

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**“DETECCION Y SUBTIPIFICACION DEL VIRUS DE INFLUENZA HUMANA
MEDIANTE TECNICA RT-PCR EN TIEMPO REAL EN LABORATORIO DE
BIOLOGIA MOLECULAR DEL COMPLEJO ASISTENCIAL MIRAFLORES”**

Informe de práctica profesional controlada
presentada a la Facultad de Ciencias
Agropecuarias y Forestales de la Universidad
de La Frontera. Como parte de los requisitos
para optar al título de Biotecnólogo.

VALERIA ROMINA RIFFO CORTEZ

PROFESOR GUÍA

DR. ALEXY ROSALES ZAPATA

TEMUCO – CHILE

2012

**“DETECCION Y SUBTIPIFICACION DEL VIRUS DE INFLUENZA HUMANA
MEDIANTE TECNICA RT-PCR EN TIEMPO REAL EN LABORATORIO DE
BIOLOGIA MOLECULAR DEL COMPLEJO ASISTENCIAL MIRAFLORES”**

PROFESOR GUÍA

: _____

Alexy Rosales Zapata
Tecnólogo Médico
Doctor en Ciencias mención Biología Celular y
Molecular Aplicada

Jefe unidad de Biología Molecular,
Complejo Asistencial Miraflores

PROFESORES CONSEJEROS

: _____

Favián Treulén Seguel
Tecnólogo Médico
Citogenetista
Magister. Doctor.

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS

: _____

AGRADECIMIENTOS

Siento la inmensa necesidad de agradecer, a Dios por permitirme vivir cada experiencia al desarrollar mi carrera de Biotecnología, por llegar a esta instancia con un tanto de incertidumbre pero con enorme gozo por las etapas superadas con éxito. Todos mis logros, no serían posible sin toda la gente que quiero y estimo con el alma, que me han acompañado a lo largo de todo este proceso.

Gracias a la educación desde casa de mis padres, Erna Cortez Méndez y Manuel Riffo González, que apoyan cada decisión que tomo y que me orientan a ser una mejor persona cada día. Especialmente agradezco a mi madre por estar a cada minuto cerca mío entregándome su cariño y apoyo incondicional. A mi hermano, Ricardo Riffo Cortez que desde la distancia me apoya en todo lo que puede y me sigue enseñando como lo hacía desde la infancia. A mis tíos y primos que de una u otra forma me acompañaron hasta esta instancia.

Agradezco a Álvaro Klaiber Lagos por toda su paciencia y ayuda, por su amor, apoyo y orientación. Por cada etapa vivida juntos y por contenerme cuando lo he necesitado. A mis amigos y compañeros que pusieron un granito de arena en esta construcción. Gracias Ana Belén Jara, Felipe Pichuante Lillo, Stefanie Aeschlimann.

Agradezco a mis profesores especialmente de los que me llevé enseñanzas más allá del aula, el señor Favián Treulen Seguel quien de manera solemne y acogedora, siempre tuvo una palabra de aliento y jamás titubeó al entregar sus conocimientos, gracias por hacer que disfrute mi carrera.

Y como no agradecer inmensamente a mi estimado Tutor, Alexy Rosales Zapata de quién aprendí durante todo este año 2012. Que compartió su lugar de trabajo, sus vivencias y enseñanzas. Gracias por confiar en mi incluso cuando yo no lo hacía, gracias por devolverme la confianza en mí misma. Gracias por cada consejo, gracias por cada día compartido en el laboratorio, porque créame que de cada uno de esos días aprendí algo nuevo y esta experiencia la llevaré en mi corazón, a usted y cada una de las personas con las que compartí en el Complejo Asistencial Miraflores, MUCHAS GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	Infecciones Respiratorias Agudas (IRA)	5
2.2	Antecedentes históricos del virus de Influenza	5
2.3	Organización de la Unidad de Biología Molecular	8
2.4	Virus Influenza	10
2.5	Estructura y composición del virus Influenza	10
2.6	Tipos de virus Influenza	12
2.7	Ciclo biológico del virus de la Influenza	13
2.8	Transmisión del virus en humanos	14
2.9	Epidemias y pandemias	15
2.10	Definición de caso de enfermedad tipo Influenza	16
2.11	Obtención de la muestra para aislamiento viral	17
2.11.1	Hisopados o exudados nasofaríngeos (ENF)	17
2.11.2	Aspirados nasofaríngeos (ANF)	17
2.12	Factores que influyen en el aislamiento viral	17
2.12.1	Tiempo	17
2.12.2	Temperatura	17
2.12.3	Medios de Transporte Viroológico (MTV)	17
2.13	Requerimientos para el transporte de muestras clínicas	18
2.14	Detección de virus Influenza humana	19
2.15	Detección de ácido nucleico del virus Influenza a través de la técnica de amplificación genética reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	21
2.15.1	Extracción de material genético con kit de extracción Qiagen QIAamp Viral RNA	21
2.15.2	Transcriptasa reversa (RT-PCR)	21

2.15.3	Reacción en cadena de la polimerasa	22
2.15.4	PCR en Tiempo Real	23
2.16	Normas de bioseguridad	25
3	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1	Muestras clínicas	27
3.2	Calibración de equipo Real Time 7500 Applied BioSystems	28
3.3	Análisis Molecular	29
3.4	Extracción de ácidos nucleicos	29
3.4.1	Preparación de Reactivos con el Kit extracción de RNA viral QiagenQIAamp viral RNA mini kit	30
3.4.2	Protocolo de extracción de RNA viral (QiagenQIAamp viral RNA mini kit) (área 1)	31
3.5	Preparación del Mix de reacción	35
3.6	Carga de muestras y controles positivos	38
3.7	Transcripción reversa y amplificación de ADN	39
3.8	Análisis de curvas de amplificación	40
3.8.1	Análisis curvas RNP	41
3.8.2	Análisis control negativo	42
3.8.3	Análisis control de extracción	43
3.8.4	Análisis controles positivos	44
3.8.5	Análisis Influenza tipo A (Flu-A)	44
3.8.6	Análisis Influenza A Subtipo pandemico H1N1 (pdm H1)	45
3.8.7	Análisis Influenza A Subtipo H3N2 (H3)	46
3.8.8	Análisis Influenza B (Flu-B)	46

3.8.9	Análisis individual de las muestras	47
3.9	Envío de resultados y muestras a confirmación al Instituto de Salud Pública (ISP)	51
3.9.1	Preparación de muestras para el envío a ISP	51
3.10	Análisis Experimental. Test rápido BD Directigen™ EZ Flu A+B	52
3.11	Análisis test rápido BD Directigen™ EZ Flu A+B	54
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.1	Resultados de nuestros análisis	56
4.2	Comparación resultados IFI/RT-PCR Tiempo Real	57
4.3	Comparación de nuestros resultados con Organismo Validador Nacional. Control externo de calidad	58
4.4	Resultados de análisis experimental para Test BD Directigen™ EZ Flu A y B comparados con la RT-PCR Tiempo Real	60
5	CONCLUSIONES	64
6	LITERATURA CITADA	66
7	ANEXOS	69

1. INTRODUCCIÓN

La Influenza es una enfermedad respiratoria aguda de origen viral, considerada un grave problema de salud pública por su elevado potencial epidémico (Rabagliati, 2004). Esto se expresa por una alta demanda de atención médica ambulatoria e ingreso hospitalario en niños, adultos mayores, pacientes crónicos e inmunodeprimidos llegando a ocasionar en algunos casos su muerte. Según el Ministerio de Salud de Chile (2010), su potencial epidémico se asocia a la elevada transmisibilidad del virus, alta variabilidad antigénica debido a la elevada capacidad para experimentar mutaciones y reorganizaciones genéticas al ser un virus ARN, pudiendo generarse en él cambios genéticos menores o drift antigénicos ocasionando brotes epidémicos y posibilidad de intercambio genético entre virus de origen humano y animal llamados shift antigénicos dando origen a nuevos mutantes del virus causando pandemias.

La presencia del virus en pacientes con síntomas como fiebre $> 38,5^{\circ}\text{C}$, tos, mialgias, odinofagia, cefalea y compromiso del estado general se puede detectar mediante técnicas de aislamiento viral, detección de antígenos o genoma viral, siendo esta última la de mayor sensibilidad y de alta especificidad ($> 95\%$), sólo realizable en laboratorios de especialidad que cuenten con equipamiento idóneo y personal altamente entrenado y certificado, lo cual garantiza un resultado confiable ante la elevada sensibilidad del procedimiento.

La búsqueda del agente etiológico se realiza en muestras de secreción respiratoria siendo la muestra de elección o Gold Standard el aspirado nasofaríngeo (ANF), debido a la mayor concentración de virus que en ella se encuentra. El rendimiento de detección viral será mayor si la muestra se obtiene los primeros cuatro días de enfermedad y su traslado al laboratorio se realiza inmediatamente, en medio de transporte viral y en frío (4°C aproximadamente) para preservar el genoma.

En mayo del año 2009, al igual que en el resto del mundo, Chile enfrentó una pandemia causada por el virus de Influenza A del subtipo H1N1. Para garantizar la detección oportuna del virus y otros patógenos emergentes en regiones, el Ministerio de Salud implementó seis centros de alta

complejidad para satisfacer esta demanda y fortalecer la vigilancia epidemiológica regional mediante el desarrollo de técnicas de biología molecular (Gallegos *et al.*, 2010), generando resultados confiables y una estadística de acuerdo al comportamiento del virus, respecto a la prevalencia de los subtipos diagnosticados en los pacientes y el debido registro e información de éstos, el Instituto de Salud Pública de Chile elabora las estrategias para la conformación de la vacuna del año venidero.

Uno de estos seis centros, es la Unidad de Biología Molecular dependiente del Complejo Asistencial Miraflores, centro de especialidad y referencia ubicado en la ciudad de Temuco, región de La Araucanía, que tiene como fin u objetivo obtener un registro preciso de lo que sucede en la población con respecto al comportamiento del virus Influenza, caso muy atingente en los últimos años, analizando cada uno de los casos sospechosos de presentar este virus, controlando así la posible aparición del virus Influenza no tipificables o subtipificables, dando informe inmediato al Instituto de Salud Pública para la confirmación y posterior secuenciación de los posibles nuevos mutantes que pudieran provocar una pandemia similar o de mayor incidencia en la población como la sucedida el año 2009.

Es por estas razones, junto al interés por interiorizarme en la biología molecular, conocer el funcionamiento de laboratorios clínicos de la Red de Salud Pública que surge mi propósito de participar y aprender técnicas, además de adquirir competencias profesionales en la biotecnología, desarrollando protocolos para diagnóstico de la Influenza a través de RT-PCR en Tiempo Real y entender la relevancia local y nacional de esta técnica y el comportamiento de este virus en la población.

Finalmente se presentarán los resultados obtenidos del análisis del total de las muestras procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Complejo Asistencial Miraflores desarrolladas dentro de la práctica profesional controlada llevada a cabo durante el periodo 2012. Cabe destacar que todas las muestras procesadas realizadas durante este periodo fueron objeto real de pacientes procedentes de la Red Asistencial Araucanía Sur y de la región de Los Ríos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar detección y subtipificación del virus de la Influenza humana en muestras de aspirado nasofaríngeo provenientes de los establecimientos de salud de La Red Asistencial Araucanía Sur y Valdivia, en dependencias del Laboratorio Biología Molecular del Complejo Asistencial Miraflores del Servicio Salud Araucanía Sur de la ciudad de Temuco.

Objetivos específicos

- Realizar protocolos de extracción de material genético, ARN viral, de muestras de aspirado nasofaríngeo en dependencias del Laboratorio Biología Molecular del Complejo Asistencial Miraflores mediante la utilización de kit comerciales.
- Realizar protocolos para detección y subtipificación del virus de la Influenza humana mediante metodología de RT-PCR en Tiempo Real, de material genético extraído de muestras de aspirado nasofaríngeo enviadas a análisis al Laboratorio Biología Molecular de Complejo Asistencial Miraflores.
- Aplicar conocimientos teórico - prácticos en biología molecular para la validación de curvas de amplificación del genoma extraído de las muestras con posible virus de la Influenza humana dentro del Laboratorio Biología Molecular del Complejo Asistencial Miraflores.
- Realizar un análisis de la utilidad de un test rápido de biología molecular para la detección del virus de la Influenza humana, utilizando la metodología de inmunoensayos, BD Directigen™, en muestras de aspirado nasofaríngeo testeadas para Influenza en el Laboratorio Biología Molecular del Complejo Asistencial Miraflores.

- Elaborar un informe detallado de Práctica Profesional Controlada sobre los protocolos y técnicas para la detección del virus de la Influenza humana dentro del Laboratorio Biología Molecular del Complejo Asistencial Miraflores del Servicio Salud Araucanía Sur de la ciudad de Temuco.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Infecciones Respiratorias Agudas (IRA).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2003) define como infección respiratoria aguda (IRA) toda aquella patología de presentación aguda que produce afección del tracto respiratorio tanto superior como inferior. Éstas constituyen un complejo grupo de enfermedades provocadas por diversos agentes causales que afectan cualquier punto de las vías respiratorias (Prieto, *et al.*, 2000). Dentro de estos, los virus son el agente etiológico que ocupa un lugar prioritario. La Influenza es el virus de mayor importancia médica seguido por el virus Sincitial Respiratorio (VRS), debido a la severidad de la enfermedad y por la alta transmisibilidad que éstas presentan (Razón, 2003). Las IRA pueden ser causadas por otros agentes virales como Adenovirus, Parainfluenza, Rinovirus, Hantavirus, entre otros (OMS, 2003).

En la última década en Chile, las enfermedades del sistema respiratorio ocupan el tercer lugar como causa de muerte, luego de las enfermedades cardiovasculares y los cánceres. La mortalidad llega a tasas de 52,77 por 100.000 habitantes; dentro de este grupo se encuentran las defunciones por Influenza y Neumonía (MINSAL, 2012). En el mundo son la principal causa de morbilidad y mortalidad. En la región de Las Américas las IRA se ubican entre las cinco primeras causas de defunción en menores de 5 años representando la causa principal de enfermedad y consulta médica estimándose que diariamente se producen 300 muertes en menores de un año producto de esta entidad (OMS, 2003).

2.2. Antecedentes históricos del virus.

La palabra influenza proviene de la Edad Media, donde se atribuía a la “influencia” de los astros la aparición de dicha enfermedad. Ya en el siglo XVIII se sabe de epidemias provocadas por el virus Influenza, entendiéndose epidemia como la ocurrencia de una enfermedad infecciosa

en una comunidad o área, excediendo el número esperado (Vaughan y Morrow, 1989). Posteriormente, se tienen datos de grandes epidemias de los años 1889-90 y 1898-1900 en Norteamérica. Esta información es indirecta debido a que se probó anticuerpos para Influenza en el suero de gente que vivió en esa época (Ayora-Talavera, 1999). La verdadera información directa se ha obtenido hasta comienzos de la década de 1930, en que se aisló y caracterizó el virus Influenza de procedencia porcina en 1931 y luego el de procedencia humana en 1933 siendo el comienzo de un mejor entendimiento de la enfermedad (Cuadro N°1).

Como se ilustra en la Figura N°1, en 1918, un virus Influenza H1N1 estrechamente relacionado con los virus aviáres se adaptó para replicar eficientemente en los seres humanos, generando una pandemia que dejó un recuerdo imborrable (1918-19) causando la muerte de aproximadamente 50 millones de personas y que a pesar que los casos de Influenza se dieron en muchos lados del planeta (Cabezas, 2006) recibe hasta estos días el nombre de “española”.

Cuadro N°1: Hitos relevantes en la historia de la influenza.

AÑO	ANTECEDENTE
1918	Descubrimiento de la influenza por Dujarric de la Riviére Nicolle y Levailly (transmisión)
1931	Shope (aislamiento del cerdo)
1933	Smith, Andrews y Laidlaw (aislamiento y caracterización de la influenza tipo A desde humanos)
1936	Burnet (cultivo en huevo fecundado)
1940	Francis y Magill, (hallazgo del virus influenza tipo B)
1941	Hirst (Hemaglutinación y elución a 37°C)
1944	Vacunas
1947	Taylor (descubrimiento influenza tipo C)
1957	“Gripe asiática”
1968	“Gripe de Hong Kong”
1981	Wiley, Skehel y Wilson (estructura tridimensional de la HA)
1983	Colman, Varghese y Laver (estructura tridimensional de la NA)

Adaptación de Cabezas, (2006).

Las pandemias pueden generar una enfermedad epidémica afectando a diversos países y que ataca a casi todas las personas de una región geográfica (Fraser, *et al.*, 2009), como las llamadas gripe asiática de 1957 y gripe de Hong Kong de 1968 presentaron una mortalidad enormemente más baja (en comparación a las anteriores) debiéndose por ejemplo a una situación de alimentación considerada como “normal” en muchas zonas de la Tierra, y la utilización de medidas sanitarias adecuadas, que se intensificaron a partir de los años cincuenta, podrían explicar la incidencia menor de esta pandemia en la población.

El virus de la influenza en 1957 (gripe asiática, un virus H2N2) adquirió tres segmentos genéticos de una especie aviar (una hemaglutinina, una neuraminidasa, y un gen de la polimerasa, PB1), y en 1968 el virus Influenza H3N2 adquirió dos segmentos genéticos de una especie de aves (hemaglutinina y PB1). Según la Figura N°1, cepas pandémicas futuras podrían surgir a través de cualquier mecanismo (Belshe, 2005).

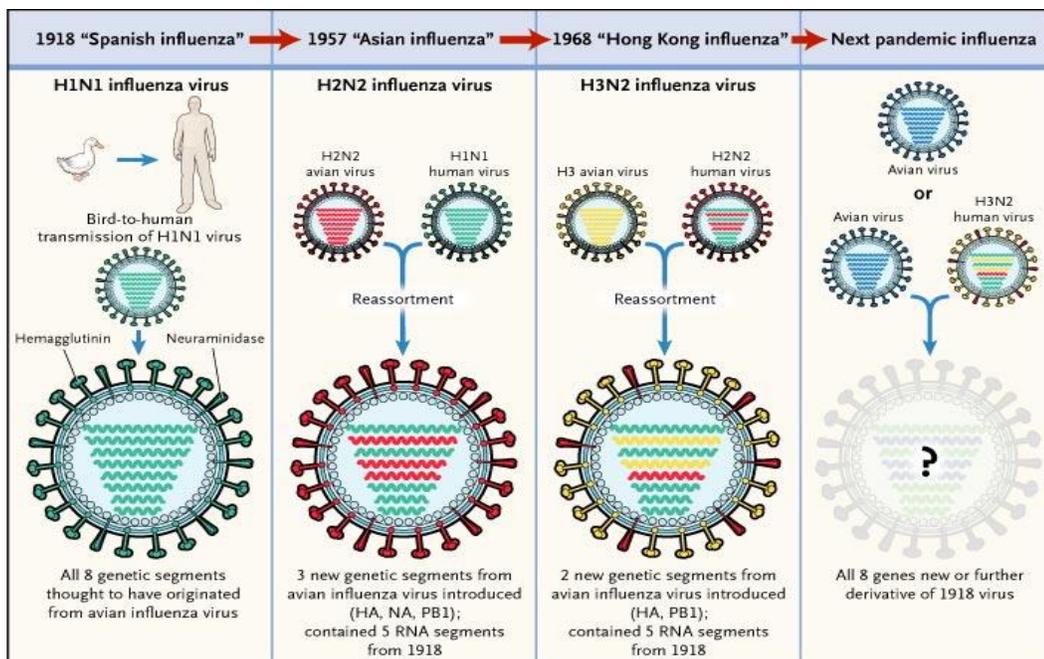


Figura N°1: Los dos mecanismos por los que se origina la influenza pandémica (Belshe, 2005).

El virus de la Influenza afecta de modo especial a ancianos y niños, además el costo económico asociado a salud por la alta demanda de prestaciones, hospitalizaciones y recurso humano la hace una enfermedad prioritaria. Debido a esto y la posible aparición de nuevos mutantes del virus es necesario mantener un monitoreo constante sobre los virus estacionales y la aparición de posibles nuevos subtipos (Cabezas, 2006).

2.3 Organización de la Unidad de Biología Molecular

En mayo del año 2009, al igual que el resto del mundo, Chile enfrentó una pandemia causada por el virus de influenza A del subtipo H1N1. Para garantizar la detección oportuna del virus y otros patógenos emergentes en regiones, el Ministerio de Salud implementó 6 centros de alta complejidad (Cuadro N°2) para satisfacer esta demanda y fortalecer la vigilancia epidemiológica regional mediante el desarrollo de técnicas de biología molecular.

Para certificar el proceso de validación de estos laboratorios y asegurar su correcto funcionamiento, el ISP estableció criterios de evaluación, como visitas a terreno por parte de un profesional de esta institución y la evaluación de concordancia de resultados, analizando el 100% de las muestras estudiadas por los laboratorios regionales durante los primeros meses del 2010 como se muestra en el Cuadro N°2. Posteriormente, sólo se envían al ISP aquellas muestras con resultados positivos y casos no confirmados (Gallegos *et al.*, 2010).

Cuadro N°2: Laboratorios regionales implementados con técnicas de biología molecular, numero de muestras de influenza procesadas en los centros regionales y concordancia con el ISP Chile, enero-junio de 2010 (Gallegos *et al.*, 2010).

Región	Laboratorios	N° Muestras Procesadas	Concordancia Resultados ISP
II	CAN Antofagasta	230	100%
V	Hospital San Camilo(*)	33	100%
RM	Hospital San Juan de Dios	92	100%
VIII	Hospital Gmo. Grant Benavente	170	100%
IX	Complejo Miraflores	91	100%
X	Hospital Pto. Montt	233	100%
Total		849	100%

(*) Se agregan otras 1.300 muestras procesadas en el 2009 para un estudio de influenza pandémica en la región.

Fuente: Laboratorio de Virus Exantemático y Respiratorios -Virología ISP (Sistema File Maker).

