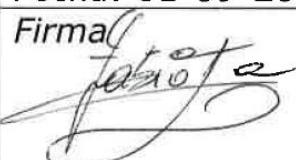

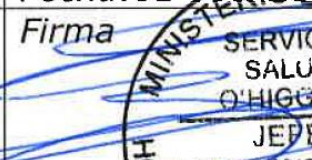




Procedimientos Sección Virus Respiratorios

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
TM. Fabiola Luengo Zúñiga. Encargada Sección Virus Respiratorio	T.M. Myriam Gallegos Valenzuela. Encargada Sección Hematología	B.Q. Rodrigo González Aranda Jefe Laboratorio
Fecha: 01-09-2015	Fecha: 01-09-2015	Fecha: 01-09-2015
Firma 	Firma 	Firma 



	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 1 de 23

ÍNDICE

PROCEDIMIENTOS SECCIÓN VIRUS RESPIRATORIOS

1.-	OBJETIVO	2
2.-	CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE	2
3.-	RECEPCIÓN DE MUESTRA	2
4.-	DEFINICIONES	3
5.-	FUNDAMENTOS	4
6.-	MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS	4
7.-	INSTRUCTIVO TÉCNICA INMUNOFLUORESCENCIA Y PCR.	7
8.-	TIEMPO RESPUESTA	16
9.-	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
10.-	ANEXOS	18

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 2 de 23

1. OBJETIVO

Estandarizar las técnicas utilizadas en el laboratorio de virus respiratorio para el diagnóstico de enfermedades respiratorias, causadas tanto por bacterias como por virus respiratorios, esto mediante el análisis por Inmunofluorescencia Directa (IFD) y Reacción de] Polimerasa en Cadena (PCR) en muestras de aspirado nasofaríngeo y deposición fresca todo esto con el fin de asegurar la calidad y confiabilidad de los resultados entregados.

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

Las técnicas de IFD, PCR para Virus Respiratorios implementadas en el Laboratorio Clínico del Hospital de Rancagua está dirigida a la identificación de ocho agentes etiológicos virales: Virus Sincial Respiratorio (VRS), Adenovirus (ADV), Virus Parainfluenza 1 (P.I. 1), Virus Parainfluenza 2 (P.I. 2), Virus Parainfluenza 3 (P.I. 3), Virus Influenza A (I.A.) y Virus Influenza B (I.B.), Metapneumovirus (Meta). En el caso del diagnóstico de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Clostridium difficile* solo se utiliza la técnica de PCR.

Estos procedimientos deben ser ejecutados por profesionales que tengan la competencia adquirida formalmente o mediante capacitación local.

Las muestras que se analizan de rutina en la sección corresponden a las siguientes procedencias:

- Pacientes de atención cerrada del Hospital Regional Rancagua.
- Pacientes de atención abierta del Hospital Regional Rancagua, en campaña de invierno y brotes epidemiológicos.
- Pacientes ambulatorios del consultorio centinela CESFAM N°4 con sospecha de Enfermedad Tipo Influenza (E.T.I.).
- Pacientes de la red de salud de la Sexta Región con sospecha de E.T.I. y Coqueluche.

3. RECEPCIÓN DE MUESTRA:

La recepción de las muestras para IFD y PCR para virus respiratorio y para *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *Clostridium difficile* es durante las 24 horas del día de lunes a domingo, éstas deben ser guardadas con su orden de examen en el refrigerador de la sección, hasta su análisis.

Cada muestra debe venir: recolectada en el tubo correcto, con su respectiva orden de examen, rotulada en forma legible con el nombre del paciente, sellada correctamente y transportada en un contenedor con unidad refrigerante. Las muestras que no cumplan con la normativa serán rechazadas.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 3 de 23

Muestras provenientes del CESFAM 4, son recibidas con el "Formulario de notificación inmediata para vigilancia de IRA grave y envío de muestras a confirmación". Este formulario debe guardarse como una orden de examen.

4. DEFINICIONES:

Competencias adquiridas formalmente: Todo profesional que haya recibido adiestramiento en Virus Respiratorios en I.S.P.

Capacitación local: Es el adiestramiento que entrega el profesional encargado de la sección Virus Respiratorios, a los profesionales nuevos que llegan a la sección.

Inmunofluorescencia: Las técnicas de inmunofluorescencia se basan en la detección de antígenos presentes en la membrana de las células en suspensión. Para ello se aprovecha la existencia de anticuerpos monoclonales conjugados y marcados con un colorante fluorescente, capaces de reconocer antígenos de membrana.

La propiedad de fluorescencia de una sustancia es la capacidad de emitir luz cuando es expuesta a radiaciones de baja longitud de onda y alta energía (UV – Rayos X). Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo), son transformadas en luz visible.

La absorción de luz se produce por parte de la molécula de fluorocromo, la eleva a un estado de excitación en el cual contiene mayor energía. La molécula permanece en el estado de excitación por un período de tiempo muy corto. El retorno a un nivel de energía menor es acompañado por emisión de luz (fluorescencia). La luz emitida puede ser captada mediante microscopía de fluorescencia, la cual es especialmente equipada con respecto al microscopio convencional, con una lámpara adicional (puede ser lámpara tipo UV, de mercurio, de xenón o argón, láser o LED).

Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) en tiempo real: Técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La PCR en tiempo real se basa en el principio del método de la PCR que permite detectar ADN a partir de pequeñas cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de veces.

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia.

Coqueluche. Es una infección de las vías respiratorias, producida por la bacteria *Bordetella Pertussis*, que produce crisis intensas de tos difíciles de tratar y que puede producir complicaciones respiratorias y neurológicas graves si ataca a niños menores de 2 años.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 4 de 23

5. FUNDAMENTOS:

5.1. Técnica de inmunofluorescencia directa (IFD):

Es la que emplea anticuerpos monoclonales murinos antígeno – específicos **directamente** marcados con **fluoresceína o Isocianato de fluoresceína** para la detección e identificación rápida de los virus respiratorios.

El colorante fluorescente a usar es fluoresceína, muestra una fluorescencia verde manzana bajo la luz ultravioleta. El pH afecta la fluorescencia y por esta razón se debe trabajar a pH estable y adecuado dependiendo del colorante: fluoresceína (pH 8). Si el antígeno esperado (del virus presunto) está presente, se formará un complejo antígeno-anticuerpo. La reacción positiva en forma de fluorescencia verde manzana puede verse con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. Mientras las células no infectadas no contendrán fluorescencia, sino que se teñirán de color rojo con la contra-tinción de Azul de Evans.

5.2. Reacción Polimerasa en Cadena (PCR):

Corresponde a una amplificación enzimática específica de ADN realizada *in vitro*, es decir, donde un segmento particular de ADN es copiado y específicamente amplificado al ser delimitado por un par de partidores que lo flanquean. El copiado se logra de forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes etapas y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN-polimerasa termoestable.

6. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

6.1. Materiales para IFD:

- Pechera plástica con mangas
- Cámara húmeda (caja plástica con tapa o equivalente)
- Contenedor plástico con gradilla
- Cubreobjetos 24x50 mm
- Lápices grafito, pasta y marcador punta fina.
- Micropipeta 10 -100 ul
- Portaobjetos DFA de 2 pocillos(color rosado)y 8 pocillos, (color blanco)
- Piseta
- Cronómetro
- Tubos Nuc de 15ml estériles
- Pipetas de transferencia estériles 3 ml
- Guantes
- Mascarillas N95
- Toalla de papel
- Puntas amarillas para micropipeta.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 5 de 23

6.2. Reactivos para IFD:

6.2.1.- Anticuerpos monoclonales antivirales respiratorios.

- **D³ Ultra DFA Screening Reagent**, como screening positivo, contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína contra todos los antígenos del panel respiratorio y más la contra-tinción de Azul de Evans. (tapa roja)
- **Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent**, como control normal de reacción, incluye una mezcla de gammaglobulina murina que demostró no ser reactiva para ninguno de los virus del panel, más la contra-tinción de Azul de Evans. (tapa amarilla)
- **Panel respiratorio:** anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína, para cada uno de los virus con su respectivo contra-antígeno.

- **Influenza A DFA reagent**
- **Influenza B DFA reagent**
- **RSV (VRS) DFA reagent**
- **Metapneumovirus DFA reagent**
- **Adenovirus DFA reagent**
- **Parainfluenza 1 DFA reagent**
- **Parainfluenza 2 DFA reagent**
- **Parainfluenza 3 DFA reagent**

6.2.2.- Láminas control positivo y negativo comerciales.

- Controles positivos derivados de cultivos celulares en 7 pocillos (Influenza A, Influenza B, VRS, Adenovirus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 y Parainfluenza 3) **Respiratory Virus Antigen Control Slides.**
- Control positivo derivado de cultivos celulares (Metapneumovirus) **hMPV Control Slides.**
- Control negativo derivado de cultivos celulares, viene incorporado un pocillo en **Respiratory Virus Antigen Control Slides.**
- Control negativo derivado de cultivos celulares, viene incorporado un pocillo en **hMPV Control Slides.**

6.2.3.- Mounting Fluid o medio de montaje presente en el kit de reactivos listo para usar. También se puede preparar en el laboratorio. Anexo 2.

6.2.4.- Buffer fosfato pH 7.2 (ANEXO 1. Recomendaciones para toma de muestra virus respiratorios, I.S.P.)

6.2.5.- Acetona anhidra P.A a 4°C

6.2.6.- Alcohol 70%.

