



Universidad Nacional
Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL ANGELES PEDREGAL

**“EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS
RÁPIDAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE
INFLUENZA”**

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN:

PATOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA A:

DRA. NANCY GERÓNIMO GUEVARA

TUTOR:

Dr. Jesús Ignacio Simón Domínguez

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

- Agradecimiento:.....3
- Resumen:.....4
- Introducción:.....5
- Antecedentes:.....5
- Justificación:.....13
- Hipótesis:.....14
- Objetivos:.....14
- Tipo de estudio:.....15
- Diseño:.....15
- Material y métodos:.....16
- Análisis estadístico:.....19
- Resultados:.....19
- Discusión:.....29
- Conclusiones:.....30
- Bibliografía:.....31

AGRADECIMIENTOS

*PRIMERO QUIERO DAR GRACIAS A DIOS POR PERMITIRME
CONCLUIR UNA ETAPA MÁS DE MI VIDA DE MANERA
EXITOSA.*

*QUIERO AGRADECER A MI FAMILIA Y EN ESPECIAL A MIS
PADRES Y HERMANOS (MARU, GERARDO Y DIEGO) QUE
SIEMPRE HAN ESTADO A MI LADO APOYANDOME Y QUE SIN
SU ESFUERZO ESTE OBJETIVO NO SE HUBIESE LOGRADO, LOS
AMO.*

*AL DR. JESUS IGNACIO SIMÓN DOMINGUEZ, POR SUS
ENSEÑANZAS Y CONOCIMIENTO COMPARTIDO EN CADA
CLASE.*

*AL PERSONAL DEL LABORATORIO CLÍNICO DEL HOSPITAL
ANGELES PEDREGAL POR SU APOYO Y CARIÑO.*

RESUMEN

Objetivo:

A lo largo del tiempo han existido varias pandemias y epidemias de influenza, que han ocasionado varios miles de enfermos y muerte, por lo que es importante el contar con pruebas que nos ayuden al diagnóstico oportuno de influenza para poder comenzar de manera oportuna el tratamiento y así prevenir brotes importantes de dicha enfermedad en todo el mundo.

El objetivo de este trabajo es valorar las pruebas rápidas de influenza para determinar si presentan buena sensibilidad y especificidad para establecer la presencia o no del virus de la influenza.

Diseño y métodos:

Se evaluaron los resultados de las pruebas rápidas de influenza en un periodo de un año 7 meses, (del 01 de septiembre del 2014 al 29 de abril del 2016), comparándolas con los resultados de las pruebas por RT-PCR, durante el mismo periodo.

Resultados:

Se realizaron 332 pruebas por RT-PCR de las cuales 120 de ellas presentaban también prueba rápida de influenza, de estas 120 pruebas 79 de ellas presentaron correlación, sin embargo en 21 de ellas no se presentó dicha correlación por lo que se realiza el análisis estadístico y se determina que tienen una sensibilidad del 39.02% y una especificidad del 79.75%, por lo que todas las pruebas se deben de corroborar por RT-PCR.

Conclusión:

Este estudio ha demostrado que la prueba rápida de influenza, por el equipo Sofía Influenza A+B FIA no es una buena prueba para detectar pacientes con influenza, ya que presenta baja sensibilidad, por lo tanto se debe confirmar siempre el resultado con pruebas más específicas aprobadas por la FDA, en el caso de este trabajo con la prueba por RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

Contexto

La influenza en la actualidad se ha vuelto tema de interés por las pandemias que ha ocasionado, porque a pesar de ser un evento natural, tiene efectos sociales, económicos, demográficos, políticos y culturales, en la sociedad.

Por tal motivo se han creado pruebas para poder identificar de manera rápida la presencia de influenza, y así poder dar un diagnóstico y tratamiento de manera más temprana y oportuna, pero, ¿cuál es la correlación existente entre estas pruebas con pruebas como la RT-PCR?

Lo anterior tiene implicaciones clínicas importantes ya que, si se detecta más temprano la enfermedad, se evitará la propagación del virus y con ello evitar las epidemias y pandemias, así como también tratar a tiempo la patología y evitar complicaciones a la salud del paciente.

En este estudio se pretende evaluar las pruebas rápidas de influenza, a través de la correlación existente entre estas pruebas y la PCR.

