

GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

DIRECCIÓN REDES EN SALUD PÚBLICA

SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE
REFERENCIA

GRUPO DE VIROLOGÍA

2017

1 de 37



GOBIERNO DE COLOMBIA



Dirección

Martha Lucia Ospina Martínez
Directora General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

María Alexandra Durán Romero
Director Técnico (E)
Redes en Salud Pública

Esther Cristina Barros Liñán
Subdirectora (E)
Laboratorio Nacional de Referencia

Dioselina Peláez
Coordinador Grupo de Virología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Omayda Cárdenas Bustamante
Equipo Técnico
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección de Redes en Salud Pública

Elaborado por

Juliana Barbosa Ramirez
Erika Ospitia Báez
Grupo de Virología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

TABLA DE CONTENIDO

1. GENERALIDADES	8
1.1 VIRUS RESPIRATORIOS	9
1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	9
1.2 Modo de transmisión	10
1.2.1 <i>Virus Influenza (FLU)</i>	10
1.2.2 <i>Adenovirus (AdV)</i>	12
1.2.3 <i>Virus Sincitial Respiratorio (VSR)</i>	13
1.2.4 <i>Parainfluenza (PIV)</i>	14
1.2.5 <i>Metapneumovirus humano (hMPV)</i>	14
1.2.6 <i>Bocavirus humano (BoV)</i>	15
1.2.7 <i>Rinovirus y Enterovirus (RV y EV)</i>	15
2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO.....	17
2.1 Bioseguridad:.....	17
2.2 Toma de muestras	17
2.2.1 Hisopados:	17
2.2.2 Aspirado Nasofaríngeo:.....	19
2.2.3 Lavados: Nasal o Bronco alveolar.....	20
2.2.4. Biopsia del tracto respiratorio	21
2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte	21
2.4 Documentación requerida	23
Las muestras deben ser enviadas con la respectiva ficha de notificación de acuerdo al protocolo nacional de IRA y con una carta de solicitud de examen y con la siguiente información:.....	23
2.5 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico	24
2.5.1 Inmunofluorescencia (IF).....	24
2.5.2 Aislamiento Viral.....	24
2.5.3 Técnicas moleculares.....	25

2.5.4 Ensayos virológicos asociados a la vigilancia por laboratorio del virus de la influenza y otros virus respiratorios	27
3. CONTROL DE CALIDAD.....	28
3.1 Control de Calidad Indirecto.....	28
3.1.1 Ensayo de Inmunofluorescencia	28
3.1.2 Ensayo de PCR.....	28
3.2 Control de calidad directo.....	29
4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS.....	29
5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS	29
5.1 Laboratorio Nacional de Referencia (LNR):	29
5.2 Funciones del Laboratorio de Salud Pública (LSP).....	30
5.3 Funciones de los laboratorios públicos y privados o referentes para el evento en el nivel municipal y/o local	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

OBJETIVOS DE LA GUÍA

Describir los lineamientos y el proceso de vigilancia por laboratorio del virus de la Influenza y otros virus respiratorios.

Establecer los procesos de obtención, conservación y transporte de las muestras para la detección del virus de la Influenza y otros virus respiratorios.

Describir los fundamentos técnico-científicos de los métodos de ensayos empleados para el diagnóstico por laboratorio del virus de la Influenza y otros virus respiratorios.

Describir los criterios técnico-operativos para la participación en el programa interlaboratorio de control de calidad para la evaluación del desempeño directo e indirecto.

Precisar cómo se articula la red nacional de laboratorios para la vigilancia por laboratorio del virus de la Influenza y otros virus respiratorios., así como describir las funciones y responsabilidades en cada uno de los niveles.

ALCANCE

La presente guía aplica para la vigilancia por laboratorio del virus de la Influenza y otros virus respiratorios en diferentes matrices y métodos con los cuales se detectan en el laboratorio nacional de referencia del INS.

DEFINICIONES, SIGLAS ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Infección Respiratoria Aguda (IRA): es toda infección que compromete una o más partes del aparato respiratorio, durante un lapso no mayor a 15 días. La mayoría se debe a virus y son auto limitadas.

Inmunofluorescencia: es una técnica de diagnóstico en la cual se evidencia la presencia de un antígeno o anticuerpo específico en una muestra biológica.

Cultivo Celular: son cultivos de células procedentes de órganos y tejidos animales, procesadas de tal manera que pueden ser sembradas en frascos estériles especiales para formar una monocapa a través del suministro de medios de cultivo, enriquecido de nutrientes especiales para su mantenimiento y crecimiento. Los cultivos celulares se clasifican en primarios y líneas celulares.

Aislamiento Viral: técnica usada para el diagnóstico de infecciones virales en muestras clínicas obtenidas adecuadamente

Sustancias Infecciosas: sustancias que contienen agentes patógenos con potencial infeccioso.

Productos Biológicos: son los productos derivados de organismos vivos, fabricados y distribuidos de conformidad con lo dispuesto por las autoridades nacionales competentes, las cuales pueden imponer condiciones especiales para su autorización, prevención, tratamiento o diagnóstico de enfermedades del ser humano o de los animales, con fines conexos de elaboración, experimentación o investigación. Pueden incluir, sin estar necesariamente limitados a ellos, productos acabados o no acabados como vacunas.

Ácido Desoxirribonucleico (ADN): es un polímero de monómeros de nucleótidos (deoxyadenilato, deoxyguanidilato, deoxycitidilato y timidilato) donde se almacena la información genética y responsable de la transmisión hereditaria.

Aspirado nasofaríngeo (ANF): muestra extraída por succión de la parte posterior de la nasofaringe mediante sonda.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una única copia del fragmento original.

PEEDD: Programa de evaluación externa del desempeño directo

PEEDI: Programa de evaluación externa del desempeño indirecto

ESI: Enfermedad Similar a Influenza

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

IRA: Infección Respiratoria Aguda

IRAG: Infección Respiratoria Aguda Grave

LNR: Laboratorio Nacional de Referencia

LSP: Laboratorio de Salud Pública

NIC: National Influenza Center - Centro Nacional de Influenza

rRT-PCR: Reacción en tiempo real en Cadena de la Polimerasa ligada a retrotranscripción

RNA: Ácido ribonucleico

UPGD: Unidad primaria generadora de datos

VSR: Virus Sincitial Respiratorio

ADV: Adenovirus

PIV: Parainfluenza virus

BoV: Bocavirus

CoV: Coronavirus

1. GENERALIDADES

La Infección Respiratoria Aguda (IRA) se define como: “Enfermedad infecciosa causada por microorganismos, que afectan el aparato respiratorio alto y bajo durante un periodo de quince días (15 días) y que pueden cursar desde un resfriado común hasta una complicación más severa como la neumonía”.

Las IRA se consideran como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, por lo que se considera en un problema en salud pública y se estima un promedio de 4.000.000 muertes por año por esta enfermedad. (López A, 2006; Mathers C, 2008).

Las IRA son también la principal causa de hospitalización y de muerte fundamentalmente en los meses fríos o más lluviosos (Neulzi y Cols, 2003; Navarro-Mari y Cols, 2003), así como también son la principal causa de administración de antibióticos y otros medicamentos en especial a los niños menores de 5 años, la mayor parte de las veces innecesarias e inadecuadas ya que con ellos no se mejoran los síntomas ni se logra una recuperación de la enfermedad, sin mencionar los efectos secundarios de estos antibióticos que son tóxicos y generadores de la aparición de resistencia bacteriana (Antimicrobial, 1998; Gonzales y Cols, 2001; Neuzil y Cols, 2000), razón por la cual tienen un gran impacto socioeconómico en los países desarrollados y en vía de desarrollo; sin mencionar que las IRA son en gran parte los responsables de un número elevado de ausentismo laboral (Barenfanger y Cols, 2000).

La etiología de las IRA está dada por un grupo variado de agentes tanto bacterianos como virales que ocasionan enfermedad con sintomatología similar (Debbia, 2001). Entre las bacterias que causan estas infecciones se pueden mencionar: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus B hemoliticus*. Entre los agentes virales más comunes se encuentran: Virus Sincitial Respiratorio, Parainfluenza, Influenza, Coxsackie, entre otros (Lam W., 2007; N, 1996; Como atender al niño con infecciones respiratorias agudas y que hacer para prevenirla). Sin embargo, a pesar de ser una enfermedad frecuente y de impacto en salud pública, existen algunos aspectos de las infecciones respiratorias aún no conocidas como lo referente a su etiología ya que entre un 40 a 60% son indeterminadas, es decir no es posible identificar un agente etiológico (Bartlett JG, 1998; Louie y Cols, 2005).

