KIT DE REACTIVOS PARA INFLUENZA DE LA OMS 2014-2015 PARA IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS DE INFLUENZA

Producido y distribuido por:

CENTRO COLABORADOR DE LA OMS PARA VIGILANCIA, EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL DE INFLUENZA
Situado en:
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
División de Influenza
Subdivisión de Vigilancia y Diagnóstico de Virus, G-16
1600 Clifton Road, NE
Atlanta, Georgia 30333, U.S.A.

Email: *InfluenzaVirusSurvei@cdc.gov*
Fax: 404-639-0080

En Colaboración con
Influenza Reagent Resource (IRR) y American Type Culture Collection (ATCC)
http://www.influenzareagentresource.org

CONTENIDO

I. Contenido del Kit de Reactivos para Influenza..... 2
A. Reactivos para Identificación de Muestras de Campo por IH……..…. 2
B. Reactivos para Diagnóstico Serológico…… 3
II. Prueba de Hemaglutinación y Inhibición de Hemaglutinación……..... 4
A. Principios de HA-IH…….. 4
B. Kit de Reactivos de la OMS necesarios para la IH……... 4
C. Protocolo para Identificación de Aislados de Campo por IH…… 5
III. Interpretación de los Resultados de IH usando los Reactivos del Kit…….. 11
A. Solución de Problemas…….. 12
B. Referencias…….. 13
IV. Sistema Global de Vigilancia y Respuesta a la Influenza (GISRS)…… 14
V. Centros Colaboradores de la OMS…… 14
VI. Sumisión de Especímenes …… 16
A. Directrices…… 16
B. Información de envío…… 17
C. Personas Contacto para Recibimiento de Aislados…….. 17
D. Solicitud de Reactivos Adicionales…….. 17
E. Solicitud de Permites para Envío para los Estados Unidos..…….. 17
F. Asistencia en Solución de Problemas Laboratorales……. 18

I. Contenido del Kit de Reactivos para Influenza

A. Reactivos para Identificación de Muestras de Campo por IH

La colección de reactivos para inhibición de la hemaglutinación consiste en antígenos y antisueros para identificación de aislados de influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2), linaje B/Yamagata/16/88 o linaje Victoria/2/87 de huevos o cultivo de tejidos.

Lista de reactivos de Influenza A para IH:

1 @ 10 ml - Antígeno Controle de Influenza A(H1N1)pdm09 (A/California/07/2009 NYMC X-179A), BPL inactivado
Lot 1314H1AG (Cat. No. FR-1184)
1 @ 1 ml - Antisuero Referencia de Carnero de Influenza A(H1N1)pdm09
Lot 1314H1AS (Cat. No. FR-1213)
1 @ 10 ml - Antígeno Controle de Influenza A(H3) (A/Texas/50/2012 X-223), BPL inactivado
Lot 1314H3AG (Cat. No. FR-1185)
1 @ 1 ml - Antisuero Referencia (mixto de Hurón y Carnero) de Influenza A(H3)
Lot 1314H3AS (Cat. No. FR-1214)

Lista de reactivos de Influenza B para IH:

1 @ 10 ml - Antígeno Controle de Influenza B, linaje Yamagata (B/Massachusetts/2/2012 NYMC BX-51B), BPL inactivado
Lot 1314BYAG (Cat. No. FR-1186)
1 @ 1 ml - Antisuero Referencia de Carnero de Influenza B, linaje B/Yamagata
Lot 1314BYAS (Cat. No. FR-1215)
1 @ 10 ml - Antígeno Controle de Influenza B, linaje Victoria (B/Brisbane/60/2008), BPL inactivado
Lot 1314BVAG (Cat. No. FR-1188)
1 @ 1 ml - Antisuero Referencia de Carnero de Influenza B, linaje B/Victoria
Lot 1314BVAS (Cat. No. FR-1216)

Otros reactivos para IH:

1 @ 1 ml - Suero Control Normal de Carnero de Influenza, Lot 61105827 (Cat. No. FR-49)
1 @ 25 ml - Enzima Destructora de Receptores (DENKA), Lot 454061 (Cat. No. FR-50)

Almacenar los antígenos de 4°C a 8°C y conservar el antisuero reconstituido en alícuotas de -20°C a -40°C.

****AVISOS IMPORTANTES PARA EL USO DEL KIT DE REACTIVOS PARA INFLUENZA DE LA OMS****

Estos reactivos no están destinados, ni evaluados, para su uso en los procedimientos de prueba que no sean las pruebas de IH para la identificación de cepas de campo. **Los antisueros de los kits deben ser utilizados para la tipificación o subtipificación de virus influenza, pero no deben ser utilizados para caracterización antigénica detallada.** Para identificar un aislado viral, los resultados de cada aislamiento deben ser comparados con aquellos de los controles del antígeno. Un aislado viral es identificado como un tipo o subtipo particular si el aislado de campo reacciona con un antisuero teniendo un título de IH cuatro veces o mayor que sus títulos con otros antisueros.

Se nota que el antígeno de referencia de influenza A (H3) (Cat. No. FR-1185, Lote # 1314H3AG) y algunos virus H3N2 pueden tener reacción cruzada con otros antisueros de referencia de los kits de la OMS 2014-2015 (página 10). Para reducir tales reactividad inespecífica, se recomienda la inactivación térmica a 64°C por 30 minutos de los antisueros después del tratamiento con RDE.

Antígenos de Influenza A(H1N1)pdm09 y H3 también pueden ser utilizados para el diagnóstico serológico por IH. Antígenos de influenza B inactivados con beta-propiolactona (BPL) son para ser utilizados en la identificación de cepas de campo, mientras que antígenos de influenza B extraídos con éter son recomendados para diagnóstico serológico (ver Diagnóstico Serológico, página 3).

B. Reactivos para Diagnóstico Serológico

Los antígenos de IH de influenza A inactivados con BPL son adecuados para uso en el diagnóstico serológico de infecciones de influenza, mientras que antígenos de influenza B **éter extraídos** deben ser utilizados para el diagnóstico serológico de la infección.

Lista de reactivos para diagnóstico serológico:

1 @ 25 ml - Enzima Destructora de Receptores (DENKA). Repuestos viales limitado (Cat. No. FR-50)
1 @ 10 ml - Antígeno Controle de Influenza A(H1N1)pdm09 (A/California/07/2009 NYMC X-179A), BPL inactivado Lot 1314H1AG (Cat. No. FR-1184)
1 @ 10 ml - Antígeno Controle de Influenza A(H3) (A/Texas/50/2012 X-223), BPL inactivado Lot 1314H3AG (Cat. No. FR-1185)
1 @ 5 ml - Antígeno Controle de Influenza B, linaje Yamagata (B/Massachusetts/2/2012 NYMC BX-51B), **Éter Extraído** Lot 1314BYEX (Cat. No. FR-1187)
1 @ 5 ml - Antígeno Controle de Influenza B, linaje Victoria (B/Brisbane/60/2008), **Éter Extraído** Lot 1314BVEX (Cat. No. FR-1189)

Almacenar los antígenos de 4°C a 8°C.

Para superar la baja sensibilidad de la prueba de IH en la detección de anticuerpos pos-infección por influenza B, antígenos de influenza B éter extraídos han sido suministrado. Debido a la sensibilidad aumentada del antígeno éter extraído, este debe ser utilizado SOLAMENTE EN DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO y no debe ser utilizado como un antígeno de referencia cuando se realizar la prueba de IH para identificar aislados.

