acetona esta bien sellado para evitar la absorción higroscópica de agua

### EQUIPOS

- Pinza
- Microscopio de epifluorescencia
- Vortex
- Incubadora 37°C
- Centrífuga
- Cámara húmeda
- Cabina de bioseguridad II

## PROCEDIMIENTOS

- Agitar el hisopo en el medio de transporte utilizando un vortex.
- Antes de retirar el hisopo presionarlo contra las paredes del tubo para escurrir el líquido.
- Centrifugar a 1700 rpm por 10 minutos.
- Separar el sobrenadante y conservarlo en un vial estéril de 2 ml a -70°C para aislamiento viral en cultivo de células o almacenar.
- Agregar al sedimento de células 2.0 ml de PBS (pH: 7.2), resuspender el sedimento celular y luego agregar nuevamente 2.0 ml de PBS
- Homogenizar en un vortex
- Centrifugar a 1700 rpm por 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante (eliminación del moco) y resuspender el sedimento de células en PBS (pH: 7.2)
- Homogenizar en un vortex
- Centrifugar a 1700 rpm por 10 minutos
- Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento con el PBS sobrante.
- A partir de la suspensión obtenida proceder a cubrir ocho pocillos de la lámina portaobjetos.
- Se debe comprobar por observación al M/O/C que la concentración de células sea la adecuada sin que exista sobre posición, dejar secar al medio ambiente.
- Fijar con acetona fría (2-8° C) durante 10 minutos y dejar evaporar la acetona al medio ambiente.

**Nota:** La acetona reutilizada no permitirá la fijación adecuada de las células en la lámina y se desprenderán durante el proceso. Asimismo, debe evitarse que el PBS se encuentre contaminado o contenga residuos de anteriores fijaciones de láminas

## COLORACION DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

- Colocar sobre cada pocillo de la lámina cubriendo el pozo, una gota con la solución de trabajo del anticuerpo monoclonal específico para el virus que se desea detectar y el control negativo (suero normal de ratón o PBS). Se debe evitar la contaminación entre pozos continuos.
- Incubar en cámara húmeda a 37° C por 30 minutos. La cámara debe estar suficientemente húmeda para evitar que la solución de anticuerpos monoclonales se seque en la lámina.
- Lavar la lámina con PBS pH 7.6, primero agregando en forma de chorro y luego sumergir las láminas de 5 -10 minutos en un Coplin conteniendo PBS de reciente preparación
- Eliminar el exceso de líquido. Los pocillos deben permanecer húmedos durante todo el proceso, no debe haber líquido entre los pocillos.
- Colocar una gota del conjugado anti-ratón IgG - FITC. El conjugado fluorescente no debe exponerse a la luz durante periodos prolongados.
- Incubar a 37° C por 30 minutos en cámara húmeda

- Lavar la lámina con PBS pH 7.6, primero agregando en forma de chorro y luego sumergir las láminas de 5-10 minutos en un Coplin conteniendo PBS de reciente preparación
- Eliminar el exceso de líquido y dejar secar al medio ambiente, protegido de la luz.
- Agregar a la lámina la solución de montaje.
- Colocar la laminilla cubreobjetos evitando se formen burbujas de aire.
- Leer al microscopio de luz UV (Epifluorescencia) con objetivo de 40X y ocular de 10X longitud de emisión de onda 520 nm. La observación de las láminas deberá realizarse inmediatamente después de agregar la solución de montaje, en caso contrario guardar a -20°C.

**Nota:** Los tiempos y las temperaturas de incubación diferentes de los indicados en las instrucciones de la prueba pueden arrojar resultados erróneos.

## **LECTURA E INTERPRETACION**

El conjugado contiene Azul de Evans, el cual permite observar de color rojo las células negativas. La coloración positiva específica es de un color verde manzana intenso y brillante. Si se observa una o más células con este patrón de coloración puede considerarse un resultado positivo.

Se deben visualizar células completas con inclusiones fluorescentes verde brillante intenso; también se pueden observar estas células con luz blanca, presentando un color azul opaco y las células que no presenta fluorescencia son de color rojo (negativas) de esta manera nos aseguramos que no hay fluorescencia inespecífica.

### **ADENOVIRUS**

La fluorescencia se presenta en el núcleo, en el citoplasma o en ambos. La coloración del núcleo es uniformemente brillante, el citoplasma presenta granulaciones.

### **INFLUENZA A Y B**

Se observa fluorescencia en el núcleo, citoplasma o en ambos. El núcleo se observa brillante y el citoplasma presenta grandes inclusiones.

### **PARAINFLUENZA 1, 2, 3.**

La fluorescencia esta restringida al citoplasma que presenta granulaciones e inclusiones irregulares.

