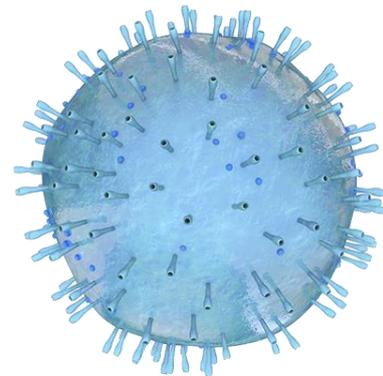
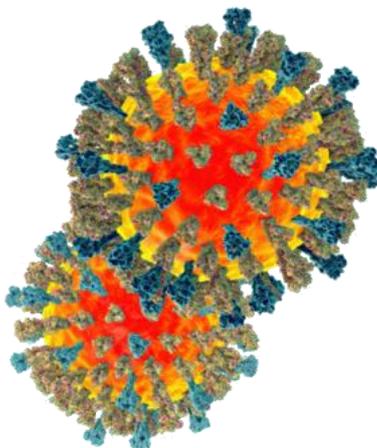
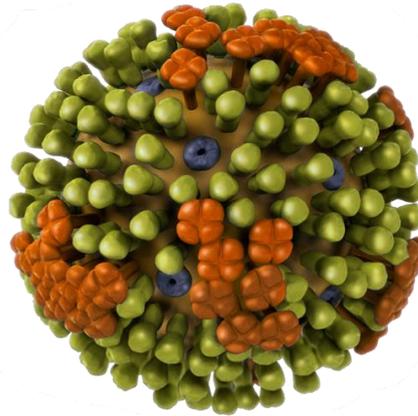


GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN
CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS**Guía de Procedimiento de determinación
cualitativa de Virus Respiratorios****Servicio de Patología Clínica
Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento**

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Equipo Técnico del área de Inmunología Especializada del Servicio de Patología Clínica	<ul style="list-style-type: none">• Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento• Unidad de Gestión de la Calidad	Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director (e) del Instituto Nacional de Salud del - Niño San Borja

Marzo 2019	GP-034/INSN-SB/USDXT-PC/V.01	Página 1 de 12
------------	------------------------------	----------------



GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS

Guía de Procedimiento de determinación cualitativa de Virus Respiratorios

- I. Título..... 3
- II. Finalidad 3
- III. Objetivo 3
- IV. Ámbito de aplicación 3
- V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT..... 3
- VI. Consideraciones Generales 3
 - a. Definiciones Operativas 3
 - 1. Definición del Procedimiento..... 3
 - b. Conceptos Básicos 4
 - c. Requerimientos Básicos 4
- VII. Consideraciones Específicas 6
 - a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento..... 6
 - b. Indicaciones..... 10
 - 1. Indicaciones Absolutas 10
 - c. Riesgos o complicaciones frecuentes..... 10
 - d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes..... 10
 - e. Contraindicaciones..... 10
- VIII. Recomendaciones 11
- IX. Autores, fecha y lugar..... 11
- X. Anexos 12
- XI. Bibliografía..... 12



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN
CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS

Guía de Procedimiento de determinación cualitativa de Virus Respiratorios

I. Título

Determinación Cualitativa de virus respiratorios por inmunofluorescencia directa.

II. Finalidad

El manual de Procedimientos operativos estandarizados (POE) tiene por finalidad describir el procedimiento técnico en detalle para la determinación cualitativa de virus respiratorios, lo cual permitirá al personal de laboratorio cumplir con un procedimiento de trabajo estandarizado y requerido en la Norma NTP-ISO 15189:2014.

III. Objetivo

Estandarizar los procedimientos pre-analíticos, analíticos y pos-analíticos de laboratorio para la detección cualitativa de virus respiratorios en muestras biológicas, para el diagnóstico de infección viral del tracto respiratorio inferior.

IV. Ámbito de aplicación

El presente manual se aplica en el Área de Inmunología especializada del Servicio de Patología Clínica, Unidad de Soporte al Diagnóstico y tratamiento del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN-SB).

V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT

Determinación cualitativa de virus respiratorios por inmunofluorescencia (CPT 87300)

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

La prueba para la detección de antígenos virales respiratorios se basa en la técnica de inmunofluorescencia directa. Se usa anticuerpos monoclonales murinos antígeno-específicos directamente marcados con fluoresceína para la detección e identificación rápida de los virus respiratorios, el kit incluye 1 reactivo screening que contiene una mezcla de anticuerpos dirigidos contra 8 virus (adenovirus, influenza A, influenza B, parainfluenza tipos 1,2 y 3, virus respiratorio sincitial y metapneumovirus), y 8 reactivos diferentes cada uno compuesto de mezclas de anticuerpos dirigidas contra un solo virus respiratorio.