1.1.1 1.1 VIRUS RESPIRATORIOS

1.1.2

1.1.3 Características generales

Entre un 80 – 90% los virus son considerados como la causa más común de infección en el tracto respiratorio, tanto en la población infantil como en los adultos, siendo en los menores la principal causa de IRA en países desarrollados y la mayor causa de muerte en los países en desarrollo. (Weber, 1998; Bloom y Cohen, 2007).

Del grupo variado de virus causantes de infecciones respiratorias agudas encontramos: Influenza Virus tipo A, B y C, Parainfluenza tipo 1, 2, 3 y 4 (PIV-1,-2,-3 y -4) Virus Sincitial respiratorio humano (hVSR), coronavirus humano OC43 y 229E, adenovirus (AdV), Rinovirus (hRV) y algunos Enterovirus (EV). Además, en los últimos años se han añadido a este grupo de virus: el Metapneumovirus humano (hMPV), Bocavirus humano (HBoV), algunos mimivirus y nuevos Coronavirus humanos (HCoV) como HKU1 (Bellau - Pujol S, 2005), los cuales han estado asociados a episodios de morbilidad y mortalidad en la población (Thompson, 2003).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el Virus Sincitial Respiratorio (VSR) y el virus tipo 3 de la Parainfluenza son las causas principales de infecciones respiratorias agudas en la infancia, causando aproximadamente entre el 20 al 25% de los casos de neumonía y cerca de 45% al 50% de bronquiolitis de hospitalizados en la población infantil especialmente (Garcia-Barrero B, 1994; Louie JK, 2005).

Por otra parte, otro agente viral recientemente descrito se ha asociado a las infecciones respiratorias tanto en niños como en adultos el cual ha sido identificado mediante técnicas moleculares, el virus denominado Metapneumovirus humano (hMPV) (Van den Hoogen B, 2001). El retraso en su descubrimiento podría deberse a que el virus se replica pobremente en las líneas celulares de uso rutinario y genera un efecto citopático inespecífico (Van den Hoogen B, 2002). Estudios posteriores demostraron que el hMPV presenta co-infecciones con otros virus respiratorios siendo más frecuentes con el VSR, esto posiblemente a que comparten similitudes estructurales y genómicas (Venter M, 2002).

En países latinoamericanos como Chile los virus respiratorios son la causa principal de hospitalización y de muerte en niños menores de 2 años; Virus Sincitial Respiratorio y Adenovirus son detectados con una tasa anual de 29% y 9.2% respectivamente (Larrañaga C, 2007).

La presentación clínica de las infecciones respiratorias virales depende en gran medida del estado del paciente, el patógeno implicado y de la época de lluvia, propia de cada país, mostrando una variedad de síntomas, incluyendo aquellos del tracto superior (resfriado común, por ejemplo, rinitis, sinusitis, otitis media) y síntomas respiratorios del tracto bajo (neumonía, bronconeumonía, bronquitis, bronquiolitis, traqueítis y laringitis). Una de las características de las manifestaciones clínicas en las IRA virales es la inespecificidad de los síntomas: un mismo cuadro clínico puede ser causado por distintos agentes virales, y un virus concreto puede producir diferentes cuadros clínicos.

1.1.4

1.1.5 Modo de transmisión

La vía de transmisión de los virus respiratorios es principalmente aérea, puede ser por contacto directo o a través de fómites (contacto indirecto), diseminándose a través de la mucosa nasal o conjuntival. La transmisión por aerosoles; ha sido documentada para el virus Influenza, pero se presume que puede ocurrir también con Rinovirus y Enterovirus (Rosete-Olvera DP, 2002)

El periodo de incubación es de 1 a 6 días. La replicación viral se produce en las células ciliadas del epitelio nasal y de la nasofaringe. La viremia no es frecuente, salvo para Enterovirus. La eliminación del virus aumenta al tercer o cuarto día de infección y suele desaparecer al quinto; en niños el periodo de eliminación puede ser más prolongado. Los síntomas, que suelen hacerse más fuertes luego del quinto día de enfermedad y desaparecer hacia el décimo día, esto se deben al edema e hiperemia de la mucosa y destrucción de células epiteliales que hacen los virus respiratorios sobre el tejido respiratorio (Rosete-Olvera DP, 2002).

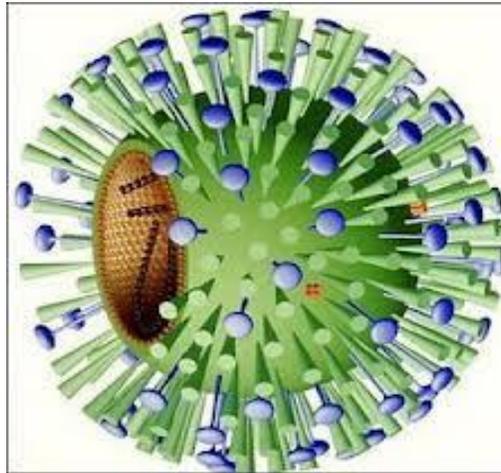
1.1.6 *Virus Influenza (FLU)*

La Influenza es una enfermedad viral altamente infecciosa. El nombre "Influenza" fue originado en el siglo XV en Italia de una epidemia atribuida a la "influencia de las estrellas". Al menos cuatro pandemias de Influenza ocurrieron en el siglo XIX, y tres han ocurrido en el siglo XX. La pandemia de "Spanish flu" en 1918-1919 causó un número estimado de 21 millones de muertes alrededor del mundo.

El virus de la Influenza, es un virus RNA de cadena sencilla y con forma helicoidal perteneciente a la familia orthomyxoviridae. Y se han descrito tres tipos de virus de influenza A, B y C los cuales fueron clasificados por su material genético. Influenza

tipo A posee subtipos los cuales son determinados por las glicoproteínas de superficie: hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N). Figura No. 1.

Figura No.1. Esquema del virus de Influenza



Fuente: <http://marioisaac.blogspot.com/2009/11/acerca-del-virus-ah1n1.html>

Influenza A causa enfermedad de un nivel moderado a severo, y afecta a todos los grupos de edades. El virus infecta a humanos y otros animales como a cerdos y aves.

Influenza B generalmente causa enfermedad más leve que el tipo A y primordialmente afecta a los niños. Puede ser asociado con el síndrome de Reye.

La patogénesis se debe a que el virus ataca y penetra en las células epiteliales respiratorias, en la tráquea y los bronquios. La replicación viral ocurre como resultado de la destrucción de la célula hospedero.

La enfermedad de la Influenza "clásica" es caracterizada por el inicio de fiebre, cefalea, mialgias, dolor de garganta y tos no productiva. La fiebre es usualmente mayor a 37°C, mialgias, tos como resultado de la destrucción del epitelio traqueal y el periodo de incubación oscila entre 2 a 5 días.

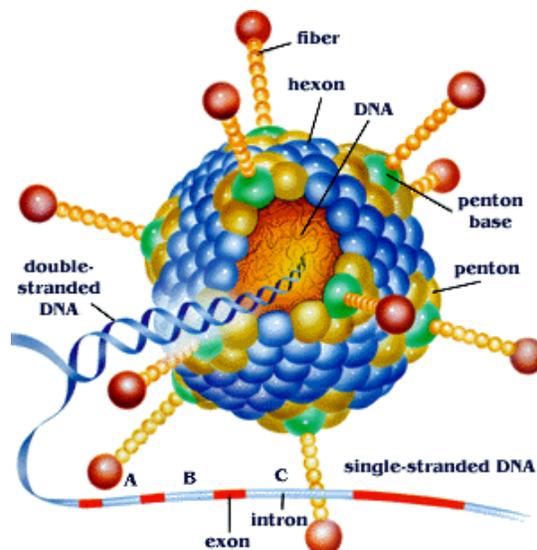
1.1.7 1.2.2 Adenovirus (AdV)

Son llamados "adenovirus" porque fueron aislados en 1953 a partir de tejido adenoidal humano. Pertenecen a la familia Adenoviridae, género Mastadenovirus.