6.2.7.- Glicerina Estéril

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 6 de 23

6.3. Equipos para IFD:

- Estufa de cultivo a 37°C
- Centrifuga rango mínimo 1500 rpm
- Microscopio fluorescencia LED.
- Gabinete de bioseguridad
- Refrigerador
- Congelador -70°C o -20°C
- Vórtex

6.4 Materiales para PCR:

- Pechera
- Guantes de nitrilo sin talco
- Pinzas
- Tubos Nuc de 15 ml.
- Tubos 1.5ml estériles.
- Micropipeta 1 - 10µl
- 2 unidades de micropipetas 2 - 20µl
- 2 unidades de Micropipetas 20-200µl
- 2 unidades de micropipetas 100-1000µl
- Puntas con filtro amarillas 2 - 20µl
- Puntas con filtro amarillas 20-200µl
- Puntas con filtro azules 100-1000µl
- Puntas con filtro rojas 1 - 10µl
- Gradilla para tubos de 1,5 ml
- Marcador punta fina
- Toallas de papel
- LighCycler 480 Placa 96, blanca. Cat.Nº 4729 692 001

6.7 Reactivos para PCR:

- Buffer fosfato pH 7.2
- Etanol 70%
- Hipoclorito de sodio 0.5%
- H₂O- grado PCR
- Isopropanol Absoluto.
- High Pure PCR Template Preparation, Kit Extracción para *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Clostridium difficile*. Anexo 5
- High pure ViraL Nucleic Acid, Kit Extracción de Virus respiratorios. Anexo 6
- LightCycler Faststar DNA Master HybProbe Cat.Nº12 239 272 001 (Carpeta insertos)
- LightCycler Multiplex RNA Virus Master Cat.Nº 07 083 173 001(Carpeta insertos)
- LightMix Modular PhHV Internal Control Cat.Nº 66-0625-96(Carpeta insertos)
- Lightmix Modular Influenza A Cat.Nº 53-0101-96 (Carpeta insertos)

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 7 de 23

- Lightmix Modular Influenza B Cat.Nº 58-0102-96 (Carpeta insertos)
- LightMix Kit Human MPV TIB Cat.Nº40-0184-16 (Carpeta insertos)
- LightMix RSV TIB (Virus Sincicial Respiratorio) Cat.Nº 40-0115-32 (Carpeta insertos)
- LightMix Adenovirus TIB Cat.Nº 40-0303-32 (Carpeta insertos)
- Lightmix kit B.pertussis/parapertussis TIB Cat.Nº 40-0575-32 (Carpeta insertos)
- LightMix kit Parainfluenza Virus 1,2,3 TIB Cat.Nº 40-0223-16 (Carpeta insertos)
- LightMix Kit *Clostridium difficile*. Cat Nº 40-0573-32. (Carpeta insertos)

6.6 Equipos para PCR:

- Centrífuga rango mínimo 0 a 1.500 rpm.
- Microcentrífuga 0 a 12000 rpm
- Gabinete de bioseguridad.
- Vortex
- Refrigerador
- Termociclador LightCycler® Z480

7 INSTRUCTIVOS:

7.1 TÉCNICA INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA (IFD)

7.1.1 MUESTRA: ASPIRADO NASOFARINGEO.

Toma de muestra ver en Anexo 1. Recomendaciones para toma de muestra virus respiratorios, I.S.P.

7.1.2. PREPARACIÓN DEL FROTIS

7.1.2.1.- Enumerar muestras y orden de exámen (numeración correlativa anual). Pegar las etiquetas en hojas de trabajo diarias, buscar en el computador, en Escritorio/FORMULARIOS Y PLANILLAS/Planilla Resultados PCR e IFI Virus Respiratorios.xlsx

7.1.2.2.- Si el aspirado nasofaríngeo viene tomado con tórula, agite vigorosamente en vórtex durante unos 15 segundos para separar las células adheridas a la tórula.

7.1.2.3.- En el gabinete de bioseguridad eliminar tórulas en contenedor de desechos biológicos, para ello se requiere de una pinza metálica, que está en el primer cajón del mueble a mano izquierda, con respecto al gabinete. Y homogenizar suavemente la muestra de aspirado nasofaríngeo en el medio de transporte con una pipeta de transferencia estéril hasta obtener una suspensión homogénea, retirando todo elemento macroscópico. Este procedimiento se repite hasta eliminar todo el moco, si es necesario agregar buffer fosfato.

NOTA: Es importante eliminar todo el moco porque puede producir fluorescencia inespecífica.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 8 de 23

7.1.2.4.- Centrifugar las muestras a 1.500 rpm por 10 minutos, en centrífuga de bacteriología, programa número 3.

7.1.2.5.- Eliminar sobrenadante del tubo primario en contenedor de desechos biológicos, ubicado dentro del gabinete de bioseguridad.

7.1.2.6.- Resuspender el pellet celular con pipetas de transferencia estériles y si es necesario agregar gotas de buffer fosfato pH 7.2, dependiendo de la densidad del mismo hasta obtener una solución, ligeramente turbia.

NOTA: La calidad de la preparación de la muestra en el portaobjeto es dependiente de la concentración de células en la suspensión; **demasiadas células:** pellet muy lechoso, puede desprenderse la muestra fijada al portaobjeto y dificulta la lectura, ante esta situación se debe preparar otro frotis; al contrario si hay **muy pocas células** (menor a 4 células por pocillo) reduce la sensibilidad del procedimiento pudiendo dar falsos negativos. Lo ideal es obtener una monocapa. (pellet ligeramente turbio).

7.1.2.7.- Enumerar dos portaobjetos por muestra, uno con 8 pocillos (blanco) y otro con 2 pocillos (rosado), con una pipeta de transferencia estéril realizar los frotis con el pellet resuspendido, colocando una gota que sea proporcional para cubrir todo el pocillo y si es necesario extenderla en cada una de las áreas delimitadas. Repita este paso con cada pocillo.