Antecedentes

Se tiene reporte de epidemias de influenza desde la antigüedad, una de estas epidemias fue reportada por Hipócrates, el padre de la Medicina, en el año 412 a.C., numerosos episodios similares también fueron descritos en la Edad Media. (1)

El nombre de esta patología deriva de influencia coeli, que en latín quiere decir, "influencia celestial", pues se pensaba que la configuración de los planetas y las estrellas determinaba su aparición, así como el gran número de muertes que causaba. (1)

Los ingleses adoptaron el nombre, pero los franceses prefirieron llamarla gripe.

La altamente contagiosa enfermedad respiratoria aguda conocida ahora como influenza, ha afectado a los humanos desde tiempo atrás. Desde hace 400 años las epidemias han sido reportadas en numerosos países, algunos historiadores piensan que en 1493 hubo en la isla La Española, (conocida actualmente como Santo Domingo) una epidemia de influenza porcina, transmitida por los cerdos que llevaba Cristóbal Colón. (2)

Existe una descripción precisa de las principales características de la influenza, la cual está en una carta enviada desde Edimburgo por Lord Randolph a Lord Cecil en noviembre de 1562:

“Inmediatamente que la Reina (María) llegó aquí, ella cayó con una nueva enfermedad que es común en este pueblo, llamado aquí la acqayntance, la cual pasó a toda su corte, ya sean estos lords, ladies o damiselas o ya sean ingleses o franceses. Es una plaga en sus cabezas, y dolor en sus estómagos, con una gran tos, que en algunos permanece por más tiempo que en otros, mientras encuentra cuerpos aptos para desarrollarse. La Reina estuvo en cama por seis días. No hubo peligro, no muchos murieron por la enfermedad, excepto algunos amigos ancianos. Mi Lord de Murraye está enfermo ahora, el Lord de Lidlington la ha tenido, y yo estoy asombrado de decir que he estado libre de ésta”(1).

Las epidemias del siglo XVI en Inglaterra y la del siglo XVIII en USA, son reconocidas como influenza, aun con la ausencia del conocimiento preciso del agente causal.

Entre 1889 y 1890 ocurrió la primera pandemia de influenza bien documentada; se calcula que provocó un millón de muertes. Pero la humanidad no ha vivido pandemia más mortífera que la de influenza que recorrió el mundo en sucesivas oleadas entre 1918 y 1919. (3)

La pandemia de influenza de 1918 fue la más grande en la historia actual, ocasionada por la cepa H1N1, causando 20 millones de muertes en todo el mundo, tuvo una tasa de mortalidad de entre un 2.5 y un 5%, más de 50 veces la mortalidad de un brote normal de influenza ya que, por cada cien enfermos morían cinco. (1)

Sólo en Filadelfia durante la tercera semana de octubre de 1918, hubo 4,600 muertes por influenza. La mayoría de las ciudades principales y otros lugares públicos fueron cerrados, y los hospitales estaban excedidos y faltos de servicios médicos. (4)

En esos años, muchos no murieron directamente por el virus sino por infecciones bacterianas que causaron neumonías graves y mortales, ya que en ese entonces aún no conocían los antibióticos, sino hasta 1928 descubiertos por Alexander Flemming, pero otra parte considerable de los decesos ocurrió directamente por el virus, que les causó neumonía y derrame pulmonar con sangre u otros fluidos que ocasionaba asfixia en los pacientes. (4)

La influenza mantuvo una frecuencia anual después de la pandemia de 1918, pero no surgió un tipo de influenza nuevo y virulento hasta inicios de 1957, con la influenza Asiática, ocasionada por el virus H2N2, que sustituyó al virus H1N1 que circuló en la población humana anteriormente, la influenza Asiática comenzó en febrero de ese año en China, posteriormente se extendió a Hong Kong y Asia Central en el mes de abril, en ese mismo mes afectó al Medio Oriente en donde se extendió hasta el mes de Junio, mes en el que más de veinte países, incluyendo EE.UU., habían experimentado su primer caso de influenza. (3)

América del Sur y países africanos se ven afectados en Julio y agosto, convirtiéndose para ese entonces en la segunda pandemia del siglo XX. (3)

En el periodo de 1957 a 1958, aproximadamente 2 millones de personas murieron de la influenza asiática en todo el mundo, y hubo aproximadamente 70,000 muertes en Estados Unidos. (3)

De manera similar, una nueva cepa pandémica que llegó en 1968, conocida como influenza del Hong-Kong, viró a H3N2 y rápidamente sustituyó al virus H2N2 que circuló entre 1957 y 1968. (1).