De acuerdo a la estructura básica de un laboratorio de Biología Molecular y en concordancia a las instrucciones, capacitaciones y supervisiones del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) y los expertos en el área de virología clínica del Centro para el Control y Prevención de enfermedades de Estados Unidos (CDC) quienes asesoraron el proceso de instalación de estos centros en el país y la capacitación de su recurso humano, la infraestructura básica de estos laboratorios consta de:

- **Área de extracción de muestras (área 1):** donde se realiza la purificación del material genético para efectuar posteriormente la RT-PCR.
- **Área limpia (área 2):** para la preparación de reactivos, además de la carga de las mezclas de reacción y de los controles negativos.
- **Área sucia (área 3):** para la carga de las muestras, controles positivos y controles negativos de extracción.

Las tres áreas están separadas entre sí para evitar al máximo la contaminación de las muestras debido a la alta sensibilidad de la técnica empleada descrita posteriormente (RT-PCR).

Además, se requiere un cuarto espacio, una sala de lectura y análisis de las curvas de amplificación donde se ubican el termociclador y computador. Y un quinto espacio, fuera del laboratorio (oficina) donde generar los informes para cada paciente.

Los kits y primers necesarios para realizar los exámenes son adquiridos según protocolo del CDC. Los controles positivos de los diferentes tipos y subtipos de virus Influenza los prepara y entrega el ISP a cada uno de los laboratorios de biología molecular implementados (Gallegos *et al.*, 2010).

Para el funcionamiento de este tipo de laboratorio se requiere un equipamiento de alta tecnología y de alto costo: termociclador en Tiempo Real de 96 pocillos con su PC (de preferencia), un gabinete de bioseguridad, dos campanas de flujo laminar (para PCR), un freezer -80°, dos refrigeradores para almacenar muestras y/o reactivos y una UPS para la protección eléctrica de los equipos. Otros implementos necesarios son las centrífugas y ultracentrífugas, agitador de tubos (vortex), set de micropipetas, etc.

2.4. Virus Influenza.

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda de origen viral, considerada un grave problema de salud pública debido a su elevado potencial epidémico. Esta patología es causada por un virus Influenza que se clasifica en tres tipos A, B y C, que corresponden a tres de los cinco géneros existentes dentro de la familia *Orthomyxoviridae* (Rabagliati, 2004).

2.5. Estructura y composición del virus Influenza

El virus de la Influenza cuenta con una nucleocápside integrada por las nucleoproteínas (NP) y el ARN viral. La clasificación de los virus de Influenza, según los tres tipos (A, B y C) se basa en sus antígenos internos, la proteína de la matriz (M) junto con la nucleocápside; los subtipos que se conocen solamente en el virus Influenza tipo A, los definen los antígenos de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) o sialidasa, distinguiéndose actualmente un total de nueve subtipos para la NA y dieciséis para la HA (Cabezas y Hannoun, 1990), aunque en la

especie humana sólo se han encontrado las cepas con HA 1 a 3 y NA 1 y 2 (Avendaño *et al.*, 2011).

La nucleocápside del virus de la Influenza está rodeada por una envoltura cubierta de proyecciones. Ésta envoltura presenta dos capas, una externa de naturaleza lipídica, derivada de la membrana citoplasmática de la célula huésped, y una capa interna, constituida por una proteína de información viral, de bajo peso molecular, que representa el 33% de todas las proteínas y proporciona estabilidad al virión, se le conoce como proteína matriz o M.

Como se muestra en la Figura nº2, en la envoltura lipídica se insertan radialmente a modo de proyecciones o espículas, las dos glicoproteínas del virus, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) (Cabezas y Hannoun, 1990). La HA es la más abundante (80%) tiene forma de bastón, están constituidas por 3 polipéptidos (trímero) y cada polipéptido se descompone a su vez en dos subunidades H1 y H2. Por la extremidad hidrófoba (H2) se une a la capa lipídica de la envoltura y por su extremidad hidrófila (H1) se fija a los receptores mucoproteicos de los glóbulos rojos y de las células del epitelio respiratorio, siendo las responsables del fenómeno de hemaglutinación y de la fijación del virus a las células, primer paso para su penetración y replicación. Las espículas de NA están compuestas por una cabeza y un filamento, la cabeza está constituida por la asociación de cuatro glicopéptidos (tetramero) que presentan actividad fermentativa pues al actuar sobre el ácido siálico (N-acetilneuramínico), principal componente de los receptores celulares, los destruye produciendo el fenómeno de separación del virus de las células infectadas, listo para infectar a otras células.

El genoma de estos virus está compuesto por ARN lineal de cadena simple con polaridad negativa, segmentado. Para los tipos Influenza A y B, el genoma está constituido por 8 segmentos de ARN (Figura Nº2) y 7 para el tipo Influenza C. Cada segmento del genoma contiene unido de forma covalente ARN polimerasa, enzimas indispensables para iniciar el proceso de replicación viral (Avendaño *et al.*, 2011). Los segmentos de ARN números 1, 2 y 3 se hallan relacionados, respectivamente, con la polimerasa básica 2 (PB2), la polimerasa básica 1 (PB1) y la polimerasa ácida (PA). Estas polimerasas son responsables de procesos de replicación viral y su interacción

con el huésped. Los cambios sutiles en su estructura podrían formar un virus altamente citotóxico y letal. Asimismo, estas polimerasas son determinantes de la alta virulencia ya que actúa específicamente sobre los macrófagos alveolares y los destruye (Taubenberger *et al.*, 2000).

El gen número 4 codifica la biosíntesis de la HA; el número 5, la biosíntesis de NP integrante de la nucleocápside; el número 6, la biosíntesis de NA; el número 7, la biosíntesis de las proteínas M1 y M2, componentes de la matriz de la envoltura, y el número 8, la biosíntesis de las proteínas no estructurales, NS1 y NS2 (Trifonov *et al.*, 2009).

Las actividades de la HA y de la NA radica en las cavidades de sus cabezas. El monómero de la HA puede efectuar la fusión del virus con la membrana de la célula hospedadora. Para la NA la función principal es la liberación de los virus recién formados, con ARN, cápside y glicoproteínas (viriones), evitando su acumulación (Cabezas y Hannoun, 1990).

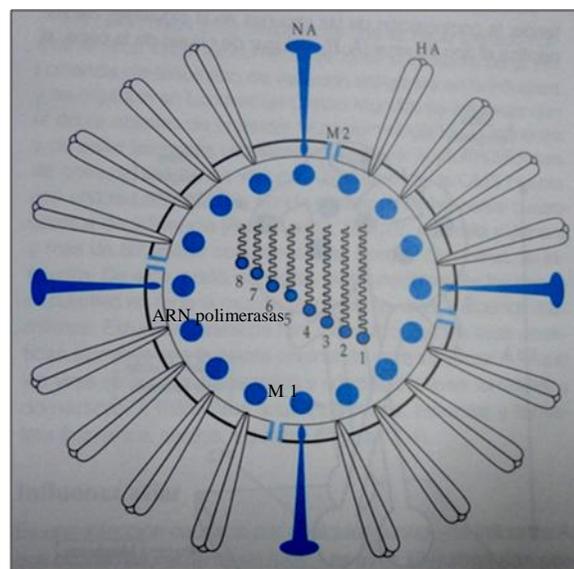


Figura N°2. Esquema de la estructura del virus de la influenza: Las glicoproteínas de superficie HA y NA emergen desde una doble capa lipídica (manto), que a su vez presenta poros conformados por la proteína M2. La proteína M1 conforma la matriz y está representada por círculos azules. Los ocho espirales interiores corresponden al ARN segmentado cubierto por las proteínas PB1, PB2 y NP. Los círculos de su extremo inferior corresponden a ARN polimerasa (Avendaño *et al.*, 2011).

2.6. Tipos de virus Influenza.

Los virus de Influenza tipo A infectan a una amplia variedad de aves y mamíferos, incluyendo humanos, y se dividen en subtipos según las glicoproteínas que presenten en la superficie o capa externa del virus: la HA y la NA (Boggild y McGreen, 2010); las cuales confieren propiedades biológicas muy importantes al virus tales como: la inducción de inmunidad en el huésped y facilitar el proceso infeccioso a nivel celular. Los virus Influenza tienen como material genético ARN y por lo tanto, tienen mayor variabilidad genética, debido a que las ARN polimerasas no tienen un sistema de corrección de errores como las ADN polimerasas (Avendaño *et al.*, 2011). Por esta misma característica los virus Influenza tipo A, tienen una alta capacidad para experimentar mutaciones y reorganizaciones genéticas, llegando a presentar cambios antigénicos de mayor (shift antigénico) o menor (drift antigénico) magnitud en sus proteínas externas (N y M), pudiendo generar la aparición de variantes virales que difieren parcial o totalmente de aquellas inmunológicamente conocidas por la población (Lagos, *et al.*, 1999).

En paralelo los virus de Influenza B infectan prioritariamente a humanos y debido a que solo existe un subtipo de ellos, tienen un bajo potencial pandémico, pero esto no impide que puedan provocar enfermedades respiratorias serias. Los virus de Influenza C causan enfermedades respiratorias moderadas en humanos y algunos animales, además de esto, solo se puede mencionar que han sido poco analizados. Boggild y McGreen (2010) indican a través de estudios filogenéticos, que los tres tipos de virus Influenza tienen un ancestro en común, sin embargo han divergido a tal grado, que los rearrreglos genéticos (el intercambio de segmentos de ARN viral entre diferentes virus) sólo pueden ocurrir entre virus del mismo tipo.

Cada año se enferman alrededor de 500 millones de personas a nivel mundial por infecciones con el virus de Influenza A, de los cuales entre 3 y 5 millones se convierten en casos graves que originan unas 250 a 500 mil defunciones. Estos casos de Influenza, que ocurren regularmente durante los meses fríos de cada año, se conocen como Influenza estacional. Desde 1977, además del virus Influenza B, circulan cada año en la población mundial, dos subtipos de virus Influenza

A (H1N1 y H3N2). La frecuencia de estos tres virus varía de manera temporal y geográfica (Boggild y McGreen, 2010).

2.7 Ciclo biológico del virus de la Influenza.

El virus de la Influenza desarrolla su ciclo biológico según dos situaciones bien diferentes:

- En el medio extracelular, sometido a las circunstancias del ambiente como radiaciones, cambios de pH o de temperatura, etc., que incluso pueden llegar a destruirlo, y
- En el intracelular, dependiendo de la vida de la célula que lo hospeda (aunque pueden condicionarla). Este segundo período consta de numerosas etapas (Cabezas y Hannoun, 1990), que pueden ser descritas en las tres fases siguientes:
 - Fijación selectiva que se inicia cuando la glicoproteína HA del virus se une al receptor que contiene ácido siálico (N-acetilneuramínico) en la superficie de la célula del hospedero y penetración del virus en la célula mediante un proceso de endocitosis formando vesículas que se unen a los lisosomas. (Cabezas, 2004), seguida de la descapsidación de éste liberándose el complejo de ribonucleoproteína-nucleocápside (RNP) en el citoplasma celular.
 - Expresión y replicación del genoma vírico; lo que determinará la formación de los constituyentes del virus, a expensas de los de la célula (la cual queda gravemente dañada).
 - Ensamblaje de los constituyentes víricos recién formados, el virión emergerá por gemación a la superficie externa de la célula, de donde será liberado por acción de la NA. Dicha enzima corta la unión de los residuos receptores constituidos por el ácido *N*-acetilneuramínico existentes en las superficies celular y vírica, evitando el acumulo de los viriones sobre la superficie de la célula y también que queden unidos entre sí (Gubareva *et al.*, 2000).

Si se desea interrumpir el ciclo de los virus de Influenza y su propagación se debe bloquear la decisiva actividad de la neuraminidasa. Dichos inhibidores actualmente son: el Zanamivir (registrado comercialmente con el nombre de Relenza por la compañía GlaxoSmithKline/Biota), y el Oseltamivir (comercializado por Gilead/Hoffmann La Roche con la denominación de Tamiflu) (Kim *et al.*, 1997). Hasta la fecha, son los dos fármacos de tipo inhibidor de la NA aprobados por las autoridades sanitarias para su uso. (Otros, relacionados, se hallan en fases previas de ensayos clínicos).

2.8 Transmisión del virus en humanos.

Una de las razones por la cual el virus Influenza es uno de los que presenta mayor importancia médica, es por su alta y fácil transmisibilidad, siendo posible a través de:

- **Contacto directo:** Este tipo de contacto se produce de persona a persona (contacto menor a un metro), generalmente desde la persona-fuente cuando ésta tose o estornuda, a través de gotitas de más de 5 μm que llegan en general hasta un metro de distancia.
- **Contacto indirecto:** A través de contacto con objetos contaminados (fómites). El virus puede sobrevivir durante algún tiempo fuera de un organismo: cinco minutos en las manos, 8-12 horas en papeles, telas y otras fibras y 24-48 horas en superficies duras (Cabrera, *et al.*, 2011).

2.9 Epidemia y pandemia.

Debido al potencial epidémico y pandémico del virus Influenza, la atención de la organizaciones internacionales y nacionales para protección de la salud está puesta en los virus Influenza tipo A. Las glicoproteínas HA y NA son los principales determinantes de patogenicidad del virus. En la naturaleza existen 16 subtipos diferentes de HA (H1 a H16) y 9 de NA (N1 a N9). Las aves silvestres acuáticas, como los patos y gaviotas entre otras, presentan todos los subtipos

de HA y NA descritos hasta ahora, por lo tanto son el principal reservorio natural de estos virus además de la principal fuente de transmisión a los demás animales, incluyendo las aves de corral. (Boggild y McGreen, 2010).

Los humanos han sido afectados durante los últimos 90 años por los subtipos de virus Influenza A H1N1, H2N2 y H3N2 causando epidemias de enfermedad respiratoria estacional cada año en la población, siendo los subtipos H1N1 y H3N2 prevalentes en los últimos 40 años. Estas epidemias emergen debido a la ocurrencia de mutaciones puntuales en las dos glicoproteínas superficiales HA y NA. La acumulación de estas da lugar a la emergencia de nuevas variantes antigénicas del virus que no son reconocidas por las defensas del huésped, provocando el contagio de un número en la población superior al esperado (epidemias). Como asevera Cabezas (1990), estos desplazamientos antigénicos serían las respuestas de los virus para perseverar mediante estas mutaciones puntuales, agotadas estas posibilidades, cada 10-20 años aproximadamente se producen en ellos rearrreglos genéticos más bruscos. Afirmando esto Avendaño *et al.*, (2011) indican que la replicación viral, permite al virus mantenerse como especie y evolucionar adaptándose al ambiente y al hospedero.

La transmisión de los virus Influenza A de humanos a aves y cerdos (zoonosis) puede ocurrir ocasionalmente, pudiendo producir en esta última especie reasociación de genes de virus Influenza cuando el animal esta co-infectado por 2 virus Influenza A, uno de humanos y el otro de cerdos, generándose así un nuevo subtipo viral con potencial pandémico.

Estos subtipos pueden considerarse nuevos para los humanos ya que se diferencian de los virus de la Influenza estacional que circulan actualmente y que son evaluados como rutina en los laboratorios (OMS, 2007) y por lo tanto, en la práctica supone que la mayoría de las temporadas el virus circulante tiene diferencias con los detectados en temporadas previas (Bengoa, *et al.*, 2002).

En contraste a las epidemias, las pandemias ocurren por la aparición de un nuevo subtipo de virus Influenza A contra la cual no existe inmunidad en la población provocándose una expansión del virus, contagiando a más y más individuos incluso cruzando las fronteras.

2.10 Definición de caso de enfermedad tipo Influenza.

Según el Ministerio de Salud de Chile (2010), en la circular n°20 para la Vigilancia Epidemiológica, Investigación y Control de Brotes de Influenza Estacional y Pandémica (H1N1) se define como:

- **Caso sospechoso.** Persona que consulta por enfermedad respiratoria tipo Influenza (ETI): Fiebre \geq a 38,5°C axilar y tos, asociado a alguno de los siguientes síntomas: mialgias, odinofagia o cefalea. Persona que se hospitaliza por infección respiratoria aguda grave (IRAG) o neumonía sin causa etiológica conocida.
- **Caso confirmado.** Persona que consulta por enfermedad respiratoria tipo Influenza (ETI) o se hospitaliza por IRAG o neumonía, y se confirma Influenza por Inmunofluorescencia (IF) (Dabanch, *et al.*, 2011).

2.11 Obtención de la muestra para aislamiento viral.

2.11.1 Hisopados o exudado nasofaríngeo (ENF). Los hisopados nasofaríngeos generalmente contienen un número de células bajo, por lo que son menos útiles que los aspirados.

2.11.2 Aspirados nasofaríngeos (ANF). Esta muestra es la recomendada para la colecta en infantes, niño pequeño y adulto mayor. Es la muestra clínica de elección para obtener los aislamientos de los virus causantes de infección respiratoria aguda (IRA).

En los laboratorios de virología se reciben las muestras con la indicación que envía un profesional médico, donde se señala el diagnóstico presuntivo del paciente. El tipo de muestra o Gold standard es el aspirado nasofaríngeo, ya que puede suministrar un número apropiado de células infectadas, para su posterior detección.

2.12 Factores que influyen en el aislamiento viral.

2.12.1 Tiempo. El periodo de excreción viral de los virus respiratorios es breve, por lo tanto las muestras deben ser colectadas antes de las 48 a 72 horas del comienzo de los primeros síntomas. Luego de esto, no deben pasar más de 24 a 48 horas para que la muestra sea viable para el aislamiento viral, de lo contrario se puede encontrar un bajo título de material genético indicando falsos negativos.

2.12.2 Temperatura. Para el transporte de la muestra hasta el laboratorio, esta debe mantenerse a 4°C, si la muestra es conservada a una temperatura superior por ejemplo, las células pueden degradarse y es posible obtener resultados falsos negativos ya que el material genético degradado no se amplificará.

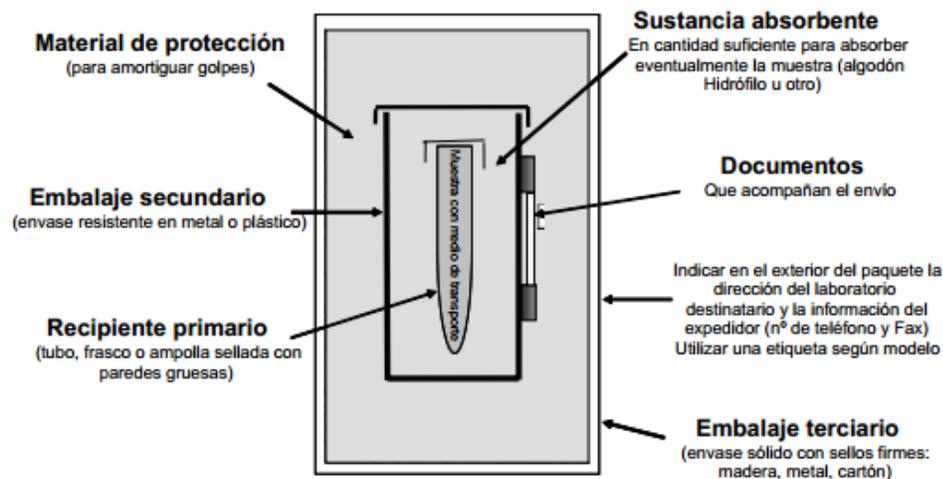
2.12.3 Medios de transporte virológico (MTV). Se debe evitar también la desecación de la muestra utilizando una solución denominada medio de transporte viral (MTV), la que proporciona los nutrientes necesarios y el pH óptimo (pH 7) para la mantención de la infectividad de las células virales hasta su tratamiento. Al MTV debe agregarse antibiótico y fungicidas para reducir el crecimiento de bacterias que integran la microbiota acompañante (Eiros *et al.*, 2009).

2.13 Requerimientos para el transporte de muestras clínicas.

El ISP Chile (2008) indica en su Normativa para el Transporte de Sustancias Infecciosas que el envío y transporte de muestras es uno de los aspectos que el laboratorio debe considerar, garantizando la seguridad del portador, del medio ambiente, de la población general y la calidad de la muestra enviada.

En la Figura N°3, se grafican cómo deben ir los tres contenedores, ubicación de las muestras y documentos. A continuación se describen las características de cada contenedor.

- **Primer contenedor:** En él se deposita la muestra clínica. Debe ser de plástico con tapa de rosca (por ejemplo un tubo falcon), cierre hermético y envolverse en suficiente papel absorbente por si hubiera algún derrame de la muestra en cuestión.
- **Contenedor secundario:** En este contenedor es donde deben colocarse las sustancias refrigerantes, hielo seco. Los datos de la muestra clínica, así como la información que describe el tipo de muestra deberá colocarse en el exterior del mismo dentro de plástico (bolsa transparente), para evitar el contacto con alguna sustancia y la pérdida de información por derrames. El contenedor secundario debe ser de un material que permita conservar la temperatura o evite los cambios bruscos de esta.
- **Contenedor Externo:** Es el encargado de proteger al segundo contenedor de daños físicos que puedan ocurrir durante el proceso de transporte. En el debe consignarse el remitente y quien lo recibe. Las etiquetas correspondientes al riesgo biológico de la muestra que está siendo transportada deberán estar visibles (OMS. 2003).



Fuente figura: <http://www.pasteur.fr/sante/clre/chap/envois/paquet.html>. Schema simplifié d'un triple emballage. Instituto Pasteur (traducción ISP).

Figura N°3: Esquema simplificado de un triple embalaje. (ISP, 2008).

Además de estas mínimas condiciones de envío las muestras, éstas deben ir acompañadas de Formulario de notificación IRA grave (Anexo 3).

2.14 Detección de virus Influenza humana.

Oropesa, *et. al.* (1998) indican que una gran cantidad de laboratorios participan en la vigilancia de la actividad de los virus de Influenza y sus cambios, debido a la necesidad de informar tempranamente la presencia de nuevas cepas epidémicas y la diferenciación entre los tipos Influenza A y B.