Las células derivadas de una muestra clínica son sometidas al reactivo de screening para determinar la presencia de antígenos virales, tras una incubación de 37°C, lavado y montaje las células se observan bajo el microscopio de fluorescencia, si la muestra contiene células fluorescentes el virus particular es identificado con los reactivos separados en nuevos preparados celulares separados.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN
CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS**b. Conceptos Básicos**

- ✓ **Antígeno:** Cualquier sustancia que hace que el cuerpo produzca una respuesta inmunitaria contra ella. Los antígenos incluyen toxinas, sustancias químicas, bacterias, virus u otras sustancias de fuera del cuerpo. Los tejidos y las células corporales, incluso las células cancerosas, también contienen antígenos que pueden producir una respuesta inmunitaria. Estos antígenos también se pueden usar como marcadores en pruebas de laboratorio.
- ✓ **Anticuerpo:** Proteína elaborada por las células en respuesta a un antígeno, cada anticuerpo se puede unir a un solo antígeno específico. El propósito de esta unión es ayudar a destruir el antígeno. Algunos anticuerpos destruyen los antígenos directamente. Otros facilitan la tarea de los glóbulos blancos para destruir el antígeno. Un anticuerpo es un tipo de inmunoglobulina.
- ✓ **Inmunofluorescencia (IF):** técnica que consiste en conjugar colorantes fluorescentes con anticuerpos, exponiendo después este conjugado a los anticuerpos o antígenos correspondientes en cortes de tejidos, frotis de microorganismo o células. Cuando la fluoresceína se conjuga directamente con el anticuerpo primario la técnica es directa y cuando la fluoresceína se conjuga con un anticuerpo secundario la técnica es indirecta.

c. Requerimientos Básicos

- **Equipos Biomédicos**
 - Centrifuga para tubos cónicos
 - Agitador vortex
 - Refrigerador-congelador de laboratorio
 - Cabina de bioseguridad
 - Incubadora de 37°C
 - Microscopio de fluorescencia
- **Material Médico no Fungible**
 - Micropipeta variable, 1 canal, 10-100 ul
 - Micropipeta variable, 1 canal, 1-50 ul
 - Soporte en carrusel para micropipetas
 - Gradilla de tubos
 - Gafas de protección transparente
 - Probeta graduada de vidrio de 500 ml
 - Timer digital de 1 alarma
 - Piceta de 200 ml (2)
 - Caja coplin de vidrio
 - Frasco de vidrio autoclavable de 1000 ml
 - Cámara húmeda

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN
CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS➤ **Material Médico Fungible**• **Reactivos**

- Kit de screening e identificación de virus respiratorios D³ Ultra 8 DFA, contiene:
 1. Reactivo screening (mezcla de anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína dirigidos contra los antígenos respiratorios virales de virus influenza A, influenza B, virus respiratorio sincicial (VRS), adenovirus, parainfluenza tipo 1,2 y 3, metapneumovirus (hPVM), la solución contiene azul de Evans).
 2. Reactivo de gammaglobulina (mezcla de gammaglobulina murina, la solución contiene azul de Evans).
 3. Reactivo de Adenovirus.
 4. Reactivo de Influenza A.
 5. Reactivo de Influenza B.
 6. Reactivo de Parainfluenza 1.
 7. Reactivo de Parainfluenza 2.
 8. Reactivo de Parainfluenza 3.
 9. Reactivo de VRS.
 10. Reactivo de hMPV.
 11. Solución de montaje.
 12. Solución concentrada de lavado 40X.
 13. Portaobjetos de control de los antígenos de virus respiratorio.
 14. Portaobjetos de control de los antígenos de hMPV.

• **Materiales**

- Medio de transporte viral
- Hisopo aplicador estéril con punta de poliéster de 6"
- Guantes de nitrilo
- Mascarilla medica desechable
- Mascarilla N95
- Gorro desechable
- Papel absorbente
- Campo de trabajo
- Cubreobjetos 22x 60 mm
- Portaobjetos multipocillos de vidrio
- PBS en tabletas, estéril

• **Soluciones**

- Alcohol medicinal 70°.
- Acetona de grado reactivo
- Agua desionizada

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN
CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS

- **Responsables:**
 - Médico Patólogo Clínico.
 - Tecnólogo Médico con especialidad en Laboratorio Clínico
 - Técnico de laboratorio.