Experiencia anterior comparando antígeno éter extraído a antígeno de virus entero en el diagnóstico serológico de infecciones por influenza B ha indicado que el antígeno éter extraído tiene aproximadamente una sensibilidad 8 veces mayor sensibilidad que el antígeno de virus entero en la detección de anticuerpos de suero humano. Este aumento de la sensibilidad permite una detección más fiable de IH que se eleva después de una infección por influenza B (Kendal y Cate, 1983).

Los antígenos para diagnóstico serológico son proporcionados para los laboratorios donde se prueban sólo un pequeño número de pares de sueros de fase aguda y convaleciente. Grandes encuestas serológicas o evaluaciones de respuestas de vacunas requieren cantidades mayores de antígeno. Antígenos pueden ser preparados localmente utilizando ya sea aislados recientes adaptados en laboratorio, o utilizando virus referencia vivos obtenidos de un Centro Colaborador de la OMS.

II. Prueba de Hemaglutinación y Inhibición de Hemaglutinación

A. Principios de HA-IH

El virus influenza contiene en su superficie muchas moléculas de hemaglutinina (HA), una proteína que se une específicamente a receptores contiendo ácido siálico, tales como aquellos encontrados en la membrana plasmática de los glóbulos rojos (hematíes). Cuando los glóbulos rojos son mezclados con el virus influenza en la proporción apropiada, el virus tiende a formar puentes entre los glóbulos rojos y cambia sus patrón normal de sedimentación. Esto es llamado de hemaglutinación. El método tradicional para la identificación de aislados de campo de influenza se aprovecha de esta propiedad. La unión específica del anticuerpo a sitios antigénicos en la molécula de HA interfiere con la unión entre la proteína viral HA y los receptores en la membrana de los glóbulos rojos. Este efecto inhibe la hemaglutinación y es la base para la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH).

La prueba de IH fue desarrollado por Hirst (1941) y posteriormente modificado por Salk (1944). En general, la prueba de IH es realizada mezclando el antígeno viral estandarizado con diluciones seriadas de suero, adicionando suspensión de glóbulos rojos para determinar unión específica del anticuerpo a la molécula de HA. Hoy en día, la prueba es frecuentemente realizada utilizando placas de microtitulación.

Un protocolo general está disponible a partir de la OMS en:
http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/

B. Kit de Reactivos de la OMS necesarios para IH

Antígenos HA de Influenza. Antígenos de Influenza A(H3), A(H1N1)pdm09 y B consisten de líquido alantoideo infectado inactivado con BPL. Las preparaciones varían dependiendo de las cepas seleccionadas para la vacuna y son derivadas ya sea un reordenamiento hecho con la cepa vacunal o una cepa de virus tipo salvaje de referencia comparable. Antígenos serológicos de influenza B son extraídos con éter para aumentar la sensibilidad. ***Almacenar el antígeno líquido de 4°C a 8°C.*** Los títulos de HA son determinados después del envase y señalo en la etiqueta, pero pueden caer durante el almacenamiento. Pruebe todos los antígenos antes de su uso inicial.

Antisueros de Referencia de Influenza para IH. Antisueros hiperinmunes son preparados en carnero mediante múltiples inyecciones intramusculares con HA purificada de la cepa de vacuna de influenza o una cepa de referencia. Antisueros de hurones son preparados en hurones mediante inoculación intranasal con virus de referencia. Estos antisueros permiten la identificación de virus influenza tipo A(H3N2), A(H1N1)pdm09 y tipo B en aislados de influenza humana y son también utilizados como antisuero de control positivo en los ensayos serológicos. El volumen de producto está descrito en la etiqueta del envase. Reconstituir a ese volumen con agua destilada. ***Almacenar suero liofilizado de 4°C a 8°C pero el suero reconstituido debe ser almacenado de -20°C a -40°C (+/- 5 ° C).***

Enzima Destructora de Receptores (RDE). La RDE suministrada es una preparación comercial y debe ser utilizada de acuerdo con el protocolo en los procedimientos. Este lote de RDE debe ser utilizado en el tratamiento de los antisueros de referencia proporcionado y puede ser utilizado en el tratamiento de sueros humanos para diagnóstico serológico. Este kit ha sido probado solamente con este lote de RDE y no ha sido verificado con ningún otro producto.

Aislados de campo. Aislamiento de influenza puede ser realizado en huevos embrionados o cultivo de tejidos. El cultivo de tejidos de uso más frecuente y recomendado es células MDCK, sin embargo, cultivo de tejido primario de riñón de mono comercial es utilizado por muchos laboratorios.

Otros Materiales (non incluidos en el kit):

1. Glóbulos rojos en solución de Alsever. Glóbulos rojos de pollo (ver nota #1 en Solución de problemas), pavo, humano tipo "O", o conejillo de Indias pueden ser utilizados.

2. Tampón fosfato salino (PBS), pH 7,2.
   a. Preparar tampón fosfato stock 25 veces concentrado (25X) contiendo en 100 ml:
      2,74 g de fosfato de sodio bibásico (Na2HPO4) y 0,79 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado (NaH2PO4). H2O).
   b. Para preparar el PBS, mezclar y disolver en agua destilada desionizada, y csp 1 litro:
      40 ml de tampón fosfato 25X y 8,5 g de cloruro de sodio (NaCl).

c. Después de mezclar bien, verificar el pH = 7,2 ± 0,1. Ajustar el pH con NaOH 1N o HCl 1N, si necesario.
d. Autoclavar o filtrar para esterilizar.
e. Almacenar PBS abierto, pH 7,2 de 4°C a 8°C por no más de 3 semanas.

3. Solución salina fisiológica, 0,85%
a. Preparar una solución stock 20X disolviendo 170 g de NaCl en agua desionizada csp 1000 ml.
b. Esterilizar en autoclave a 121°C.
c. Para preparar la solución salina fisiológica, 0,85% de NaCl, añadir 50 ml de solución stock 20X a 950 ml de agua desionizada.
d. Esterilizar en autoclave a 121oC.
e. Almacenar la solución salina fisiológica abierta de 4°C a 8°C por no más de 3 semanas.

4. Equipo de microtitulación incluyendo platos y tapas.

C. Protocolo para Identificación de Aislados de Campo por IH

El siguiente protocolo es recomendado para la identificación de cepas de campo de influenza por IH. El procedimiento está escrito asumiendo el uso de microplacas de 96 pocillos. Placas de microtitulación con 96 pocillos en forma de V son utilizadas con glóbulos rojos aviar, conejillo de indias, o humano tipo O. Placas de microtitulación en forma de U pueden ser utilizados con eritrocitos de conejillo de indias o humanos tipo O. Los pocillos de la microplaca son designados A-H en el lado de 8 cm y 1-12 en el lado de 12 cm, de modo que así el pocillo #1 es designado como A1 (Figura 1). Básicamente, el procedimiento de prueba de IH envuelve (1) el tratamiento de los sueros para la eliminación de inhibidores no específicos, (2) la adsorción de los sueros para la eliminación de las aglutininas no específicas, (3) titulación de HA de antígenos control de referencia y de las cepas de campo, (4) preparación de dilución de antígeno estandarizado conteniendo las unidades adecuadas, y, finalmente, (5) la prueba de IH para identificación de cepas de campo. La prueba de IH también pueden ser utilizadas para el diagnóstico serológico o encuestas para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos en suero humano y animal.