Desde la aparición de la “nueva Influenza H1N1” en 2009, los métodos de detección de los laboratorios han evolucionado rápidamente para cumplir con los desafíos planteados por esta cepa epidémica. Los primeros desafíos, identificar la naturaleza del virus y la disponibilidad oportuna de información del subtipo de Influenza A, han sido hoy reemplazados por la necesidad de establecer algoritmos diagnósticos para que los laboratorios no se vean abrumados por muestras clínicas dada la amplia circulación de la Influenza H1N1. En consecuencia, los

laboratorios han buscado métodos de detección rápidos, sensibles, específicos y de alto rendimiento a escala, para lidiar mejor con las demandas a nivel poblacional de las pruebas diagnósticas inherentes a una situación de pandemia. En este afán, se han desarrollado distintas pruebas diagnósticas que tienen alta sensibilidad y se diferencian en su utilidad clínica para tomar decisiones:

- ***Aislamiento viral (cultivo):*** Constituye el *Gold standard*. Aunque presenta una deficiencia y es su demora en la obtención de los resultados, lo que limita su utilidad clínica. Su ventaja es que permite reconocer subtipos y evaluar resistencia a antivirales.
- ***Detección de proteínas virales:*** Son test fáciles y rápidos. Menos sensibles que el cultivo, pero el resultado se obtiene en menos de una hora, por lo que permite indicar el inicio de un tratamiento antiviral. Algunos de estos test, permiten identificar a ambos géneros de Influenza, aunque sin subtipificar. En el caso de la Red Asistencial Araucanía Sur estos test se utilizan como se indica anteriormente para obtener resultados rápidos pero al tener baja sensibilidad un resultado negativo en el análisis no indicaría con toda seguridad que el paciente no presente el virus, por lo tanto la muestra debe enviarse a un laboratorio de especialidad para una RT-PCR, técnica que tiene una alta sensibilidad y especificidad entregando un resultado confiable para indicar o no tratamiento y aislamiento del paciente.

Uno de estos test rápidos es BD Directigen™ EZ Flu A+B (Becton, Dickinson and Company Sparks, Maryland USA) inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa directa, y detección separada del virus Influenza A y B utilizando un solo dispositivo. Puede diferenciar los antígenos virales de Influenza A y B a partir de una sola muestra (ANF) (McFarland *et al.*, 2005). Este test debe ser utilizado solo como una ayuda en el diagnóstico de la virus Influenza A y B y no como única base para tratamiento u otras decisiones de gestión, ya que resultados negativos se deben confirmar mediante RT-PCR y positivos para Influenza A se deben subtipificar.

- **Serología:** Se basa en la detección del ascenso de anticuerpos en 2 muestras al inicio y 10-14 días después de presentados los síntomas. Reconoce ambos géneros del virus, pero no es útil en la tomas de decisiones.
- **Detección de ácido nucleico viral:** Se realiza una amplificación del material genético viral por medio de la técnica de Transcriptasa Reversa y posterior PCR en Tiempo Real. Su gran ventaja es la alta especificidad y fiabilidad, además que los resultados se obtienen en algunas horas, y permite también identificar subtipos. (Erios *et al.*, 2009).

Según el ISP Chile la incorporación de la técnica de Reacción de Polimerasa en Cadena (RT-PCR) en Tiempo Real a la vigilancia ha permitido caracterizar oportunamente la actividad del virus Influenza en nuestro país, detectando en forma temprana los subtipos circulantes, y diferenciar entre Influenza estacional o pandémica.

2.15 Detección de ácido nucleico viral del virus Influenza a través de la técnica de amplificación genética reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.15.1 Extracción de material genético con kit de extracción QiagenQIAamp Viral RNA.

Las estructuras celulares y proteínas presentes en muestra de ANF son lisadas usando un agente desnaturizante (buffer de lisis) con la inactivación simultánea por RNAasas, con lo cual el ARN virales liberado a la solución. El ARN se une a la membrana QIAamp con la asistencia del ARN de transferencia (carrier) y los contaminantes (proteínas e inhibidores de nucleasas) son eliminados durante el lavado con los tampones de lavado o wash buffer I y II, que contienen hidrocloreuro de guanidina (irritante) y ácido de sodio como perseverante, respectivamente. El ARN purificado es eluído de la membrana usando un buffer de elución conteniéndolo en un tubo eppendorf hasta su amplificación (a -20°C).

2.15.2 Transcriptasa reversa (RT-PCR). Luego de extraer el ARN (material genético) se realiza una transcripción inversa utilizando una enzima denominada “transcriptasa reversa”, que es ADN polimerasa ARN dependiente. En este paso, el ARN es copiado a ADN conocido como ADN complementario o cADN, que se utiliza como molde para la reacción posterior de PCR (Avendaño *et al.*, 2011).

El proceso comienza con la síntesis de una hebra de cADN por la acción de la transcriptasa inversa, una ADN polimerasa dirigida por ARN, permaneciendo el cADN unido al molde como dúplex ARN: cADN. En una segunda etapa se desnaturaliza el dúplex y comienza la amplificación según el mecanismo de una PCR normal: la hebra de cADN liberada actúa como molde para una segunda hebra de cADN y luego el dúplex se amplifica en sucesivos ciclos (Luque, 2006).

2.15.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consiste en una técnica que permite la extensión y replicación del ADN *in vitro*, la cual tiene como fin amplificar un templado en el orden de millones de copias para que este sea detectado (Kubista *et al.*, 2006). La reacción en si se basa en la biología de la replicación realizada por medio de una enzima, denominada ADN polimerasa III, la cual extiende y replica las hebras de ADN con fines mitóticos. La PCR, fue descubierta y dada a conocer en el año 1986 por el científico estadounidense Karry Mullis, la cual ha trascendido de manera significativa e importante ya que esta técnica, junto a un conjunto muy acotado de herramientas, han permitido la expansión de diversas áreas del conocimiento (Mullis *et al.*, 1992).

La PCR es la técnica más empleada, tanto convencional como en la de Tiempo Real. En ambas la reacción de amplificación tiene que ir precedida de una transcripción inversa para transformar en ADN cualquiera de los 8 segmentos de ARN que contiene el genoma de los virus Influenza A y B (Erios *et al.*, 2009).

La amplificación logarítmica de un segmento de ADN ocurre en una reacción térmica cíclica (25-30 ciclos) a 92°C para desnaturalización del ADN, donde las hebras de ADN de doble cadena se

separan por la rotura de las interacciones de puente de hidrógeno que las mantienen unidas. Una segunda fase o segmento del ciclo, cuya temperatura varía entre los 40°C a 65°C, donde se unen al templado los fragmentos diseñados para la extensión de la polimerasa, los *primers* o partidores, sirven de guía y flanqueadores de la reacción enzimática (Kubista *et al.*, 2006). Finalmente, en un tercera parte de este ciclo se encuentra la fase de extensión enzimática, donde sucede la reacción de polimerización del segmento a amplificar.

Los componentes de la reacción incluyen: el templado ADN, promotores (*primers*) de oligonucleótidos (18-30 nucleótidos) delanteros y reversos, deoxinucleótidos (dNTPs: A, C, G, T), magnesio (Mg^{+2}) y ADN Taq polimerasa.

La detección del producto de la amplificación se puede realizar al final de la reacción de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa o en tiempo real en el cual el amplicón puede visualizarse según progresa la reacción utilizando oligonucleótidos marcados (sondas) con fluorocromos.

Debido a que las secuencias genéticas difieren entre tipos/subtipos de los virus Influenza, solo es posible diseñar los partidores y sondas que pueden detectar específicamente el tipo o el subtipo de virus. El gen de la matriz (M) es el menos variable de todos los genes, por lo que puede ser utilizado para la detección de los virus influenza tipo A o tipo B, mientras que los genes de la HA y NA son utilizados para la identificación de subtipo de Influenza A y variantes que están circulando en la población.

2.15.4 PCR en Tiempo Real. Teóricamente señala Anaya *et al.*, (2005), la PCR genera copias a partir de un templado de ADN en forma exponencial; nos obstante, debido a inhibidores en la reacción, a la limitación de reactivos y la acumulación de moléculas de pirofosfato, la amplificación exponencial de las moléculas no siempre se observa en la práctica. Algunas reacciones generan más productos que otras; por tanto, la cuantificación en tiempo real se hace necesaria. La técnica se basa en la detección y medición de productos generados durante la PCR;

de esta forma, es necesario disponer de un método que exprese la acumulación del producto de PCR y un aparato que documente los resultados durante cada ciclo de la reacción.

En la PCR Tiempo Real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de realizar ninguna acción adicional, como elaboración, tinción y visualización de geles. Además, mediante la detección por fluorescencia se puede medir, durante la amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite evaluar y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Fonseca, *et al.* 2010). La metodología de esta técnica logra ser cuantitativa (a diferencia de la PCR convencional que es cualitativa) siendo una tecnología cada vez más habitual en laboratorios de expresión genética, por sus capacidades de detección y precisión (Schmittgen and Livak, 2008). Un tipo de cuantificación es la absoluta, que se utiliza para cuantificar muestras desconocidas por interpolación a partir de una curva estándar, generada a partir de diluciones en serie de una muestra de concentración conocida del ADN blanco. Un caso en donde se utiliza este tipo de cuantificación, es la determinación del número de copias de un virus. La cuantificación relativa es utilizada para analizar cambios en la expresión de un gen en una muestra en relación a otra muestra de referencia.

La creciente aplicación de la PCR en Tiempo Real para la detección de patógenos en muestras clínicas es debido a sus amplias ventajas, como son su sensibilidad, precisión, rapidez de resultados y su cada vez más bajo costo (Derveaux *et al.*, 2010).

La PCR puede dividirse en 4 fases: la de crecimiento lineal, la exponencial temprana, la exponencial y la de finalización (plateau). La fluorescencia evaluada es la que se produce durante la fase de crecimiento exponencial temprana, y el ciclo de PCR en el que se produce es denominado Ct (Curve threshold) o CP (Crossing point). Este valor está relacionado con el número de copias blanco que posee la muestra que se está evaluando, lo cual permite a través de la PCR en tiempo real se realice la cuantificación con una alta sensibilidad y especificidad.

Para llevar a cabo la PCR en Tiempo Real, los termocicladores incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento de la reacción, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos. Estas sondas tienen unidos un fluorocromo reportero y un fluorocromo quencher. Cuando ambos están unidos a la sonda, el reportero no emite señal. Pero cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa corta al fluorocromo reportero del resto de la sonda, permitiendo la emisión de una señal fluorescente, la cual es medida en tiempo real (Costa, 2004).

2.16 Normas de bioseguridad.

Según la Organización Mundial de la Salud (2003), los laboratorios de diagnóstico y cuidados de la salud (instituciones de salud pública, hospitales o clínicas) deben poseer nivel de bioseguridad II o superior. Es necesario además de la práctica de buenas técnicas microbiológicas, el uso de ropa protectora, la simbolización de la seguridad biológica y el uso de gabinetes de seguridad biológica Clase II. En este nivel se trabajan el Virus Sincitial Respiratorio, los Virus Parainfluenza, Adenovirus, Virus Influenza y Rinovirus.

El símbolo internacional de seguridad biológica debe ser colocado en la puerta de las habitaciones donde se trabajan organismos que pertenecen a los grupos de riesgo II o superior.

- Solo se debe permitir la entrada al área de trabajo del personal autorizado.
- Las puertas de los laboratorios deben permanecer cerradas.
- No se debe permitir la entrada de niños menores de 16 años a las áreas de trabajo.
- No se puede fumar, comer o beber dentro o fuera del laboratorio.

Es importante también la protección del personal, procurando que los trabajadores permanezcan dentro del laboratorio con batas o uniforme destinado al trabajo dentro del mismo. Usar guantes

para todos los procedimientos que involucren el contacto directo con muestras de sangre, material infeccioso, etc. Después de terminar el trabajo los guantes y batas deben ser desinfectados o eliminados y las manos deben ser correctamente lavadas.

Lentes de seguridad, máscaras faciales u otras medidas de protección deben ser empleadas cuando es necesario proteger los ojos y la cara del impacto de objetos, de radiaciones ultravioletas o contaminantes volátiles.

No debe abandonarse el área de trabajo llevando consigo ropa u otros dispositivos protectores del laboratorio hacia otra área (biblioteca, oficinas, baños). Está prohibido guardar alimentos en cualquiera de las áreas de trabajo del laboratorio.

Respecto a los procedimientos dentro del laboratorio, existen acciones que van en directa relación con el propio cuidado del trabajador, por ejemplo: Nunca se debe pipetear con la boca. Todos los procedimientos deben procurar evitar o minimizar la formación de aerosoles o gotas. Si el procedimiento genera estos mismos, el trabajo debe desarrollarse en un gabinete de seguridad biológica.

Cualquier accidente, derrame o exposición a material infeccioso debe ser reportado a un supervisor del laboratorio y deben ser correctamente archivados.

En vista de los antecedentes descritos se hace primordial desarrollar protocolos validados y seguros para la correcta detección y subtipificación de virus de influenza en muestras de ANF que son analizadas en la unidad de biología molecular del complejo asistencial Miraflores.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En el Laboratorio Biología Molecular Complejo Asistencial Miraflores, se trabaja con nivel de bioseguridad tipo II ya que el virus de la Influenza presenta una alta transmisibilidad y volatilidad por lo tanto el protocolo de trabajo indica que el operador debe manipular las muestras a analizar dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II, limpiar éste y su contenido con alcohol al 70% y RNAsaZap (para descontaminación de la superficie de trabajo y destruir RNAsas que pueden degradar el material genético), utilizar una mascarilla de tres filtros para evitar el ingreso del virus al tracto respiratorio, ropa protectora (bata desechable), guantes desechables y las demás normas de bioseguridad para este tipo de establecimiento.

3.1 Muestras clínicas.

Un total de 81 muestras fueron recepcionadas, de Marzo a Diciembre del presente año, en nuestra unidad para determinación molecular del agente etiológico Influenza. Las muestras fueron enviadas desde los diferentes establecimientos adscritos a la Red Asistencial Araucanía Sur canalizando sus envíos mediante el Hospital Hernán Henríquez Aravena de Temuco y de la Red Asistencial Valdivia mediante el Hospital Base de Valdivia.

El rango de edad de usuarios a quienes se les solicitó estudio de Influenza fluctuaba entre 7 días y 94 años. La gran mayoría de los usuarios analizados pertenecían a niños, algunos menores al año, y adultos mayores. Las unidades clínicas que más solicitaron estudios fueron los Servicios de Urgencia Pediátrica y la unidad de Pediatría del Hospital Hernán Henríquez Aravena.

El tipo de muestra enviada para los análisis fue en un 100% aspirado nasofaríngeo y casi la mayoría presentaba Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para Influenza como resultado previo. Las condiciones de T° (4°C), transporte e integridad (sin derrames) son chequeadas al momento

de la recepción de las muestras, además deben venir con los datos correctos y concordantes en planilla (Anexo 2) y Formulario IRA grave correspondientes (Anexo 3).

Posteriormente se registraron en el libro de “Recepción de Muestras”, donde se deja constancia sobre la fecha y hora en que llegaron, procedencia, tipo de muestras y condiciones en las que ingresó, además de los datos del paciente, número asignado, número de ingreso al sistema (petición).

3.2. Calibración de equipo Real Time 7500 Applied BioSystems.

La calibración del equipo Real Time 7500 Applied BioSystems de la sección de Biología Molecular del Complejo Asistencial Miraflores se realiza con el objetivo de proporcionar los criterios necesarios y tecnológicamente actualizados para la aceptación de las técnicas y procedimientos en un instrumento debidamente identificado con la finalidad de proporcionar las condiciones óptimas para desarrollar un procedimiento confiable que permite obtener resultados de calidad.

Para la calibración del equipamiento, primero se debe comunicar y requerir la presencia del personal calificado de Genesys Chile Ltda. (representante directo de la tecnología A&B en Chile). Es necesaria la presencia de personal capacitado para la detección de Influenza a través de RT-PCR Tiempo Real, para validar el proceso de calibración mediante la corrida de muestras biológicas de aspirado nasofaríngeo, con resultados conocidos de virus Influenza. Desarrollar la calibración con los reactivos acreditados por ISP Chile y CDC para su ejecución, y comprobar que estos cumplan con los requisitos de calidad y estabilidad señalados por el fabricante para su uso y almacenamiento.

Luego de esto analizar muestras, si no arrojan alarmas de procesamiento (indicadas en manual de uso del equipo 7500 PCR Tiempo Real), éstas pueden ser sometidas a validación.

3.3 Análisis Molecular.

Para ejemplificar la metodología utilizada, se decidió ilustrar los protocolos utilizados seleccionando 4 muestras correlativas de aspirados nasofaríngeos (ANF) en suero fisiológico al 0,9% de pacientes IRAG (Infección Respiratoria Aguda grave), dos de ellos hospitalizados en el Hospital Nueva Imperial y dos en el Hospital Hernán Henríquez Aravena (H.H.H.A.) de Temuco (Anexo 4) que presentaban la sintomatología para considerarse casos sospechosos de padecer Influenza. A todas estas muestras se les realizó Inmunofluorescencia (IFI) previamente en el H.H.H.A cuyos resultados se presentan en el Cuadro N°3. Los ANF utilizados fueron recepcionados el día 26 de Septiembre del 2012 y se les asignaron números por el orden de llegada al laboratorio (Anexo 4).

Cuadro N°3: Muestra seleccionadas, procedencia y resultado Inmunofluorescencia (IFI) previa.

MUESTRA	PROCEDENCIA	IFI
56	H. Nueva Imperial	Negativo
57	H. Nueva Imperial	Influenza B
58	H.H.H.A	Influenza A
59	H.H.H.A	Influenza B

Todas las muestras de ANF llegaron al Laboratorio acompañadas de Formulario de Notificación IRA grave (Anexo 3), con todos los datos del paciente y antecedentes clínicos para poder hacer el correcto ingreso y análisis de las muestras.

3.4 Extracción de ácidos nucleicos.

Toda muestra analizada se debe considerar como peligrosa ya que no se sabe si presenta el virus de la Influenza, por lo tanto su manipulación se realizó dentro del gabinete de bioseguridad tipo II utilizando además vestuario de seguridad que consistió en una bata protectora, mascarilla y

guantes libres de polvo desechables. Por protocolo una vez iniciado el proceso de extracción y tipificación de una muestra queda estrictamente prohibido el ingreso de otra persona que no sea el profesional responsable o autorizado.

El primer paso antes de comenzar la extracción del material genético fue accionar la Luz UV en gabinete bioseguridad tipo II (programadas por 20 minutos) para esterilizar el gabinete y su contenido. Luego se corroboró que todos los materiales necesarios para el trabajo estuvieran presentes: gaza estéril, papel absorbente, micropipetas, puntas y tubos eppendorf estériles libres de polvo desechables, RNAsas, alcohol al 70%, reactivos y otros, para no tener que levantarse del lugar de trabajo (gabinete) y evitar la contaminación de las muestras, el gabinete de bioseguridad y la indumentaria. La limpieza, posterior al protocolo de esterilización, se realizó con papel absorbente y etanol al 70% (en abundancia) alcanzando todo el gabinete y su contenido. Se repitió el mismo paso con gaza y RNAsaZap para degradar cualquier residuo de material genético que pueda interferir en la correcta extracción.

Se debe tener bastante precaución cuando se trabaja con material genético, evitar la presencia de inhibidores de ARN o ADN, principalmente enzimas que destruyen ácidos nucleicos, es por esta razón que se trabaja con materiales libres de ARN-ADNasas. Se debe cambiar guantes con frecuencia y tener algunos equipos de uso exclusivo para cada etapa, es decir, para la extracción, amplificación y etapa de post-amplificación.

3.4.1 Preparación de Reactivos del Kit extracción de RNA viral QiagenQIAamp viral RNA mini kit.

- Buffer de lisis: Se disolvió el RNA Carrier con el buffer AVL poniendo la mezcla en la misma botella de AVL. Se alícuotaron 560 µl del Buffer de lisis en tubos eppendorf. Se guardaron las alícuotas en congelador (-20°C) hasta su utilización. Este Carrier mejora la unión del ARN viral con la membrana QIAamp, especial en el caso de bajo título muestras, y evita posible degradación de los ARN virales debido a cualquier actividad residual de RNAsa.

- Buffers de lavado: Se preparó buffer wash I y buffer wash II introduciendo el volumen especificado de etanol absoluto que cada botella indica. Ambos buffer mejoran significativamente la pureza del filtrado de ARN. Los lavados aseguran la eliminación completa de los contaminantes residuales sin afectar la unión del RNA viral.

3.4.2 Protocolo de extracción de RNA viral (QiagenQIAamp viral RNA mini kit) (área 1).

1. Dentro del gabinete de bioseguridad, se homogenizó la muestra y agregó 140 μ l de esta en 560 μ l de buffer AVL rotulado con el número de la muestra y 140 μ l de H₂O libre de RNAsas en 560 μ l de buffer AVL rotulado como “C ext” (que será el control de extracción), dando un total de 5 tubos eppenderf rotulados como: 56, 57, 58, 59 y “C ext”. Vortex por 15 segundos para asegurar una lisis eficiente y una solución homogénea. Los tubos se incubaron durante 10 minutos para inactivar el virus a temperatura ambiente, como se muestra en la Figura N°4. Este buffer lisa la muestra del paciente en condiciones altamente desnaturizantes inhibiendo RNAsas y se asegurando el aislamiento intacto del ARN.



Figura N°4: inactivación del virus con buffer AVL. Nº corresponde al número de muestra (56, 57, 58 y 59) y “C ext” al control de extracción.

2. Se centrifugó por 10 segundos (Spin) para extraer gotas de la tapa del tubo con posible presencia de material genético.
3. Agregó 560 μ l de etanol absoluto a cada tubo y homogenizó. Spin (Figura N°5).