La siguiente amenaza significativa que surgió por la influenza, fue en 1997 que provino nuevamente de Asia, donde una influenza aviar (H5N1) infectó a pájaros, y luego se transmitió a humanos. Varias personas se enfermaron y murieron a causa del virus. (3)

Los brotes fueron graves particularmente en los años 2003-2004, cuando decenas de millones de aves de corral y acuáticas murieron por la gripe. Sin embargo, el virus no se contagiaba de una persona a otra, sino solo entre las aves, y luego a los humanos. (3)

La falta de contagio entre humanos limitó la incidencia de la enfermedad. Después de una destrucción extensa de bandadas de ave de corral, se disminuyó la amenaza. Sin embargo, se mantiene la amenaza de la gripe aviar, pues podría surgir otra cepa mortal que podría ser capaz de contagiarse entre humanos y provocar una pandemia. (3)

La última pandemia que se ha presentado, fue en 2009 en la Ciudad de México donde oficialmente el 21 de abril de ese año, se dio a conocer, mediante una publicación dos casos de infección respiratoria aguda ocasionada por un nuevo tipo de influenza A, el cuál posteriormente fue identificado como un virus de origen porcino con dos genes de linaje euroasiático.

Se cree que dicho virus se originó en La Gloria, una comunidad localizada en el valle de Perote, en Veracruz, México. Sin embargo, se realizaron análisis en retrospectiva, en donde fue posible inferir que el nuevo virus se encontraba en circulación a nivel mundial desde varios meses antes de ser identificado y que la letalidad de la enfermedad resultó ser selectiva (en general, sólo afecta a personas con enfermedades subyacentes) y tan pequeña como la de la influenza estacional.

Estudios de diferentes países sostienen la teoría de que una proporción elevada de sus poblaciones fue infectada por el nuevo virus, desarrollando inmunidad contra la enfermedad, lo que proporciona una posible explicación para la disminución de los casos. (5)

La experiencia acumulada en México sirvió para hacer una valiosa aportación a la comunidad médica mundial en la elaboración de la Guía de práctica-clínica preliminar para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la Influenza tipo A/H1N1. En tal documento se refieren, entre otros, los principales signos y síntomas encontrados en los pacientes sospechosos y confirmados, así como las definiciones operativas, que condujeron a mejorar el diagnóstico, según se consigna en el siguiente cuadro:

CASOS CONFIRMADOS		CASOS SOSPECHOSOS	
Datos clínicos	%	Datos clínicos	%
Tos	88.9	Fiebre	83.3
Cefalea	83.3	Tos	78.7
Fiebre	82.9	Cefalea	66.3
Insuficiencia respiratoria	79.2	Insuficiencia respiratoria	63.2
Rinorrea	74	Rinorrea	62.6
Odinofagia	70.6	Disnea	60.6
Mialgias	68.6	Postración	58.9
Disnea	64.9	Mialgias	56.8
Dolor torácico	63.8	Odinofagia	55.4
Atralgias	56	Atralgias	52.2
Congestión nasal	44.7	Dolor torácico	47.5
Polipnea	36.8	Congestión nasal	43.7
Dolor abdominal	21.6	Coriza	34.5
Irritabilidad en menores de 5 años	57.1	Irritabilidad en menores de 5 años	51.2
Fuente: Coordinación de Vigilancia Epidemiológica, IMSS, mayo 13, 2009			