7.1.2.8.- Secar a temperatura ambiente en gabinete de bioseguridad.

7.1.2.9.- Una vez secos los portaobjetos colocarlos en el contenedor para la fijación, agregando acetona anhidra fría a 4 °C, hasta que cubra todos los pocillos por 5 minutos, siendo este punto crítico para el proceso posterior. Se recomienda sacar del refrigerador la acetona en el momento de usar.

7.1.2.10.- Secar los frotis a temperatura ambiente en gabinete de bioseguridad.

7.1.2.11.- Si las láminas ya fijadas no van a ser trabajadas en forma inmediata, guardarlas en el refrigerador a 4°C protegidas de la humedad. Se sugiere utilizar el contenedor de fijación vacío y tapado para guardarlas.

Si se desea guardar las láminas para controles del PEEC (Programa de Evaluación Externa de la Calidad), éstas se guardan envueltas en papel aluminio, en cajas identificadas en freezer a -20°C.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 9 de 23

7.1.3. TINCIÓN SCREENING

7.1.3.1.- Colocar en cámara húmeda las láminas ya fijadas. Se requiere tener la cámara pre calentada entre 35°C a 37°C. (ver Figura N°1)

En el portaobjetos de Screening (portaobjetos rosado, añada 10 µl del DFA Screening Reagent (tapa roja) en el pocillo Screening. Luego agregue 10 µl del Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent en el pocillo control normal.

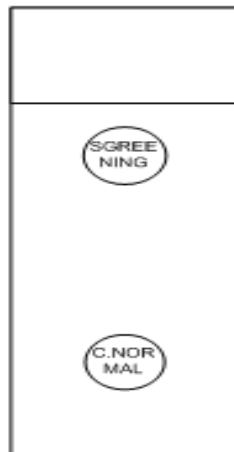


Figura N°1 Modo de carga pocillo Screening

7.1.3.2.- Incubar las láminas en cámara húmeda en estufa entre 35° a 37°C por 15 minutos.

7.1.3.3.- Lavar las láminas usando una piseta con buffer fosfato pH 7.2 para retirar el exceso de anticuerpos (nunca directamente en el pocillo) la posición del portaobjeto debe ser horizontal.

7.1.3.4.- Lavar las láminas en 2 receptáculos con buffer fosfato pH 7.2, en forma correlativa por 5 minutos cada uno.

7.1.3.5.- Secar los frotis a temperatura ambiente en gabinete de bioseguridad.

7.1.3.6.- Añada una gotita de Mounting fluid a cada pocillo y coloque los cubreobjetos de 24x50 mm al portaobjetos.

7.1.4 LECTURA DE LOS POCILLOS DE PORTAOBJETOS SCREENING

7.1.4.1.- Examine los frotis al microscopio de fluorescencia con aumento de entre 100x y 400x.

7.1.4.2.- Para determinar screening positivo, en el pocillo n°1 debe verse una fluorescencia de color verde manzana en las células. A su vez en el pocillo n°2 no debe presentar fluorescencia, pero si células de color rojo.

7.1.4.3.- Si el resultado es positivo, se debe proceder con la tinción para identificación, en el portaobjetos de ocho pocillos (blanco).

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 10 de 23

7.1.5 TINCIÓN IDENTIFICACIÓN

7.1.5.1.- Colocar en cámara húmeda las láminas ya fijadas. Se requiere tener la cámara pre calentada entre 35°C a 37°C.

7.1.5.2.- Añada 10 ul de cada DFA Reagent Viral a su respectivo pocillo en el portaobjeto con las muestras de 8 pocillos (blanco) (ver figura 2)

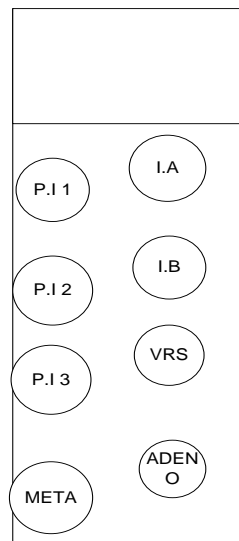


Figura N°2
Modo de carga pocillo Identificación.

7.1.5.3.- Incubar las láminas en cámara húmeda en estufa entre 35° a 37°C por 15 minutos.

7.1.5.4.- Lavar las láminas en 2 receptáculos con buffer fosfato pH 7.2, en forma correlativa por 5 minutos cada uno. Una vez terminado agitar con la mano suavemente el soporte de las láminas (3 veces).

7.1.5.5.- Secar los frotis a temperatura ambiente en gabinete de bioseguridad.

7.1.5.6.- Añada una gotita de Mounting fluid a cada pocillo y coloque los cubreobjetos de 24x50 mm al portaobjetos.

7.1.6. LECTURA DE LOS POCILLOS DE PORTAOBJETOS IDENTIFICACIÓN

7.1.6.1.- Examine los pocillos en el microscopio de fluorescencia con aumento de entre 100x y 400x.