I. ESTANDARIZACIÓN DE GLÓBULOS ROJOS

Si se utiliza glóbulos rojos de pollo o pavo, la concentración final de HA/IH debe ser en una concentración de 0,5%. Una mayor concentración de 0,75% para glóbulos rojos de conejillo de indias y humano tipo "O" mejora la lectura. Aunque la mayoría de los laboratorios tienen un procedimiento para la estandarización de las células, el siguiente procedimiento es utilizado en el Centro Colaborador de la OMS como un ejemplo.

1. Los glóbulos rojos son normalmente suministrados en solución de Alsever. Para lavar las células, filtrar un volumen (45 ml) a través de gasa, y centrifugar a 1.200 RPM (aproximadamente 300 x g) durante 5 min. (~ 500 x g para las células rojas de la sangre conejillo de indias).
2. Aspirar la solución de Alsever y añadir 50 ml de PBS (pH 7,2 a 7,4) para lavar. Hacer movimiento suave en espiral para mezclar y centrifugar a 1.200 RPM (aproximadamente 300 x g) durante 5 minutos para obtener células empacadas. Aspirar el sobrenadante.
3. Repita el lavaje con PBS dos o tres veces, hasta que el sobrenadante esté claro.
4. Al lavaje final, centrifugar a 1.200 RPM (aproximadamente 300 x g) durante 10 min. (~ 500 x g para las células rojas de la sangre conejillo de indias).
5. Diluir las células empacada para la concentración apropiada basado en volumen de células empacadas. La concentración puede ser comprobada y ajustada usando un hemocitómetro.
Nota: Se ha observado que la mayoría de los aislados de A(H3) actual no logran aglutinar glóbulos rojos de pollo. (Ver Solución de problemas, página 11)

II. TRATAMIENTO DE LOS SUEROS

A. Eliminación de inhibidores no específicos de suero

Los sueros de muchas especies animales contienen inhibidores no específicos de la hemaglutinación que, a menos que eliminados, puede llevar a resultados falsos-positivos. Diferentes métodos pueden ser utilizados para eliminar los inhibidores no específicos, sin embargo, se recomienda el tratamiento de los antisueros de referencia con la enzima destructora de receptores (RDE) suministrada en este kit. Si se sospecha que los inhibidores no se han eliminado completamente una concentración mayor de RDE puede ser utilizada. Si el

tratamiento con RDE no tiene éxito, los métodos alternativos pueden ser (1) calor y peryodato o (2) tripsina, calor y peryodato. Utilice el siguiente procedimiento con el RDE suministrado en este kit.

Procedimiento de tratamiento con RDE

1. Reconstituir el RDE con 25ml de solución salina fisiológica.
2. Añadir 3 vol de RDE a 1 vol de suero (0,3 ml de RDE + 0,1 ml de suero). Incubar 12-18 horas a 37°C.
3. Calentar a 56°C durante 30 min. Añadir 6 volúmenes de solución salina fisiológica. (0,6 ml adicionales a solución de 0,4 ml de RDE y suero)

B. Eliminación de aglutininas inespecíficas

Sueros tratados pueden contener sustancias que aglutinan no específicamente los glóbulos rojos. Para determinar la presencia de aglutininas no específicas, siga el procedimiento descrito en la Sección V para controles de suero (añadiendo PBS en lugar del antígeno). Añadir los glóbulos rojos y incubar a temperatura ambiente hasta que los glóbulos rojos se han asentado completamente en el control de células. La presencia de hemaglutinación en los pocillos de suero indica la presencia de aglutininas no específicas. Estas aglutininas pueden ser eliminadas con el siguiente procedimiento.

1. Para un volumen de glóbulos rojos empacados, añadir 20 volúmenes de suero RDE tratado.
2. Mezclar bien y incubar de 4°C y 8°C, mezclando en intervalos para resuspender las células.
3. Después de 1 hora, centrifugar a 300 x g durante 5 minutos.
4. Retirar cuidadosamente el suero adsorbido sin molestar a las células empacadas.
5. Repetir los controles de suero como descrito en la Sección V. Adsorber con los glóbulos rojos hasta los controles séricos estén negativos.

III. TITULACIÓN DE HA DE ANTÍGENOS CONTROL DE REFERENCIA Y AISLADOS DE CAMPO

Los antígenos HA deben ser titulados antes de cada prueba de IH. La Figura 1 es un esquema de titulación de HA.

1. Añadir 50 µl de PBS (pH 7,2) a los pocillos #2 hasta 10 de cada hilera de letras en una placa de microtitulación. (Use una placa de fondo en V si se utiliza glóbulos rojos aviares; una placa de fondo U puede ser utilizada para glóbulos rojos de mamíferos.)
2. Añadir 100 µl de cada antígeno al primer pocillo de la hilera de letras que será diluida.
3. Dos o más pocillos de control de glóbulos pueden ser preparados en cualquier pocillo das hileras 11 y 12 mediante la adición de 50 µl de PBS. Estos pocillos sirven como indicadores de un patrón de asentamiento completo sin antígeno.
4. Hacer diluciones seriadas dobles de cada antígeno, transfiriendo 50 µl de pocillo a pocillo y descartando el 50 µl final después da hilera 10. Las diluciones de 2 veces serán de 1:1 a 1:512.
5. Añadir 50 µl de suspensión de glóbulo rojo a cada pocillo en la placa. Mezclar mediante el uso de un vibrador mecánico o agitando manualmente las placas.
6. Incubar las placas a temperatura ambiente (22 a 25°C) durante 30 minutos si utilizando células aviares, pero 60 minutos para los glóbulos rojos de conejillo de Indias para permitir la sedimentación celular completa.
7. Registrar los resultados e interpretar.

Hemaglutinación ocurre cuando los glóbulos rojos están en suspensión después de que el control de RBC se ha asentado completamente. Esto es generalmente registrado usando un símbolo "+". Un símbolo "O" es utilizado para registrar la ausencia de hemaglutinación cuando se forma un botón compacto en el fondo de los pocillos; este botón correrá si la placa está inclinada. Este es el caso con glóbulos rojos aviares, sin embargo con glóbulos rojos de conejillo de indias o humanos tipo O, la ausencia de hemaglutinación aparecerá como un "halo" o círculo de células sedimentadas en el fondo de los pocillos. Los glóbulos rojos control deben estar completamente sedimentados como un botón compacto o "halo". La dilución más alta del virus que causa la hemaglutinación completa es considerada el punto final de la titulación de HA. Por ejemplo, si la última dilución mostrando aglutinación completa es de 1:128, entonces el título de HA es el recíproco de la dilución, que es 128.

IV. PREPARACIÓN DE ANTÍGENO ESTANDARIZADO PARA PRUEBA IH Y PROCEDIMIENTO DE RE-TITULACION

Una "unidad" de la hemaglutinación no es una medida de una cantidad absoluta de virus, pero es una unidad operacional dependiente del método utilizado para la titulación de HA. Una unidad de HA se define como la cantidad de virus necesaria para aglutinar un volumen igual de una suspensión de glóbulos rojos estandarizada.