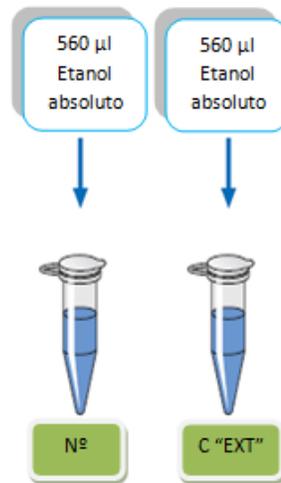


Figura N°5: 560 μ l de etanol absoluto

4. Se dispusieron 630 μ l de la mezcla en la columna QIAamp mini rotulada como el tubo anterior y cerró la tapa (Figura N°6). Se centrifugó a 8000 rpm. Luego se eliminó el eluido en el contenedor de residuos biológicos.

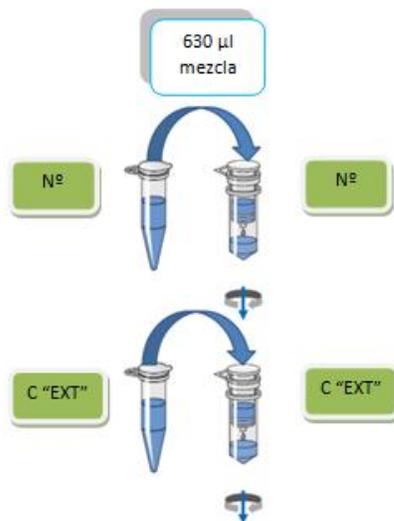


Figura n°6: 630 µl de la mezcla se agregan a una columna QIAamp mini rotulada como el tubo anterior. Luego de centrifugar se cambia el tubo colector.

5. Repitió paso 4, para traspasar la totalidad del contenido del tubo.
6. Se agregó 500 µl de wash buffer I en cada columna y cerró la tapa (Figura N°7). Centrifugó a 8000 rpm y eliminó el eluido en el contenedor de residuos biológicos.

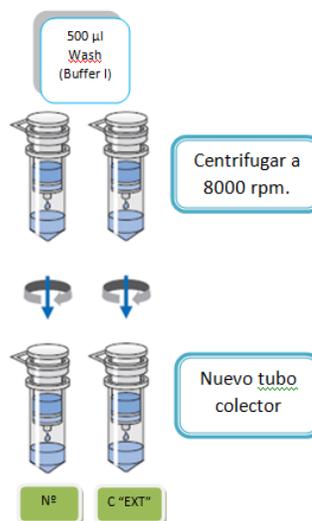


Figura N°7: Lavado con wash buffer I, centrifugación y cambio de tubo colector.

7. Se agregaron 500 μl de wash buffer II en cada columna y se cerró la tapa (Figura N°8). Se centrifugó a 13000 revoluciones por 3 minutos y eliminó el eluido en el contenedor de residuos biológicos.



Figura N°8: Lavado con wash buffer I, centrifugación y cambio de tubo colector.

8. Se centrifugó a 13000 rpm y eliminó todo el eluido de la columna en el contenedor de residuos biológicos.
9. Se dispuso cada columna en un tubo eppendorf rotulado como la columna anterior. Agregó 60 μl de buffer AVE en el centro de cada columna (es importante agregarlo al centro de la columna para así obtener una mayor concentración de material genético), se dejó a temperatura ambiente a lo menos 1 minuto como muestra la Figura N°9. Este Buffer (AVE) evita el crecimiento microbiano y la posterior contaminación con RNAsas.

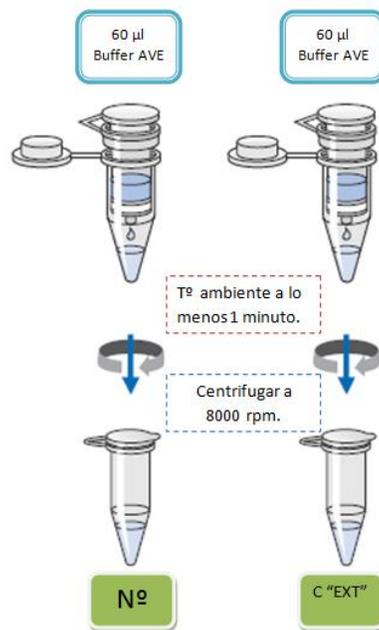


Figura N°9: Columna en un tubo eppendorf con 60 µl de buffer AVE.

10. Luego de terminada la extracción se limpió con etanol al 70% todo el gabinete de bioseguridad y su contenido. Las muestras se llevan a congelación a -20°C si no se utilizarán a la brevedad. En este caso se llevaron a baño a 37°C mientras se seguía con el protocolo. Los guantes, bata y mascarilla se desechan (basurero) y deja actuar la luz UV por 20 minutos.

3.5 Preparación del Mix de reacción

Previo a la extracción del material genético (antes de entrar al laboratorio) se crea el Panel de Subtipificación (Figura n°12), esto se decide ya que las muestras a analizar como indica el Cuadro n°3 presentan una muestra con IFI (+) para Influenza A por lo tanto es necesario subtipificar, si solo llegaran con IFI (-) o (+) para Influenza B se debe tipificar, ya que el virus Influenza B no presenta subtipos. En este Panel de Subtipificación se debe especificar el número de muestras que se procesarán entregando una guía de cómo rotular la placa para la correcta

adición de reactivos (ubicación y concentraciones de éstos) y posterior templado para el software de termociclador 7500/7500 Applied Biosystems.

26-Sep-12
Mediodía

PANEL INFLUENZA RT-PCR TIEMPO REAL

Nombre corrida:	Su tipificación Flu A y Flu B	Kit extracción:	QIAmp Viral RN1	Kit PCR:	
Termociclador:	7500 Real Time PCR System	Lote/Vencimiento:	13626641 24-07-2011	Lote/Vencimiento:	PN AM1005, 4387424
Fecha ejecución:	26 de Septiembre del 2012	Volumen muestra:	140 uL	Volumen muestra:	N/A
Vortex / 75°C x 5 min:		Volumen Elución:	60 uL	Volumen Elución:	N/A
Realizado por:	TM. Alexy Rosales- Valeria Rifo	Removedor RNAsas:	N/A	Removedor RNAsas:	N/A

Muestra/Sonda	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A					
	C Neg	56	57	58	59	C extr	Flu A (+)					
B	pdm H1											
	C Neg	56	57	58	59	C extr	pdmH1 (+)					
C	H3											
	C Neg	56	57	58	59	C extr	H3 (+)					
D	Flu B											
	C Neg	56	57	58	59	C extr	Flu B (+)					
E	RNP											
	C Neg	56	57	58	59	C extr	RNP (+)					
F												
G												
H												

Mezcla de reacción:

Reactivo	Marca	Volumen 1x (µl)	Lote/tubo/Inicio uso	C/sonda
2xQRT-PCR Master mix (-20°C)	Invitrogen	12,5	N° tubos: 7	87,5
Primer Forward 40µM (-20°C)		0,5		3,5
Primer Reverse 40µM (-20°C)		0,5		3,5
Sonda 10µM (-20°C)		0,5		3,5
RT/RNase Enzime mix (-20°C)	Superscript III	0,5		3,5
H2O DNase/RNase free (TA)		5,5		38,5
Volumen total		20		140,0
ARN (µl)		5		

Run Method:

Temperatura	Tiempo	Captura Flu
50°C	30 min	
95°C	2 min*	
95°C	15 seg	
55°C	30 seg	FAM

45 ciclos

*10min para kit Brilliant II QRT-PCR Mater mix

1-step Stratagene n° 600809

**2 min para kit Superscript III Platinum 1-step quantitative RT-PCR Invitrogen

***AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit lot: PN AM 1005,4387424

Sonda		RT-PCR Influenza A/B Typing panel RUO	
N°	Lote	Sonda	N° Lote
FluAM	029771-02	FluAM	908102
SwintA	029774-02	Flu B	908102
SwH1	030294-01	RNP	908102
RNP	029780-02		

RT-PCR Subtipificación Influenza A	
Sonda	Protocolo
Flu A	2012
pdm H1	2012
H3	2012
RNP	2012

Figura N°10: Panel de Subtipificación Influenza RT-PCR Tiempo Real.

Utilizó bata estéril y guantes libres de polvo. En este paso no es necesaria la mascarilla ya que no se trabaja con muestras biológicas potencialmente contaminadas.

Se limpió con papel absorbente y etanol al 70% (en abundancia) toda la campana de flujo laminar y su contenido. Se repitió el mismo paso con gaza y RNAsa para degradar cualquier residuo de material genético que pueda interferir en la preparación del mix de reacción.

El Master mix y el agua libre de RNAsa se descongelaron a 37°C en baño. Luego dentro de la cámara de flujo laminar (Área 2) se rotularon tubos eppendorf libres de RNAsa como Flu-A, H3, pdm H1, Flu-B y RNP, para primer y sondas específicas para detectar Influenza A, Subtipo H3N2, Subtipo H1N1, Influenza B y presencia de material genético, respectivamente. A cada

eppendorf se adicionó la enzima, primers y sonda específicos para cada detección en los volúmenes que indica el Cuadro N°4.

Cuadro N°4: Reactivos y volúmenes requeridos para Mix de reacción (área 2).

REACTIVO	VOLUMEN 1x (µl)
RT-PCR Master Mix	12,5
Primer Forward	0,5
Primer Reverse	0,5
Sonda	0,5
Enzima mix	0,5
H2O libre de DNAsa/RNAsa	5,5
TOTAL	20

Luego de haber agitado los tubos con reactivos en vortex y un spin en centrífuga para homogenizar, se rotuló una placa de 96 posillos para termociclador 7500 Real Time PCR AppliedBioSystems, con las filas y columnas que se utilizarán como se muestra en el panel de subtipificación (Figura N°10). Se cargaron 20 µl de cada tubo respetando el orden de las filas en la placa sobre cooler y luego 5µl de H₂O para PCR en la primera columna como esquematiza la Figura N°11, luego se tapó la columna, y la placa se cubrió con papel aluminio para evitar la exposición a luz de los reactivos y transportar la placa en el cooler a la siguiente campana de flujo laminar (área 3) para agregar las muestras y demás controles.

Teniendo el cooler en el área siguiente se limpió con etanol al 70% todo el gabinete de bioseguridad y su contenido. Los guantes y bata se desechan (basurero) y deja actuar la luz UV por 20 minutos.

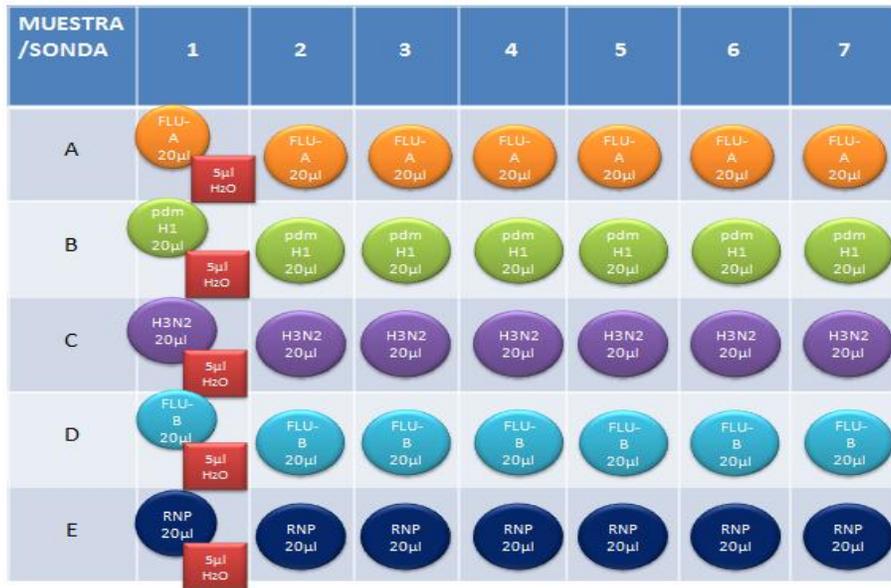


Figura N°11: Esquema de placa y la ubicación de los reactivos específicos para Flu-A, pdm H1, H3, RNP y el control negativo.

3.6 Carga de muestras y controles positivos.

En esta área se utilizó bata estéril y guantes libres de polvo. En este paso no fue necesaria la mascarilla ya que las muestras biológicas potencialmente contaminadas con virus Influenza fueron inactivadas al incubarse con buffer AVL.

Se limpió con papel absorbente y etanol al 70% (en abundancia) toda la campana de flujo laminar y su contenido. Se repitió el mismo paso con gaza y RNAsa para degradar cualquier residuo de material genético que pueda interferir en la amplificación de las muestras.

Dentro de la cámara de flujo laminar (Área 3) se cargaron 5µl de las muestras (ARN viral extraído previamente), control de extracción y positivos de la siguiente manera (previa descongelación a 37°C):

- **Donde la columna:**
 - **1 es el CONTROL NEGATIVO (H₂O agua para PCR, cargado en área 2).**
 - **2 es la MUESTRA DEL PACIENTE (56)**
 - **3 es la MUESTRA DEL PACIENTE (57)**
 - **4 es la MUESTRA DEL PACIENTE (58)**
 - **5 es la MUESTRA DEL PACIENTE (59)**
 - **6 es el CONTROL DE EXTRACCIÓN**
 - **7 es el CONTROL POSITIVO para FLU-A (fila A), pdm H1 (fila B), H3N2 (fila C), FLU-B (fila D) y RPN (fila E).**

3.7 Transcripción reversa y amplificación de ADN.

En el software del termociclador 7500/7500 Real Time PCR Applied BioSystems, se creó un nuevo templado con el mismo formato del Panel de Subtipificación de la Figura N°10, se revisaron las condiciones del experimento como indican el Cuadro n°5. Se insertó la placa con las muestras y controles al termociclador e inició “StartRun” para que comenzar la reacción de amplificación.

Cuadro N°5: Condiciones de termociclador de sets de primers y sondas para genespecífico.

Temperatura	Tiempo	Fases	Captura fluorescencia
50°C	30 minutos	Transcripción inversa (RT)*	
95 °C	2 minutos	Denaturalización**	
95 °C	15 segundos	Anneling	
55 °C	30 segundos	Elongación	FAM
45 ciclos			

*RT se realiza una vez.

** Denaturalización, Anneling y elongación se repiten durante 45 ciclos seguidos.

3.8 Análisis de curvas de amplificación.

Al término de la amplificación del material genético (RT-PCR Tiempo Real) se deben analizar y comparar el comportamiento de las curvas de amplificación. Analizar la emisión de fluorescencia en las muestras desconocidas y las reacciones de las muestras controles definidas previamente como control negativo, control de extracción (Agua ADN/ARNasa Free) y controles positivos (ARN de Influenza de referencia) desde el cual se fija la línea de base (**Ct**) y el umbral (**Threshold**) en forma manual verificando que se encuentren en la fase exponencial de las curvas de amplificación, dejando por debajo de ésta las amplificaciones no específicas o ruido para optimizar el análisis de datos. Las curvas de amplificación observadas en el software 7500 del termociclador 7500/7500 AppliedBiosystems (Figura N°12) para las muestras positivas son del tipo exponencial con una línea base, línea logarítmica y una fase de Plateau.

La PCR convencional, también llamada PCR de tiempo final, se analiza por la presencia/ausencia de productos de DNA de tamaño particular por medio de corrida electroforética, mientras que en la PCR de tiempo real el análisis es por medio de la determinación de un ciclo de corte o Ct, donde la fluorescencia del reportero es significativamente superior a un *background* definido (Kubista *et al.*, 2006). Este valor, comparado entre las diferentes muestras, coincide con la fase exponencial de la reacción donde existe suficiencia de reactivos así como la reacción ocurre en su máxima eficiencia (Bar *et al.*, 2011). El valor del Ct está inversamente relacionado con la cantidad del templado, a medida que el Ct es menor, mayor es la proporción del templado en la muestra.

Así, se pueden comparar dos muestras de tal forma, que se pueden atribuir disminución o aumento en la relación del templado para las muestras comparadas (Pfaffl, 2010).

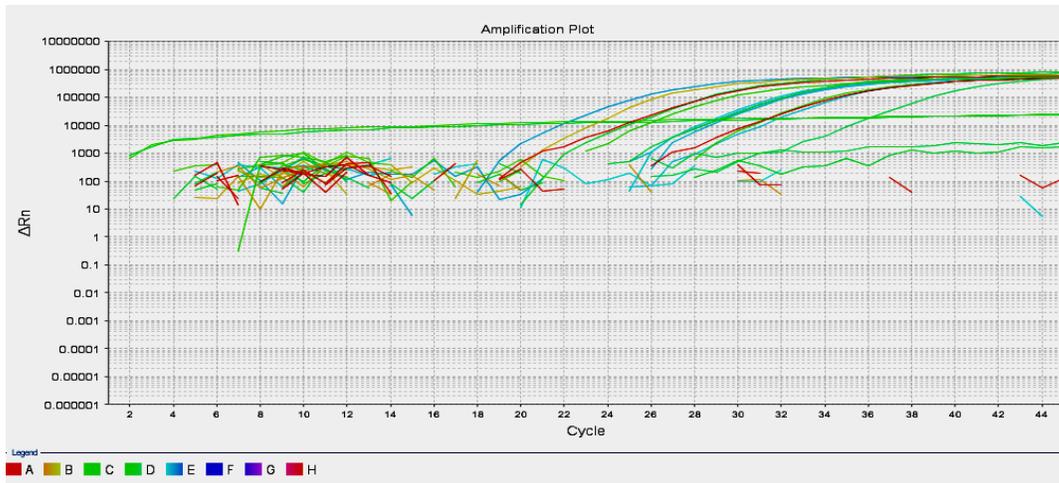


Figura N°12: Finalizada la RT-PCR Tiempo Real, se observan todas las curvas de amplificación de las muestras 56-59, controles y todos los target seleccionados.

Todos los valores obtenidos se debe registrar en el panel de subtificación creado con anterioridad según el número de muestras (Figura N°13). El análisis se realizará seleccionando las filas (según target) y las columnas (controles y muestras) de este.

Muestra/Sonda	1	2	3	4	5	6	7
A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A
	C Neg	56	57	58	59	C extr	FluA (+)
B	pdm H1						
	C Neg	56	57	58	59	C extr	pdmH1 (+)
C	H3						
	C Neg	56	57	58	59	C extr	H3 (+)
D	Flu B						
	C Neg	56	57	58	59	C extr	Flu B (+)
E	RNP						
	C Neg	56	57	58	59	C extr	RNP (+)

Figura N°13: Panel de Subtificación que especifica la ubicación de los controles, las muestras y los tipos y subtipos de influenza a analizar.

3.8.1 Análisis curvas RNP. Las primeras curvas que se deben analizar son las de presencia de material genético (RNA) ya que si las muestras a analizar no presentan curvas de amplificación exponenciales en este target, indica que no hay presencia de material genético, por lo tanto el primer paso de la prueba, la extracción de material genético no fue realizada con éxito debiendo repetir el proceso desde el inicio, esto también puede indicar que los reactivos pueden estar deteriorados, vencidos, o incluso un error de manipulación. Como se muestra en la Figura N°14 desde la muestra 56-59 se observa que el crecimiento de las curvas de amplificación va desde los ciclos 20 y 28, con una fase exponencial y plateau, indicando que si hay presencia de material genético por lo tanto es justificado seguir analizando las muestras y controles. Además los controles de extracción y negativo solo presentan amplificaciones inespecíficas (ruido observado bajo la línea de threshold), sin presentar amplificación de material genético.

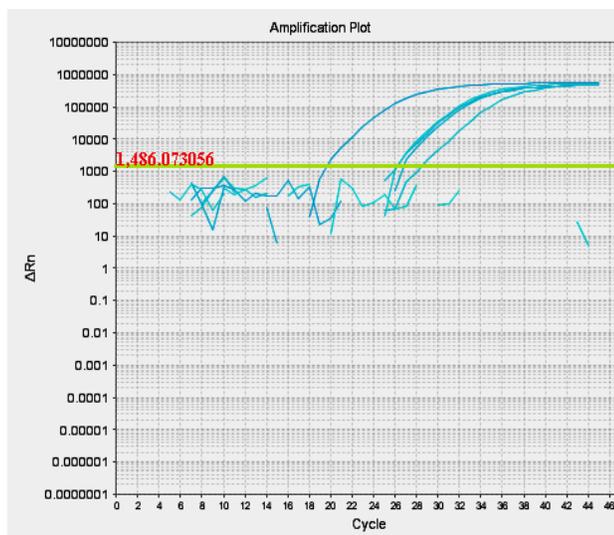


Figura N°14: Fila E del panel de Subtipificación. Target RNP Threshold corregido 56-59. Se observan las curvas logarítmicas de todas las muestra 56-59 y control positivo para RNP con Ct 26, 29, 26, 27 y 20 respectivamente.

3.8.2 Análisis control negativo. La Figura N°15 muestra las curvas del control negativo, donde en el gráfico A se ve una leve amplificación exponencial, pero analizando el comportamiento de la curva en el gráfico lineal (B) se observa que la amplificación no es significativa ya que su pick no se eleva por sobre las 50000 copias y es muy similar a la línea de base. Por lo tanto la amplificación que se observa es de producto inespecífico resultado el control negativo, negativo.

Gracias a esto se puede deducir también que los reactivos de la preparación del mix de reacción están en buen estado, como lo es el Agua libre ADN/ARNasa para PCR y no contaminados con material genético y que el procedimiento y manipulación estuvieron correctos.