Los adenovirus se clasifican en 6 subgrupos (A - F), basándose principalmente en sus propiedades de hemoaglutinación y su homología de ADN. Los tipos 40, 41 pertenecen al subgrupo F y son patógenos entéricos. Mientras que los subgrupos A y B están asociados a infecciones del tracto respiratorios.

Estos son virus desnudos con un diámetro de 70-90nm. Su genoma es ADN lineal de cadena doble (ds) con dos proteínas mayores. La cápside es icosaédrica formada por 252 capsómeros, 240 son hexones; en los vértices hay 12 pentones, de los cuales se proyecta una proteína llamada "fibra" la cual posee una protuberancia terminal. Este complejo es tóxico a las células causando redondeamiento y muerte de las células a través de la inhibición de su síntesis proteica. Las proteínas fibrilares determinan la especificidad de las células diana. Figura No. 2.

Figura No. 2. Esquema de Adenovirus



Fuente: <https://microbewiki.kenyon.edu/images/8/81/Adenojpg.gif>

El virus ataca primariamente a células del moco epitelial de la conjuntiva, tracto respiratorio, tractos gastrointestinal y genitourinario. La fijación a receptores de la célula huésped se da mediante la proteína fibrilar. El virus se replica en el citoplasma de las células huésped, pero el ADN viral se replica dentro del núcleo de la célula huésped.

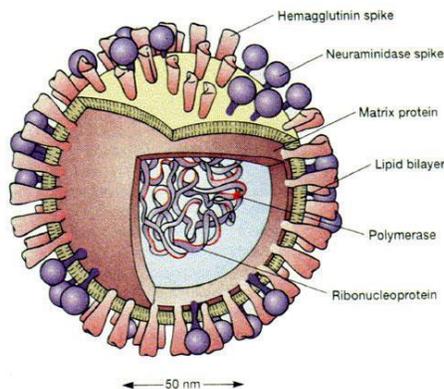
El resfriado común (rinitis), faringitis (con o sin fiebre), tonsilitis, bronquitis, fiebre faringoconjuntival, enfermedad respiratoria aguda (infección del tracto respiratorio inferior), síndrome similar a pertussis, neumonía, algunas veces con secuelas, tiene un periodo de incubación de 2-14 días.

1.1.8

1.1.9 1.2.3 *Virus Sincitial Respiratorio (VSR)*

El VSR se clasifica dentro del Orden Mononegavirales y pertenece a la Familia Paramyxoviridae, su genoma está formado por una cadena simple de RNA con polaridad negativa (no segmentado) (Figura No. 3).

Figura No. 3. Esquema de un virus de la familia Paramixovirus



Fuente: <http://medicpedia.es.tl/Microbiologia.htm>

En los niños este virus puede causar neumonía, bronquiolitis (inflamación de las vías respiratorias pequeñas de los pulmones) y croup. En los adultos sanos y en los niños mayores es una afección respiratoria usualmente leve.

1.1.10 1.2.4 Parainfluenza (PIV)

Los virus de Parainfluenza son patógenos que causan infecciones en el tracto respiratorio alto y bajo afecta tanto adultos como a niños son la segunda causa de enfermedad del tracto respiratorio inferior en niños pequeños, después del virus Sincitial respiratorio.

Pertencen a la familia Paramyxoviridae del género Paramixovirus Parainfluenza 1, 2 y 3. Los virus de la Parainfluenza son relativamente grandes, casi 150 - 300 nm de diámetro. Son pleomórficos. Son virus con RNA de sentido negativo, no segmentado y de cadena sencilla, el centro (Core) de la nucleocápside es filamentoso, parecido a un tejido dentado, tiene un ARN helicoidal fuertemente asociado con la Nucleoproteína (NP) fosfoproteína (P) y proteína larga (L).

Se pueden ver infecciones primarias y re-infecciones, pero la mayoría son asintomáticas, especialmente en niños mayores y en adultos. El periodo de incubación es de 2 a 6 días. Sin embargo, la mayoría de las personas han tenido alguna infección primaria en los primeros 5 años de vida. Las re-infecciones son clínicamente menos severas, por lo general implican el tracto respiratorio superior y pueden verse en cualquier etapa de la vida.

Causan fiebre y dentro del espectro de infecciones respiratorias causadas: rinorrea/rinitis, faringitis, tos, croup (laringotraqueobronquitis), bronquiolitis y neumonía.

1.1.11 1.2.5 Metapneumovirus humano (hMPV)

En 2001, en Holanda, Benardette Van den Hoogen y colaboradores; identificaron por técnicas de PCR un nuevo patógeno causante de infecciones en el tracto respiratorio alto y bajo en 28 aspirados nasofaríngeos almacenados en un periodo de 20 años. Estos patógenos pueden afectar a niños y adultos. El virus identificado fue denominado metapneumovirus humano (hMPV), el retraso en su descubrimiento podría deberse a que el virus se replica pobremente en las líneas celulares de uso rutinario y genera un efecto citopático inespecífico. (Chan P. 2003).

El hMPV pertenece al género Metapneumovirus y al igual que el virus respiratorio Sincitial (VSR), pertenece a la subfamilia Pneumoviridae y a la familia Paramyxoviridae. Existen por lo menos 2 especies de hMPV (A y B) cada una de las cuales se subdivide en subgrupos 1 y 2. Las principales diferencias entre el VSR

y el metapneumovirus consisten en que el hMPV carece de dos proteínas no estructurales que están presentes en los pneumovirus y en que presenta pequeñas diferencias genómicas.

1.1.12 1.2.6 Bocavirus humano (BoV)

En 2005, Allander y colaboradores publicaron el descubrimiento de un nuevo parvovirus humano, aislado de muestras respiratorias obtenidas de niños con infecciones del tracto respiratorio. Los análisis filogenéticos de este nuevo virus mostraron que es un parvovirus y que está estrechamente relacionado con los únicos dos miembros del género Bocavirus, un parvovirus bovino y canino de cuyas dos primeras sílabas ha tomado el nombre; Finalmente, HBoV fue incluido en el género Bocavirus, subfamilia Parvovirinae, familia Parvoviridae (Francisco Pozo, 2008).

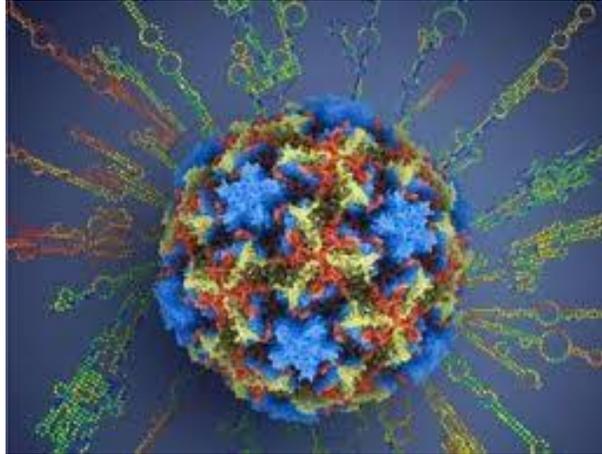
Los parvovirus son virus esféricos de 18 a 26 nm de diámetro y simetría icosaédrica, carentes de envoltura y con genoma constituido por una molécula lineal de ADN, son virus DNA de tamaño muy pequeño, se estima que existen dos (2) genotipos de HBoV circulando en varios países, (Avellón A, P. P. 2001).

1.1.13 1.2.7 Rinovirus y Enterovirus (RV y EV)

La familia Picornaviridae está compuesta por nueve (9) géneros, de los cuales cinco (5) producen infección en humanos (Rinovirus, Enterovirus, Hepatovirus, Kobuvirus y Parechovirus). Es así que los Rinovirus (RV), y en menor medida los Enterovirus (EV), se han visto asociados con Infecciones respiratorias agudas. Estos son virus simples, pequeños (20-30 nm), con forma esférica. Son icosaédricos y sin envoltura lipídica, compuesta por 60 monómeros de 4 proteínas estructurales, VP1, VP2, VP3 y VP4, organizados en 12 pentámeros. Figura No. 4.