7.1.6.2.- Para determinar identificación, leer cada uno de los pocillos hasta encontrar el pocillo que tenga células con una fluorescencia de color verde manzana. Puede haber más de un pocillo positivo.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 11 de 23

7.1.7 LECTURA Y CRITERIOS DE RESULTADOS EN INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

Antes de leer las muestras es necesario revisar los controles internos. Ver punto 7.1.9.1. La lectura se realiza en función de la fluorescencia: Verde manzana brillante.

Muestra positiva:

Se considera positiva aquella muestra que posee al menos 1 célula con tinción específica. Muestras positivas para Influenza A o B, se debe proceder de acuerdo al instructivo de vigilancia del I.S.P. Ver anexo 3

Muestra negativa:

Se considera negativa aquella muestra que posea un número mínimo 20 células epiteliales por campo y/o presenten características de color rojizo con ausencia de fluorescencia.

Registrar los resultados en las hojas de trabajo diario, buscar en el computador, en Escritorio/FORMULARIOS Y PLANILLAS/Planilla VIRUS RESPIRATORIOS RT-PCR 2015.xlsx. Luego traspasar de forma manual los resultados al sistema informático OMEGA y entregar informe final.

7.1.8 TINCIÓN CARACTERÍSTICA DE LOS VIRUS RESPIRATORIOS.

- Virus Respiratorio Sincicial.

La fluorescencia se observa en el citoplasma y asociada a los sincicios. El citoplasma se tiñe como granulación fina con pequeñas inclusiones.

- Adenovirus.

La fluorescencia es nuclear y citoplasmática. La tinción nuclear es de un brillo uniforme y en el citoplasma la tinción es punteada.

- Parainfluenza 1,2 y,3.

La fluorescencia es confinada en el citoplasma. La tinción es punteada con inclusiones irregulares.

- Influenza A y B.

Puede presentar una fluorescencia nuclear, citoplasmática o ambas. La tinción nuclear es de brillo uniforme. La tinción citoplasmática es punteada con grandes inclusiones.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 12 de 23

- Metapneumovirus.

La fluorescencia es citoplasmática y punteada con pequeñas inclusiones en los sincicios.

7.1.9 CONTROL DE CALIDAD

7.1.9.1 Control de calidad interno.

El objetivo del control interno es evaluar la reproducibilidad de la técnica comprobando el rendimiento de los antisueros. Se realiza a partir de láminas controles comerciales que consisten en láminas de vidrio previamente fijadas que contienen células de cultivos negativos (control negativo) y positivos específicas para cada virus. El control de calidad se debe realizar una vez al día, al inicio de la jornada.

Material control

Se usan dos láminas:

- **Respiratory Virus Antigen Control Slides (blanca):** con 8 pocillos, 7 positivos para la identificación de los virus y un control negativo.
- **hMPV Control Slides (rosado):** con 2 pocillos, uno positivo para Metapneumovirus y otro negativo.

Instrucctivo.

- 1** Sacar los controles del refrigerador, y dejar a temperatura ambiente.
- 2** Procesar en forma conjunta con las muestras a partir del paso 7.3.
- 3** Rotular con fecha a realizar.
- 4** Cargar cada pocillo de láminas con 10ul de DFA Screening Reagent (tapa roja), excepto los pocillos NEG, luego agregue 10 µl del Normal Mouse Gamma Globulin en los pocillos NEG.
- 5** Incubar las láminas en cámara húmeda en estufa entre 35° a 37°C por 15 minutos.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 13 de 23

7.1.9.2. Requisitos de calidad del control interno.

Ésta se basa en la intensidad de la tinción entregada por el Conjugado específico marcado con fluoresceína. Esto se define en:

Intensidad en cruces	Definición
++++	Fluorescencia verde- manzana brillante
+++	Fluorescencia verde-manzana
++	Fluorescencia apagada verdosa
+	Fluorescencia muy tenue verdosa

El control positivo debe mostrar una reacción **superior a ++** de intensidad.
El control negativo no debe presentar fluorescencia.

Si los controles positivos y negativos dan dentro de lo esperado, la técnica se considerará como válida. En caso contrario, la prueba debe repetirse incluyendo los controles.

7.1.10. REGISTROS

7.1.10.1 Se deben registrar diariamente los controles internos en una planilla que está en el computador, en Escritorio/FORMULARIOS Y PLANILLAS/ PLANILLA CONTROL CALIDAD.xlsx

7.1.10.2 En la planilla completar con los siguientes datos:

Lote de láminas de Respiratory Virus Antigen Control Slides y hMPV Control Slides.

Resultado en intensidad la fluorescencia obtenida en cada uno de los pocillos examinados.

Lote del kit en uso.

7.1.10.3 Archivar los registros en carpeta rotulada como CONTROL DE CALIDAD INTERNO Y EXTERNO.

7.1.11 CONTROL DE CALIDAD EXTERNO.

La sección Virus Respiratorios participa en el Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) implementado por el I.S.P. Esta evaluación se realiza una vez al año.

RESPONSABLE DE EVALUACIÓN: Instituto de Salud Pública

RESPONSABLE DEL ENVÍO DE LÁMINAS: Profesional encargado(a) de la sección virus respiratorios.