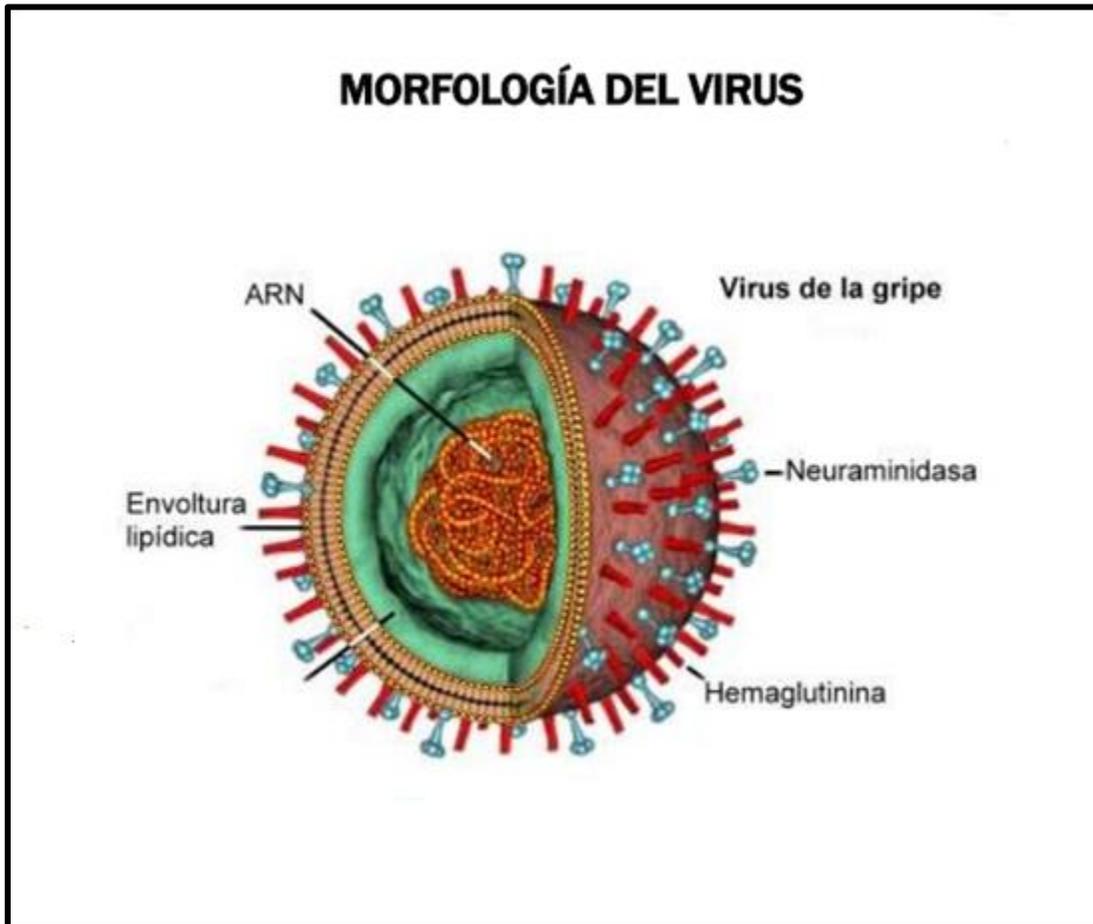
Como se puede observar a lo largo de la historia de la humanidad, siempre hemos estado en constante peligro de padecer pandemias originadas por diferentes tipos de virus de influenza, pero, ¿qué es el virus de la influenza?

La infección por el virus de la influenza está causada por un virus ARN perteneciente a la familia Orthomyxoviridae. (6)

Las partículas virales o viriones son pleomórficos. Pueden ser partículas esféricas y medir de 80 a 120 nm o tener forma de filamentos con un tamaño mayor.

La envoltura viral está formada por la membrana plasmática de la célula hospedero y contiene proteínas virales tales como neuraminidasas (NA), hemaglutininas (HA) y proteínas llamadas de matriz.

En el interior de la partícula viral hay una esfera o nucleocápside con un diámetro de 9 a 15 nm formada por la proteína viral M1 y contiene el genoma viral. (7)



Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.

Con base en sus características moleculares e inmunológicas, los virus de influenza se clasifican en tipos A, B, y C. (7)

Los virus de influenza A se dividen en subtipos según dos proteínas de la superficie del virus: la hemaglutinina (H) y la neuraminidasas (N). Hay 18 subtipos diferentes de hemaglutinina y 11 subtipos diferentes de neuraminidasas. (H1 hasta H18 y N1 hasta N11 respectivamente). (8)

Cualquier cambio en la secuencia del RNA se ve reflejado en cambios en la conformación de la hemaglutinina. (9)

Según la CDC solo existen dos subtipos actuales de virus de influenza A que se detectan en las personas:

- AH1N1
- AH3N2 (8)

REPLICACIÓN VIRAL

La infección viral se inicia con el enlace de la hemaglutinina a un receptor de membrana que contienen residuos terminales de ácido neuramínico. El virus se internaliza en un endosoma y posteriormente las ribonucleoproteínas se liberan en el citoplasma.

Subsecuentemente, estas pasan por los poros nucleares al núcleo para la transcripción (síntesis de RNA mensajero viral) y la replicación que son mediadas por la RNA polimerasa viral.

La síntesis de las proteínas virales la lleva a cabo la célula.

Los componentes proteicos necesarios para la formación de las ribonucleoproteínas y la nucleocápside se exportan al núcleo celular. Las proteínas virales de la envoltura se transportan y modifican en el aparato de Golgi para finalmente ser insertadas en la membrana celular. El ensamblaje final de la partícula viral es un proceso no bien comprendido. La liberación de la partícula viral produce lisis celular. (7).