El rinovirus afecta a niños mayores y a adultos, los síntomas más frecuentes es el catarro común, y ocasionan un cuadro clínico indistinguible del causado por otros virus respiratorios. Tras un periodo de incubación de 1 a 4 días, comienzan los síntomas de una infección respiratoria de vías altas, con rinorrea, tos, estornudos y mayor o menor grado de fiebre. El tiempo de recuperación es variable, pero puede llegar hasta dos semanas.

Figura No. 4. Rinovirus



Fuente: <http://www.milenio.com/tecnologia>

La temperatura óptima de crecimiento del rinovirus es 33°C y se piensa que ha sido el resultado de un proceso de adaptación a su hábitat más frecuente en la nasofaringe.

1.2.8 Coronavirus (CoV)

En 1931 Schalk y Hawn, describen este virus por primera vez en una enfermedad respiratoria en pájaros. En 1975 estos virus fueron aceptados como un nuevo género denominado Coronavirus (HCoV), familia Coronaviridae. Son partículas pleomórficas de 80-160 nm y poseen un genoma de RNA, son envueltos con proyecciones superficiales en forma de pétalo que le dan el aspecto de una corona solar

Los HCoV OC43 y 229E son los agentes responsables de un resfriado común, su período de incubación es de 2 a 5 días, desapareciendo sus síntomas generalmente a la semana. Suelen asociarse con infecciones de vías respiratorias altas, con intensa rinorrea, aunque ocasionalmente se han asociado con neumonías en recién nacidos, niños mayores, inmunodeprimidos y reclutas.

2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

El éxito del diagnóstico del virus de la influenza y otros virus respiratorios depende de;

- ✓ Dinámica de la infección (tiempo entre fecha de inicio de síntomas y fecha de recolección de la muestra)
- ✓ Recolección de la muestra (buena celularidad)
- ✓ Conservación y transporte (para garantizar la viabilidad del virus y la seguridad del profesional y de la comunidad)
- ✓ Método de diagnóstico (inmunofluorescencia y técnicas moleculares)

2.1 Bioseguridad:

Para el análisis de muestras todos los procedimientos se deben realizar en cabina de seguridad biológica clase 2A, bajo normas de limpieza y desinfección con alcohol al 70%, luz ultravioleta y flujo laminar 15 minutos antes de su uso. Igualmente todo elemento empleado durante el procedimiento debe limpiarse previamente con alcohol al 70% para ser introducido al interior de la cabina. Es recomendable dejar atemperar los reactivos a utilizar en los procesos de cultivos celulares dentro de la cabina de seguridad biológica con la luz UV encendida. Al finalizar el trabajo, se deben retirar todos los elementos y limpiar y desinfectar la cabina con alcohol al 70%, luz ultravioleta y flujo laminar durante 10 a 15 minutos antes de apagarla.

El personal encargado de los procedimientos debe conocer lo del uso de los elementos de protección personal (tapabocas, guantes y bata) y todo lo relacionado con el fin de prevenir la contaminación cruzada; microbiana en los cultivos, en la PCR, el mismo analista y el ambiente de trabajo.

1.1.14

2.2 Toma de muestras

Todas las muestras respiratorias para el análisis del virus de la influenza y otros virus respiratorios deben ser recolectadas dentro de los primeros 10 días de inicio de síntomas (preferiblemente en el 4 o 5 día cuando la carga viral está aumentada y garantiza la detección de los virus respiratorios).

2.2.1 Hisopados: faríngeos, nasofaríngeos o combinados nasofaríngeo y nasal.

- Marque el recipiente de la muestra con la fecha de la recolección y el nombre del paciente.
- Póngase los guantes y destape el hisopo (hisopos con punta sintética de poliéster o dacrón® y mango plástico).
- Pida al paciente que abra la boca y saque la lengua repitiendo reiteradamente la letra “a” con el fin de mantener la faringe cerrada.
- Con la ayuda de un baja lenguas presione la lengua. La manipulación en este momento de la recolección de muestra es de gran importancia para evitar que la lengua interfiera, y también para evitar la contaminación que de ella se derive.
- Lleve el hisopo hasta el fondo de la orofaringe y rótelos por la parte posterior de las tonsilas (amígdalas), y a la vez de arriba hacia abajo, con el fin de obtener el mayor número de células. Figura No. 5
- Posteriormente el hisopo debe introducirse en un vial de plástico que contiene de 1,5 mL de medio de transporte viral (MTV), cortando el resto del escobillón para que permita tapar adecuadamente el vial con la muestra.

Figura No. 5: Recolección de muestra de hisopados



Fuente: Grupo de Virología - SRNL

Notas:

- No use hisopos con alginato de calcio o hisopos de madera, debido a que estos pueden contener sustancias que pueden interferir en técnicas como el aislamiento viral en cultivos celulares o en la prueba de PCR.
- La UPGD no debe retirar los hisopos del MTV ya que estas no cuentan con cabina de bioseguridad.
- Los LSP o el INS con capacidad de proceso son los responsables de retirar el escobillón y así continuar con el debido procedimiento de IFI o de PCR
- Muestras de hisopados enviadas en solución salina no serán procedas por el LSP o por el INS.

2.2.2 Aspirado Nasofaríngeo: Aspirado nasofaríngeo, Aspirado endotraqueal

- Rotular el recipiente que de la muestra con los datos del paciente (nombres, apellidos y documento de identificación del paciente) y la fecha de la recolección.
- Introducir 1 mL de solución salina estéril (pH: 7.0) en una de las fosas nasales, utilizando una jeringa unida a una sonda.
- Aspirar todo el material de la secreción nasofaríngea que sea posible, agregar la muestra a un tubo estéril y repetir el procedimiento con la otra fosa nasal, figura No. 6.
- Opcionalmente con ayuda de tijeras previamente desinfectadas, cortar una porción de la sonda utilizada que contiene la muestra y depositarla en el tubo.
- Agregar solución salina estéril hasta completar un volumen final mínimo de 3 mL y cerrar muy bien el tubo.
- Refrigerar o congelar el vial para garantizar la viabilidad viral, según sea el caso, hasta su procesamiento en el LSP con capacidad diagnóstica o en el Laboratorio Nacional de Referencia INS

Figura No. 6: Recolección de muestra de aspirado



Fuente: <https://es.slideshare.net/ssucbba/vigilancia-del-virus-influenza>

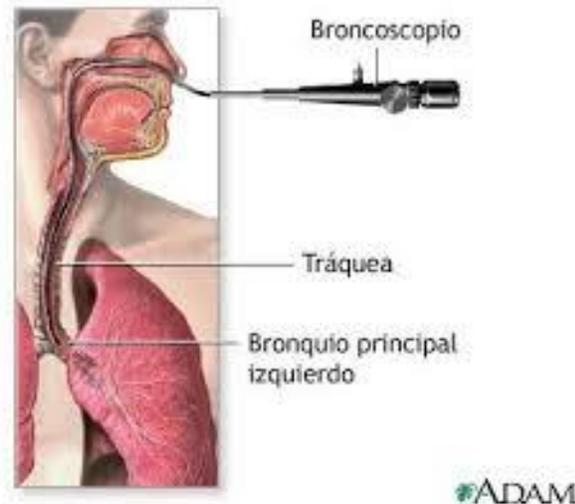
Notas:

- Las muestras de aspirados nasofaríngeos, deben ser recolectadas en mínimo 3 mL de solución salina estéril
- El aspirado puede ser recolectado con sonda nasofaríngea o con trampa de acuerdo al procedimiento que realiza cada hospital.
- Dejar la sonda dentro de la solución salina (3mL). Si la decisión es retirar la sonda, se debe garantizar el escurrimiento total del contenido de la sonda en los 3 mL de solución salina y así evitar la pérdida de la partícula viral y muestras inadecuadas o falsos negativos.

1.1.15 2.2.3 Lavados: Nasal o Bronco alveolar

- Marque el recipiente de la muestra con la fecha de la recolección, el nombre del paciente.
- Se solicita al paciente sentarse con la cabeza ligeramente inclinada de atrás para adelante diciendo "K" mientras se realizan lavados con solución salina, la cual se aplica en la ventana nasal con el broncoscopio, figura No. 7.
- Se recoge la muestra en recipiente con tapa rosca.
- El proceso es repetido alternando las fosas nasales hasta recolectar un total de 10-15 mL de lavado.
- Luego se realiza una dilución 1:2 de 3 mL de lavado.