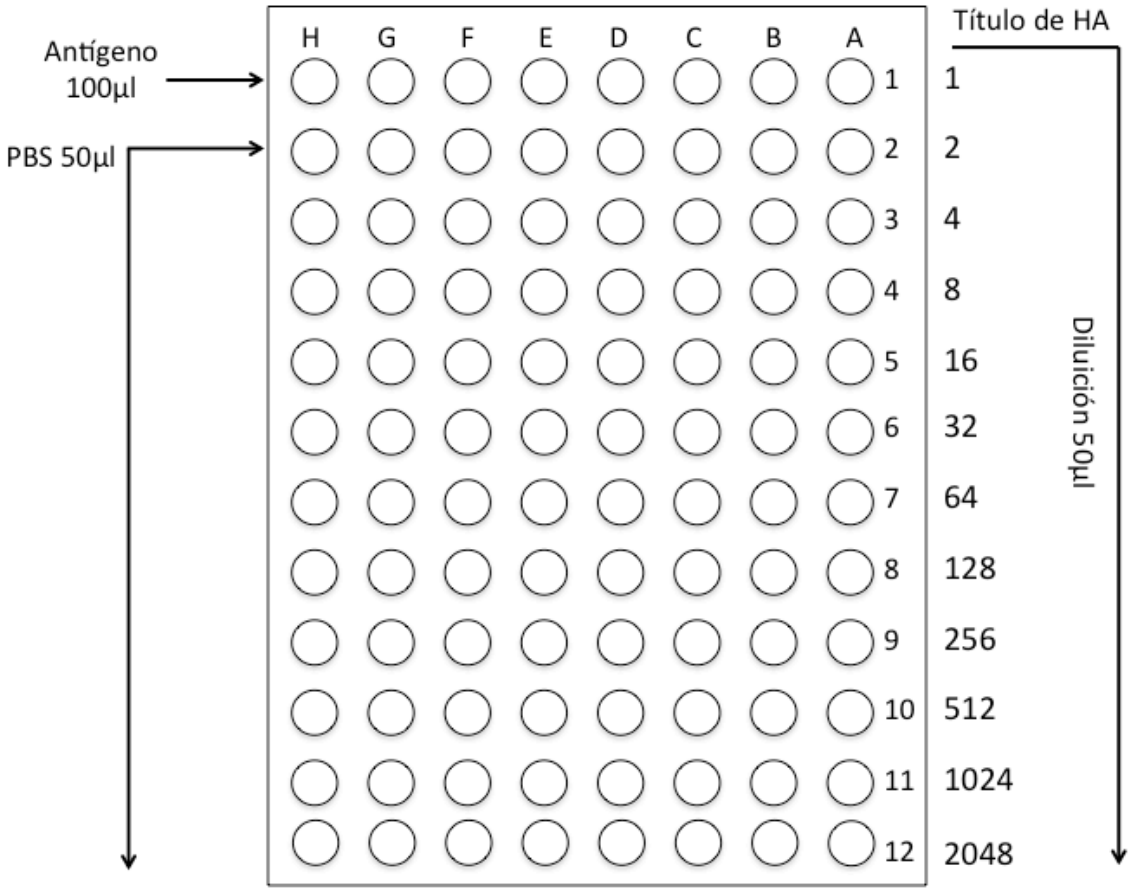
1. Determinar el volumen de antígeno estandarizado necesario para la prueba de IH. Por ejemplo, 1 ml de antígeno probará 5 sueros, cada uno de los cuales está diluido en 8 pocillos, con 25 µl de antígeno añadido a cada pocillo (5 sueros X 8 pocillos X 25 µl = 1 ml de antígeno estandarizado). Preparar un volumen adicional de 1,0 ml para "re-titulación" y pérdida.

2. El estándar para la prueba de IH es 4 unidades de antígeno HA añadido a 2 veces diluciones de antisueros. Una vez que 25 ml de antígeno son utilizados por prueba, una dilución viral que contiene 4 unidades HA / 25 µl o 8 unidades HA / 50 µl es necesario. Calcular la dilución de antígeno dividiendo el título de HA, que es basado en 50 µl, por 8. Por ejemplo, un título de HA de 128 dividido por 8 es 16. Mezcla 1 parte de virus con 15 partes PBS para obtener la volumen deseado de antígeno estandarizado (Ej.: añadir 0,1 ml de antígeno a 1,5 ml de PBS). Calcular y preparar la dilución. Mantener un registro de la dilución preparada.

3. Realizar una “re-titulación" para verificar las unidades mediante la realización de una segunda prueba de HA. Antígenos estandarizados deben tener un título de HA de 8 unidades HA / 50 µl. Este título irá hemaglutinar los primeros cuatro pocillos de la placa de re-titulación. Si un antígeno no titule 8, este debe ser ajustado por consiguiente mediante la adición de más antígeno para aumentar as unidades o mediante la dilución para disminuir las unidades. Por ejemplo, si un virus tiene un título de 16 entonces el antígeno de prueba debe ser diluido al doble. A la inversa, si un virus tiene un título de 4 un volumen igual de virus debe ser añadido al antígeno de prueba que se utilizó cuando el antígeno fue diluido inicialmente. Esto duplicará la concentración de virus en el antígeno de prueba para dar un título de 8. Continuar ajustando la concentración de antígeno hasta 4 unidades HA / 25 µl (8 unidades / 50 µl) se obtiene. ***Almacenar el antígeno diluido de 4^{o}C a 8^{o}C y utilizar en del mismo día.***

4. Registrar los resultados.

Figura 1
Esquema para Titulación de HA



I. Diluir antígenos y aislados de campo

Placa #1	Placa #2
A - Antígeno Controle de Influenza A(H1N1)pdm09 (A/California/07/2009 NYMC X-179A)	A - Aislado de campo #1
B - Antígeno Controle de Influenza A(H3) (A/Texas/50/2012 X-223)	B - Aislado de campo #2
C - Antígeno Controle de Influenza B (B/Massachusetts/2/2012 NYMC BX-51B)[1]	C - Aislado de campo #3
D - Antígeno Controle de Influenza B (B/Brisbane/60/2008)[1]	D - Aislado de campo #4
E - Antígeno Controle de Influenza B Éter Extraído (B/Massachusetts/2/2012 NYMC BX-51B)[2]	E - Aislado de campo #5
F - Antígeno Controle de Influenza B Éter Extraído (B/Brisbane/60/2008)[2]	F - Aislado de campo #6
G - Blanco	G - Blanco
H - Control de Células	H - Control de Células

1. B/Massachusetts/2/2012 es a linaje referencia actual para la linaje B/Yamagata/16/1988. B/Brisbane/60/2008 es a linaje referencia actual para la linaje B/Victoria/02/1987.
2. Las titulaciones HA de antígeno controle éter extraído son realizadas para diagnóstico serológico.

II. Anãdir 50µl de glóbulos rojo estandarizados

III. Incubar y registrar los resultados

V. PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS

Pruebas de inhibición de la hemaglutinación para aislados de campo deben ser conducidas con todos los antisueros suministrados [A(H1N1)pdm09, A(H3), linaje B Yamagata y B Victoria]. Al mismo tiempo, los antígenos de control suministrados deberán ser incluidos en la prueba de IH contra cada antisuero como mostrado en la Tabla 1 de la Sección III. La interpretación de los resultados de IH utilizando los reactivos del kit 2014-2015 (página 10) para la identificación del tipo / subtipo se basa en el título IH más alto obtenido, que debe ser por lo menos 4-8 veces o más que cualquier patrón de reacción cruzada observada.

En este punto, (1) los antisueros de referencia han sido tratados con RDE y (2) los antígenos control de referencia y antígenos de aislado de campo han sido estandarizados para 4 unidades HA / 25 µl. La Figura 2 es un esquema para la prueba de IH. Este esquema puede ser utilizado para dos antígenos por placa y un conjunto completo de cinco antisueros de referencia y un suero control negativo. Una palca extra es requerida para 1) suero control en que PBS es añadido en lugar de antígeno; 2) Control de los glóbulos rojos en que sólo glóbulos rojos y PBS son añadido.