TRANSMISIÓN

La influenza se transmite de persona a persona mediante gotitas de saliva producidas al toser o estornudar, las cuales al ser inhaladas depositan un inóculo infeccioso en el epitelio de las vías respiratorias, o bien por contacto con manos o superficies contaminadas. Se considera como periodo de incubación desde la exposición hasta el inicio de la enfermedad y varía de 1 a 4 días dependiendo de la magnitud de la dosis viral del inóculo y el estado inmune del hospedero.

El periodo infeccioso se debe a la diseminación del virus y comienza un día antes de la aparición de los síntomas, llega al máximo en 24 horas, se mantiene durante 1 o 2 días y declina con rapidez.

PATOGENIA

Una vez que los virus se han implantado en el epitelio de las vías respiratorias comienzan a replicarse y diseminarse en el tracto respiratorio, causando la descamación de las células ciliadas y de las células secretoras de moco. La multiplicación viral lleva a la lisis de estas células con la liberación de antígenos virales que atraen a macrófagos y a linfocitos.

La liberación de mediadores humorales de inflamación como la interleucina-1 por los macrófagos da como resultado fiebre. Es probable que el interferón cause dolores musculares difusos y fatiga, los mediadores de la inflamación producen vasodilatación y edema en la nariz, lo que provoca obstrucción y rinorrea; la irritación provocada por los restos virales y celulares estimula la producción de moco.

El daño ocasionado por la lisis de células del epitelio respiratorio favorece la colonización de bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* que pueden producir neumonía.

CUADRO CLÍNICO

La enfermedad tiene un inicio súbito, fiebre mayor de 38°C, postración, cefalea, mialgias, tos seca y manifestaciones nasales como estornudos, rinorrea y obstrucción aérea, con inflamación faríngea.

La fiebre declina al segundo o tercer día de la enfermedad, al ceder la fiebre los síntomas respiratorios pueden exacerbarse, la tos y la rinorrea pueden ser más intensos.

Cuando se resuelven la mayoría de los síntomas, la tos y la debilidad pueden persistir hasta una semana más.

Las complicaciones que se pueden observar son neumonía bacteriana secundaria, neumonía viral primaria y neumonía mixta, viral y bacteriana.

Las complicaciones extrapulmonares incluyen el síndrome de Reyé, miositis, encefalitis y manifestaciones neurológicas inespecíficas.

Las formas severas de la enfermedad son causadas por los tipos A y B, mientras que el tipo C causa infecciones subclínicas durante la infancia. (7).

Además del ser humano, el virus de la influenza tipo A se puede encontrar en ballenas, cerdos, caballos, aves silvestres y aves de corral. Existe la posibilidad del contacto entre estas especies, y gracias a la capacidad que tienen los virus de

influenza para combinarse entre ellos, se puede obtener una variedad antigénica diferente. Los virus de influenza tipo B y C sólo se presentan en seres humanos. (7).

Por todo lo anterior, existe la vigilancia epidemiológica de Influenza y otros virus respiratorios, la cual se realiza de forma internacional a través de FluNET, que es una herramienta global para la vigilancia virológica de influenza. Los datos se proporcionan a distancia por los Centros Nacionales de Influenza (CNI) de la Vigilancia de la Influenza Global y Sistema de Respuesta (GISRS) y otros laboratorios nacionales de referencia de la influenza que colaboran activamente con GISRS o se integran las bases de datos regionales de la OMS.

De acuerdo con lo sugerido por la OMS, los objetivos de la planeación en el plano global para la prevención de una pandemia de influenza se orientan a:

1. Reconocer de manera oportuna la emergencia de cepas virales de potencial pandémico y monitoreo de su evolución.
2. Establecer mecanismos que permitan identificar el inicio de la pandemia de influenza.
3. Reducir la morbilidad, mortalidad e ingresos hospitalarios por la enfermedad.
4. Desarrollar la capacidad para atender un elevado número de individuos enfermos graves en la comunidad y en hospitales.
5. Asegurar que los servicios esenciales se mantengan funcionando para reducir al máximo la interrupción de la vida diaria.
6. Brindar información adecuada, oportuna y actualizada al personal de salud, población general, medios de comunicación y todos aquellos grupos que lo requieran.

Existe el Reglamento Sanitario Internacional (RSI 2005), que es un instrumento jurídico internacional adoptado por la Asamblea Mundial de la Salud en 2005. El reglamento es jurídicamente vinculante para 194 países en todo el mundo y ofrece un marco jurídico mundial para la prevención, el control y la respuesta a riesgos para la salud pública que se pueden propagar entre los países. (OMS, 2009).