Figura No. 7 Recolección de muestra de lavados



Fuente: https://clon.uab.es/pda_ssl/web/pneumologia/2_2_Pruebas_invasivas

1.1.16 2.2.4. Biopsia del tracto respiratorio

- Se puede recolectar muestras de secreción respiratoria hasta seis horas posteriores a la muerte.
- Rrecolectar cortes de tejido del tracto respiratorio (4x5 cm) que representen el órgano y en frascos independientes refrigerados para análisis virológico, con contra muestra adicional de los mismos tejidos en formol tamponado al 10% para estudio histopatológico;
 - 1.Parénquima pulmonar representativo de los pulmones derecho e izquierdo
 - 2.Bronquios primarios derecho e izquierdo
 - 3.Tráquea (proximal y distal)

1.1.17 2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte

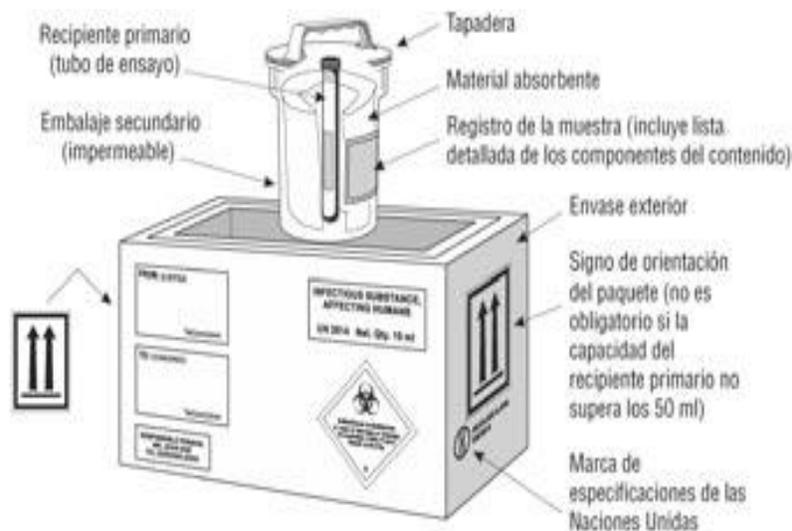
Todas las muestras clínicas deben conservarse a temperatura de refrigeración (2 a 8°C) y estas deben ser enviadas al laboratorio para su análisis lo antes posible. Si

las muestras son procesadas o enviadas al LSP o al INS después de las 48 horas estas deben ser congeladas (-70°C). El transporte de las muestras debe realizarse con geles o pilas congeladas, temperaturas superiores a 8°C degradan la partícula viral, obteniéndose falsos negativos; muestras recibidas en el INS con temperaturas superiores a 8°C, no serán procesadas.

Para el transporte de muestras debe usarse el sistema básico de triple embalaje de acuerdo al sistema de la IATA, según lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud para el transporte de muestras biológicas infecciosas; IATA Dangerous Goods Regulations (DGR) 58th Edition 2017, ver figura; así como seguir las recomendaciones del manual de transporte de las sustancias infecciosas del INS.

El embalaje debe constar de tres componentes:

- Recipiente principal o primario hermético: es el que contiene la muestra
- Embalaje secundario/contenedor secundario hermético: debe ser resistente y antifugas
- Embalaje exterior rígido adecuado: cuenta con una superficie de una dimensión de al menos 10 cm x 10 cm.



Embalaje/ensado y etiquetado de sustancias infecciosas de la categoría A



Embalaje/ensado y etiquetado de sustancias infecciosas de la categoría B

El INS se reserva el derecho de no procesar muestras en los siguientes casos:

- Muestras que no cumplan con las definiciones correctas de caso.
- Muestras procedentes de LSP con capacidad diagnóstica (a excepción de casos fatales o IRAG inusitado).
- Muestras inadecuadas (mal embaladas, muestras no aptas para proceso, muestras mal conservadas o con deficiente diligenciamiento de la ficha).
- Muestras que excedan los porcentajes de vigilancia estipulados para cada LSP.

1.1.18 2.4 Documentación requerida

1.1.19

1.1.20 Las muestras deben ser enviadas con la respectiva ficha de notificación de acuerdo al protocolo nacional de IRA y con una carta de solicitud de examen y con la siguiente información:

- Nombre y Apellidos
- Fecha del comienzo de los primeros síntomas
- Fecha de Toma de las Muestras
- Tipo de Muestra recolectada

2.5 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico

Las muestras empleadas para diagnóstico rápido por inmunofluorescencia (IF), por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o aislamiento viral son secreciones respiratorias tomadas mediante aspirados, lavados o hisopados, sin embargo, las muestras enviadas para IF, **NO** pueden ser congeladas ya que el proceso de congelación y descongelación rompe las células, lo cual dificulta su reconocimiento.

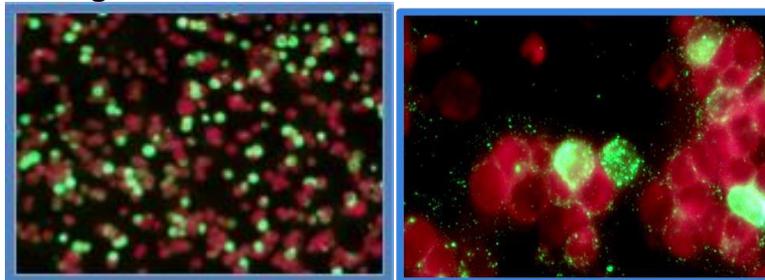
1.1.21

1.1.22 2.5.1 Inmunofluorescencia (IF)

La inmunofluorescencia fue introducida por primera vez a principios de los años 40 y fue utilizada en el diagnóstico virológico a mediados de los 50's, Figura No. 8. Se ha comprobado que es una técnica sensible, segura y rápida para diagnosticar virus. Puede ser directa (detectar antígenos víricos específicos) o indirecta (detectar anticuerpos específicos de virus conocidos), en pocas horas.

Nota: Se deben seguir las recomendaciones y pasos del fabricante

Figura No. 8: Técnica de Inmunofluorescencia



Fuente: Grupo de Virología – SRNL

1.1.23 2.5.2 Aislamiento Viral

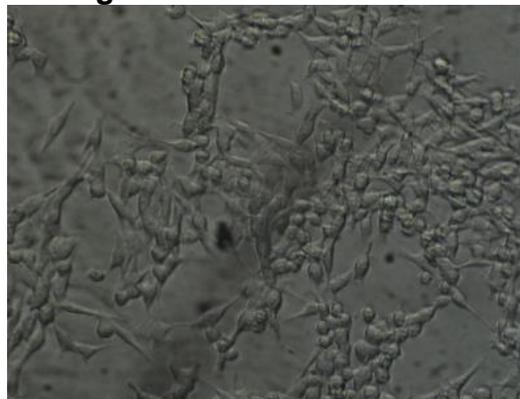
El aislamiento viral en cultivos celulares es el patrón de oro para el diagnóstico de virus respiratorios agentes de IRA, sin embargo, tiene algunas limitaciones como el

costo, el tiempo de análisis, requiere de líneas celulares muy sensibles a los virus a estudiar, personal entrenado y un laboratorio robusto con capacidad técnica para el manejo de cultivos celulares.

Para el aislamiento del virus respiratorio se emplean varias líneas celulares, por ejemplo Hep-2 (línea celular continua de origen humano), para virus respiratorio Sincitial (VRS), MDCK (células primarias de rincón de perro cookie spanish), para aislamiento de virus influenza. Una vez inoculada la muestra en las líneas celulares el cultivo celular se observa día a día y se registra el efecto citopático característico de cada virus. Figura No. 9.

Nota: Los cultivos celulares se deben realizar en paralelo a las pruebas inmunológicas rápidas con el fin de recuperar el virus para estudios de caracterización e identificación de la cepa prevalente.