1. Preparar diluciones de antisueros RDE tratados en la placa de microtitulación apropiada de acuerdo con los glóbulos rojos siendo utilizado, primero mediante la adición de 25 µl de PBS a los pocillos B a H (B1 - H12) de cada columna numerada.

2. Utilizando el conjunto de sueros tratados (6 sueros), añadir 50 µl de cada suero al primer pocillo de la columna apropiada numerada. Por ejemplo, el suero #1 debe ser añadido al pocillo A1 y pocillo A7; suero #2 a A2 y A10; etc. La dilución inicial del suero tratado es 1:10.

3. Preparar dobles diluciones seriadas de los sueros tratados mediante la transferencia de 25 ml desde el primer pocillo de las columnas numeradas 1-12 a los pocillos sucesivos. Descartar el 25 µl final después de la hilera H.

4. Añadir 25 µl de antígeno control estandarizado #1 para todos los pocillos de un conjunto completo de sueros tratados diluido (Ej.: A1 - H6). Continuar con el resto de los antígenos control estandarizados y antígenos de prueba de campo.
   NOTA: Cuatro unidades de HA son añadidas a la prueba en 25 µl porque los cálculos de la unidad HA son basados en un volumen de 50 µl.

5. Añadir 25 µl de PBS en lugar del antígeno a la placa control de suero.

6. Mezclar el contenido de las placas por agitación en un vibrador mecánico durante 10s o por agitación manual de las placas.

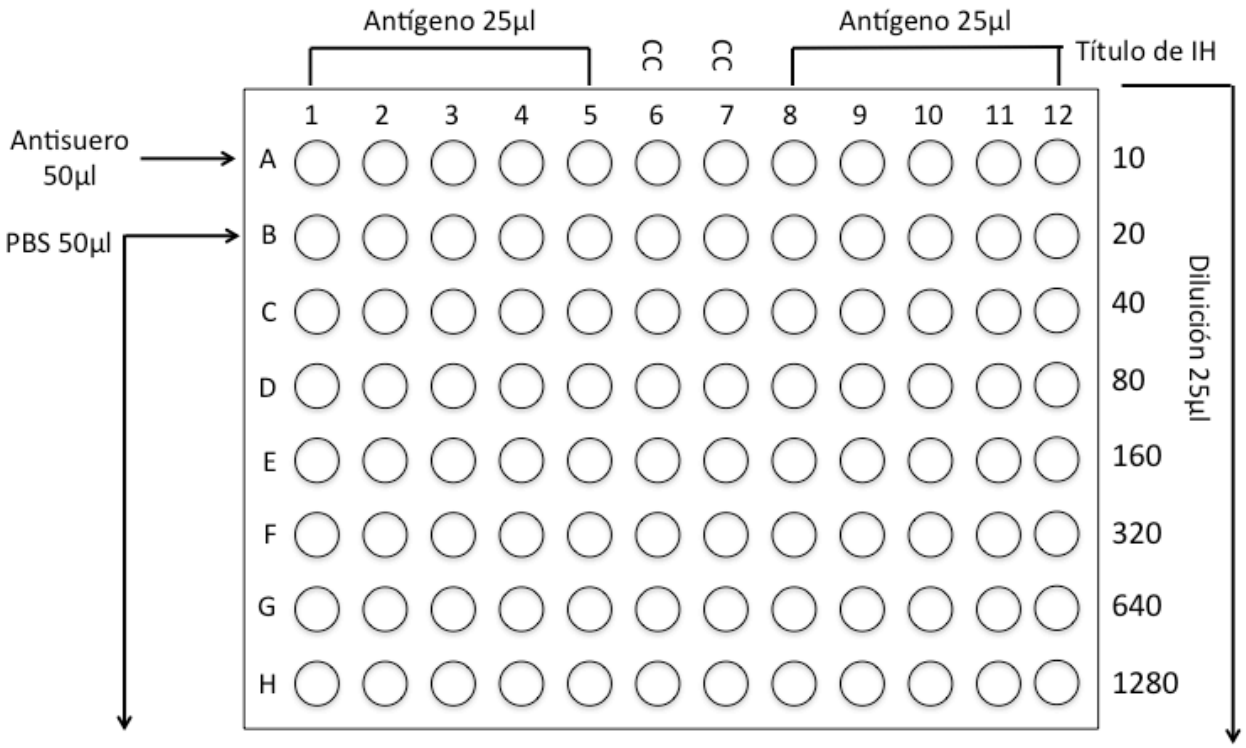
7. Cubrir las placas e incubar a temperatura ambiente (22^{o} a 25^{o}C) durante 15 minutos.

8. Añadir 50 µl de glóbulos rojos estandarizados a todos los pocillos. Mezclar como antes.

9. Cubrir las placas y permitir que los glóbulos rojos se asiente a temperatura ambiente (22^{o} a 25^{o}C) durante el tiempo apropiado de acuerdo con los glóbulos rojos siendo utilizados.

10. Registrar y interpretar los resultados. Símbolos de "+" para la HA y la "o" de la ausencia de HA o inhibición de HA pueden ser utilizados. El título de IH es la última dilución del antisuero que inhibe completamente HA.

Figura 2
Esquema para Identificación por IH de Aislados de Campo



I. Preparar diluciones de los antisueros

1 - Antisuero Referencia de Carnero de Influenza A(H1N1)pdm09
2 - Antisuero Referencia de Influenza A(H3) (mixto de Hurón y Carnero)
3 - Antisuero Referencia de Carnero de Influenza B, linaje B/Yamagata
4 - Antisuero Referencia de Carnero de Influenza B, linaje B/Victoria
5 - Antisuero Control Negativo
6 - Control de Células (50 µl PBS)
7 - Control de Células (50 µl PBS)
8 - Antisuero Referencia de Carnero de Influenza A(H1N1)pdm09
9 - Antisuero Referencia de Influenza A(H3) (mixto de Hurón y Carnero)
10 - Antisuero Referencia de Carnero de Influenza B, linaje B/Yamagata
11 - Antisuero Referencia de Carnero de Influenza B, linaje B/Victoria
12 - Antisuero Control Negativo

II. Añadir 25 µl de antígeno control estandarizado y antígenos de prueba de campo

III. Incubar

IV. Añadir 50 µl de glóbulos rojos estandarizados

V. Incubar, registrar los resultados y interpretar

III. Interpretación de los Resultados de IH usando los Reactivos del Kit de la OMS 2014-2015

Para identificar un aislado viral, los resultados para cada aislado deben ser comparados con los de los antígenos controles. Un virus aislado es identificado como un tipo o subtipo particular, si el virus de campo reacciona con un antisuero dando título de IH **cuatro veces o mayores** que sus títulos con los otros antisueros. Como ejemplo, la Tabla 1 suministra los resultados de las pruebas de laboratorio realizado por el Centro Colaborador de la OMS para la Vigilancia, Epidemiología y Control de la Influenza, CDC, Atlanta.