### **VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL**

La fluorescencia se observa en el citoplasma de la célula y también asociado con la presencia de sincicios, con granulaciones y pequeñas inclusiones. En las células del aspirado nasal faríngeo se observan células polarizadas de la mucosa respiratoria, que presentan gran cantidad de fluorescencia en la región del citoplasma en posición opuesta al núcleo.

## INMUNOFLUORESCENCIA NO ESPECÍFICA

- **Luminosidad difusa de color amarillo verdoso:** la tinción no se identifica con una morfología específica, las posibles causas: objetivos y láminas sucios.
- **Fluorescencia amarillo verdosa apagada asociada a agrupamiento de células:** la causa es el excesivo número de células y el conjugado está atrapado entre las capas de células, usar láminas con pozos de 5 a 6 mm. y una lámina por paciente.
- **Fluorescencia verde manzana sólo en el extremo de la muestra:** la tinción puede parecer específica, pero se debe a que la lámina se ha secado durante la incubación con los monoclonales o el conjugado o en el periodo antes de agregar el conjugado.

## INMUNOFLUORESCENCIA NEGATIVA

La ausencia de detección del virus en muestras de pacientes que presentan infección respiratoria aguda puede deberse a factores como:

- Obtención de muestra en un momento inadecuado del curso de la enfermedad (más de 7 días desde el inicio de la enfermedad o no hay eliminación de virus en el momento de la toma de muestra)
- No se realizó el hisopado adecuadamente sobre la zona de la mucosa afectada por el virus
- Manipulación inadecuada de la muestra.

La coloración positiva específica es de un color verde manzana intenso y brillante. Si se observa una o más células con este patrón de coloración y se ha asegurado que no hay fluorescencia inespecífica, puede considerarse un resultado positivo y se debe relacionar con los datos clínicos y epidemiológicos del paciente

## CONTROL DE CALIDAD

El Kit incluye láminas de control con células infectadas y no infectadas, permitiendo controlar la reacción de los anticuerpos monoclonales y del conjugado. Se debe realizar esta prueba antes de iniciar el trabajo con un nuevo kit.

La observación de las láminas al microscopio permite conocer el patrón de coloración para cada monoclonal específico. El control negativo no debe tener precipitaciones de color verde porque dificultan la lectura de la lámina, se aconseja sumergir la lámina en PBS para eliminar el moco u otros precipitados inespecíficos.

## VII. INFORME DE RESULTADOS

El Laboratorio Centinela Regional ingresará y verificará los resultados obtenidos, para lo cual deberá seguir los siguientes procedimientos:

### **Paso 1: Ingresar resultado**

- En el menú de opciones (parte izquierda de la pantalla), hacer clic en la opción ***“Ingresar resultado”***.

- En la ventana que aparecerá en la parte derecha, en el campo **“código muestra”** se deberá ingresar el código de la muestra que figura en la etiqueta de códigos de barra, manualmente o con la lectora de códigos de barra. Luego se deberá hacer clic en la imagen de la lupa para cargar, de forma automática, los datos de la muestra en la sección **“DATOS DE LA MUESTRA”** (código de paciente, código local, apellidos y nombres, documento de referencia, establecimiento, enfermedad, prueba, fecha laboratorio)
- En la sección **“VARIABLES DE RESULTADO”** se deberán ingresar los resultados propiamente dichos de la prueba. Al costado de cada resultado hay un campo para ingresar observaciones en caso sea necesario. La fecha de resultado sale por defecto y no puede ser modificada.
- Finalmente, se deberá presionar el botón **“ingresar”** para grabar los resultados en el sistema.

En el caso de que la muestra haya tenido algún problema y no se logró obtener el resultado, entonces se produce una “no conformidad”. En ese caso, en la sección **“DATOS DEL RESULTADO”** se debe seleccionar la opción **“no conforme”** (por defecto tiene el valor **“conforme”**), al hacerlo aparecerá una nueva opción para seleccionar el motivo de la no conformidad o motivo de rechazo (muestra insuficiente, contaminada, hemolizada, etc). Se puede agregar opciones a este listado en caso sea necesario. Igualmente, para finalizar se debe presionar el botón **“ingresar”** para grabar la no conformidad en el sistema.