Figura No. 9: Cultivo celular



Fuente: Grupo de Virología – SRNL

1.1.24 2.5.3 Técnicas moleculares

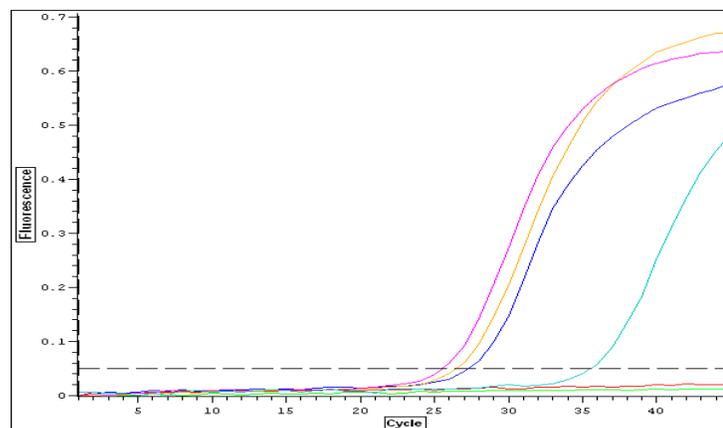
La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR (polymerase chain reaction), fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN.

Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

La técnica de extracción puede variar dependiendo el kit comercial que se utilice, entre los recomendados por el CDC encontramos; reactivos de extracción comerciales (Kit Qiamp Viral RNA - Qiagen part No. 52904 o 52906, Roche MagNa Pure Total Nucleic Acid kit, Invitrogen Purelink minikit).

La PCR en tiempo real (rRT-PCR), consiste en detectar en tiempo real la amplificación de un genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar, figura No. 10. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia y es iluminada por el fluoróforo. Es importante incluir un tubo control, el cual va servir como control interno de la técnica de extracción. Los extractos de ácido nucléico se deben almacenar a -70°C o a -20°C si se realiza la rRT-PCR en las próximas 24 horas.

Figura No.10 RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR)



Fuente: Grupo de Virología – SRNL

PRECAUCIÓN: La manipulación de los diferentes componentes de la mezcla de reacción, tubos, puntas y demás, deben ser realizadas utilizando guantes de nitrilo o látex EXCENTOS DE TALCO y debe ser realizada en un ambiente limpio (cabina de flujo laminar) en donde no se haya procesado previamente material biológico que pueda ser fuente de contaminación de los reactivos.

La técnica de rRT-PCR es muy sensible y podría mostrar amplificación ante cualquier contacto con agente contaminante, debido a la presencia de nucleasas fluorogénicas 5', se deben tomar precauciones especiales para evitar amplificaciones de falsos positivos. La calidad de la muestra clínica es de gran importancia para la prueba, por tal motivo debe conservar la cadena de frío y ser enviada dentro del tiempo estipulado. Virus de muestras clínicas que infectan células epiteliales son muy lábiles y pueden ser fácilmente dañadas por manejo inapropiado o por almacenamiento prolongado antes de ser procesadas.

Los analistas deben estar entrenados y familiarizados con los procedimientos de muestreo y la interpretación de los resultados previo a la realización de la prueba. Un resultado falso negativo puede ocurrir si existe una cantidad inadecuada de organismos presentes en la muestra debido a una recolección, manejo o transporte inapropiados. También puede ocurrir si hay un exceso de plantilla de DNA/RNA en la reacción.

1.1.25 2.5.4 Ensayos virológicos asociados a la vigilancia por laboratorio del virus de la influenza y otros virus respiratorios

En los casos de Enfermedad Similar a Influenza - ESI ó casos de Infección Respiratoria Aguda Grave – IRAG: serán procesadas para diagnóstico de Influenza y otros virus respiratorios, por la técnica de inmunofluorescencia y/o rRT-PCR en los respectivos laboratorios de salud pública departamentales o distrital (LSP), según su capacidad diagnóstica, cumpliendo con las indicaciones en cuanto a recolección, conservación y transporte de muestras establecidas a nivel nacional. Las muestras respiratorias que no cumplan con los criterios referenciados en este numeral NO serán procesadas por el INS, ver diagramas de procesos, figuras No. 11 y 12.

Se debe remitir de inmediato las muestras con resultado positivo para influenza tipo A y B por IFI al LSP capacitado para PCR o al INS, con el fin de realizar la debida subtipificación del virus de Influenza tipo A y confirmación influenza B.

Las muestras con resultado positivo para Influenza A que no se puedan subtipificar, es decir, que no correspondan A (H1N1) pdm09, deben enviarse de inmediato al INS para realizar la debida subtipificación del virus de influenza,

Para los casos de IRAG inusitado o mortalidades: se debe realizar rRT-PCR para influenza tipo A y B, así como el diferencial con otros virus respiratorios, ensayos que se realizarán en el laboratorio de Virología del INS, el cual actúa como laboratorio nacional de referencia y centro colaborador de la red mundial de influenza de OMS.

3. CONTROL DE CALIDAD

1.1.26 3.1 Control de Calidad Indirecto

Para el programa de evaluación externa del desempeño indirecto (PEEDI); los laboratorios que realizan inmunofluorescencia indirecta para la identificación de virus respiratorios y rRT-PCR para identificar virus de la Influenza A y otros virus respiratorios, deben remitir la primera semana de cada mes al Laboratorio Nacional de Referencia INS, el control de calidad indirecto y enviar en medio electrónico el consolidado de las muestras procesadas en los formatos establecidos y los criterios indicados según ensayo;

1.1.27 3.1.1 Ensayo de Inmunofluorescencia

- Envío mensual al INS del 100% de láminas de casos positivos y del 10% de láminas de casos negativos.
- Envío mensual al INS del 100% de las muestras positivas con sus respectivas fichas epidemiológicas y el consolidado de muestras procesadas en el mes en la plantilla recomendada por el INS.
- Enviar cada 15 días el consolidado de las muestras procesadas por semana epidemiológica (formato del INS); esto es solo para los departamentos que realizan IFI.

1.1.28 3.1.2 Ensayo de PCR

- Envío mensual del 100% de muestras positivas y el 10% de muestras negativas. La muestra a enviar al INS tanto para muestras positivas como negativas, es el extracto de RNA, junto con las muestras originales (negativas y/o positivas), acompañada de la respectiva ficha de notificación.

- Envió mensual al INS del consolidado de muestras procesadas en la plantilla de base de datos recomendada por el INS.

Nota: El INS podría no procesar las muestras que excedan los porcentajes estipulados en el presente numeral.

1.1.29 3.2 Control de calidad directo

Para el Programa de evaluación externa del desempeño directa – PEEDD; se envía una vez al año 10 muestras biológicas liofilizadas, para evaluar el desempeño de los Laboratorios de Salud Pública participantes en cuanto a la detección del virus de la Influenza A y otros Virus Respiratorios, mediante la técnica de RT-PCR.

4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

La vigilancia del virus de la influenza y otros virus respiratorios, consiste en detectar e identificar la circulación a nivel de país y a nivel regional, con el fin establecer factores de riesgo y vulnerabilidad de la población que permita orientar las acciones de promoción prevención y control.

El análisis de información resultante de la vigilancia permitirá contar con indicadores los cuales se publican a través de boletines regionales para uso por parte de la comunicad científica, médica, académica y administrativa los del sistema de salud y el público en general.

5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

1.1.30 5.1 Laboratorio Nacional de Referencia (LNR):

- ✓ Procesar las muestras de laboratorios con centinelas ESI/IRAG sin capacidad diagnóstica
- ✓ Procesar las Muestras de IRAGi, mortalidades (tejidos)
- ✓ Realizar el control de calidad indirecto de PCR mensual
- ✓ Realizar lectura de control de calidad indirecto de IFI mensual

- ✓ Prepara la EDD: 1 vez al año (septiembre) para los LSP con capacidad de RT-PCR el MTV, en lo posible da sostenibilidad de reactivos a los LSP para IFI y biología molecular
- ✓ Participa en el panel de Evaluación del desempeño del CDC y de WHO (1 vez año)
- ✓ Capacita / brinda asistencia técnica en el diagnóstico por laboratorio a los LSP
- ✓ Participa en proyectos internos y externos (nacional o internacional)
- ✓ Enviar a CDC de Atlanta para formulación de la vacuna (febrero-agosto) – evaluación.
- ✓ Enviar al CDC las muestras no subtipificables
- ✓ Apoyar a los LSPD con insumos y reactivos necesarios para sostener la vigilancia por laboratorio
- ✓ Emitir el resultado (informe virológico) dentro del tiempo determinado según los indicadores, cumplir con las actividades del NIC (Centro nacional de Influenza), realizar informe del control de calidad indirecto, así como elaborar el respectivo envío del PEEDD.