Los resultados y análisis de las evaluaciones del P.E.E.C. se archivan en carpeta rotulada como CONTROL DE CALIDAD INTERNO Y EXTERNO. **Anexo 4.**

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 14 de 23

7.2 TÉCNICA REACCIÓN REACCION POLIMERASA EN CADENA (PCR)

7.2.1 MUESTRA: ASPIRADO NASOFARINGEO.

Toma de muestra ver en **Anexo 1**. Recomendaciones para toma de muestra virus respiratorios, I.S.P.

Las muestras para diagnóstico de *Clostridium difficile* deben ser de deposición fresca en frasco de tapa rosca de 25 ml, la cantidad mínima es media lenteja de deposición.

7.2.2. PREPARACIÓN DE MEUSTRAS ASPIRADOS NASOFARÍNGEOS.

7.2.2.1.- Enumerar muestras y orden de exámen (numeración correlativa anual). Pegar las etiquetas en hojas de trabajo diarias, buscar en el computador, n Escritorio/FORMULARIOS Y PLANILLAS/Planilla Resultados PCR e IFI Virus Respiratorios.xlsx

7.2.2.2.- Si el aspirado nasofaríngeo viene tomado con tórula, agite vigorosamente en vórtex durante unos 15 segundos para separar las células adheridas a la tórula.

7.2.2.3.- En el gabinete de bioseguridad eliminar tórulas en contenedor de desechos biológicos, para ello se requiere de una pinza metálica, y homogenizar suavemente la muestra de aspirado nasofaríngeo en el medio de transporte con una pipeta de transferencia estéril hasta obtener una suspensión homogénea, retirando todo elemento macroscópico.

7.2.2.4.- Centrifugar las muestras a 1.500 rpm por 10 minutos.

7.2.2.5.- Eliminar sobrenadante del tubo primario en contenedor de desechos biológico ubicado dentro del gabinete de bioseguridad.

7.2.3. PREPARACIÓN DEPOSICIÓN FRESCA.

7.2.3.1 Tomar media lenteja de deposición 1 ml de reactivo RNA/DNA stabilization Reagent for Blood /Bone marrow en un tubo de 1.5ml.

7.2.3.2 Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

7.2.3.3 Centrifugar 1 minuto a 6000 rpm. Tomar 200 ul del sobrenadante para extracción.

7.2.4 EXTRACCIÓN

7.2.4.1.- Tomar 200 ul en un tubo de 1.5 ml y realizar la extracción según protocolo de High Pure PCR Template Preparation Kit para búsqueda de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Clostridium difficile*, o High pure ViraL Nucleic Acid Kit para Virus respiratorios.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 15 de 23

7.2.4 AMPLIFICACIÓN

7.2.4.1 La amplificación de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* se debe proceder según el protocolo **DIAGNÓSTICO POR PCR BORDETELLA PERTUSSIS Y BORDETELLA PARAPERTUSSIS** ubicado en carpeta HOJAS DE TRABAJO/BORDETELLA PERTUSSIS PARA.docx del escritorio PC virus respiratorio.

La amplificación de *Clostridium difficile* se debe proceder según el protocolo **DIAGNÓSTICO POR PCR CLOSTRIDIUM DIFFICILE** en carpeta HOJAS DE TRABAJO/CLOSTRIDIUM DIFFICILE.docx del escritorio PC virus respiratorio

7.2.4.2 La amplificación de virus respiratorio proceder según se detalla a continuación:

Virus	Nombre archivo
Adenovirus	DIAGNÓSTICO POR PCR ADENOVIRUS
Influenza A Influenza B	DIAGNÓSTICO POR PCR INFLUENZA A/B
Metapneumovirus	DIAGNÓSTICO POR PCR METAPNEUMOVIRUS (MPV)
Parainfluenza 1,2 y 3	DIAGNÓSTICO POR PCR PARAINFLUENZA 1,2 y 3
Virus Sincicial	DIAGNÓSTICO POR PCR VIRUS SINCICIAL (VRS)

Cada archivo se encuentra ubicado en carpeta HOJAS DE TRABAJO del escritorio PC virus respiratorio.

7.2.5 RESULTADOS

Los resultados se deben ingresar de manera manual al sistema informático del laboratorio para su validación y posterior impresión.

7.2.6 CONTROL DE CALIDAD

Cada reacción de amplificación por PCR incluye un control interno, un control positivo y control negativo.

Control interno (CI): Consiste en un ADN comercial que compite con el DNA de la muestra problema, su realización permite revisar la calidad de los reactivos utilizados en la reacción de PCR.

Control positivo (C+): Consiste en un plásmido que contiene el ADN del virus analizado.

Control negativo(C-): En la reacción de PCR se debe reemplazar el ADN por agua grado PCR

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 16 de 23

7.2.7 REQUISITOS DE CALIDAD DEL CONTROL INTERNO.

Como requisito de calidad en cada análisis de los resultados de PCR, se deben evaluar las siguientes curvas:

Control interno: En caso de muestras de pacientes que no amplifican, se debe evaluar la amplificación del control interno de ese pocillo, para así descartar que la muestra problema no exista una inhibición o contaminación.