VII. Consideraciones Específicas**a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento**

Tiempo: 180 minutos

a.1. Indicaciones pre-analíticas

1. La orden médica deberá ser entregada a la recepción del servicio de Patología Clínica, con los datos completos del paciente, sello y firma del médico, sello del SIS (si corresponde) y adjuntando la ficha clínica epidemiológica del paciente. (ver anexo 1).
2. La muestra deberá obtenerse durante los primeros días del cuadro respiratorio, entre 1-4 días

a.2. Materiales de toma de muestra

1. Medio de transporte viral
2. Hisopo con punta de poliéster de 6".
3. Guantes, mascarilla y las gafas de protección.

a.3. Procedimiento de toma de muestra

1. Tipos de muestras:
 - Hisopados: nasofaríngeos
 - Lavados: nasofaríngeos y broncoalveolares
 - Aspirados: nasofaríngeos y endotraqueales
2. Obtención de la muestra por hisopado nasofaríngeo
 - Inclinar la cabeza del paciente hacia atrás con el cuello extendido e insertar cuidadosamente el hisopo en la fosa nasal en posición recta hasta que llegue a la parte posterior de la nasofaringe, realizar un movimiento rotatorio y luego retirarlo cuidadosamente.
 - Colocar el hisopo en el medio de transporte MR4T rompiendo el mango a la altura de la parte superior del tubo del medio de transporte, cerrar el tubo.
3. Otras muestras clínicas respiratorias
Las muestras de aspirado/lavado nasofaríngeo y lavado broncoalveolar serán realizadas por el personal médico. Las muestra obtenida se deberá diluir en volúmenes iguales del medio de transporte.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN
CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS**a.4. Transporte y almacenamiento de las muestras**

1. Las muestras serán llevadas inmediatamente a la recepción del Servicio de Patología Clínica, transportadas entre 2-8°C mediante el uso de un contenedor incluyendo hielo húmedo u otro refrigerante.
2. Las muestras deben conservarse entre 2-8°C durante no más de 2 días antes de realizar las pruebas. Si se requiere más tiempo de almacenamiento, las muestras deben congelarse a -70°C o menos.

a.5. Preparación y almacenamiento de los componentes del kit:

1. Los componentes del kit deben ser conservados a 2-8°C en oscuridad y serán llevados a temperatura ambiente (18-25°C) durante al menos 30 min. antes de usarlos. Los reactivos serán estables hasta la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta.
2. La preparación de la solución de lavado de trabajo se realizara diluyendo los 25 ml de la solución de lavado concentrada (40X) en agua desionizada c.s.p 1000 ml; y almacenar a 20-25°C.

a.6. Preparación y almacenamiento de las soluciones

1. Solución PBS para preparación de la muestra.
2. En un recipiente limpio añadir 1000 ml de agua desionizada y colocar 1 tableta de PBS (Buffer fosfato salino); una vez disuelto realizar la medición del pH (7.3+/- 0.2) en el potenciómetro digital. Almacenar entre 20-25°C.
3. La acetona grado reactivo (>99% pura): deberá mantenerse refrigerada entre 2-8°C, firmemente sellado para evitar la absorción higroscópica de agua que pueda producir una fluorescencia de fondo brumosa.

a.7. Control de calidad

1. A las láminas controles de antígenos virales respiratorios y láminas controles de antígeno hPVM se les realizaran el procedimiento de tinción igual que a las muestras clínicas, para asegurar el correcto rendimiento de la prueba.
2. Los pocillos positivos mostraran múltiples células infectadas de fluorescencia verde manzana brillante mientras que los pocillos negativos mostraran únicamente células negativas teñidas de rojo debido a la contra-tinción de Azul de Evans.

a.8. Procesamiento de la muestra**Preparación de la Muestra:**

1. El procesamiento se realizará en la cabina de bioseguridad, siguiendo las medidas establecidas de bioseguridad.
2. El hisopo con la muestra deberá exprimirse varias veces contra las paredes del tubo del medio de transporte, eliminar el hisopo en un contenedor y tapar el tubo.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN
CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS

3. Agitar en el vortex el tubo del medio de transporte con la durante unos 10 seg.
4. Centrifugar a 600g x 10 min.
5. Eliminar el sobrenadante y añadir 5ml de Solución de PBS y agitar en vortex 10 seg.
6. Centrifugar 600g x 10 min.
7. Eliminar el sobrenadante y añadir de 0-5 1.0 ml de Solución de PBS.
8. Homogeneizar en vortex 5 seg. para suspender el pellet celular, formando una suspensión ligeramente turbia.