### **Paso 2: Verificar resultado**

- En el menú de opciones (parte izquierda de la pantalla), hacer click en la opción **“Verificar resultado”**.
- En la ventana que aparecerá en la parte derecha se mostrará un campo con el listado de todas las muestras que se encuentran pendientes por verificar. Para verificar un resultado se deberá hacer clic en la imagen ubicada en la parte izquierda del listado (al lado izquierdo del código de la muestra) o ingresar el código de la muestra en el campo ubicado en la parte superior del listado y luego presionando la imagen de la lupa.
- En ambos casos, se mostrará una ventana con los resultados ingresados, si los resultados son correctos se debe presionar el botón **“guardar”** para que los resultados puedan ser accedidos por todos desde la página Web del Sistema NETLAB.
- En caso que los resultados ingresados estén incorrectos se puede usar la opción **“Editar resultado”** para hacer las correcciones necesarias y luego volver a la pantalla de verificación para terminar con el proceso.

## **VIII. BIOSEGURIDAD**

El manejo de muestras no debe constituir un riesgo para la salud humana, para lo cual se deben cumplir las siguientes recomendaciones:

- El operador para su protección debe usar guantes y mandil.
- Realizar el procedimiento de trasvase de muestras dentro de la cabina de bioseguridad.
- Envolver los crioviales con parafilm para evitar derrames

- Después de eliminar los guantes, el operador se debe lavar las manos con jabón para evitar infectarse por contacto los ojos o la boca.
- Los guantes, hisopos, tubos, tips o pipetas utilizados para trasvasar las muestras, deben ser eliminados dentro de un recipiente para ser autoclavados o sumergidos en hipoclorito al 5%.

# ANEXOS

## ANEXO 1

**Ministerio de Salud del Perú**  
**Vigilancia de influenza y otros virus respiratorios**  
**Ficha de investigación clínico - epidemiológica**

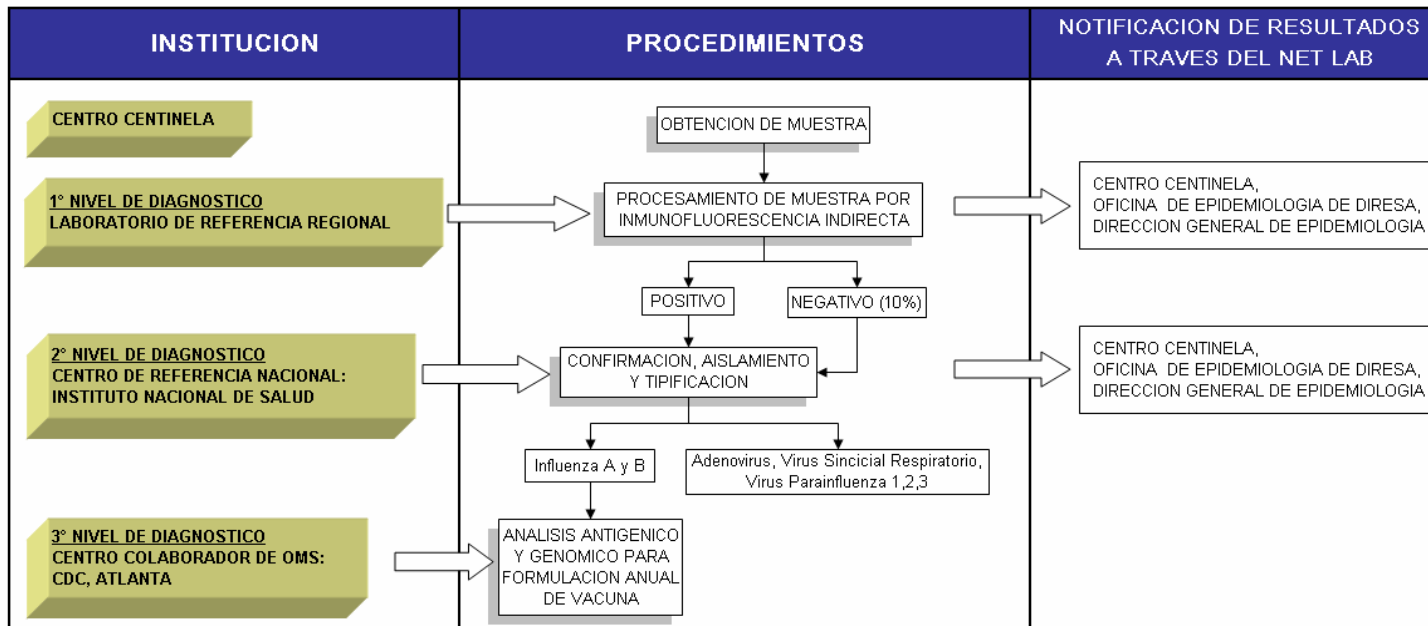
<b>ESTABLECIMIENTO NOTIFICANTE</b>			
Establecimiento de Salud: <input style="width: 150px;" type="text"/>		DIRESA / DISA: <input style="width: 100px;" type="text"/>	
Nombre del médico tratante: <input style="width: 150px;" type="text"/>		Correo: <input style="width: 100px;" type="text"/>	
<b>IDENTIFICACION DEL PACIENTE</b>			
Apellido paterno: <input style="width: 100px;" type="text"/>		Apellido materno: <input style="width: 100px;" type="text"/>	
Nombres: <input style="width: 100px;" type="text"/>			
Fecha de nacimiento (dd/mm/aa): <input style="width: 50px;" type="text"/>		Edad: <input style="width: 50px;" type="text"/>	
Años <input style="width: 50px;" type="text"/>		Meses <input style="width: 50px;" type="text"/>	
Sexo: Masculino <input type="checkbox"/>		Femenino <input type="checkbox"/>	
DNI: <input style="width: 100px;" type="text"/>		Ocupación: <input style="width: 100px;" type="text"/>	
Dirección y/o domicilio: <input style="width: 150px;" type="text"/>		Teléfono: <input style="width: 100px;" type="text"/>	
<b>ANTECEDENTES</b>			
Contactos con otras personas con sintomatología respiratoria en últimos 7 días: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No			
Contacto con animales: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No ¿Cuáles? <input style="width: 100px;" type="text"/>			
País-lugar que visitó últimos 15 días (Lugar, fecha ingreso y salida): <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>			
Vacunación Antigripal: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Fecha de Vacunación (dd/mm/aa): <input style="width: 50px;" type="text"/>			
<b>CLINICA</b>			
		Fecha de inicio de síntomas: <input style="width: 50px;" type="text"/>	
Fiebre:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Medida con termómetro:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Tos	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Temperatura Máxima (°C):	<input style="width: 50px;" type="text"/>
Dolor garganta	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Otalgia	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Rinorrea	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Adenopatías	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Expectoración	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Fotofobia	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Sibilancias	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Astenia	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Congestión faríngea	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Congestión conjuntival	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Otras manifestaciones:	<input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>		
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Vómitos	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Mialgias	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Dolor abdominal	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Malestar general	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Diarrea	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Erupción dérmica	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
<b>Criterios de gravedad (compromiso sistémico)</b>			
Hospitalización	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Dificultad respiratoria	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Falla multi orgánica	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Colapso circulatorio	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Fecha de defunción:	<input style="width: 50px;" type="text"/>	Pérdida de conciencia	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
	<input style="width: 50px;" type="text"/>	Muerte	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
<b>Diagnóstico presuntivo</b> <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>			
<b>Laboratorio</b>			
Tipo de muestra	Fecha de obtención (dd/mm/aa)	Tipo de Prueba	Resultado
Hisopado nasal:	<input style="width: 50px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>
Hisopado faríngeo:	<input style="width: 50px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>
Aspirado nasofaríngeo	<input style="width: 50px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>
Suero de fase aguda:	<input style="width: 50px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>
Suero de fase convalescente:	<input style="width: 50px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>
Otros: <input style="width: 100px;" type="text"/>	<input style="width: 50px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>	<input style="width: 100px;" type="text"/>
<b>Tratamiento</b>			
Antibióticos:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Cuáles: <input style="width: 100px;" type="text"/>	Antivirales: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Cuáles: <input style="width: 100px;" type="text"/>	