Tabla 1. Reacción de Inhibición de Hemaglutinación de Reactivos de Influenza de la OMS 2014-2015

	KIT DE ANTÍSUEROS DE REFERENCIA DE LA OMS 2014-2015					
KIT DE ANTÍGENOS DE REFERENCIA DE LA OMS 2014-2015	H3N2	H1pdm09	B-VIC	B-YAM	NEGATIVE[1]	INTERPRETACIÓN[2]
FR-1185 INFLUENZA A(H3N2), BPL TRATADO	**5.120**	80	160	160	40	A(H3N2)
FR-1184 INFLUENZA A (H1N1)pdm09, BPL TRATADO	10	**1280**	20	20	<10	A(H1N1)pdm09
FR-1188 INFLUENZA B VICTORIA LINEAGE, BPL TRATADO	<10	<10	**640**	40	<10	LINAJE B-VICTORIA
FR-1186 INFLUENZA B YAMAGATA LINEAGE, BPL TRATADO	<10	<10	20	**1280**	<10	LINAJE B-YAMAGATA
PRUEBA DE ANTÍGENOS						
AISLADO #1	160	20	10	10	20	A(H3N2)
AISLADO #2	320	40	20	20	20	A(H3N2)
AISLADO #3	640	80	20	20	20	A(H3N2)
AISLADO #4	320	80	10	10	10	A(H3N2)
AISLADO #5	160	40	10	10	10	A(H3N2)
AISLADO #6	<10	640	<10	<10	<10	A(H1N1)pdm09
AISLADO #7	<10	640	<10	<10	<10	A(H1N1)pdm09
AISLADO #8	<10	640	<10	<10	<10	A(H1N1)pdm09
AISLADO #9	<10	320	<10	<10	<10	A(H1N1)pdm09
AISLADO #10	<10	160	<10	<10	<10	A(H1N1)pdm09
AISLADO #11	<10	<10	320	20	<10	LINAJE B-VICTORIA
AISLADO #12	<10	<10	320	20	10	LINAJE B-VICTORIA
AISLADO #13	<10	<10	320	20	10	LINAJE B-VICTORIA
AISLADO #14	<10	<10	320	20	10	LINAJE B-VICTORIA
AISLADO #15	<10	<10	640	20	<10	LINAJE B-VICTORIA
AISLADO #16	<10	<10	<10	1280	<10	LINAJE B-YAMAGATA
AISLADO #17	<10	<10	20	640	10	LINAJE B-YAMAGATA
AISLADO #18	<10	<10	20	640	10	LINAJE B-YAMAGATA
AISLADO #19	<10	<10	20	1280	10	LINAJE B-YAMAGATA
AISLADO #20	<10	<10	<10	640	<10	LINAJE B-YAMAGATA

1. El negativo es suero de carnero no infectado. Todos los sueros son tratados con el RDE del Kit de Reactivos de la OMS.
2. **Si reactividad cruzada entre diferentes antisueros ocurre con algunos aislados, la identificación de las cepas de campo debe basarse en la diferencia de 4-veces o mayor en el título de IH.**

Problemas en la interpretación pueden surgir de las siguientes condiciones:

a. Si hay cualquier aglutinación en los sueros controles, se debe a presencia de aglutininas no específicas en los sueros y puede interpretarse como falsos negativos. (Ver II B. Eliminación de Aglutininas No Específicas).
b. Ocasionalmente aislados son altamente sensibles a los inhibidores no específicos presentes en los sueros. Estos ni siempre son eliminados completamente con el tratamiento por RDE. Los inhibidores pueden dar falsos positivos y los resultados deben ser interpretados con cuidado. Estos aislados se suelen dar títulos altos a más de un antisuero presente en la prueba.

A. Solución de Problemas

Por favor, póngase en contacto con el Centro Colaborador de la OMS en Atlanta (Consulte la página 13) si problemas técnicos surgieren en la identificación de las cepas de campo utilizando estos reactivos.

1. En algunos casos, los glóbulos rojos de conejillo de Indias o células humanas "O" pueden ser más sensibles que los glóbulos rojos de aves para detectar cepas de influenza humana. **Desde los principios de 1990, se ha observado que la mayoría de los aislados de A(H3) no logran aglutinar glóbulos rojos de pollo. Por esta razón, le sugerimos que utilice otra especie de glóbulos rojos, si es posible.** (ver Medeiros et al, 2001: Virología 289: 74-85). Al pasaje en cultivo de tejidos la mayoría de las cepas se adaptarán a aglutinación de glóbulos rojos aviar. Este fenómeno ha sido reportado en la literatura (ver referencias).

2. En caso de cualquier antígeno reaccionar a un título significativo (> 20) con más de un antisuero de referencia, posibles explicaciones pueden ser:

a. Uso de títulos inadecuados de virus. Antígenos diluidos deben ser titulados inmediatamente antes de su uso en la prueba de IH. Esta re-titulación verificará si el antígeno diluido contiene la concentración de virus apropiado, que es de cuatro unidades HA / 25 µl.

b. Contaminación bacteriana. Aglutininas de origen no-influenza en las muestras contaminadas pueden reaccionar de forma no específica con todos los antisueros o pueden fallar para reaccionar con cualquier antisuero.

c. Lectura incorrecta de los resultados de las pruebas de IH. La inhibición debe ser señalada sólo cuando la actividad de hemaglutinación del virus de está completamente inhibida.

d. Artefactos debido a anticuerpos contra componentes del hospedero. Esto se ha observado en ocasiones con los virus influenza B aislados en células MDCK. Tales aislados pueden ser inhibidos por los componentes normales de los sueros, y por tanto reaccionan con todos los sueros suministrado. Si este problema es observado, las muestras de sueros deben ser absorbidas con células MDCK no infectadas. Suero de carnero no infectado se ha incluido como un suero "normal" para la identificación de reacciones inespecíficas.

e. Inhibidores no específicos. La presencia de inhibidores no específicos de origen natural en el suero de las especies animales requiere tratamiento antes de realizar la prueba de IH para evitar resultados falsos positivos. Virus más sensibles reaccionarán a estos inhibidores no específicos inherentes a un título que puede conducir fácilmente a una interpretación errónea. En caso de ocurrir este problema con los reactivos de influenza suministrado, por favor póngase en contacto con el Centro Colaborador de la OMS en Atlanta para métodos alternativos de tratamiento como la inactivación térmica a 64^{o}C durante 30 minutos después tratamiento con RDE, peryodato y tripsina, o calor y peryodato.

   La mayoría de los contaminantes de laboratorio ocurren cuando los reactivos de control de virus influenza (control positivo o virus de investigación, cepas y virus adaptadas en laboratorio distribuidos para la certificación del laboratorio) son distribuidos durante los meses de invierno y son procesados al mismo tiempo que las muestras de diagnóstico. La mejor protección es **no** trabajar con cepas vivas de laboratorio y materiales clínicos enviados para aislamiento al mismo tiempo.

ADVERTENCIA: EN CUALQUIER MOMENTO QUE UNA CEPA ADAPTADA EN LABORATORIO ES PROPAGADA PARA FINES DE DIAGNÓSTICO O INVESTIGACIÓN, UN RIESGO DE CONTAMINACIÓN DE ESPÉCIMENES DE DIAGNÓSTICO OCURRE. (Cuando es necesario crecer cepas de virus vivos, precauciones deben ser tomadas para reducir la probabilidad de contaminación de las muestras de diagnóstico.)

B. Referencias

Cox, N.J., T.L. Braymer, and H.L. Regnery. 1994. Influenza: Global surveillance for epidemic and pandemic variants. Eur. J. Epid. 10: 467-470.

Burnett, F.M. and D.R. Bull. 1943. Changes in influenza viruses associated with adaptation to passage in chick embryos. Aust. J. Exp. Biol. Sci. 21:55-69.

Burnett, F.M. and J.D. Stone. 1947. The receptor destroying enzyme of (Vibrio) Cholerae. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 25: 227-233.

Fong, C.K.Y, M.K. Lee and B.P. Griffith. 2000. Evaluation of R-Mix FreshCells in Shell Vials for Detection of Respiratory Viruses. Journal of Clin. Virol. 38(12):4660-4662.