En México el punto focal de contacto con el RSI es la Dirección General de Epidemiología, siendo éste punto la única vía de comunicación de eventos relevantes que pueden implicar un riesgo para la salud pública global. (6)

En la República Mexicana la vigilancia de Influenza se realiza mediante un sistema centinela recomendado por la OMS, denominado Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Influenza (SISVEFLU), el cual forma parte del Sistema Nacional

de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) y es coordinado por la Dirección General de Epidemiología, DGE. Este sistema centinela cuenta con 583 Unidades de Salud Monitoras de Influenza (USMI) de primer, segundo y tercer nivel de atención, del Sistema Nacional de Salud en México y están distribuidas estratégicamente en las 32 entidades federativas del país. (6)

El objetivo principal de la vigilancia epidemiológica de influenza es favorecer la salud de la población, previniendo o mitigando epidemias y brotes de enfermedades respiratorias, mediante vigilancia epidemiológica funcional que permita detectar oportunamente la aparición de casos nuevos de enfermedad respiratoria asociada con el incremento de la influenza estacional. (6)(11).

JUSTIFICACIÓN

Las Infecciones respiratorias agudas (IRAs) son un conjunto de padecimientos infecciosos de las vías respiratorias con evolución menor a 15 días, con una amplia gama de signos y síntomas que pueden incluir: tos, escurrimiento nasal, obstrucción nasal, dolor al deglutir, dolor de oído, respiración ruidosa, dificultad respiratoria, las cuales pueden estar o no acompañados de fiebre y en ocasiones se complican con neumonía, responsable de un número significativo de muertes.

Entre las IRAs cabe destacar la influenza, padecimiento que sin considerar el año pandémico del 2009 y el remanente del 2010, representó en el periodo 2006 a 2008 un promedio de solamente 217 casos anuales, en comparación con los 24 millones de IRAs, lo que sin duda refleja el gran subregistro e inoperatividad de un sistema general basado en la cuenta de casos y dependiente de la situación sociocultural, política y financiera del momento.

Por eso es importante contar con pruebas que nos puedan dar un diagnóstico temprano ya que el diagnóstico presuntivo de influenza se establece con base en signos y síntomas, pero el diagnóstico definitivo requiere de la demostración de antígenos virales por métodos inmunológicos.

La presencia de anticuerpos específicos solo tiene valor diagnóstico si el título de anticuerpos es 4 veces mayor al título basal obtenido en muestras de individuos sanos con la misma técnica y en el mismo laboratorio.

Las muestras biológicas requeridas para el diagnóstico pueden ser: exudado faríngeo, nasofaríngeo, lavado broncoalveolar o suero. La muestra debe tomarse en las primeras 72 horas de iniciado el padecimiento y mantenerse a 4°C.

El diagnóstico puede requerir también el aislamiento del virus por cultivo en líneas celulares o en embrión de pollo. Las técnicas utilizadas para la identificación son la inmunofluorescencia indirecta o directa y la inhibición de la hemaglutinación. La demostración de la presencia de ácidos nucleicos virales por la técnica de RT-PCR es un método muy rápido y sensible para el diagnóstico.

En el laboratorio del Hospital Ángeles Pedregal se cuenta para la detección de la enfermedad, con la prueba Sofía Influenza A+B FIA y con RT-PCR, esta última prueba se realiza en el laboratorio de Referencia del Hospital Ángeles Pedregal en donde, para la detección del virus de la influenza se hace a través de microarreglos o microarrays, se utiliza el equipo CLART PneumoVir.

La prueba Sofía A+B FIA, utiliza el método de inmunofluorescencia para detectar antígenos nucleoproteínicos del virus de la gripe A y B.

Está demostrado que la administración temprana del tratamiento antiviral en pacientes con sospecha de influenza, tienen menor probabilidad de complicaciones que en aquellos en donde se retrasa el inicio del tratamiento. Por ello, es importante tener pruebas que sean rápidas y confiables para detectar a los enfermos de influenza, en este trabajo se busca evaluar las pruebas rápidas de influenza observando la correlación existente de estas con los resultados obtenidos por RT-PCR.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha visto que existe una amenaza constante de tener epidemias o pandemias de virus de influenza, ya que los virus están en constante cambio ocasionando mutaciones en los mismos.

A pesar de que los casos de influenza han ido en decremento y se ha tenido un mejor control de la patología, aún existe el problema de subregistros de casos, por la falta de realización de pruebas para confirmar el diagnóstico.

Por su accesibilidad y costo la prueba que se realiza la mayoría de las veces es la prueba rápida de influenza y en mucho menor frecuencia se realiza la identificación del virus de influenza por PCR, es por eso que el objetivo principal del presente trabajo es buscar la correlación entre ambas pruebas.