Control positivo: Esta curva siempre debe amplificar en la reacción PCR.

Control Negativo: Esta curva NO debe presentar amplificación en la reacción por PCR.

7.2.8 CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

Actualmente no existe un programa de evaluación externa para virus respiratorios ni para *Bordetella pertussis* ni *B. parapertussis* por técnica de PCR.

8 TIEMPO DE RESPUESTA:

Los resultados de IFD se entregarán dentro de la jornada normal siempre que las muestras lleguen antes de las 15:00 hrs. en caso contrario el resultado quedará pendiente para el próximo día. El intervalo de horas depende de la cantidad de muestras en proceso.

Los fines de semana y festivos sólo las muestras recepcionadas hasta las 10:00 hrs. se entregarán los resultados dentro de la jornada que corresponde al profesional de turno. Las muestras que lleguen después de las 10:00 hrs quedarán guardadas en el refrigerador hasta el día siguiente.

En caso de muestras provenientes de atención abierta, los resultados se enviarán por fax o correo electrónico, a través de la secretaria de la sección.

El tiempo de respuesta es de 1 día.

En el caso de muestras de virus respiratorios por PCR, las muestras recepcionadas antes de las 10:00 am comenzarán a trabajarse el mismo día para obtener resultados completos al día siguiente. Si llegan después de las 10:00am quedan guardadas para el día siguiente.

Las muestras de *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* y *Clostridium difficile* por PCR que lleguen antes de las 12:00 am, se entregarán los resultados durante el día. Si llegan después de las 12:00am quedarán guardadas para el día siguiente.

Los fines de semana no se realizarán PCR.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 17 de 23

9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Manual de Técnicas Virus Respiratorios. I.S.P. Chile, 2006.
- Informe consolidado Vigilancia Virus Respiratorios SE N°32/2015. I.S.P. Chile, 2015.
- 5. Microscopía de Fluorescencia y Epifluorescencia. Obtenido el 21 de agosto 2015, dirección web: <http://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2011/especifica/microscopia-optica/microscopia-optica-y-laser-confocal-2a-ed/tema-5.pdf>. Universidad de Alicante, España. 2011
- INMUNOFLUORESCENCIA. Obtenido el 21 de agosto 2015, dirección web: http://exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/Laboratorio_TPN8.pdf. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, 2009.
- Documentos técnicos para el laboratorio clínico: recomendaciones para la toma de muestras respiratorias para la técnica de inmunofluorescencia para detección de virus respiratorios. I.S.P. Chile, 2013.
- Recomendaciones para laboratorios que realizan la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Áreas y flujos de trabajo. Documento técnico para el laboratorio clínico. I.S.P. 14 de enero 2013.

 <p>HOSPITAL REGIONAL RANCAGUA</p>	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 18 de 23

Anexo 1.

Recomendaciones para toma de muestras respiratorias para la técnica de Inmunofluorescencia para detección de virus respiratorios, I.S.P.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 19 de 23

Anexo 2.

Preparación de Medio de Montaje Virus Respiratorios

Medio de montaje:

9 Partes de Glicerina Estéril.....90 mL
 1 Parte Tampón pH 9.5..... 10 mL

TAMPÓN pH 9.5:

Solución Carbonato de Na 0.5 M:

Na₂CO₃ Anhidro5.3 grs
 H₂O dd.c.s.p.100 mL

Solución Bicarbonato de Na 0.5 M:

NaHCO₃4.2 grs
 H₂O dd.c.s.p.100 mL

Para preparar la solución Tampón pH 9.5:

Carbonato de Na 0.5 M.....10 mL
 Bicarbonato de Na 0.5 M.....13 mL
 Ajustar Ph en Phímetro

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 20 de 23

Anexo 3.

Instructivo vigilancia de virus respiratorios año 2015.

Usar en caso de pesquisa de Influenza A y B por Inmunofluorescencia Directa (IFD) y/o RT-PCR, para su tipificación por PCR.

Se debe enviar junto con el formulario Vigilancia Virus Respiratorios (completado en secretaría), debe especificar examen solicitado (marcar Influenza A y/o B, según sea el caso) y colocar vigilancia Influenza.

En caso de sospecha de I.R.A. GRAVE, el médico tratante debe completar el formulario Notificación de I.R.A. GRAVE.

Se pueden enviar al ISP máximo 5 muestras por semana.

La derivación de la muestra se realiza de la siguiente manera:

El pellet con la muestra del IFD y/o PCR positivo debe ser rotulada con nombre del paciente para su envío al I.S.P.

Conservar el pellet refrigerado si la muestra será enviada antes de las 72 horas. Si el envío se realizará después, la muestra se debe congelar a -20° C.

Enviar a I.S.P. según procedimiento de traslado de muestras contagiosas, adjuntar formulario y formulario de derivación de muestras.

Ante cualquier duda comunicarse con B.Q. Rodrigo Fasce encargado de Sección Virus Respiratorio en I.S.P. (Fono: 255453 Red Minsal)

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 21 de 23

Anexo 4.

Registro desempeño en evaluaciones PEEC.