Hirst, G. K. 1942. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. J. Exp. Med. 75: 47-64.

Huang, Y.T., and B.M. Turchek. 2000. Mink Lung Cells and Mixed Mink Lung and A549 Cells for Rapid Detection of Influenza Virus and Other Respiratory Viruses. 2000. Journal of Clin. Micro. 38(1):422-423.

Kendal, A.P. Pereira,M.S. and Skehel,J.J 1982. Concepts and Procedures for Laboratory-Based Influenza Surveillance, (distributed by the Viral Disease Unit, W.H.O., Geneva, or the WHO Collaborating Center for Influenza, Centers for Disease Control, Atlanta,Georgia 30333, U.S.A.)

Kendal, A.P. and T.R.Cate. 1983. Increased sensitivity and reduced specificity of hemagglutination inhibition tests with ether-treated influenza B/Singapore/222/79. J. Clin. Microbiol. 18:930-934.

Lennette and Schmidt, Eds. 1989. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections, 6th Edition. American Public Health Association, Inc. Washington, D.C. Pg 604.

Medeiros, R., N. Escriou, N. Naffakh, J. Manuguerra, and S. van der Wert. 2001. Hemagglutinin Residues of Recent Human A(H3N2) Influenza Viruses that Contribute to the Inability to Agglutinate Chicken Erythrocytes. Virology 289:74-85.

McQuillin, J., C. R. Madeley, and A. P. Kendal. 1985. Monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of influenza A and B virus infections by immunofluorescence. Lancet 2(8961):911-914.

Navarro-Mari, J.M., S. Sanbonmatsu-Gamez, M. Perez-Ruiz and M. de la Rosa-Fraile. 1999. Rapid Detection of Respiratory Viruses by Shell Vial Assay Using Simultaneous Culture of HEp-2, LLC-MK2 and MDCK Cells in a Single Vial. Journal of Clin. Virol. 37(7):2346-2347.

Rota, P.A., T.R. Wallis, M.W. Harmon, J.S.D. Rota, A.P. Kendal and K. Jerome. 1990. Co-circulation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B viruses since 1983. Virol. 175: 59-68.

Salk, J.E. 1944. Simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. J. Immunol. 49: 87-98.

Tkacova M., E. Vareckova, I. C. Baker, J. M. Love, and T. Ziegler. 1997. Evaluation of monoclonal antibodies for subtyping of currently circulating human type A influenza viruses. J. Clin. Microbiol. 35: 1196-1198.

Walls, H. H., M. W. Harmon, J. J. Slagle, C. Stocksdale, and A. P. Kendal. 1986. Characterization and evaluation of monoclonal antibodies developed for typing influenza A and influenza B viruses. J. Clin. Microbiol. 23:240-245.

Weinberg, A., L. Brewster, J. Clark, E. Simoes and ARIVAC consortium. 2004. Evaluation of R-Mix shell vials for the diagnosis of viral respiratory tract infections. Journal of Clin. Virol. 30:100-105.

WHO Manual for the Laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. (2011). http://www.who.int/influenza/resources/documents/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/index.html

Ziegler, T., H. Hall, A. Sanchez-Fauquier, W. C. Gamble, and N. J. Cox. 1995. Type- and subtype-specific detection of influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. J. Clin. Microbiol. 33:318-321.

IV. Sistema Global de Vigilancia y Respuesta a la Influenza (GISRS)

La vigilancia virológica global de la influenza se ha realizado a través del Sistema Global de Vigilancia y Respuesta a la Influenza (GISRS por sus siglas en inglés) durante más de medio siglo.

- GISRS / OMS monitoriza la evolución de los virus influenza y proporciona recomendaciones en áreas que incluyen el diagnóstico de laboratorio, vacunas, susceptibilidad a antiviral y evaluación de riesgos.
- GISRS / OMS también sirve como un mecanismo de alerta global para la emergencia de virus influenza con potencial pandémico.

Establecida en 1952, la red actualmente cuenta con seis Centros Colaboradores de la OMS, cuatro Laboratorios Reguladores Esenciales y 137 instituciones de 107 Estados Miembros de la OMS, que son reconocidos por la OMS como Centros Nacionales de Influenza, además al grupos ad hoc establecidos para hacer frente a las nuevas cuestiones específicas.

Los objetivos de GISRS incluyen:

- Aislamiento e identificación de virus influenza actualmente circulantes seguido por análisis antigénico completo para el propósito de recomendaciones de las cepas de la vacuna anual.
- Detección temprana de los brotes de gripe y las epidemias y la identificación de los factores epidemiológicos asociados (ej. edad, patrones de comportamiento, y contacto con animales).
- Identificación de las zonas de alto riesgo y grupos de población.
- Detección temprana de nuevos virus influenza con potencial pandémico.
- Seguimiento de la resistencia a los medicamentos antivirales.

La actividad de la influenza en todo el mundo y la caracterización antigénica de cepas circulantes están a disposición en The Weekly Epidemiological Record (WER) en el sitio web de la OMS www.who.int/wer/en. Datos de vigilancia y de laboratorio de los Estados Unidos pueden ser accesado en línea en http://www.cdc.gov/flu/weekly/fluactivitysurv.htm y actualizaciones periódicas a respecto de la influenza son publicadas en el MMWR Weekly Report en www.cdc.gov/mmwr/.

V. Centros Colaboradores de la OMS

Dentro del GISRS, los Centros Colaboradores de la OMS (WHOCC por sus siglas en inglés) y los Laboratorios Reguladores Esenciales son elementos cruciales de vigilancia de la influenza y la respuesta a la vacuna.

Los Centros Colaboradores de la OMS designados se encuentran listados abajo. Los participantes del GISRS son encorajados a comunicarse con un de estos centros en el nivel de actividad de la influenza y proporcionar aislados de influenza para análisis antigénico detallado en una base regular. El kit de reactivos para influenza de la OMS es suministrado para que los virus influenza pueden ser identificados con precisión con reactivos estandarizados.

CENTRO COLABORADOR DE LA OMS PARA VIGILANCIA, EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL DE INFLUENZA
Centers for Disease Control and Prevention
Influenza Division, G-16
1600 Clifton Road, NE
Atlanta, Georgia 30333 USA

Dr. Nancy J. Cox, Director
Dr. Xiyan Xu (contact)

Numero de teléfono: 404-639-1657

CENTRO COLABORADOR DE LA OMS PARA REFERENCIA Y INVESTIGACIÓN EN INFLUENZA
National Institute for Medical Research
The Ridgeway, Mill Hill
LONDON NW7 1AA,
UNITED KINGDOM

Dr. John McCauley, Director
Dr. Rod Daniels. Deputy Director (contact)

Numero de teléfono: 44-208-816-2152

CENTRO COLABORADOR DE LA OMS PARA REFERENCIA Y INVESTIGACIÓN EN INFLUENZA
10 Wreckyn Street
North Melbourne 3051
Victoria, Australia

Dr. Anne Kelso, Director
Dr. Ian Barr, Deputy Director (contact)

Numero de teléfono: 61-3-9342-3944

CENTRO COLABORADOR DE LA OMS PARA REFERENCIA Y INVESTIGACIÓN EN INFLUENZA
National Institute of Infectious Diseases
Department of Virology III
4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama-shi
Tokyo 208-0011, Japan

Dr. Masato Tashiro, Director
Dr. Takato Odagiri, Chief (contact)