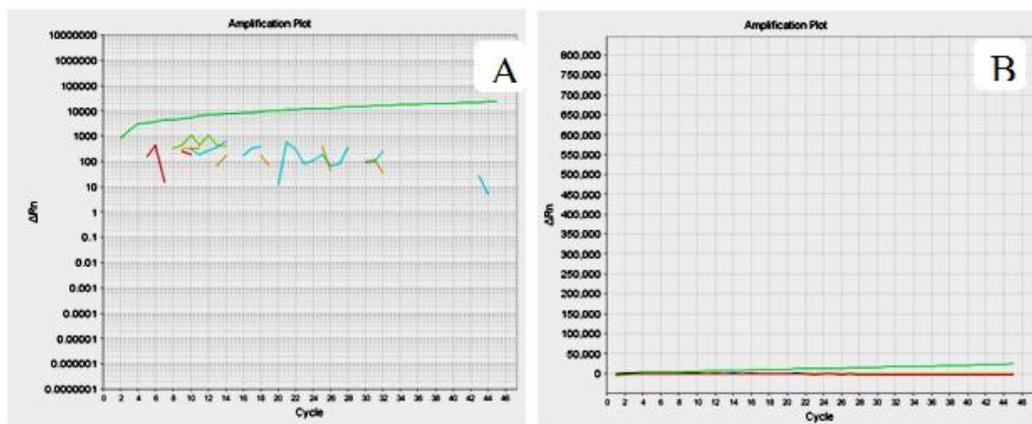


Figura N°15: Columna 1 del panel de Subtipificación. (A)Gráfico logarítmico análisis columna 1 Control negativo (-). (B)Gráfico lineal análisisControl negativo (-).

3.8.3 Análisis control de extracción. Como muestra la Figura N°16, no hay curvas con crecimiento exponencial, solo se observan ruido, correspondiente a amplificaciones inespecíficas como hibridación de primers entre sí, por lo tanto no hay ARN inicial para que se produzca amplificación. Este resultado negativo, indica que la extracción de material genético fue bien realizada ya que no hubo contaminación cruzada con ninguna muestra y que los reactivos están en buen estado.

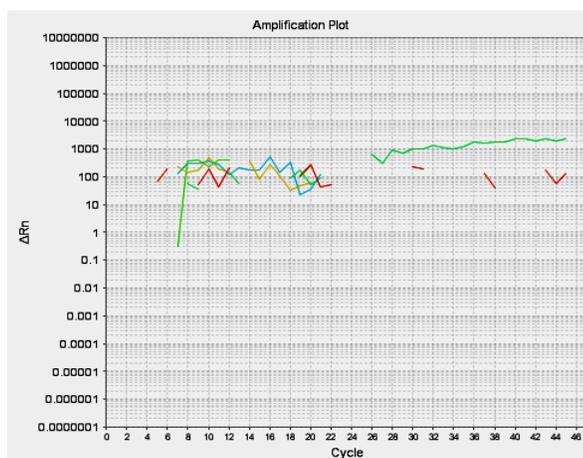


Figura N°16: Columna 6 del panel de Subtipificación. Control de extracción muestras 56-59, gráfico logarítmica.

3.8.4 Análisis controles positivos. Como se visualiza en la Figura N°17 A, los controles positivos están dentro de los rangos esperados, donde el crecimiento exponencial de las curvas comienza entre los ciclos 18 y 22, aunque para el control positivo de Influenza B es más tardío cerca del ciclo 32 aun se encuentra dentro los 38 ciclos, ya que superior a esto las amplificaciones se consideran inespecíficas. Pero para confirmar que este control está correcto se analiza el grafico lineal (Figura N°17B), donde se observa claramente un crecimiento exponencial de la amplificación entre los ciclos 36 y 38 pudiendo deberse a bajo titulo de muestras ya que el valor del Ct es inversamente proporcional a la cantidad del templado, a medida que el Ct es mayor, menor es la proporción del templado en la muestra (Pfaffl, 2010). Así, se pueden comparar al control positivo para RNP y Flu-B diciendo que el primero presenta un Ct menor teniendo mayor cantidad de templado que Flu-B.

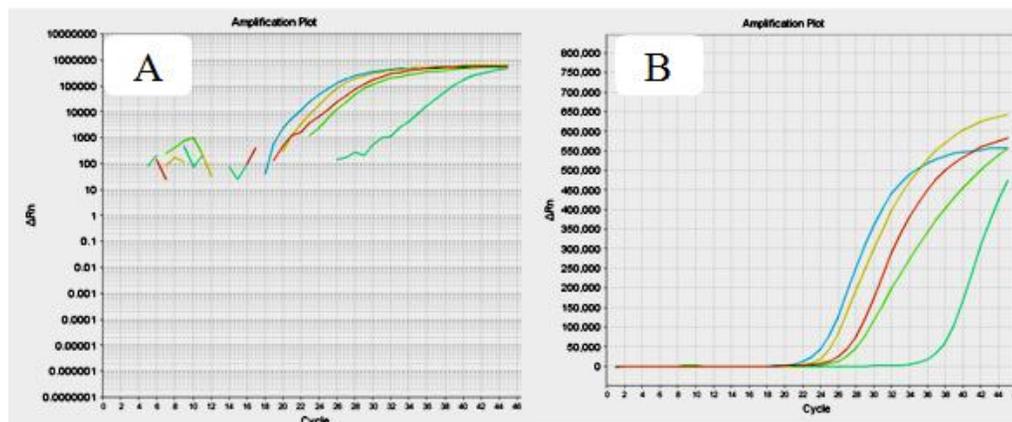


Figura N°17: Columna 7 del panel de Subtipificación. (A) Gráfico logarítmico con controles positivos para Influenza A, subtipo pdm H1, subtipo H3N2, Influenza B y presencia de material genético RNP. (B) Gráfico lineal con controles positivos para Influenza A, subtipo pdm H1, subtipo H3N2, Influenza B y presencia de material genético RNP.

3.8.5 Análisis Influenza tipo A (Flu-A). Primero se modifica manualmente la línea umbral o threshold sobre las amplificaciones inespecíficas o ruido y coincidentemente en la fase exponencial de las curvas donde sucede la mayor eficiencia de la reacción de amplificación. Este threshold corregido a través del software arrojará el valor Ct que definirá a la muestra como positiva o negativa. La Figura N°18, muestra la línea threshold corregida indicando que la

muestra 58 es positiva para Flu-A al igual que el control positivo de Flu-A, con Ct 29 y 23 respectivamente.

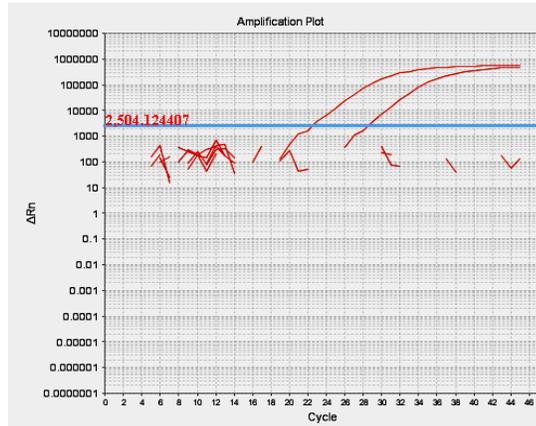


Figura N°18: Fila A del panel de Subtipificación. Target Flu-A Threshold corregido 56-59. Se observan las curvas logarítmicas de la muestra 58 y control positivo para Flu-A con Ct 29 y 23 respectivamente.

3.8.6 Análisis Influenza A Subtipo pandémico H1N1 (pdm H1). En la Figura N°19 solo se observa la clara amplificación del control positivo de pdm H1N1, indicando que la única muestra que podía ser positiva para este subtipo (58), no lo es. El valor Ct del control positivo es 21.

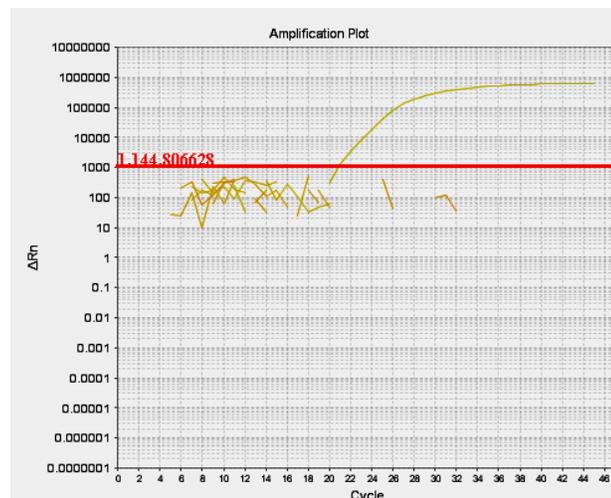


Figura N°19: Fila B del panel de Subtipificación. Target pdm H1 Threshold corregido 56-59. No observan las curvas logarítmicas de la muestra solo se observe el control positivo para pdm H1 con Ct 21.

3.8.7 Análisis Influenza A Subtipo H3N2 (H3). La Figura N°20 muestra la curva exponencial de la muestra 58 para el subtipo H3N2 y para su control positivo, al modificar la línea threshold ignorando la amplificación inespecífica presentada por el control negativo, antes descartada, el software indica que los Ct para la muestra 58 y control positivo H3 son 32 y 27 respectivamente. Por lo tanto la muestra 58 es positiva para Influenza tipo A, subtipo H3N2.

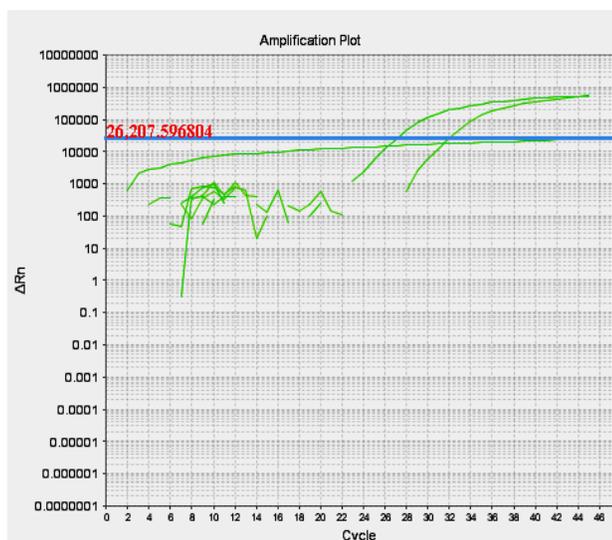


Figura N°20: Fila C del panel de Subtipificación. Target H3 Threshold corregido 56-59. Se observan las curvas logarítmicas de la muestra 58 y control positivo para H3 con Ct 32 y 27 respectivamente.

3.8.8 Análisis Influenza B (Flu-B). La Figura N°21 muestra las curvas exponenciales de las muestras 57 y 59 para Influenza B y para su control positivo, al modificar la línea threshold ignorando la amplificación inespecífica presentada por el control negativo, antes descartada, el software indica que los Ct para el control negativo es indeterminado y para las muestras 57, 59 y control positivo Flu-B los Ct son 23, 27 y 33 respectivamente. Indicando que las muestras 57 y 59 son positivas para Influenza B.

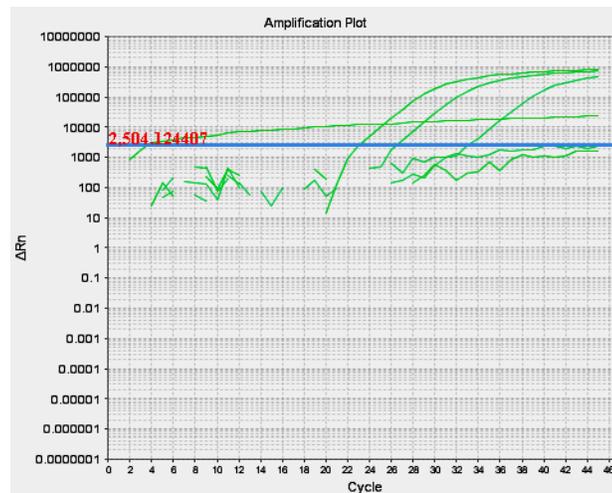


Figura N°21: Fila D del panel de Subtipificación. Target Flu-B Threshold corregido 56-59. Se observan las curvas logarítmicas de la muestra 57, 59 y control positivo para Flu-B con Ct 23, 27 y 33 respectivamente.

3.8.9 Análisis individual de las muestras.

- **Muestra 56:** Como se observa en la Figura N°22 la muestra 56 presenta solo una curva de amplificación exponencial la cual corresponde a que si se amplificó material genético ((+) para RNP), indicando que la extracción se realizó correctamente afirmando que la muestra es negativa para Influenza A y cualquiera de sus subtipos e Influenza B.

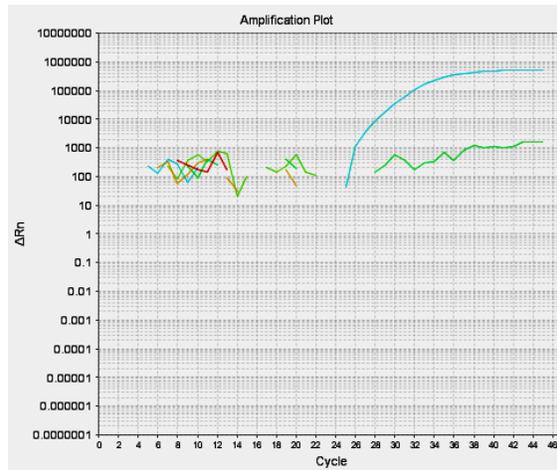


Figura N°22: Columna 2 del panel de Subtipificación. Curva logarítmica muestra 56. Negativo para influenza A y B y subtipo, pero presenta material genético.

- **Muestra 57:** Según la Figura N°23 la muestra 57 es positiva para Influenza B y para presencia de material genético.

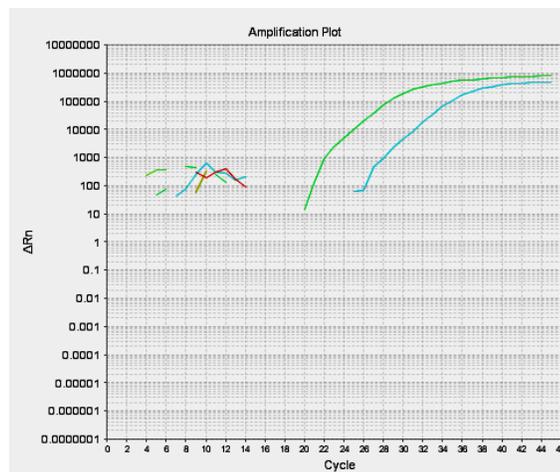


Figura N°23: Columna 3 del panel de Subtipificación. Curva logarítmica muestra 57 positiva para influenza B y para RNP.

- **Muestra 58:** Se observan (Figura N°24) 3 curvas de amplificación exponencial, correspondientes a Flu-A, H3 y RNP. Por lo tanto la muestra 58 es positiva para Influenza A subtipo H3N2.

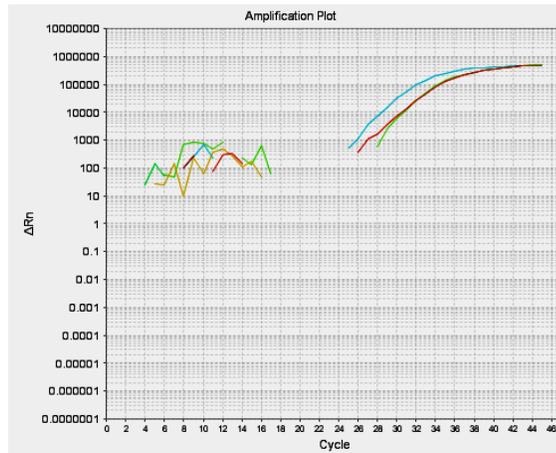


Figura N°24: Columna 4 del panel de Subtipificación. Curva logarítmica muestra 58, positiva para Influenza tipo A subtipo H3N2 y RNP.

- **Muestra 59:** Según la Figura N°25 la muestra 59 es positiva para Influenza B y para presencia de material genético.

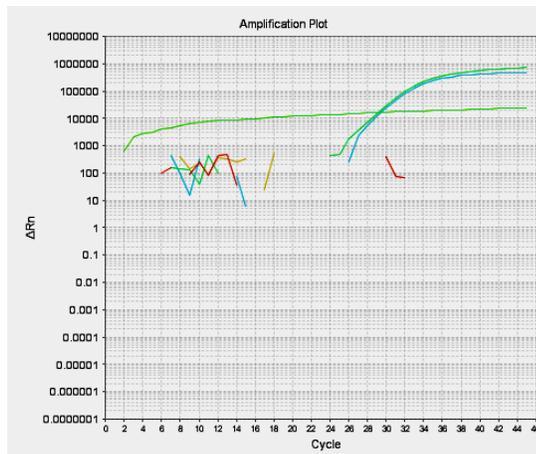


Figura N°25: Columna 5 del panel de Subtipificación. Curva logarítmica muestra 59, positiva Influenza B y RNP.

Al corregir todos los threshold y analizar cada muestra la planilla de amplificación en el software se ve como en la Figura N°27. Este experimento debe guardarse con nombre y fecha, como respaldo del examen realizado. Además todos los Ct deben corregidos deben escribirse manualmente en el Panel de Subtipificación y las muestras positivas como en la Figura N°28. Este Panel también será guardado como respaldo y ayuda para completar la información del

Formulario de Envío Muestras Vigilancia de Influenza Subdepartamento Virología ISP (Anexo 4).

	1	2	3	4	5	6	7
A	CNeg U FluaM Ct: Undeterm...	56 U FluaM Ct: Undeterm...	57 U FluaM Ct: Undeterm...	58 U FluaM Ct: 28.53	59 U FluaM Ct: Undeterm...	C ext U FluaM Ct: Undeterm...	CpostFluaM U FluaM Ct: 22.59
	CNeg U pdm H1 Ct: Undeterm...	56 U pdm H1 Ct: Undeterm...	57 U pdm H1 Ct: Undeterm...	58 U pdm H1 Ct: Undeterm...	59 U pdm H1 Ct: Undeterm...	C ext U pdm H1 Ct: Undeterm...	CPost pdm H1 U pdm H1 Ct: 20.97
C	CNeg U H3 Ct: Undeterm...	56 U H3 Ct: Undeterm...	57 U H3 Ct: Undeterm...	58 U H3 Ct: 31.99	59 U H3 Ct: Undeterm...	C ext U H3 Ct: Undeterm...	Cpost H3 U H3 Ct: 27.07
	CNeg U Flu B Ct: Undeterm...	56 U Flu B Ct: Undeterm...	57 U Flu B Ct: 23.19	58 U Flu B Ct: Undeterm...	59 U Flu B Ct: 26.6	C ext U Flu B Ct: Undeterm...	Cpost Flu B U Flu B Ct: 33.16
E	CNeg U RNP Ct: Undeterm...	56 U RNP Ct: 26.26	57 U RNP Ct: 28.54	58 U RNP Ct: 26.21	59 U RNP Ct: 26.74	C ext U RNP Ct: Undeterm...	Cpost RNP U RNP Ct: 19.71

Figura N°27: Plantilla de la amplificación de las muestras 56-59, con los Cts corregidos. Donde la columna 1 es el control negativo (-), columna 2 muestra 56 (-), columna 3 muestra 57 (+) Flu-B, columna 4 muestra 58 (+) Flu-A subtipo H3N2, columna 5 muestra 59 (+) Flu-B, columna 6 es el control de extracción (-) y columna 7 controles positivos (+) para los diferentes target. Fila E indica que todas las muestras (56-59) tuvieron buena extracción del material genético, ya que sus RNP son (+) y por lo tanto la muestra negativa 56 se puede validar.

Muestra/Sonda	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A	Flu A	
	C Neg	56	57	58	59	C extr	FluA (+)	23
B	pdm H1							
	C Neg	56	57	58	59	C extr	pdmH1 (+)	21
C	H3							
	C Neg	56	57	58	59	C extr	H3 (+)	27
D	Flu B							
	C Neg	56	57	58	59	C extr	Flu B (+)	33
E	RNP							
	C Neg	56	57	58	59	C extr	RNP (+)	
F		26	29	26	27		20	
G								

Figura N°28. Panel de Subtipificación, con los Ct y las muestras positivas.

Obtenidos los resultados para cada muestra y validando la amplificación, se emiten los informes para cada paciente a los respectivos hospitales con la finalidad de comenzar o respaldar el tratamiento indicado por el clínico y realizar las medidas epidemiológicas que el equipo médico determine, como por ejemplo el aislamiento del paciente para evitar contagios entre otros usuarios o el inicio de tratamiento antiviral.

3.9 Envío de resultados y muestras a confirmación al Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

Como indica el algoritmo de identificación y subtipificación de Influenza A y B mediante RT-PCR en Tiempo Real (Anexo 1) las muestras analizadas fueron enviadas al Instituto de Salud Pública. Para esto se ingresan los datos del paciente y datos de la corrida (Anexo 4) en el “FORMULARIO ENVIO MUESTRAS (MODELO 2012) VIGILANCIA DE INFLUENZA SUBDEPARTAMENTO VIROLOGÍA I.S.P.”.

3.9.1 Preparación de muestras para el envío a ISP. En el gabinete de bioseguridad tipo II se rotulan dos criotubos estériles por muestra (tubo que permite el almacenaje a temperaturas bajo 0°C) con el número, el nombre completo del paciente y el lugar de procedencia. Se alicuotan 1.300 µl aproximadamente de muestra en cada criotubo y 700 µl de Medio de Transporte Viral (MTV) que es estable a temperatura ambiente y puede mantener la viabilidad (y la infectividad) del virus, durante su transporte al laboratorio de análisis. El MTV incluye proteínas para lograr estabilización, antibióticos para minimizar la contaminación bacteriana y fúngica, además de un tampón para mantener neutro el pH.

Colocar máximo 2 criotubos dentro de falcon 15 ml. Luego los tubos falcon se colocan al interior de una caja plástica o de material sólido con unidad refrigerante, acompañada de formulario completo (dentro de plástico para evitar deterioro por derrames) y sellar. Empaquetar y colocar el rotulo de envío a ISP (Anexo 9).

Elaborar nómina de envío con copia a Tecnólogo Médico Supervisor. Entregar en secretaría para su posterior envío. Si el envío no se realiza a la brevedad se debe refrigerar.

Pasado una semana, verificar los resultados emitidos por el ISP Chile en el sitio web (Anexo 4).