HIPÓTESIS

¿Es la prueba rápida de influenza un biomarcador útil para la detección de influenza igual que PCR?

OBJETIVOS

- 1.- Determinar la cantidad de resultados de la prueba de PCR que coinciden con la prueba rápida de influenza.
- 2.- Determinar el Valor Predictivo Positivo y el Valor Predictivo Negativo de la prueba rápida para el diagnóstico de influenza.
- 3.- Establecer tipo de virus más frecuente en población general.

4.- Establecer tipo de virus más frecuente por género

TIPO DE ESTUDIO

Observacional, transversal- descriptivo, retrospectivo.

DISEÑO

Se analizan resultados de pruebas rápidas de influenza y por RT-PCR realizados en el Hospital Ángeles Pedregal en el periodo comprendido del primero de septiembre del 2014 al 29 de abril del 2016, obtenidos de la base de datos del Laboratorio de Rutina del área de Microbiología y del Laboratorio de Referencia del Hospital Ángeles Pedregal.

DEFINICION DEL UNIVERSO

Todos los resultados de pacientes internos y externos del Hospital Ángeles Pedregal que se realizaron la prueba de PCR para diagnóstico de influenza y que además se hayan realizado la prueba rápida de influenza, se incluyen a todos los grupos etarios.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes con prueba rápida de influenza, que además tengan prueba de PCR en el periodo del 01 de septiembre del 2014 al 29 de abril del 2016.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Pacientes que se hayan realizado ambas pruebas en el periodo comprendido del primero de septiembre del 2014 al 29 de abril del 2016, y que una de estas pruebas haya sido cancelada.

MÉTODO DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Base de datos del sistema SILC del Laboratorio Clínico del Hospital Ángeles Pedregal con resultados de prueba rápida de influenza y de RT-PCR.

DEFINICION DE LA VARIABLE

Variable Independiente: Resultado de la prueba por RT-PCR para detección del virus de influenza.

Variable dependiente: Resultados de prueba rápida de influenza.

MATERIAL Y METODOS

La información se obtuvo a partir de la base de datos del sistema SILC del laboratorio clínico del Hospital Ángeles Pedregal. Se incluyeron a todos los pacientes con resultados de prueba rápida de influenza y RT-PCR, del 1 de septiembre del 2014 al 29 de abril del 2016.

La toma de prueba rápida de influenza se realizó según procedimientos establecidos por el Laboratorio Clínico del Hospital Ángeles Pedregal, tomadas por el personal del laboratorio utilizando un hisopo estéril para exudado nasal, el cual viene incluido en el kit del equipo de Sofía Influenza A+B FIA, este hisopo se introduce con cuidado en la fosa nasal que presente más secreción ante una inspección visual, se gira suavemente, y se empuja el bastoncillo hasta sentir resistencia a nivel de los cornetes (menos de una pulgada o 2.54cm) dentro de la fosa nasal, se rota el hisopo contra la pared nasal varias veces y finalmente se retira de la nasofaringe, posterior a la toma de la muestra se dispensa toda la solución de reactivo en el tubo de reactivos y se gira el tubo de reactivos para disolver su contenido, se coloca la muestra de exudado del paciente en el tubo de reactivos, se gira el hisopo al menos tres veces a la vez que se presiona la punta contra el fondo y a los costados del tubo de reactivos.

Se deja el hisopo en el tubo de reactivos durante un minuto, pasado este tiempo se pasa la punta del hisopo contra el interior del tubo de reactivos al retirarlo, se desecha el hisopo usado en los desechos de riesgos biológicos.

Se llena la pipeta pequeña transparente de volumen fijo de 120µl con la muestra del paciente del tubo de reactivos, una vez hecho esto, se coloca la muestra de la pipeta, dentro del pocillo de muestra del cartucho, y se deja incubando 15 minutos, posteriormente se introduce el cartucho en el equipo Sofía A+B FIA y se configura en modo LECTURA INMEDIATA, el equipo realiza la prueba y muestra los resultados transcurrido un minuto.

El equipo Sofía A+B FIA muestra la opción de LECTURA DIFERIDA, para la realización de la prueba, una vez que se pone la muestra del paciente en el cartucho, este es introducido al equipo y lo incubara 15 minutos, transcurrido este tiempo se realiza la lectura.

Los resultados se muestran en la pantalla del equipo como positivos o negativos para la gripe A y/o B.