Otras funciones:

- ✓ técnica al Ministerio de Salud y Protección Social para la formulación de políticas y lineamientos del evento.

Elaborar informes,

- ✓ Brindar asesoría guías y documentos técnicos científicos.
- ✓ Definir las técnicas de confirmación en los laboratorios.
- ✓ Difundir los lineamientos de remisión, transporte, conservación de las muestras y de los aislamientos.
- ✓ Realizar la estandarización y/o validación de las metodologías diagnósticas para su implementación en el país.
- ✓ Capacitar a los profesionales de la Red de Laboratorios.
- ✓ Participar en programas Interlaboratorios internacionales o de ensayos de aptitud.

1.1.31 5.2 Funciones del Laboratorio de Salud Pública (LSP)

- ✓ Adoptar las políticas nacionales de la RNL.
- ✓ Monitorear la red de hospitales y clínicas que realizan la vigilancia de IRA y verificar los estándares de calidad.
- ✓ Participar en las evaluaciones externas del desempeño.

- ✓ Realizar evaluaciones de desempeño a los laboratorios de su red de laboratorios.
- ✓ Realizar la identificación viral de influenza y otros virus respiratorios de acuerdo a la capacidad diagnóstica de su laboratorio a todas las muestras procedentes de la vigilancia de IRA
- ✓ Asegurar todos los insumos y reactivos para la recolección de muestras respiratoria y procesamiento de las muestras
- ✓ Asegurar la vigilancia de las diferentes estrategias de la vigilancia de IRA
- ✓ Capacitar a la red de laboratorios en la toma, diagnóstico, interpretación de las pruebas y envío de muestras nasofaríngeas para diagnóstico de influenza y otros virus respiratorios.
- ✓ Informar a los epidemiólogos y los casos confirmados por el laboratorio.
- ✓ Garantizar la vigilancia de IRA en su departamento, corroborar que las muestras estén correctamente embaladas para su envío al INS-Grupo de Virología, procesar correctamente las muestras ya sea para IFI o rRT-PCR. Solo los laboratorios con capacidad diagnóstica deben cumplir con el respectivo envío mensual del control de calidad indirecto (IFI/rRT-PCR).

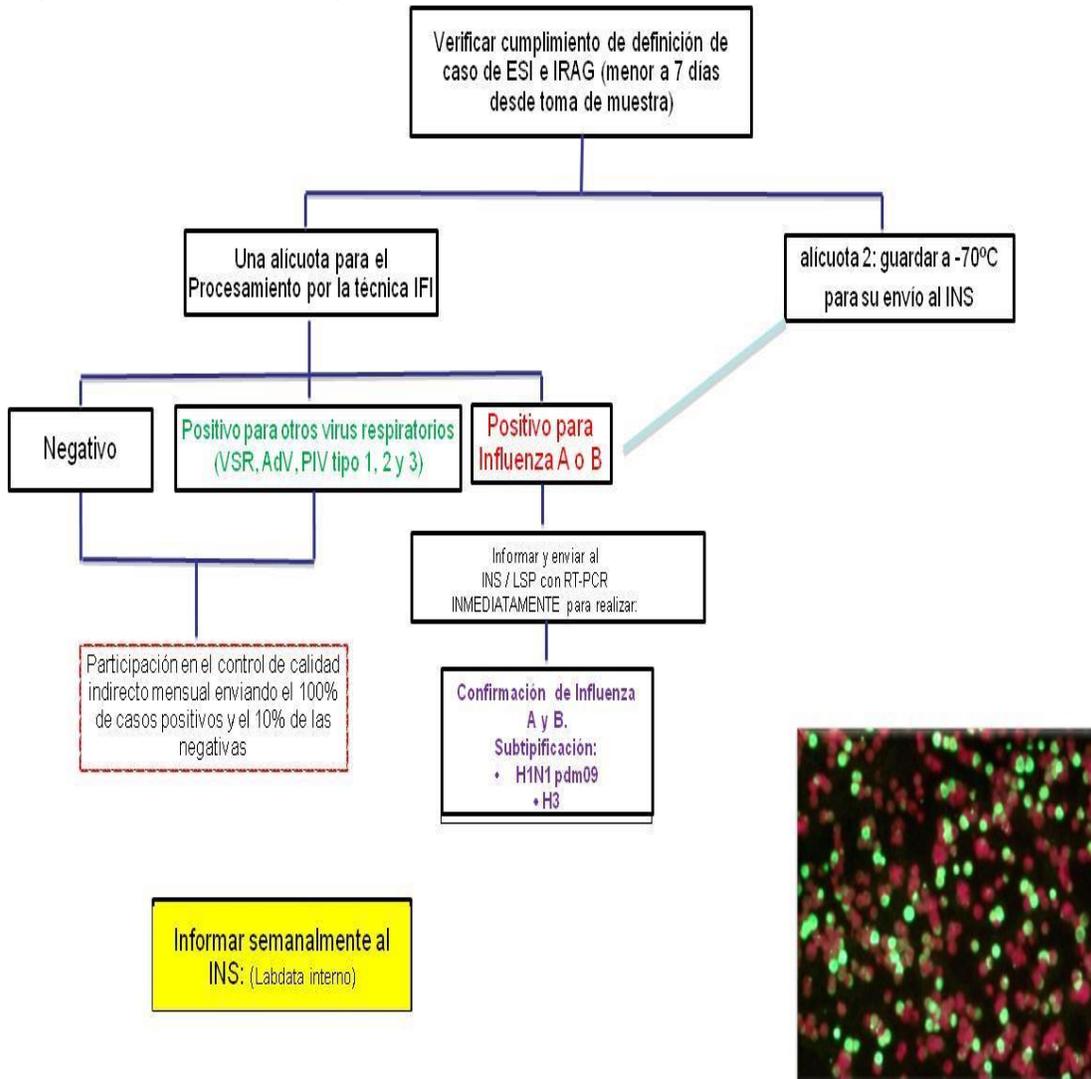
1.1.32

1.1.33 5.3 Funciones de los laboratorios públicos y privados o referentes para el evento en el nivel municipal y/o local

- ✓ Informar a los laboratorios de salud pública las técnicas de diagnóstico que realizan en sus laboratorios IRA.
- ✓ Asegurar todos los insumos y reactivos para la recolección de muestras respiratoria
- ✓ Asegurar la vigilancia de las diferentes estrategias de la vigilancia de IRA
- ✓ Realizar la remisión de muestras con la documentación establecida para la vigilancia del evento).
- ✓ Informar a los epidemiólogos y al LSP de los casos confirmados por el laboratorio.
- ✓ Las UPGD centinelas seleccionadas para la vigilancia de ESI e IRAG respectivamente, son Responsables de recolectar muestras de manera semanal, captar correctamente el caso de ESI-/IRAG, IRAG y Mortalidades.