Prueba directa de la Muestra:

1. Colocar 25 ul de la suspensión celular de la muestra preparada
2. en 2 pocillos del portaobjetos multipocillos, repetir este paso para cada muestra.
3. (Si luego de terminar el procedimiento total y observar al microscopio el resultado es positivo, se realiza lo siguiente: colocar esta vez 25 ul de la suspensión celular de la muestra preparada en 8 pocillos del portaobjetos multipocillos, usar un portaobjetos por muestra).
4. Dejar secar completamente los pocillos al aire.
5. En un coplin colocar acetona grado reactivo e introducir los portaobjetos para la fijación de las células, durante 10 min. entre 2-8°C.
6. Retirar los portaobjetos y dejarlos secar al aire.
7. Añadir 1 gota del reactivo Screening DFA a uno de los pocillos de la muestra y 1 gota del reactivo gammaglobulina DFA al otro pocillo; repetir este paso para cada muestra. (Solo para el portaobjetos de 8 pocillos descrito arriba se realiza lo siguiente: añadir 1 gota de cada reactivo DFA de virus individual a su correspondiente pocillo).
8. Colocar los portaobjetos en una cámara cubierta y humidificada entre 35-37°C durante 30 min.
9. Inclinar los portaobjetos y eliminar cuidadosamente los reactivos lavándolos con la solución de lavado de trabajo, usando una piceta.
10. En un recipiente añadir solución de lavado de trabajo y colocar los portaobjetos (verificar que estén hundidos en la solución), colocar en rotador de placas durante 10 min.
11. Inclinar y enjuagar cuidadosamente los portaobjetos con agua desionizada, usando una piceta.
12. Absorber suavemente el exceso de agua desionizada.
13. Añadir una gota de solución de montaje a cada pocillo y cubrir con el cubreobjetos.
14. Examinar las células teñidas y montadas usando el microscopio de fluorescencia.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN
CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS

15. Si el resultado es positivo (presencia de fluorescencia en el interior de las células) para virus respiratorio, el procedimiento de tinción se repite para la identificación individual viral.

a.9. Evaluación de la calidad de la muestra en el portaobjetos**Revisión de células en el portaobjetos:**

- Haciendo uso del microscopio de fluorescencia, evaluar cada pocillo en diferentes campos usando un aumento de 200X.

Muestra adecuada (satisfactoria):

- Detectar la presencia de células epiteliales columnares (células más altas que anchas).
- Debe tener al menos 2 células epiteliales columnares por campo.
- Se visualiza al menos de 20 células epiteliales columnares presentes en todo el pocillo.
- De no cumplir con lo mencionado la muestra se considera inadecuada, y la prueba no valida; debiéndose obtener y realizar la prueba con una nueva muestra.

a.10. Interpretación de resultados**1. Resultado Negativo**

Realizar la lectura con un aumento de 400X, un resultado negativo se indica por la ausencia de fluorescencia (células teñidas de color rojo) en el pocillo con un mínimo de 20 células epiteliales columnares.

2. Resultado Positivo

Realizar la lectura con un aumento de 400X, un resultado positivo es aquella en la que se observa una fluorescencia verde manzana brillante en las células epiteliales del portaobjetos de screening o el de identificación individual.

Patrón de tinción fluorescencia viral:

- Adenovirus: fluorescencia nuclear (uniformemente brillante), citoplasmática (punteada) o ambas.
- Influenza A y B: fluorescencia nuclear (uniforme y brillante), citoplasmática (punteada con grandes inclusiones) o ambas.
- Parainfluenza 1, 2 y 3: fluorescencia citoplasmática (punteada y con inclusiones irregulares).
- VRS: fluorescencia citoplasmática (punteada y con pequeñas inclusiones).
- hMPV: fluorescencia citoplasmática (punteada y con pequeñas inclusiones).