3.10 Análisis Experimental. Test rápido BD Directigen™ EZ Flu A+B.

Con la finalidad de aprender otras metodologías útiles en la detección de la Influenza se ejecutara un análisis experimental el cual servirá para realizar una comparación práctica entre un test diagnóstico rápido y los resultados obtenidos mediante IFI y RT-PCR en tiempo Real. Este test es un inmunoensayo cromatográfico que detecta cualitativamente en muestras de ANF, la presencia de los antígenos virales de Influenza A y B, su utilidad es muy común en los laboratorios de pequeña categoría.

Toda manipulación de muestras biológicas debe considerarse peligrosa por lo cual se sugiere que este test se realice dentro del gabinete de bioseguridad con bata protectora, mascarilla y guantes. Las personas con autorización que ingresen al laboratorio deben tener la misma precaución (por la volatilidad de este tipo de muestras), utilizando mascarillas, guantes y bata estéril/desechable para su protección

El protocolo recomendado para este análisis es el siguiente: las muestras y los reactivos se dejaron a temperatura ambiente (15-25°) por algunos minutos.

1. Se etiquetó un dispositivo y un tubo Dispens Tube para cada control y muestra testada (Control positivo Flu-A, Control positivo Flu-B, Muestras 56, 57 y 58).
2. Se mezcló suavemente el reactivo E. Se dispensaron 4 gotas en el tubo Dispens Tube. El reactivo se posicionó en forma vertical (aproximadamente una pulgada por encima del tubo Dispens Tube), mientras que se agregaban las gotas.



Figura N°29: Ejemplo de cómo agregar cuatro gotas de reactivo E.

3. Se mezcló bien la muestra a analizar.
4. Pipeteó 300 μ l de muestra en el tubo Dispens Tube (que ya contiene reactivo E). Insertó la punta del Dispens Tube y mezcló.

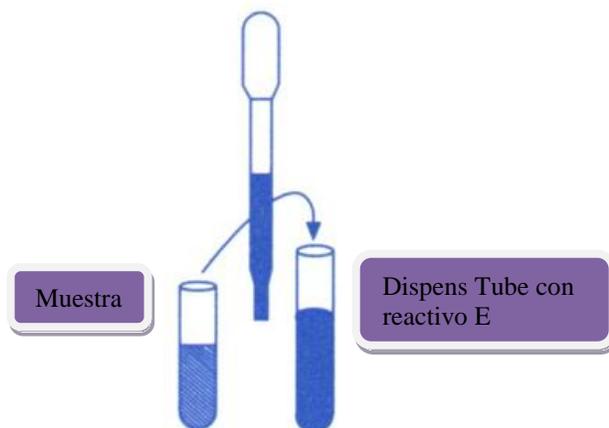


Figura N°30: Pipetear 300 μ l de la muestra en el Dispens Tube.

5. Agregar 3 gotas de la mezcla a cada pocillo de muestra.

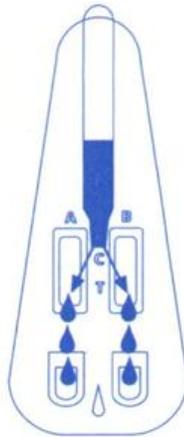


Figura N°31: Ejemplo para dispensar muestra en los pocillos

6. Después de la adición de la muestra, se leyó cada dispositivo transcurrido 15 min.

3.11 Análisis test rápido BD Directigen™ EZ Flu A+B

Transcurrido 15 minutos los antígenos virales influenza A o B se unen a los anticuerpos anti-influenza conjugado se visualizarán en las ventanas correspondientes a las tiras de A y B. El complejo antígeno-conjugado migra a través de la tira de prueba hasta el área de reacción y es capturado por la línea de anticuerpo en la membrana. Los controles positivos para Influenza A y B se ven como en la Figura n°14. Solo se debe hacer una comparación visual de las bandas en cada ventana entre los controles y las muestras procesadas.

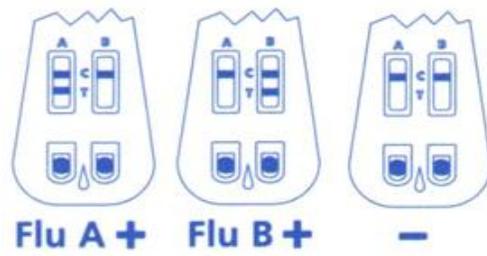


Figura N°32: Controles Test BD Directigen™ EZ Flu A+B transcurrido 15 minutos luego de agregar las gotas de cada control (+).

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados de nuestros análisis

Del total de muestra analizadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Complejo Asistencial Miraflores (81) se obtuvieron 49 muestras positivas para Influenza A H3N2 lo que equivale al 60% (Figura N°33) de las muestras analizadas. 24 muestras fueron positivas para Influenza B equivalente al 30%. Las restantes 8 fueron negativas para Influenza A y B lo que equivale al 10% del total de muestras analizadas

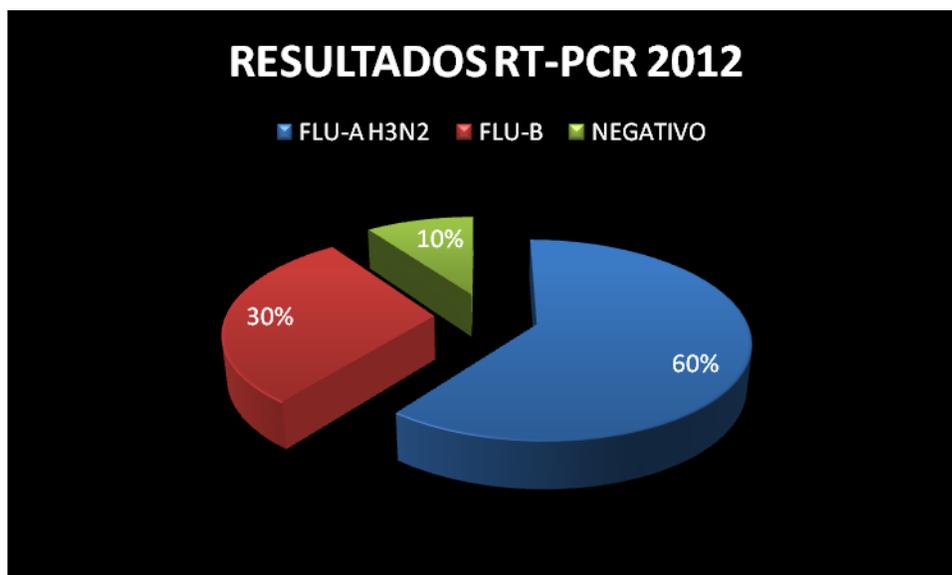


Figura N°33: Resultados de las 81 muestras analizadas el año 2012 en el Laboratorio de Biología Molecular Complejo Asistencial Miraflores, expresadas en porcentajes.

Las 49 muestras positivas para Influenza tipo A se subtipificaron siendo el 100% de ellas positivas para el subtipo estacional H3N2, sin ningún análisis positivo para el subtipo H1N1. Este último resultado indica que gracias a la subtipificación de la Influenza tipo A en años anteriores

se favorece la creación de estrategia de vacunación realizada por el ISP Chile inmunizando a la población con éxito contra el virus Influenza tipo A subtipo H1N1.

4.2 Comparación resultados IFI/RT-PCR Tiempo Real.

El 90% del total de muestras recepcionadas y analizadas en el Laboratorio, presentaban un análisis previo de Inmunofluorescencia (IFI). 45 muestras fueron diagnosticadas como Influenza A sin subtipificar a través de esta prueba, correspondiente al 55%. 21 muestras fueron positivas para Influenza B, el 26% y restante 9% (7 muestras) fueron negativas para Influenza A o B (Figura N°34).

Del total de muestras analizadas por IFI y por RT-PCR, solo existieron dos discordancias (Anexo 8), IFI negativa y positivo para Influenza A H3N2 en RT-PCR, IFI positiva para Influenza A y positivo para Influenza B en RT-PCR, esto puede deberse a la baja sensibilidad del inmunoensayo, siendo alrededor del 60%, versus una sensibilidad de la RT-PCR del 95%. Se tiene certeza de la validez de los resultados obtenidos en el Laboratorio de especialidad de Biología Molecular ya que el equipo utilizado está calibrado y certificado, al igual que los protocolos, reactivos y controles, además que todos los exámenes son revisados y validados por un profesional certificado por el ISP. En el caso de que los resultados erróneos de la IFI fueran debidos a la calidad de las muestras, por ejemplo por no haber sido tomadas dentro de los primeros tres días de iniciados los síntomas en el paciente (presentando mayor cantidad de virus, si estuviera infectado) o que las muestras sufrieran cambios bruscos de temperatura ($>4^{\circ}\text{C}$), se hubiese detectado al realizar la RT-PCR, ya que las células presentes en la muestra estarían degradadas y posiblemente también su material genético, reflejándose en un valor negativo del RNP (presencia de material genético) de la muestra obligando a informar la necesidad de que el paciente se tome otra muestra, y todos los inconvenientes que esto conlleva. Como esto no sucedió y las muestras fueron validadas el Laboratorio de especialidad, se asegura que el problema no estuvo en la calidad de las muestras.

Otro motivo por el cual existe esta diferencia de resultados puede ser una mala manipulación de la muestra en la ejecución de la técnica de IFI ya que las muestras en si no estaban ni contaminadas ni en mal estado porque se analizaron sin dificultad y sin resultados ambiguos a través de RT-PCR.

A pesar de la baja sensibilidad de la IFI, ésta prueba es de vital ayuda en épocas de epidemias o pandemias, ya que el número de personas con sospecha de padecer Influenza es elevado y esta prueba entrega resultados rápidos que permiten a los profesionales encargados comenzar con un tratamiento y aislación del paciente por ejemplo si la IFI fuera positiva para Influenza A, permitiendo dar antivirales y aislar al paciente para evitar el contagio de otras personas.

Mientras esto sucede, la muestra del que ya está en tratamiento sigue con una prueba más certera y confiable, la RT-PCR, que permite confirmar y entregar el subtipo del virus o indicar que se suspenda el tratamiento porque la muestra era negativa.



Figura N°34: Resultado de las pruebas IFI, presentado en porcentajes.

4.3 Comparación de nuestros resultados con Organismo Validador Nacional. Control externo de calidad.

Como se menciona anteriormente las muestras positivas para Influenza A subtipificadas e Influenza B analizadas, fueron enviadas al Instituto de Salud Pública al igual que las muestras discordantes (Anexo 8). Luego de analizarlas, el Instituto publicó y confirmó en la página Web de Vigilancia de Influenza y Virus respiratorio (Figura N°35) cada una de las muestras enviadas por nuestro laboratorio con un 100% de concordancia demostrando que los procedimientos y técnicas realizados para el diagnóstico de estas muestras dentro del Laboratorio Biología Molecular Complejo Asistencial Miraflores fueron ejecutados eficientemente, en específico las cuatro muestras distintivas utilizadas como ejemplo en la Metodología.

HOSPITAL NUEVA IMPERIAL	09		2	7	M	09-10-2012	POSITIVO B	39	Validado,
HOSPITAL DE LOTA	08		0	6	F	09-10-2012	POSITIVO A (H3N2)	38	Validado
HOSPITAL DE LOTA	08		3	4	F	09-10-2012	POSITIVO B	37	Validado
HOSPITAL DE CORONEL	08		3	1	M	09-10-2012	POSITIVO B	38	Validado
HOSPITAL DE CORONEL	08		8	4	F	09-10-2012	POSITIVO B	38	Validado
HOSPITAL DR. HERNAN HENRIQUEZ ARAVENA	09		0	8	F	09-10-2012	POSITIVO B	39	Validado
HOSPITAL DR. HERNAN HENRIQUEZ ARAVENA	09		1	3	M	09-10-2012	POSITIVO B	39	Validado
HOSPITAL DR. HERNAN HENRIQUEZ ARAVENA	09		0	0	M	09-10-2012	POSITIVO A (H3N2)	39	Validado

Figura N°35: Validación de resultados de las muestras positivas para Influenza B e Influenza A H3N2, emitido por el ISP Chile en sitio web. Transcurrida una semana desde el envío a confirmar. *En ningún caso se pueden mostrar los datos personales de los pacientes.

Cada muestra que llegó al Laboratorio de especialidad del Complejo Miraflores fue analizada a la brevedad, obteniendo resultados en unas cuantas horas (dentro del día de recepción) o en su defecto al día siguiente, por razones de horario, para emitir los informes correspondientes y comunicar al profesional a cargo del paciente y a las autoridades pertinentes. Luego transcurrido

aproximadamente una semana se envió la confirmación del ISP, ya que por protocolo del Laboratorio se realizan envío una vez por semana a excepción de urgencias.

Esta entidad además de la confirmación realiza la secuenciación de los casos en que se pudo tipificar una muestra como Influenza A pero no subtipificar, entendiéndose que podría tratarse de un mutante de esta cepa. El resto de las muestras positivas se secuencian para llevar un control y registro de las pequeñas variaciones que pueden existir en las cepas del virus (drift antigénicos) que pudieran provocar epidemias por falta de inmunización de la población debido a estas nuevas mutaciones en el virus de Influenza.

4.4. Resultados de análisis experimental para Test BD Directigen™ EZ Flu A y B comparados con la RT-PCR Tiempo Real

Las muestras procesadas con este test transcurrido 15 minutos:

- Muestra 56 mostró las mismas líneas de color rojizo en ambas ventanas C y ninguna en la ventana T, como el control negativo. Por lo tanto se deduce que la muestra es negativa.



Figura N°36: Test BD Directigen™ EZ Flu A+B transcurrido 15 minutos luego de agregar las gotas de muestra 56.

- Muestra 57 mostró las mismas líneas de color rojizo en ambas ventanas C y ninguna en la ventana T el control negativo. Por lo tanto se deduce que la muestra es negativa.



Figura N°37: Test BD Directigen™ EZ Flu A+B transcurrido 15 minutos luego de agregar las gotas de muestra 57.

- Muestra 58 mostró las mismas líneas de color rojizo en ambas ventanas C y una línea en la ventana T de la derecha, como el control positivo para Influenza A. Por lo tanto se deduce que la muestra 58 es positiva para Influenza tipo A.



Figura N°38: Test BD Directigen™ EZ Flu A+B transcurrido 15 minutos luego de agregar las gotas de muestra 58.

Al comparar las 4 muestras procesadas en este análisis experimental se pudo observar que la muestra 56 fue negativa para Influenza A o B y aunque su sintomatología pudiese indicar la presencia de un agente viral este pueden deberse a otro agente etiológico.

En relación a las muestras 57 y 59, estas son positivas para Influenza B según RT-PCR Tiempo Real coincidiendo con los resultados de las IFI (Cuadro N°6), pero no así la muestra 57 con el Test rápido que indica que la muestra es negativa. Como se mencionó anteriormente un resultado negativo entregado por este test no descarta la presencia del virus en las muestras, debiéndose por ejemplo a un bajo título células infectadas confirmándose la baja sensibilidad de este test al compararlo con el resultado entregado por la RT-PCR Tiempo Real técnica de alta sensibilidad y especificidad que requiere incluso solo unas cuantas copias del material genético a amplificar.

Como muestra el Cuadro N°6, coinciden en su resultado el test rápido y la IFI respecto a la muestra 58 positiva para Influenza A, pero ninguna de estas pruebas debido a sus características indica el subtipo de ésta. Este resultado se obtuvo por RT-PCR Tiempo Real donde se analizaron las muestras según Panel de Subtipificación indicando a esta muestra como positiva para Influenza tipo A subtipo H3N2. Según el informe de virus respiratorios del ISP (Anexo 10) este subtipo estacional ha predominado el año 2012 sobre el subtipo H1N1, debido a que la vacunación contra este subtipo del virus Influenza inmunizó a la población.

La subtipificación de los virus Influenza A positivos diagnosticados por los laboratorio de especialidad implementados por el ISP como el Laboratorio Biología Molecular del consultorio Miraflores permiten fortalecer la vigilancia epidemiológica regional y nacional a través de la técnica RT-PCR Tiempo Real, generando una estadística de los resultados obtenidos ya que de acuerdo al comportamiento del virus, respecto a la prevalencia de los subtipos diagnosticados en los pacientes y el debido registro e información de estos, el ISP elabora las estrategias para la conformación de la vacuna del año venidero como se mencionó anteriormente.

Cuadro N°6: Resultados de las muestras 56-58 de Test rápido BD Directigen™ EZ Flu A+B y muestras 56-59, IFI y RT-PCR Tiempo Real.

Nº Muestra	Test rápido BD Directigen™ EZ Flu A+B	IFI	RT-PCR Tiempo Real
56	Negativo	Negativo	Negativo
57	Negativo	Influenza B	Influenza B
58	Influenza A	Influenza A	Influenza A H3N3
59	-----	Influenza B	Influenza B

Debido a la baja sensibilidad de este test, bajos niveles del virus en la muestra pueden producir un resultado falso negativo, por lo tanto, un resultado negativo de esta prueba no elimina la posibilidad de que la muestra esté infectada con Influenza A y B. Así es que se confirma la necesidad de realizar RT-PCR en Tiempo Real para determinar si las muestras 56 y 57 presentan el virus. Si bien la muestra 58 es similar al control positivo de Influenza A, no se sabe el subtipo de ésta por lo tanto también se debe hacer una subtipificación a través de RT-PCR en Tiempo Real.

Si se puede aseverar la rapidez con que se obtienen resultados con estos test (15 minutos en BD Directigen, y menos de una hora en IFI), y aunque no se puede subtipificar el virus, si permiten indicar el inicio de un tratamiento antiviral e indicaciones de bioseguridad como el aislamiento de los pacientes infectados.

Respecto al aislamiento viral, la creciente aplicación de la PCR en Tiempo Real para la detección de patógenos en muestras clínicas como lo es el diagnóstico del virus de Influenza en muestras de

aspirado nasofaríngeo es debido a sus amplias ventajas, como son su sensibilidad, precisión, rapidez de resultados y su cada vez más bajo costo. Por lo tanto sería muy beneficioso para la Red de Salud pública ampliar la aplicación diagnóstica de esta técnica a otros agentes etiológicos de interés clínico como por ejemplo, cuantificación absoluta y relativa de la expresión génica, Identificación de mutaciones o polimorfismos de base simple (SNP) y genotipificación, entregando resultados más precisos y confiables a los usuarios.

5. CONCLUSIONES

Respecto a la realización de la detección y subtipificación del virus de la Influenza humana en muestras de aspirado nasofaríngeo provenientes de los establecimientos de salud de La Red Asistencial Araucanía Sur y Valdivia, en dependencias del Laboratorio Biología Molecular Complejo Asistencial Miraflores Servicio Salud Araucanía Sur de la ciudad de Temuco, se concluye que los procesos desarrollados durante el periodo de práctica profesional controlada 2012 se realizó con éxito.

Los protocolos de extracción de ARN viral, de muestras de aspirado nasofaríngeo fueron realizados eficazmente ya que los resultados óptimos requeridos se fueron logrando a medida de la práctica, cumpliendo cada paso a seguir, comprendiendo las funciones de éstos y resolviendo los posibles problemas relacionados con éste proceso.

Por su parte dentro del proceso se aplicaron los conocimientos teórico - prácticos en biología molecular adquiridos durante los cursos de pregrado de la carrera de Biotecnología de la Universidad de La Frontera y la práctica profesional controlada, para la validación de curvas de amplificación del genoma extraído de las muestras con posible virus de la Influenza humana, obteniendo un 100% de concordancia con los resultados entregados por el Instituto de Salud Pública de Chile.

En cuanto a la comparación de un test rápido y RT-PCR Tiempo Real para la identificación del virus Influenza, se encuentran diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad de ambas técnicas, aunque respecto a la mayor eficiencia del cómo actuar frente a una situación de pandemia o epidemia el complemento de ambas técnicas genera una mejor resolución en cuanto al diagnóstico rápido y pronto tratamiento de los pacientes sospechosos de padecer el virus.

Sin embargo durante el proceso, en algunas ocasiones los resultados no tuvieron éxito, a pesar de ello se analizaron los posibles errores de procedimiento, falla de reactivos o material

contaminado, repitiendo los exámenes hasta tener resultados certeros. Entendiendo que las fallas de procedimiento van de la mano de la práctica y al aprendizaje significativo.

Siento haber adquirido las competencias básicas para el desempeño dentro de un laboratorio de especialidad como lo es la Unidad de Biología Molecular Complejo Asistencial Miraflores, enfrentando situaciones adversas producidas en el mismo desarrollo de los protocolos. Transversalmente logré adquirir destrezas de autogestión tanto en lo actitudinal como procedimental.

6. LITERATURA CITADA

- Anaya, J. M., Shoenfeld, Y., Correa, P. A., García Carrasco, M., & Cervera, R.** (2005). Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune. Medellín: CIB.
- Avendaño, L. F., Ferrés, M., & Spencer, E.** (2011). Virología Clínica. Santiago Chile: Mediterraneo.
- Ayora-Talavera, G.** (1999). Influenza: Historia de una enfermedad. Revista Biomédica; 10:57-61.
- Bar, T., Kubista, M., Tichopad, A.,** (2011). Validation of kinetics similarity in qPCR. Nucleic acids research.
- Belshe, R.,** (2005). The Origins of Pandemic Influenza — Lessons from the 1918 Virus. New England Journal of Medicine; 353:2209-2211.
- Bengo, A., San Martín, M., Vicente D., Larrañaga, M.** (2002). Temporada gripal 2001-02 en una consulta de Pediatría en Atención Primaria. Bol. s Vasco-nav pediatr; 36: 5-8.
- Boggild, A., & McGreen, A.** (2010). Diagnóstico de laboratorio del virus influenza A H1N1 2009. Critical Care Medicine, 38-42.
- Cabezas, J. A.** (2004). Datos actuales sobre virus de la gripe de patos salvajes y pollos, y virus de la gripe tipo C. Agentes antigripales. Monografía conjunta de las Reales Academias Nacionales de Medicina y Farmacia (31-III-2004), titulada: Síndrome agudo respiratorio y gripe aviar.
- Cabezas, J. A.** (2006). Inhibidores de la neuraminidasa y nuevas estrategias terapéuticas frente al virus de la gripe. Real Academia Nacional de Medicina España. Monografía XXI: 187-239.
- Cabezas, J. A., Hannoun, C.** (1990): La gripe y sus virus. Inv. Ciencia, 159: 62-69
- Cabrera, A., Echenique, H., Uez, O., Kuznier, G., & del Mónaco, R.** (2011). Manual para el fortalecimiento de la vigilancia de la enfermedad tipo influenza utilizando la estrategia de unidades centinelas de infección respiratorias agudas graves. Buenos Aires: OPS/OMS.