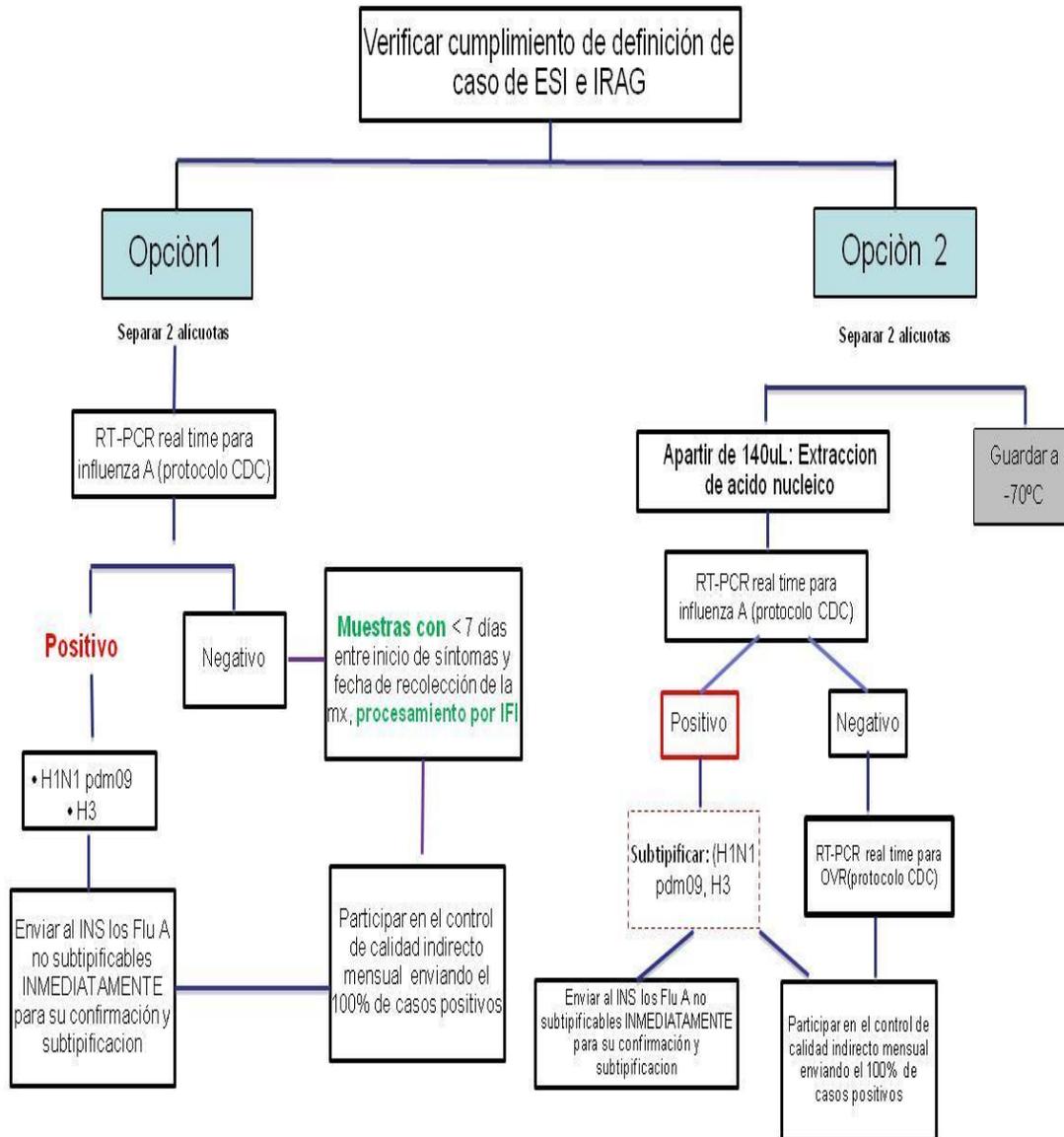
- ✓ Embalar correctamente las muestras y anexar toda la documentación requerida para el envío de las mismas.

Figura No. 11: LSP que hacen detección del virus de la influenza y otros virus respiratorios solamente por IFI



Fuente: Grupo de Virología – SRNL

Figura No. 12: LSP que hacen detección del virus de la influenza y otros virus respiratorios por Real -Time RT-PCR



Fuente: Grupo de Virología – SRNL

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Academy of Pediatrics. En: Report of the Committee on Infectious Diseases. Respiratory syncytial virus. In: Pickering LK, ed. Red Book: American Academy of Pediatrics. 24 ed. 2000:483-7.
2. Anderson L, Hierholzer J, Tsou C, Hendry R, Fernie B, Stone Y, et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. J Infect Dis 1985; 151:626-33.
3. Arbiza J, Delfraro A, Frabasile. Molecular epidemiology of human in Uruguay: 1985-2001. Memorias. Instituto Oswaldo Cruz. 2005; 100:221-30.
4. Avellón A, P. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infection by a generic polymerase chain reaction. Journal of virological methods. 2001:92, 113-120.
5. Bellau - Pujol S. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. Journal of virological methods. 2005:126, 53-63.
6. Boivin G, M. I. (2004). Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. Emerg Infect Dis, 10, 1.154-7.
7. Boivin G, Mackay I, Sloots T, Madhi S, Freymuth F, Wolf D, et al. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. Emerg Infect Dis 2004; 10:1.154-7.
8. Cane P, Matthews D, Pringle C. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. J Gen Virol 1991; 72:2091-6.
9. Carballal G, Videla C, Sequeira M, Mistchenko A, Requeijo P, Arbiza J. Respiratory syncytial virus: changes in prevalence of subgroups A and B among Argentinian children, 1990 – 1996. J Med Virol 2000; 61:275-79.
10. Chan P, Tam J, Lam C, Chan E, Wu A, Li C, et al. Human Metapneumovirus detection in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. Emerg Infect Dis 2003; 9:1058-63.

11. Cheuk DK, Tang TW, Chan KH, Woo PC, Peris MJ, Chiu SS. Rhinovirus infection in hospitalized children in Hong Kong: a prospective study. *Pediatric infect Dis J* 2007; 26:995-1000.
12. Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML Casas I, Perez Breña P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004; 72:484-95.
13. Comité nacional de neumonología. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones respiratorias agudas bajas en menores de 2 años. *Arch Argentina pediátrica*. [Seriada en línea] 2007: [159-176]. Disponible en: URL http://www.sap.org.ar/staticfiles/archivos/2006/arch06_2/159.pdf
14. Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fres cells. *J Clin Microbiol* 2004; 42; 79 -82.
15. Francisco Pozo, I. C.-B. Aplicación de los métodos moleculares al diagnóstico y el estudio epidemiológico de las infecciones respiratorias causadas por virus. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008: 26, 15-25.
16. Garcia-Garcia ML, Ordobas M, Calvo Rey C, Gonzalez M, Aguilar J, Arreguigu A, et al. Infecciones virales de vías aéreas inferiores en lactantes hospitalizados; etiología, características clínicas y factores de riesgos. *Esp Pediatr* 2001; 55:101-7
17. García Garcia ML, Calvo Rey C, Martin del Valle F, Lopez-Huertas MR, Casas FL, Diaz-Delgado R, Perez- Breña P. Respiratory infections due to metapneumovirus in hospitalized infants. *An Pediatric, Barcelona* 2004; 61:213-218
18. Kaplan N, Dowe W, Abu-Zeis A, Shamon H, Adb Eldayem S, Hart A, Human Bocavirus infection among children, Jordan. *Emerg Infect Dis J* 2006; 12:1418-9.
19. Kesebir D, Vasquez M, Wibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human Bocavirus infection in young children in the United States molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006; 194:1276-82.
20. Lau SK, Woo PC, Yip CC, Tse H, Tsoi HW, Cheng VC, et al. Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol*. 2006; 44; 2063-71

21. López-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, Garcia-Garcia ML, Coiras MT, Pérez-Braña P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods* 2005; 129:1-7
22. Protocol for detection and characterization of Influenza. Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2007.
23. Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las Infecciones Respiratorias Agudas de etiología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. 2003.
24. Ramirez GL, Vera V, Villamil LU. Cultivos de células animales. Universidad Nacional de Colombia. 2005
25. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA*, 282, 1440–1446.
26. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses 1,2,3 and 4. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:1564-9
27. Thompson, W. S. Mortality associated with influenza and respiratory Syncytial virus in the United States. *JAMA*. 2003:179-186.
28. Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen, Kuiken T, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001, 7:719-24
29. Viral RNA Mini Handbook For purification of RNA from Plasma, FERUM, Cell-free body fluids, Cell- culture supernatants, QIAGEN. Qiamp 2a Edition, 2005.
30. Zheng X, Quianzon S, Mu Y, Katz BZ. Comparison of two new rapid antigen detection assays for respiratory Syncytial virus with another assay and shell vial culture. *J Clin Virol* 2004; 31; 130-3.
31. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Guía operativa para la vigilancia nacional intensificada de IRAG. 2010.

32. CAMPS, M, et al. Metapneumovirus humano. Revista Med Clin. 2005.

33. GONZALO, R, et al. Infecciones víricas del tracto respiratorio inferior. Pediatría Integral.2012; XVI (1):23-34.