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN
CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS**a.11. Informe de resultados**

1. Los resultados son ingresados al sistema de registros de pacientes del área de Inmunología, por el Tecnólogo Médico de turno y posteriormente impresos.
2. El Médico Patólogo valida los resultados y los ingresa al sistema hospitalario Galenos (solo los resultados de los pacientes del INSN-SB)
3. Los resultados impresos y validados son entregados al personal técnico del Servicio de Patología para su informe según corresponda la procedencia de la solicitud médica:
 - a. A la oficina de Archivos: los resultados de las solicitudes procedentes de consultorios del INSN-SB.
 - b. Al servicio de hospitalización: los resultados de las solicitudes procedentes de hospitalización.
 - c. Al archivo del Servicio de Patología: los resultados de las solicitudes externas al INSN-SB.

b. Indicaciones**1. Indicaciones Absolutas**

La prueba está indicada para:

- Todo paciente menor de 2 años internado por IRA en sala común, unidades de cuidados intermedios o intensivos.
- Todo paciente de cualquier edad internado por IRAG en sala de cuidados intensivos.
- Vigilancia epidemiológica.

c. Riesgos o complicaciones frecuentes

Ninguno

d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes

Ninguno

e. Contraindicaciones

Ninguna.



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS

VIII. Recomendaciones

1. Para las muestras de hisopado nasofaríngeos, se recomienda no hacer gárgaras ni limpieza con ninguna solución bucofaríngea.
2. No se recomienda los hisopados nasales y de garganta ya que no contienen un número suficiente de células epiteliales columnares que permitan la detección directa de los virus respiratorios.
3. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección viral, los resultados de la prueba deben interpretarse conjuntamente con la información de los estudios epidemiológicos, evaluación clínica del paciente.

IX. Autores, fecha y lugar

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja
Laboratorio de Inmunología Especializada-Servicio de Patología Clínica.
Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Fecha de Elaboración: Marzo 2019
Vigencia: 02 años

Autores:

- | | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| 1. Dr. Emilio Aguilar Huauya | eaguilar@insnsb.gob.pe |
| 2. Lic. T.M. Yaquelina Chirinos Saire | ychirinos@insnsb.gob.pe |
| 3. Lic. T.M. Robert Reyna García | rreyna@insnsb.gob.pe |

Marzo 2019	GP-034/INSN-SB/USDXT-PC/V.01	Página 11 de 12
------------	------------------------------	-----------------



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIOS

X. Anexos

insn INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO SAN BORJA (INSNSB)
AV. AGUSTIN DE LA ROSA TORO 1399 URB. JACARANDA II SAN BORJA
TELEFONO : 51-1-2300600

PATOLOGIA CLINICA (306166)

ORDEN MEDICA 469751

N° H.C. : ██████████ Cuenta : 619266
 Paciente : ██████████ Fecha Solicitud : 22/09/2018 01:59:00p.m Tipo Ate: Consultorios Ext
 Edad : 4 años 1 meses 1 días Sexo : MASCULINO Procedencia : CONSULTA HEMATOLOGIA 1
 Tipo Plan : SIS N° filac.(180 R 00602069) N° FUA : 20662717 N° Cama :
 Resumen H : Paciente varon de 4 años con DX LMA en abandono de tratamiento, cursa con tos productiva y fiebre pesar de tratamiento antibiotico A d/c PROCESO VIRAL Prof de la Salud : ARAUJO CHAVEZ ROXANA LIZET
 CMP : 56841
 N° Movimiento : 306166

Diagnóstico : C92.0 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

CodCPT	Cod SIS	Procedimiento	Fecha Programada	Tipó Prov.	Cant.
87300		DETERMINACION CUALITATIVA DE VIRUS RESPIRATORIO POR INMUNOFLUORESCENCIA - IFI VIRAL Diag: C92.0 -LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Just: Paciente varon de 4 años con DX LMA en abandono de tratamiento, cursa con tos productiva y fiebre pe	24/09/2018 08:00:00 a.m.	INSTITUCIONAL	1

DEBE LLEGAR UNA HORA ANTES DE SU HORA PROGRAMADA

 ARAUJO CHAVEZ ROXANA LIZET
 SELLO Y FIRMA DEL PRESCRIPTOR

YCHIRINOS INSNSB-05754 29/09/2018 05:19:45p.m. Page 1 of 1

XI. Bibliografía

1. Bayona Y, Niederbacher J. Infecciones respiratorias virales en pediatría: generalidades sobre fisiopatogenia, diagnóstico y algunos desenlaces. MED. UIS. 2015;28(1):133-141
2. Escudero A, Gómez J. Guía técnica de vigilancia de influenza y otros virus respiratorios, Lima 2007. Ministerio de Salud; Dirección General de Epidemiología.
3. Diagnostic hybrids. Manual DFA Screening e identificación de virus respiratorios. Ref I-01-110000.