NUMERO EVALUACION	
MES / AÑO	
FECHA RECEPCION DE MUESTRAS	
FECHA ENVIO DE RESULTADOS	

DESEMPEÑO (SATISFACTORIO, INSATISFACTORIO O CUESTIONABLE)

<i>ANALITO</i>	<i>SATISFACTORIO</i>	<i>CUESTIONABLE</i>	<i>INSATISFACTORIO</i>

MEDIDAS DE MEJORAMIENTO ADOPTADAS EN CASO DE RESULTADOS INSATISFACTORIO O CUESTIONABLE EN DOS EVALUACIONES CONSECUTIVAS

PROFESIONAL RESPONSABLE :	FECHA :

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 22 de 23

Anexo 5.

EXTRACCIÓN DNA POR HIGH PURE PCR TEMPLATE PREPARATION KIT

1. En un tubo 1.5ml agregar 200uL de aspirado nasofaríngeo.
2. Agregar 200uL de **"BINDING BUFFER"** más 40 uL Proteinasa K, inmediatamente mezclar (vortex) e incubar durante 10 minutos a 70°C.
3. Agregar 100 uL de Isopropanol y mezclar bien (vortex). Depositar la mezcla en un tubo **"HIGH PURE FILTER"** dentro de un **"COLLECTION TUBE"** y centrifugar 1 minuto por 6000 RPM.
4. Eliminar el **"COLLECTION TUBE"** y su contenido. Y reponer con un nuevo **"COLLECTION TUBE"**
5. Agregar 500 uL **"INHIBITOR REMOVAL BUFFER"**
6. Centrifugar durante 1 minuto a 6000 RPM
7. Eliminar el **"COLLECTION TUBE"** y su contenido. Y reponer con un nuevo **"COLLECTION TUBE"**
8. Agregar 500uL **"WASH BUFFER"**
9. Centrifugar durante 1 minuto a 6000 RPM
10. Eliminar el **"COLLECTION TUBE"** y su contenido. Y reponer con un nuevo **"COLLECTION TUBE"**
11. Agregar 500uL **"WASH BUFFER"**
12. Centrifugar durante 1 minuto a 6000 RPM
13. Descartar **SOLO** el contenido del **"COLLECTION TUBE"**
14. Centrifugar durante 10 segundo a 10000 RPM
15. Eliminar el **"COLLECTION TUBE"** y su contenido. Y reponer con un tubo nuevo de 1.5 ml.
16. Agregar 50 uL de **"ELUTION BUFFER"**.
17. Centrifugar durante 1 minuto a 6000RPM
18. Rotular tubo de 1,5 ml que contiene el DNA y guardar a 4°C si se va a procesar inmediatamente,) o por un periodo prolongado a -20°C hasta su uso.

	Procedimientos Sección Virus Respiratorios	Código: SGC-PR-VR
		Fecha: 01-09-2015
		Versión: 0
		Vigencia: 01-09-2020
		Página 23 de 23

Anexo 6.

EXTRACCIÓN DNA VIRAL POR HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT

1. En un tubo 1.5ml agregar 200uL de aspirado nasofaríngeo.
2. Agregar 200uL de **"BINDING BUFFER"** suplementado con **poly (A)* (Solución de trabajo)** más 50 uL Proteinasa K, inmediatamente mezclar (vortex) e incubar durante 10 minutos a 72°C.
3. Luego agregar 100 uL **"BINDING BUFFER"** mezclar y depositar la solución en un tubo **"HIGH PURE FILTER"** dentro de un **"COLLECTION TUBE"** y centrifugar 1 minuto por 6000 RPM.
4. Eliminar el **"COLLECTION TUBE"** y su contenido. Y reponer con un nuevo **"COLLECTION TUBE"**
5. Agregar 500 uL **"INHIBITOR REMOVAL BUFFER"**
6. Centrifugar durante 1 minuto a 6000 RPM
7. Eliminar el **"COLLECTION TUBE"** y su contenido .Reponer con un nuevo **"COLLECTION TUBE"**
8. Agregar 450uL **"WASH BUFFER"**
9. Centrifugar durante 1 minuto a 6000 RPM
10. Eliminar el **"COLLECTION TUBE"** y su contenido. Reponer con un nuevo **"COLLECTION TUBE"**
11. Agregar 450uL **"WASH BUFFER"**
12. Centrifugar durante 1 minuto a 6000 RPM
13. Descartar **SOLO** el contenido del **"COLLECTION TUBE"**
14. Centrifugar durante 10 segundo a 10000 RPM
15. Eliminar el **"COLLECTION TUBE"** y su contenido. Y reponer con un tubo nuevo de 1.5 ml.
16. Agregar 200 uL de **"ELUTION BUFFER"**.
17. Centrifugar durante 1 minuto a 6000 RPM
18. Rotular tubo de 1,5 ml que contiene el eluado de DNA y guardar a 4°C si se va a utilizar durante el día. Sí es en un período superior guardar a -20°C hasta su uso.

***Cálculo preparación de solución de trabajo:**

Nº muestra	Binding buffer	Poly A	Volumen Final
1	196 ul	4 ul	200ul
2	392 ul	8 ul	400ul
n	196 ul x n	4*n	X ul