Fecha de llenado de la ficha:

Nombre y firma de la persona que llena la ficha: \_\_\_\_\_

## ANEXO 2

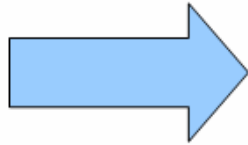
### FLUXOGRAMA PARA LA VIGILANCIA LABORATORIAL DE INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS



### ANEXO 03

#### TRANSPORTE DE MUESTRAS DEL CENTRO CENTINELA LOCAL AL LABORATORIO CENTINELA REGIONAL

**Centro  
Centinela  
Local**



La muestra debe ser transportada en cadena de frío (2-8°C) usando:

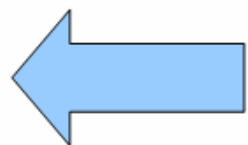
**Envase primario:**  
Criovial 4.5-5.0 ml



**Envase secundario:**  
Bolsa plástica



**Laboratorio  
Centinela  
Regional**



**Envase exterior:**  
Cooler con refrigerantes





**ANEXO 04**

**TRANSPORTE DE MUESTRAS DEL LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL  
AL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD**

**Laboratorio  
Centinela  
Regional**



La muestra debe ser transportada en cadena de hielo seco usando:

**Envase primario:**  
Criovial 2.0 ml



**Envase secundario:**  
Bolsa plástica



**Envase exterior:**

1. Caja de EPS  
tecnopor® con  
hielo seco



2. Caja de cartón



**INS**