Numero de teléfono: 81-42-561-0771

CENTRO COLABORADOR DE LA OMS PARA REFERENCIA Y INVESTIGACIÓN EN INFLUENZA
Chinese National Influenza Center (CNIC)
National Institute for Viral Disease Control and Prevention
155# Changbai road, Changping district,
Beijing, P.R. China 102206 (New site)

Dr. Yuelong Shu, Director
Dr. Wang Dayan (contact)

Numero de teléfono: 86-10-58900859

CENTRO COLABORADOR DE LA OMS PARA ESTUDIOS DE LA ECOLOGIA DE INFLUENZA EN ANIMALES
Virology Division Department of Infectious Disease MS 330, Room E-9056 St. Jude Children's Research Hospital
262 Danny Thomas Place Memphis, TN 38105-3678

Dr. Richard Webby, Director

Numero de teléfono: (901) 595-3014

VI. Sumisión de Especímenes

Los reactivos suministrados en este kit están destinados a proporcionar la identificación inicial de las cepas de campo como influenza A(H3N2), influenza A(H1N1)pdm09, o influenza B. Debido a la gran heterogeneidad de cepas prevalentes dentro de cada tipo y/o subtipo, no se puede esperar que estos reactivos caractericen antigénicamente una cepa. Por tanto, cepas de campo representativas deben ser enviadas a un laboratorio de contrato apropiado (EE.UU.) o al Centro Colaborador de la OMS para análisis antigénico detallado. Listado abajo están las directrices para la selección de las cepas a sean enviadas. El Centro de la OMS tiene la capacidad de analizar las cepas del virus de todas las regiones del mundo y, como resultado, puede establecer la caracterización de las cepas prevalentes en todo el mundo.

A. Directrices

1. **En los países donde la influenza es estacional:**
   (Directrices para el envío de muestras han sido enviadas a los Laboratorios de Salud Pública en los EE.UU.)

   a. **Cualquier aislados de la pre-temporada y los primeros aislados (5-10) de la temporada.** Estos aislados pueden proporcionar información importante sobre la circulación de cepas en comparación con la temporada anterior, la correspondencia entre la vacuna y las cepas circulantes, y la información necesaria para la formulación de la vacuna para el próximo año.

   b. Durante la temporada de influenza a venir, enviar un ***paquete conteniendo hasta veinte aislados representativos junto con sus materiales clínicos correspondiente a cada dos meses a partir de sus casos más recientes, tomados aproximadamente dentro de 4 semanas de envío.***

   c. Con el fin de apoyar la recomendación bianual de la composición de la vacuna de la OMS, se recomienda fuertemente hacer un envío en el principios de **enero** y uno en medio de **agosto**, a más tardar, para asegurar el mejor valor de sus virus permitiendo la inclusión de los resultados de los análisis en el siguiente consulta de la OMS para recomendación de la composición de la vacuna.

2. **En los países donde la influenza ocurre durante todo el año**: ***aislados representativos deben ser enviados en intervalos regulares, pero no más de diez tomadas en un periodo de dos semanas.***

3. **Aislados obtenidos durante los brotes:** Los brotes pueden ocurrir en las poblaciones inmunizadas o en poblaciones no inmunizadas donde la tasa de ataque es alta. Enviar no más de 3 virus de un brote ya que los virus de un brote son generalmente muy similares.

4. **Aislados que no pueden ser tipificado o subtipificado por pruebas de IH con los reactivos del kit:** Debido a importancia de detectar rápidamente nuevas variantes de influenza, los aislados que son negativos cuando probado con el kit de antisueros deben ser identificado por IFI o RT/PCR en tiempo real (si la técnica está disponible en su laboratorio). ***Cualquier aislado de influenza A no subtipificable deberá ser remitido a un centro colaborador de la OMS en 24 horas.***

5. **Aislados de personas recibiendo agente antiviral o de sus contactos que se enfermen:** El aumento del uso de agentes antivirales para el tratamiento y profilaxis de la influenza en algunas zonas del mundo ha creado un potencial para la emergencia y propagación de los virus resistentes a los antivirales que debe ser monitoreado.

6. **Aislados de casos de sospecha de transmisión de animal a humano del virus influenza:** Estos son necesarios para monitorear las características de los virus y para examinar el potencial de propagación.

Informaciones laboratoriales y epidemiológica sobre los aislados deben ser enviadas utilizando el formulario "The Influenza Specimen Submission" junto con el envío de los aislados. Este formulario puede ser descargado en el sitio web: *http://www.influenzareagentresource.com/*

Recientes mejoras en la base de datos nos permiten entrar su especímenes con mayor precisión mediante el uso del formulario electrónico de sumisión.

POR FAVOR INTENTE HACER PRUEBAS DE IH PARA QUE EL SUBTIPO DE HA DEL AISLADOS DE INFLUENZA A PUEDAN SER DESIGNADO EN ESTE FORMULARIO.

B. Información de envío

1. Envío de Aislados: Los aislados deben ser enviados a uno de los cinco Centros Colaboradores de la OMS listados en las páginas 14-15. Un formulario completo de **"Influenza Specimen Submission"** con informaciones laboratoriales y epidemiológica debe acompañar los aislados. Es importante rellenar el formulario de la forma más completa posible, prestando especial atención a la **fecha de recogida**, **Historia de Pasaje**, **Tipo / subtipo**, **nivel de actividad**, y **información laboratorial**.

2. Envíos internacionales: Cuando sea posible, es especialmente importante para el Centro Colaborador de la OMS ser notificado de la hora de llegada del envío por correo electrónico, fax, carta o teléfono. Los permisos de importación para los envíos al Centro Colaborador de la OMS Atlanta han sido proporcionados por e-mail en abril de 2014. En caso de permisos adicionales seren necesarios, por favor notifique a la persona de contacto listada bajo.

C. Personas Contacto para Recibimiento de Aislados

Centro Colaborador de la OMS en Influenza en el Centers for Disease Control and Prevention en Atlanta, GA. USA
Dr. Xiyan Xu. Teléfono: 404-639-1657 Fax: 404-639-0080

Centro Colaborador de la OMS en Influenza en el National Institute for Medical Research en Mill Hill, London
Dr. Rod Daniels. Teléfono: 44-208-816-2152 Fax: 61-3-9342-3939

Centro Colaborador de la OMS en Influenza en el Commonwealth Serum Laboratories, Victoria, Australia
Dr. Ian Barr. Teléfono: 61-3-9342-3944 FAX: 61-3-9342-3939

Centro Colaborador de la OMS en Influenza en el National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan
Dr. Takato Odagiri. Teléfono: 81-42-561-0771 FAX: 81-42-561-0812

Centro Colaborador de la OMS en Influenza en el National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Beijing, China
Dr. Wang Dayan. Teléfono: 86-10-58900859 FAX: 86-10-58900859

D. Solicitud de Reactivos Adicionales: *www.influenzareagentresource.org*

E. Solicitud de Permites para Envío para los Estados Unidos

Centro Colaborador de la OMS en Influenza en el Centers for Disease Control and Prevention en Atlanta, GA. USA

Dr. Xiyan Xu (404-639-1657 o xxx1@cdc.gov) **o Ms. Teresa Wallis** (404-639-1687 or TWallis@cdc.gov)

F. Asistencia en solución de problemas laboratorales con referencia al uso de reactivos y cuestiones en metodología laboratorial:

Centro Colaborador de la OMS en Influenza en el Centers for Disease Control and Prevention en Atlanta, GA. USA - **Dr. Xiyan Xu** (404-639-1657 o xxx1@cdc.gov)