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Microbiológicas Clínicas*, 299-305.

Dabanch, J., Perret, C., Wilhelm, J., Fasce, R. Sotomayor, V., Vergara, J. Otaíza, F., Del Campo, S., Rivera, M. (2011). Guía Clínica para el Diagnóstico y Manejo Clínico de Casos de Influenza. Disponible en: www.minsal.cl Plan de Invierno 2011

Derveaux, S., Vandesomepele, J., Hellemans, J., (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50, 227-230.

Eiros, J., Ortiz de Lejarazu, R., Tenorio, A, Casas, I., Pozo, F., Ruiz, G., Pérez-Breña, P., (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones virales respiratorias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas Clínicas*, Elsevier España.; 27(3):168-177.

Fonseca Mendoza, D., Mateus Arbeláez, H., & Contreras Bravo, N. (2010). Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: su aplicación en genética básica. Bogotá: Universidad de Rosario.

Fraser, C., Donnelly, C., Cauchemez, S., Hanage, W., Van Kerkhove, M., Hollingsworth, T., Griffin, J., Baggaley, R., Jenkins, H., Lyons, E., (2009). Pandemic Potential of a Strain of Influenza A (H1N1): Early Findings. *Science*: Vol. 324 no. 5934 pp. 1557-1561

Gallegos, D., Fasce, R., Rojo, P., Andrade, W., Ferruz, J. (2010). Descentralización del diagnóstico de influenza pandémica en Chile: implementación laboratorios regionales de RT-PCR. *Boletín de vigilancia en salud pública*. 27-30.

Gubareva, L. V.; Kaiser, L., Hayden, F. K. (2000). Influenza virus neuraminidase inhibitors. *The Lancet*, 353:827-835.

Instituto de Salud Pública, (2008). Normativa Técnica para el Transporte de Sustancias Infecciosas a Nivel Nacional hacia el Instituto de Salud Pública (ISP). Gobierno de Chile, Ministerio de Salud. 3-5.

Kim, C. U.; Lew, W., Williams, M. A. (1997): Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of arbo-cyclicsialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *Journal of the American Chemical Society*. 119: 681-690.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27, 95-125.

Lagos Z, R., Avendaño C, L., & Levine, M. (1999). Vigilancia sistemática de virus influenza, respiratorio sincicial, parainfluenza y adenovirus, en niños ambulatorios con infecciones respiratorias agudas. *Revista Médica de Chile*, vol. 127, no.9, pp. 1063-1072.

Luque, J. (2006). *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Madrid: Elsevier.

Ministerio de Salud de Chile (2010). Influenza estacional y pandémica (H1N1): vigilancia epidemiológica, investigación y control de brotes. Circular n°20.

Ministerio de Salud de Chile (2012). Guía para el Diagnóstico y Manejo Clínico de casos de Influenza. Recuperado el 16 de 10 de 2012, de www.minsal.cl

McFarland, E., Yup, A., Joshi, S., Lovell, S., Stahler, J., Finnerty, C., Pope, B., Newman, J., Crews, V. (2005). Evaluation of the BD Directigen™ EZ Flu A+B Rapid Chromatographic Immunoassay*. BD Diagnostics • 7 Loveton Circle • Sparks, MD 21152, USA. As presented at the Clinical Virology Symposium.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27.

Organización Mundial de la Salud. (2003). Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. Habana: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. 23-30.

Oropesa, S., Rodríguez, D., Goyenechea, Á., Morier, L., Hernández, B., Valdivia, Á. (1998). Detección y caracterización rápida de los virus de influenza A y B en secreciones nasofaríngeas mediante el método de la inmunoperoxidasa. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 36-41.

Pfaffl, M., (2010). The ongoing evolution of qPCR. *Methods* 50, 215-216.

Prieto, M., Russ, G., & Reitor, L. (2000). Factores de riesgo de infecciones respiratorias agudas en menores de 5 años. *Revista Cubana de Medicina*. [online]: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-21252000000200010&script=sci_arttext

Razón, R. (2003). Prevención de las infecciones respiratorias agudas. Presente y futuro. *Revista Cubana de Pediatría*.

Rabagliati, R. (2004). Influenza-A as etiology of fever and respiratory insufficiency in adults hospitalized during an outbreak in Chile. *Revista Médica de Chile*;

132: 317-324.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 3, 1101-1108

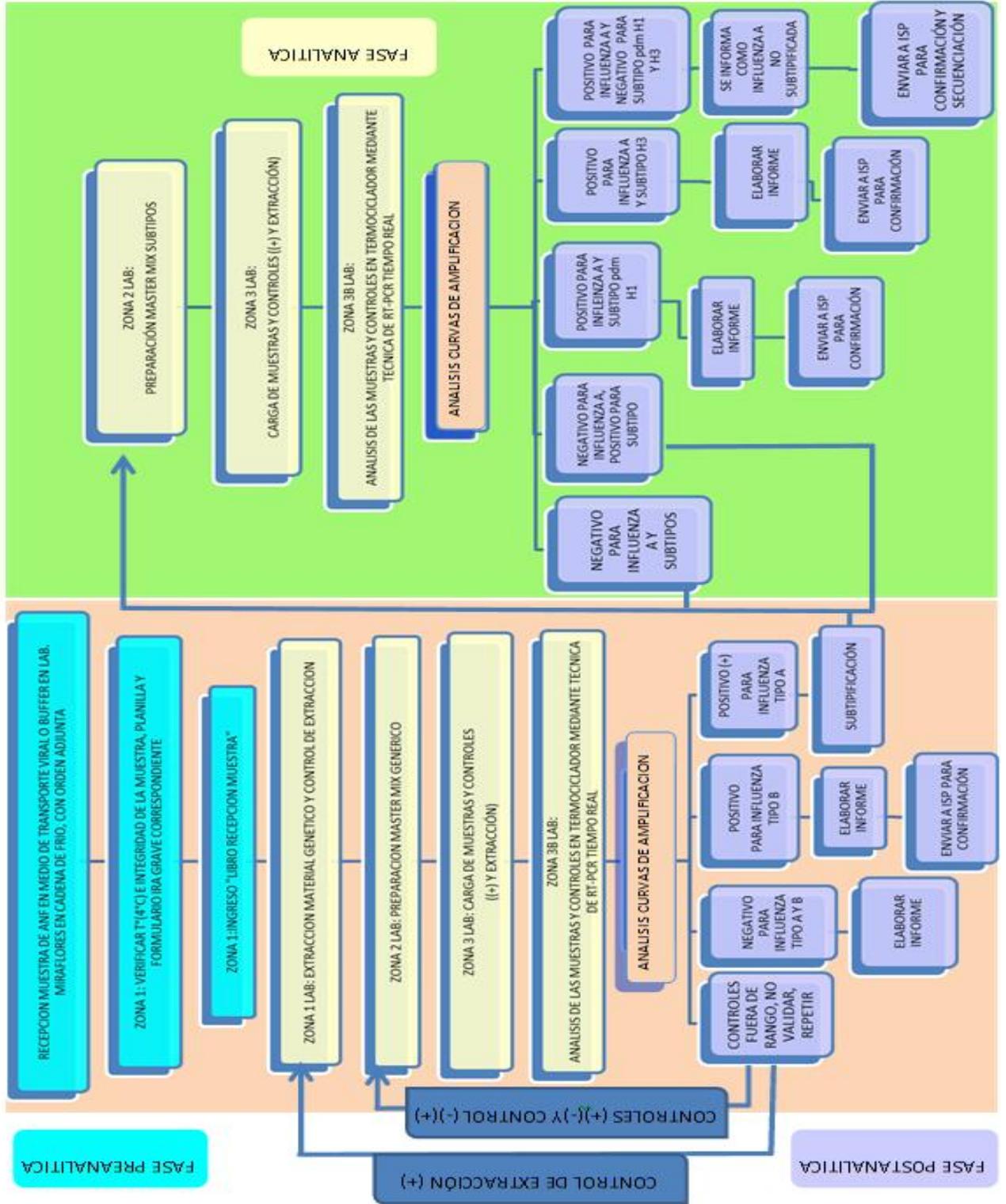
Taubenberger, J., Reid, A., Fanning, T. (2000). The 1918 influenza virus: a killer comes into view. *Virology*, 274:241-245.

Trifonov V., Khiabani H., Khiabani H., Rabadan R. (2009). Geographic Dependence, Surveillance, and Origins of the 2009 Influenza A (H1N1) Virus. *New England Journal of Medicine.*; (361); 2: 115-119.

Vaughan, P., Morrow, R. (1989). *Salud comunitaria: Manual de epidemiología para la gestión de sistemas locales de salud.* Pax, ciudad de México.

7. ANEXOS

Anexo 1. Algoritmo de identificación y subtipificación de Influenza A y B mediante RT-PCR en Tiempo Real.



Anexo 2. Planilla de ingreso al laboratorio.



ANEXO N° 1

Establecimiento : HOSPITAL DR. HERNAN HENRIQUEZ ARAVENA
 A : CONSULTORIO MIRAFLORES.

Fecha envío muestras: 26/09/2012

Responsable de enviar las muestras:

Nombre del paciente	RUT	Fecha nacimiento	Servicio clinico hospitalización	Fecha Toma de muestra	Resultado IF/Fecha
56 <input type="text"/>	<input type="text"/>	18/09/1939	HOSP. NUEVA IMPERIAL	23/09/2012	NEGATIVO 24/09/2012
57 <input type="text"/>	<input type="text"/>	07/02/2012	HOSP. NUEVA IMPERIAL	24/09/2012	INFLUENZA B 24/09/2012
58 <input type="text"/>	<input type="text"/>	05/09/2012	PEDIATRIA HOSP. DR. HERNAN HENRIQUEZ	25/09/2012	INFLUENZA A 25/09/2012
59 <input type="text"/>	<input type="text"/>	28/12/2011	PEDIATRIA HOSP. DR. HERNAN HENRIQUEZ	25/09/2012	INFLUENZA B 25/09/2012

Petición: 9267001 H. HERNAN HENRIQUEZ A. 	Petición: 9267002 H. HERNAN HENRIQUEZ A. 	Petición: 9267003 H. HERNAN HENRIQUEZ A. 	Petición: 9267004 H. HERNAN HENRIQUEZ A.
---	---	---	---

HOSPITAL DR. HERNAN HENRIQUEZ ARAVENA
 UNIDAD LABORATORIO CLINICO
 M. MONTT 115 - FON0 459021 - 459027
 TEMUCO

Anexo 3. Formulario notificación inmediata y envío de muestras a confirmación.

A. Correspondiente a muestra 56

56

Ministerio de Salud
República de Chile

**FORMULARIO NOTIFICACIÓN INMEDIATA Y ENVÍO DE MUESTRAS A CONFIRMACIÓN
IRA GRAVE y FALLECIDOS POR INFLUENZA (COMPLETAR CON LETRA IMPRINTA)**

1- IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

Apellidos Paterno: [redacted] Apellidos Materno: [redacted] Nombre: [redacted]

R.U.T.: [redacted] SEXO: Femenino Masculino Edad: 77 años 0 meses Fecha de Nacimiento: 18/9/39

DOMICILIO: Calle: Imperialito Nueva Valdivia Provincia: Punta Arenas

COMUNA: Imperial Región: Magallanes Teléfono fijo o celular: 8 [redacted]

Trabajador activo o gerente de centros: NO Personal de Salud: NO Embarazo: NO Semanas gestación: 1

2. ANTECEDENTES CLÍNICOS

Fecha inicio síntomas: 15/9/12 Fecha 1ª consulta: 16/9/12

Síntomas:

Fiebre (T >= 38,5°) <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO	Tos <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Cefalea <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
Dolor de garganta <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO	Rinorrea congestión nasal <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Taquipnea <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
Malgia <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO	Dificultad Respiratoria <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Hipoxia <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
Neurralgia <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Hipotensión <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Ortopnea <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
Exudado <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO	Desnutrición o rechazo alimentario (por fatiga) <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO	

Comprensión hemodinámica: SI NO

Enfermedad de base: SI NO Especificar: IAC II HD en

Consulta repetida por deterioro cuadro respiratorio: SI NO

Hospitalización:

De hospitalización: SI NO Fecha hospitalización: 22/9/12 Dirección de Ingreso: Según Puesto de Registro - Alameda 607

Grave: SI NO Ingreso UCI: SI NO VM: SI NO VAF: SI NO EMO: SI NO

Uso Anticel: SI NO Fecha inicio: 1/10/12 Anticel. Oral: SI NO Zoonosis: SI NO

Fallecimiento:

Fallece: SI NO Fecha fallecimiento: 1/10/12 Diagnóstico fallecimiento: HA - icc IAC

Antecedentes Vacunación

Vacuna contra Influenza: SI NO Fecha vacunación: 16/6/11

3. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS Y EXÁMENES

Fecha obtención de la muestra: 23/9/12 Fecha envío muestra: 23/9/12

Virus detectado localmente

Intenso Fluorescencia: Influenza A Influenza B VRS Adenovirus Parainfluenza Negativo Establecimiento: HHHA

Test Pack: Influenza A Influenza B Negativo Establecimiento: HHHA

RT-PCR: Influenza A (H1N1) pdm Influenza A no subtipo pdm Negativo Establecimiento: HHHA

Tipo de muestra: Aspirado Nasofaríngeo Líquido Nasofaríngeo Biopsia o Tejido Pulmónal Otro:

Establecimiento: H. Valdivia Fono: 557921

Responsable de la notificación: [redacted] Fecha notificación: 24/9/12

ENVIAR UNA COPIA JUNTO CON ESTE FORMULARIO NOTIFICATIVO AL DE INMEDIATO A EPIDEMIOLOGÍA SEREMI SALUD RESPECTIVO

Dirección SEREMI Salud: seremi.salud@seremi.cl | seremi.salud@seremi.cl | seremi.salud@seremi.cl | seremi.salud@seremi.cl
seremi.salud@seremi.cl | seremi.salud@seremi.cl | seremi.salud@seremi.cl | seremi.salud@seremi.cl
seremi.salud@seremi.cl | seremi.salud@seremi.cl | seremi.salud@seremi.cl | seremi.salud@seremi.cl

B. Correspondiente a muestra 57



**FORMULARIO NOTIFICACIÓN INMEDIATA Y ENVÍO DE MUESTRAS A CONFIRMACIÓN
IRA GRAVE y FALLECIDOS POR INFLUENZA (COMPLETAR CON LETRA IMPRINTA)**

1.- IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE
Apellido Paterno: _____ Apellido Materno: _____ Nombre: _____
R.U.T.: 23 32 5127-5 SEXO: Femenino Masculino Edad: 2 años 7 meses Fecha de nacimiento: 07/02/2010
DOMICILIO: Calle _____ N° 1523 Previsión FOUASA C.
COMUNA: NOVA LIPERUAC Región NOVENA Teléfono fijo o celular: _____
Trabajador/a libre o grandes de edad: SÍ NO Personal de Salud: SÍ NO Embarazo: SÍ NO Semanas gestación: 1

2. ANTECEDENTES CLÍNICOS.
Fecha inicio síntomas 22/09/12 Fecha Tª coreala 22/09/12
Síntomas:
Fiebre (Tº > 38,5° C): SÍ NO Tos: SÍ NO Cefalea: SÍ NO
Dolor de garganta: SÍ NO Rinorrea / congestión Nasal: SÍ NO Taquipnea: SÍ NO
Mialgia: SÍ NO Dificultad Respiratoria: SÍ NO Hipoxia: SÍ NO
Neumonía: SÍ NO Hipotensión: SÍ NO Cianosis: SÍ NO
Encéfalo: SÍ NO Deshidratación o rechazo alimentario (en lactantes): SÍ NO
Compromiso hemodinámico: SÍ NO
Enfermedad de base: SÍ NO Específicas: _____
Consulta repetida por deterioro cuadro respiratorio: SÍ NO
Hospitalización:
Se hospitalizó: SÍ NO Fecha hospitalización 24/09/2012 Diagnóstico de Ingreso: NEUMONIA VERSUS INFLUENZA
Grave: SÍ NO Ingreso UCI: SÍ NO VM: SÍ NO VAP: SÍ NO ECMO: SÍ NO
Uso Antiviral: SÍ NO Fecha inicio: 1/1/12 Antiviral Oseltamivir Zanamivir
Fallecimiento:
Falleció: SÍ NO Fecha fallecimiento: 1/1/12 Diagnóstico fallecimiento: _____
Antecedentes Vacunación
Vacuna contra influenza: SÍ NO Fecha vacunación: 1/1/12 no le correspondió.

3. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS Y EXÁMENES
Fecha obtención de la muestra: 24/09/12 Fecha envío muestra: 24/09/12
Virus detectado localmente
Inmuno Fluorescencia: Influenza A Influenza B VRS Adenovirus Parainfluenza Negativo Establecimiento: H444
Test Pack: Influenza A Influenza B Negativo Establecimiento: _____
RT-PCR: Influenza A (H1N1) pdm Influenza A no subtipificable Negativo Establecimiento: _____
Tipo de muestra: Aspirado Nasofaríngeo Tórulas Nasofaríngeas Biopsia o Tejido Pulmonar Otro: _____

Establecimiento: Dep. Vna. Imperial Fono: 957901
Responsable de la notificación: _____ Fecha notificación: 24/09/2012

ENVIAR UNA COPIA JUNTO CON LA MUESTRA AL ISP y OTRA VÍA MAIL, DE INMEDIATO A EPIDEMIOLOGÍA SEREMI SALUD RESPECTIVA/

- Direcciones SEREMI Salud: notificacion_seremi@minsa.cl
- Dirección Regional de Salud: notificacion_seremi@minsa.cl

C. Correspondiente a muestra 58

ANEXO 1

Ministerio de Salud
República de Chile

Abril 2010

FORMULARIO NOTIFICACIÓN INMEDIATA Y ENVÍO DE MUESTRAS A CONFIRMACIÓN
IRA GRAVE y FALLECIDOS POR INFLUENZA (COMPLETAR CON LETRA IMPRINTA)

1.- IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

Apellidos Paterno: [] Apellidos Materno: [] Nombre: []
 R.U.T.: [] Sexo: Femenino Masculino Edad: [] años ^{1.º Año de vida} Fecha de Nacimiento: 25/09/12
 DOMICILIO: Calle Camino Chul Chul 1.º Providencia
 COMUNA: Chul Chul Región: Navegación Teléfono fijo o celular: []
 Trabajador activo o gerente de empresa: SI NO Personal de Salud: SI NO Embarazo: SI NO Semanas gestación: / /

2. ANTECEDENTES CLÍNICOS.

Fecha Inicio síntomas: 14/09/12 Fecha 1.º consulta: 24/09/12

Síntomas:

Fiebre (> o = 38,5° C)	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	Tos	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Carditis	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>
Dolor de garganta	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	Rinorrea flogocítica nasal	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Taquipnea	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>
Miagia	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	Dificultad Respiratoria	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	Hipoxia	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>
Neumonía	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	Hipotensión	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	Canchales	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>
Encefalitis	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	Deshidratación o rechazo alimentario (en lactantes)	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		
Comorbilidad hemodinámica	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>				
Enfermedad de base:	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Especificar:	En estudio por soplo cardíaco		
Consulta repetida por deterioro cuadro respiratorio:	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>				

3. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS Y EXÁMENES

Fecha obtención de la muestra: 25/09/12 Fecha envío muestra: 25/09/12

Virus detectado localmente

Immuno Fluorescencia: Influenza A Influenza B VRS Adenovirus Parainfluenza Negativo Establecimiento: _____
 Test Pack: Influenza A Influenza B Negativo Establecimiento: _____
 RT-PCR: Influenza A (H1N1) pdm Influenza A no subtipificable Negativo Establecimiento: _____

Tipo de muestra: Aspiración Nasofaríngea Tórulas Nasofaríngeas Biopsia o Tejido Pulmonar Otro: _____

Establecimiento: Hospital Hernán Henríquez Arce Puro
 Responsable de la notificación: Alejandra Moscoso A. Fecha notificación: 25/09/12

ENVIAR UNA COPIA JUNTO CON LA MUESTRA AL ISP y OTRA VÍA MAIL DE INMEDIATO A EPIDEMIOLOGÍA SEREMI SALUD RESPECTIVA

Dirección SEREMI Salud seremi@seremi.cl seremi@seremi.cl seremi@seremi.cl	seremi@seremi.cl seremi@seremi.cl seremi@seremi.cl seremi@seremi.cl	seremi@seremi.cl seremi@seremi.cl seremi@seremi.cl seremi@seremi.cl	seremi@seremi.cl seremi@seremi.cl seremi@seremi.cl seremi@seremi.cl
--	--	--	--

D. Correspondiente a muestra 59

ANEXO 1

Ministerio de Salud
República de Chile

Abril 2010

FORMULARIO NOTIFICACIÓN INMEDIATA Y ENVÍO DE MUESTRAS A CONFIRMACIÓN
IRA GRAVE y FALLECIDOS POR INFLUENZA (COMPLETAR CON LETRA IMPRINTA)

1.- IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

Apellidos Paterno: [redacted] Apellidos Materno: [redacted] Rutina: [redacted]

R.U.T.: [redacted] SEXO: Femenino Masculino Edad: [redacted] años País de origen: Chile Fecha de nacimiento: 25/12/2011

DOMICILIO: Calle: [redacted] N°: 510 Prebida: Fonasa A

COMUNA: Temuco Región: Novena Teléfono fijo o celular: [redacted]

Trabajador agrícola o ganadero de cerdos Personal de salud Empleado Semanas gestación: 1 / 1

2. ANTECEDENTES CLÍNICOS.

Fecha inicio síntomas: 11/08/12 Fecha 1ª consulta: 12/08/12

Síntomas:

Fiebre ($T > 38,1^{\circ}$) <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO	Tos <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO	Cefalea <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> NO
Dolor de garganta <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO	Rinorrea congestión nasal <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO	Taquipnea <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO
Miagia <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> NO	Dificultad Respiratoria <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO	Hipoxia <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> NO
Nauseas <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO	Hipersalivación <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> NO	Clonus <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> NO
Exofalito <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> NO	Desorientación o cambios alimentarios (en lactantes) <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO		
Compromiso hemodinámico <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> NO				
Enfermedad de base <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> NO	Especificar: <u>HTA</u>			
Comorbilidad por deterioro sustrato respiratorio <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO				

Hospitalización:

Se hospitalizó: SÍ NO Fecha hospitalización: 25/08/12 Diagnóstico de ingreso: Neumonía retroviral leve + SBO leve

Grave: SÍ NO Ingreso UC: SÍ NO VM: SÍ NO VVD: SÍ NO ECM: SÍ NO

Uso Antibiótico: SÍ NO Fecha inicio: 1 / 1 Antibiótico: Cloranfenicol Zanamivir

Fallecimiento:

Falleció: SÍ NO Fecha fallecimiento: 1 / 1 Diagnóstico fallecimiento: _____

Antecedentes Vacunación

Vacuna contra Influenza SÍ NO Fecha vacunación: 1 / 1 No vacunado.

3. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS Y EXÁMENES

Fecha obtención de la muestra: 25/08/12 Fecha envío muestra: 25/08/12

Virus detectado localmente

Introna Fluorescente: Influenza A Influenza B VRS Adenovirus Parainfluenza Negativo Establecimiento: HIMHA

Taxi Pack: Influenza A Influenza B Negativo Establecimiento: _____

RT-PCR: Influenza A (H1N1) pdm Influenza A no subtipificada Negativo Establecimiento: _____

Tipo de muestra: Aspirado Nasofaríngeo Tórax Nasofaríngeo Sopleo e Tejido Pulmonar Otro:

Establecimiento: Hospital Hospital General de Temuco

Responsable de la notificación: Colombina María Teresa A. Fecha notificación: 25/08/12

ENVIAR UNA COPIA JUNTO CON LA MUESTRA AL ISP y OTRA VIA MAIL DE INMEDIATO A EPIDEMIOLOGÍA SEREMI SALUD RESPECTIVO

Divisiones SEREMI Salud: seremi.salud@minsa.gub.cl seremi.salud@minsa.gub.cl seremi.salud@minsa.gub.cl seremi.salud@minsa.gub.cl

Anexo 3. Informes emitidos en el Laboratorio de Biología Molecular Complejo Miraflores.

A. Muestra 56

	CONSULTORIO MIRAFLORES - TEMUCO		Fecha Informe : 26/09/2012
	LABORATORIO CLINICO		Hora Informe : 15:00
			Nº Peticion: 9267001
Nombre:	<input type="text"/>		
RUT:	<input type="text"/>	Edad: 73	Procedencia: H. HERNAN HENRIQUEZ A.
Diagnóstico:	NO INFORMADO		Profesional Solicitante: NO INFORMADO

EXAMEN	RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA
Validado por: T.M. Alexy Rosales Zapata		
<u>VIROLOGIA</u>		
Test de Influenza A	NEGATIVO	[NEG]
1. Sub-tipo H1N1	NEGATIVO	
2. Sub-tipo H3N2	NEGATIVO	
Test de Influenza B	NEGATIVO	[NEG]

B. Muestra 57

	CONSULTORIO MIRAFLORES - TEMUCO		Fecha Informe : 26/09/2012
	LABORATORIO CLINICO		Hora Informe : 15:00
			Nº Peticion: 9267002
Nombre:	<input type="text"/>		
RUT:	<input type="text"/>	Edad: 232Días	Procedencia: H. HERNAN HENRIQUEZ A.
Diagnóstico:	NO INFORMADO		Profesional Solicitante: NO INFORMADO

EXAMEN	RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA
Validado por: T.M. Alexy Rosales Zapata		
<u>VIROLOGIA</u>		
Test de Influenza A	NEGATIVO	[NEG]
1. Sub-tipo H1N1	NEGATIVO	
2. Sub-tipo H3N2	NEGATIVO	
Test de Influenza B	POSITIVO	* [NEG]

C. Muestra 58



**CONSULTORIO MIRAFLORES - TEMUCO
LABORATORIO CLINICO**

Fecha Informe : 26/09/2012
Hora Informe : 15:00

Nº Peticion: 9267003

Nombre:
RUT: Edad: 021Días Procedencia: H. HERNAN HENRIQUEZ A.
Diagnóstico: NO INFORMADO Profesional Solicitante: NO INFORMADO

EXAMEN	RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA
Validado por: T.M. Alexy Rosales Zapata		
<u>VIROLOGIA</u>		
Test de Influenza A	POSITIVO	* [NEG]
1. Sub-tipo H1N1	NEGATIVO	
2. Sub-tipo H3N2	POSITIVO	
Test de Influenza B	NEGATIVO	[NEG]

Muestra 59



**CONSULTORIO MIRAFLORES - TEMUCO
LABORATORIO CLINICO**

Fecha Informe : 26/09/2012
Hora Informe : 15:00

Nº Peticion: 9267004

Nombre:
RUT: Edad: 273Días Procedencia: H. HERNAN HENRIQUEZ A.
Diagnóstico: NO INFORMADO Profesional Solicitante: NO INFORMADO

EXAMEN	RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA
Validado por: T.M. Alexy Rosales Zapata		
<u>VIROLOGIA</u>		
Test de Influenza A	NEGATIVO	[NEG]
1. Sub-tipo H1N1	NEGATIVO	
2. Sub-tipo H3N2	NEGATIVO	
Test de Influenza B	POSITIVO	* [NEG]

**FORMULARIO ENVÍO MUESTRAS
VIGILANCIA DE INFLUENZA
SUBDEPARTAMENTO SUPERVISORES VISUALES
ISP**

RUT: <input type="text"/> Edad (en años, solo números): <input type="text"/> Sexo: <input type="radio"/> M <input type="radio"/> F <input type="radio"/> I FechaNacimiento: <input type="text"/>	ApellidoPaterno: <input type="text"/> ApellidoMaterno: <input type="text"/> Nombres: <input type="text"/> Grupos: <input type="text"/> EstablecimientoOrigen: <input type="text"/>	FechaInicio Síntomas: <input type="text"/> Otros Síntomas: <input type="text"/> Fiebre: <input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Ignorado FechaObtenciónMuestra: <input type="text"/> OtroTipoMuestra: <input type="text"/>	TipoMuestra: <input type="radio"/> Aspirado <input type="radio"/> Tórula PacienteGrave: <input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Ignorado PacienteFallecido: <input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Ignorado	<p>Resultados Formato 2012 (A, H1pdm09, H3, B, Y)</p> <p>PCR Flu A <input type="radio"/> Positivo <input type="radio"/> Negativo PCR Flu B <input type="radio"/> Positivo <input type="radio"/> Negativo PCR A Hipómós <input type="radio"/> Positivo <input type="radio"/> Negativo PCR A H3 <input type="radio"/> Positivo <input type="radio"/> Negativo PCR RNP <input type="radio"/> Positivo <input type="radio"/> Negativo</p> <p>Control positivo Flu A: <input type="text"/> Control positivo Flu B: <input type="text"/> Control positivo A Hipómós: <input type="text"/> Control positivo A H3: <input type="text"/> Control positivo RNP: <input type="text"/></p> <p>Control Negativo: <input type="radio"/> Negativo <input type="radio"/> Positivo PRC Realizado Por: <input type="text"/> Código Establecimiento: <input type="text"/> 21-303 Inmuno Fluorescencia: <input type="radio"/> No Realizado <input type="radio"/> Influenza A <input type="radio"/> VRS <input type="radio"/> Influenza B <input type="radio"/> Adenovirus <input type="radio"/> Negativo <input type="radio"/> Parainfluenza</p>
---	--	--	--	--

FORMULARIO ENVÍO MUESTRAS

FechaChequeo: 02/12/2012 HoraChequeo: 03:42 UsuarioChequeo: 21-303-007 FechaModificación: 02/12/2012 HoraModificación: 03:42 UsuarioModificación: 21-303-007 RecordID: 2134	<p>Formularios Ira Grave del RUT</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; height: 20px;">Valor</td> <td style="width: 50%; height: 20px;">NroConfirmacionISP: 0</td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; height: 20px;">Enviar (Guardar)</td> <td style="width: 50%; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; height: 20px;">Imprimir 2012 (Presione Ctrl y C/D)</td> <td style="width: 50%; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; height: 20px;">Muestras Por Laboratorio</td> <td style="width: 50%; height: 20px;"></td> </tr> </table>	Valor	NroConfirmacionISP: 0	Enviar (Guardar)		Imprimir 2012 (Presione Ctrl y C/D)		Muestras Por Laboratorio	
Valor	NroConfirmacionISP: 0								
Enviar (Guardar)									
Imprimir 2012 (Presione Ctrl y C/D)									
Muestras Por Laboratorio									

RESULTADO ISP (según RUT)

Fecha Resultado	Nro. Muestra ISP	Resultado
		Control

Anexo 5. Formulario envío a ISP de las muestras positivas (+)

A. Muestra 57

50

FORMULARIO ENVIO MUESTRAS (Modelo 2012)
VIGILANCIA DE INFLUENZA
SUBDEPARTAMENTO VIROLOGÍA I.S.P.

1.- IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE		
Nombres y Apellidos Paterno y Materno : _____		
RUT : _____	Fecha de Nacimiento : 07-02-2010	
Edad : 2	Sexo : M	
Establecimiento : 21-303 HOSP. NUEVA IMPERIAL	Región : 09	
2. ANTECEDENTES		
Fecha inicio síntomas : 22-09-2012	Fiebre (> o = 38° C) : Si	
Otros síntomas : DOLOR DE GARGANTA- MIALGIA- TOS- RINORREA- CEFALEA- TRAQUIPNEA		
Fecha de Obtención de la muestra : 24-09-2012		
Tipo de Muestra : Aspirado	Otra :	
Paciente IRA grave : Si		
Paciente Fallecido : No		
3. Resultados Locales		
PCR Influenza A (FluA)	Negativo	Valor de CT:
PCR Influenza B	Positivo	Valor de CT: 23
PCR Influenza A H1pdm09		Valor de CT:
PCR A H3		Valor de CT:
PCR RNP	Positivo	Valor de CT: 29
Control positivo FluA	Valor de CT:	23
Control positivo FluB	Valor de CT:	33
Control positivo A H1pdm09	Valor de CT:	21
Control positivo H3	Valor de CT:	27
Control positivo RNP	Valor de CT:	20
Control negativo :	Negativo	
PCR realizada por : TM. ALEXY ROSALES ZAPATA Fecha PCR: 09/26/2012		
ESTABLECIMIENTO : 21-303 Centro de Salud Familiar Miraflores		
Inmuno Fluorescencia : Influenza B		
Fecha IF : 09/24/2012		
Observaciones:		

Toda muestra deberá ser enviada en envase estéril con tapa hermética y refrigerada, acompañada de este formulario completo.

Unidad de Recepción de Muestras del ISP 5755187

Muestra enviada a ISP: 03 de Octubre 2012.-
Confirmación del ISP: 09 de Octubre 2012.

B. Muestra 58

50

**FORMULARIO ENVIO MUESTRAS (Modelo 2012)
VIGILANCIA DE INFLUENZA
SUBDEPARTAMENTO VIROLOGÍA L.S.P.**

L- IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE		
Nombres y Apellidos Paterno y Materno : <input type="text"/>		
RUT <input type="text"/>	Fecha de Nacimiento : 07-02-2010	
Edad : 2	Sexo : M	
Establecimiento : 21-303 HOSP. NUEVA IMPERIAL	Región : 09	
2. ANTECEDENTES		
Fecha inicio síntomas : 22-09-2012	Fiebre ($> o = 38^{\circ} C$) : Si	
Otros síntomas : DOLOR DE GARGANTA- MIALGIA- TOS- RINORREA- CEFALEA- TRAQUIPNEA		
Fecha de Obtención de la muestra : 24-09-2012		
Tipo de Muestra : Aspirado	Otra :	
Paciente IRA grave : Si		
Paciente Fallecido : No		
3. Resultados Locales		
PCR Influenza A (FluA)	Negativo	Valor de CT:
PCR Influenza B	Positivo	Valor de CT: 23
PCR Influenza A H1pdm09		Valor de CT:
PCR A H3		Valor de CT:
PCR RNP	Positivo	Valor de CT: 29
Control positivo FluA	Valor de CT:	23
Control positivo FluB	Valor de CT:	33
Control positivo A H1pdm09	Valor de CT:	21
Control positivo H3	Valor de CT:	27
Control positivo RNP	Valor de CT:	20
Control negativo :	Negativo	
PCR realizada por : TM ALEXY ROSALES ZAPATA Fecha PCR: 09/26/2012		
ESTABLECIMIENTO : 21-303 Centro de Salud Familiar Miraflores		
Inmuno Fluorescencia : Influenza B		
Fecha IF : 09/24/2012		
Observaciones:		

Toda muestra deberá ser enviada en envase estéril con tapa hermética y refrigerada, acompañada de este formulario completo.

Unidad de Recepción de Muestras del ISP 5755187

Muestra enviada a ISP: 03 de Octubre 2012.-
Confirmación del ISP: 09 de Octubre 2012.

<http://10.8.179.18/VirusRespiratorio/PCR/imprimir2012.php?action=browse&-recid=6787> 27-09-2012

C. Muestra 59

**FORMULARIO ENVIO MUESTRAS (Modelo 2012)
VIGILANCIA DE INFLUENZA
SUBDEPARTAMENTO VIROLOGÍA I.S.P.**

1.- IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE		
Nombres y Apellidos Paterno y Materno : <input type="text"/>		
RUT : <input type="text"/>	Fecha de Nacimiento : 28-12-2011	
Edad : 0	Sexo : F	
Establecimiento : 21-303 H.I.H.A.	Región : 09	
2.- ANTECEDENTES		
Fecha inicio síntomas : 17-09-2012	Fiebre (> o = 38° C) : Si	
Otros síntomas : DOLOR DE GARGANTA- NEUMONIA- TOS- RINORREA- DIFICULTAD RESPIRATORIA- DESHIDRATACION- TRAQUIPNEA		
Fecha de Obtención de la muestra : 25-09-2012	Otra :	
Tipo de Muestra : Aspirado		
Paciente IRA grave : Si		
Paciente Fallecido : No		
3. Resultados Locales		
PCR Influenza A (FluA)	Negativo	Valor de CT:
PCR Influenza B	Positivo	Valor de CT: 27
PCR Influenza A H1pdm09		Valor de CT:
PCR A H3		Valor de CT:
PCR RNP	Positivo	Valor de CT: 27
Control positivo FluA	Valor de CT:	23
Control positivo FluB	Valor de CT:	33
Control positivo A H1pdm09	Valor de CT:	21
Control positivo H3	Valor de CT:	27
Control positivo RNP	Valor de CT:	20
Control negativo :	Negativo	
PCR realizada por : TM ALEXV ROSALES ZAPATA Fecha PCR: 09/26/2012		
ESTABLECIMIENTO : 21-303 Centro de Salud Familiar Miraflores		
Inmuno Fluorescencia : Influenza B		
Fecha IF : 09/25/2012		
Observaciones:		

Toda muestra deberá ser enviada en envase estéril con tapa hermética y refrigerada, acompañada de este formulario completo.

Unidad de Recepción de Muestras del ISP 5755187

Muestra enviada a ISP: 03 de Octubre 2012
Confirmación del ISP: 09 de Octubre 2012.

<http://10.8.179.18/VirusRespiratorio/PCR/imprimir2012.php?action=browse&-recid=6789> 27-09-2012

Anexo 6. Rótulo de envío a ISP

Remitente: (completar)

Nombre: _____

Hospital/ Laboratorio: _____

Dirección: _____

Ciudad: _____

Teléfono: _____ Fax: _____

Conservar a:

4°C a 8°C

- 20°C

Destinatario:

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE

Laboratorio Nacional de Referencia de

Recepción de Muestras

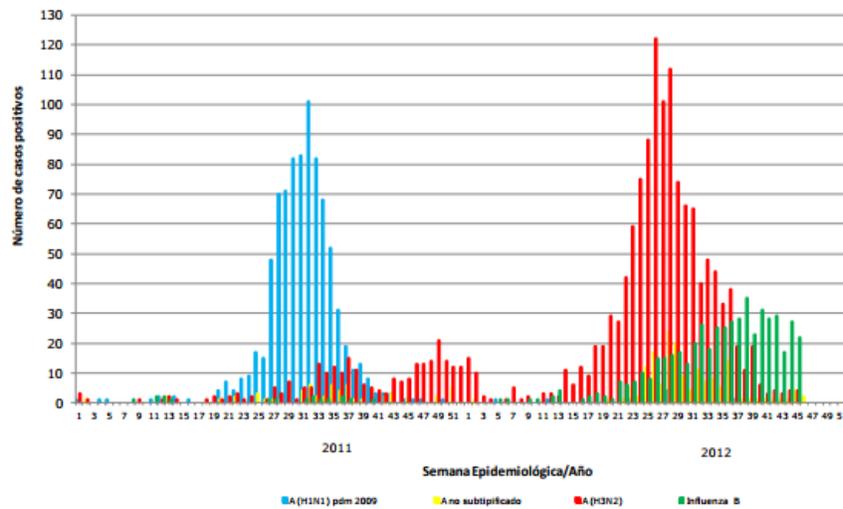
Avenida Marathon 1000

7780050 ÑUÑO A, SANTIAGO-CHILE

FONO: (56-2) 3507244 - 3507245

EN CASO DE EMERGENCIA COMUNICARSE CON EL REMITENTE

Anexo 7. Instituto de Salud Pública de Chile. Distribución del número de casos Influenza por tipos y subtipos por semana epidemiológica, Chile 2011-2012.



Fuente: Sección Virus Respiratorios Exantemáticos. Departamento de Laboratorio Biomédico. Instituto de Salud Pública de Chile. 2012.

Anexo 8

Tabla de comparación de resultados IFI y RT-PCR de las 81 muestras de Aspirado Nasofaríngeo analizadas durante el periodo 2012.

MUESTRA	RESULTADO IFI	RESULTADO RT-PCR TIEMPO REAL
1	NO TIENE	NEGATIVO
2	NO TIENE	NEGATIVO
3	NO TIENE	NEGATIVO
4	NO TIENE	FLU-A H3N2
5	FLU-A	FLU-A H3N2
6	FLU-A	FLU-A H3N2
7	FLU-A	FLU-A H3N2
8	FLU-A	FLU-A H3N2
9	FLU-A	FLU-A H3N2
10	FLU-A	FLU-A H3N2
11	FLU-A	FLU-A H3N2
12	NEGATIVO	NEGATIVO
13	FLU-A	FLU-A H3N2
14	FLU-A	FLU-A H3N2
15	FLU-A	FLU-A H3N2
16	NEGATIVO	NEGATIVO
17	NEGATIVO	NEGATIVO
18	FLU-A	FLU-A H3N2
19	FLU-A	FLU-A H3N2
20	FLU-A	FLU-A H3N2
21	FLU-A	FLU-A H3N2
22	FLU-A	FLU-A H3N2
23	FLU-A	FLU-A H3N2
24	FLU-A	FLU-A H3N2
25	FLU-A	FLU-A H3N2
26	FLU-A	FLU-A H3N2
27	FLU-A	FLU-A H3N2
28	FLU-A	FLU-A H3N2
29	FLU-A	FLU-A H3N2

30	FLU-A	FLU-A H3N2
31	FLU-A	FLU-A H3N2
32	FLU-A	FLU-A H3N2
33	FLU-A	FLU-A H3N2
34	NEGATIVO*	FLU-A H3N2*
35	FLU-A	FLU-A H3N2
36	FLU-A	FLU-A H3N2
37	FLU-A	FLU-A H3N2
38	FLU-A	FLU-A H3N2
39	FLU-A	FLU-A H3N2
40	FLU-B	FLU-B
41	FLU-A	FLU-A H3N2
42	FLU-A	FLU-A H3N2
43	FLU-A	FLU-A H3N2
44	FLU-A	FLU-A H3N2
45	FLU-A	FLU-A H3N2
46	FLU-A	FLU-A H3N2
47	FLU-A	FLU-A H3N2
48	FLU-A	FLU-A H3N2
49	FLU-B	FLU-B
50	FLU-A	FLU-A H3N2
51	FLU-B	FLU-B
52	NO TIENE	FLU-A H3N2
53	FLU-B	FLU-B
54	NEGATIVO	FLU-A H3N2
55	NO TIENE	FLU-A H3N2
56	NEGATIVO	NEGATIVO
57	FLU-B	FLU-B
58	FLU-A	FLU-A H3N2
59	FLU-B	FLU-B
60	FLU-B	FLU-B
61	NEGATIVO	NEGATIVO

62	FLU-A	FLU-A H3N2
63	FLU-B	FLU-B
64	FLU-A	FLU-A H3N2
65	FLU-B	FLU-B
66	FLU-A*	FLU-B*
67	FLU-B	FLU-B
68	FLU-B	FLU-B
69	FLU-B	FLU-B
70	FLU-B	FLU-B
71	FLU-B	FLU-B
72	FLU-B	FLU-B
73	FLU-B	FLU-B
74	FLU-B	FLU-B
75	FLU-B	FLU-B
76	NO TIENE	FLU-B
77	FLU-A	FLU-A H3N2
78	FLU-B	FLU-B
79	NO TIENE	FLU-B
80	FLU-B	FLU-B
81	FLU-B	FLU-B

***Discordancia de resultados entre IFI-RT-PCR Tiempo Real.**