La especificidad de la prueba no se ve afectada por otros microorganismos, en la tabla 1.1 se especifican estos microorganismos, la concentración a la que se evaluaron y el resultado, según inserto del equipo Sofía Influenza A+B FIA.

Tabla 1.1

Especificidad analítica y reactividad cruzada

Organismo/virus no gripe	Concentración	Resultado de la gripe A	Resultado de la gripe B
<i>Bordetella Pertussis</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Candida albicans</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Haemophilus influenzae</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Legionella pneumophila</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (no virulento)	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Neisseria meningitidis</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Neisseria subflava</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
<i>Streptococcus salivarius</i>	2x10 ⁶ ufc/ml	Negativo	Negativo
Adenovirus tipo 1	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Adenovirus tipo 7	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Coronavirus humano (OC43)	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Coronavirus humano (229E)	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Virus Coxsakie humano	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Citomegalovirus	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Virus de Epstein Barr	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Parainfluenza humano tipo 1	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Parainfluenza humano tipo 2	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Parainfluenza humano tipo 3	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo

Sarampión	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Metaneumovirus humano	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Virus de parotiditis (Mumps)	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Virus Sincicial Respiratorio Tipo A	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Virus Sincicial Respiratorio Tipo B	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo
Rinovirus tipo 1B	2x10 ⁵ DICT ₅₀ /ml	Negativo	Negativo

DICT: procedimiento para titulación de virus por método de Reed_Muench.

Tiempo de reporte de los resultados de influenza por prueba rápida es de una hora.

La prueba Sofía A+B FIA, utiliza el método de inmunofluorescencia para detectar antígenos nucleoproteínicos del virus de la gripe A y B en muestras de exudado nasal, nasofaríngeo y aspirado/lavado nasofaríngeo extraídas directamente de pacientes con síntomas, esta es una prueba cualitativa indicada como una ayuda en el diagnóstico diferencial rápido de infecciones virales graves con gripe A y B.

Con esta prueba se recomienda que cuando un resultado sea negativo se haga una prueba confirmatoria a través de un cultivo viral o un ensayo molecular aprobado por FDA.

Para la realización de la RT-PCR se toma la muestra por personal del laboratorio del Hospital Ángeles Pedregal, de la misma manera que se realiza para la prueba rápida de influenza a partir del hisopo enviado por Laboratorio de Referencia del Hospital Ángeles Pedregal del kit CLART® PneumoVir, la muestra se coloca en medio de transporte UTM (tapón rojo), y se refrigera a 4°C, para ser enviada al laboratorio de referencia para su procesamiento.

Esta última prueba se realiza en el Laboratorio de Referencia del Hospital Ángeles Pedregal en donde, para la detección del virus de la influenza se hace a través de microarreglos o microarrays, se utiliza el equipo CLART PneumoVir el cuál es capaz de detectar y caracterizar la presencia de los 19 tipos y subtipos más frecuentes de virus humanos que causan infecciones respiratorias en las muestras clínicas más comunes, incluida la detección específica del subtipo de Influenza A causante de la gripe A (H1N1/2009).

Los virus analizados son: Adenovirus; Bocavirus; Coronavirus; Enterovirus (Echovirus); Influenza virus A (subtipos H3N2 humano, H1N1 humano, B, C y H1N1/2009); Metapneumovirus (subtipos A y B); Parainfluenza virus 1, 2, 3, y 4 (subtipos A y B); Rinovirus; Virus Sincicial Respiratorio tipo A (VSR-A); Virus Sincicial Respiratorio tipo B (VSR-B).

La detección de los virus se lleva a cabo mediante la amplificación por RT-PCR, de un fragmento específico del genoma vírico de entre 120-330 pb.

Para evitar los falsos negativos, los tubos de PCR incorporan un control interno de amplificación cuya detección asegura el buen funcionamiento del proceso de amplificación.

La detección del producto amplificado por PCR se lleva a cabo mediante una plataforma tecnológica basada en microarrays de baja densidad: CLART® (Clinical Arrays Technology). La plataforma se fundamenta en un principio muy sencillo que consiste en imprimir un microarray en el fondo de un pocillo de placa microtiter (CLARTStrip® -CS), lo que simplifica todo el proceso de hibridación y visualización frente a los sistemas de microarrays clásicos.

El sistema de detección con CLART® PneumoVir se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del microarray en las que se produce la hibridación de los productos amplificados con las sondas específicas.

Durante la RT-PCR, los productos amplificados se marcan con biotina. Después de la amplificación, estos productos se hibridan con sus respectivas sondas específicas que están inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del microarray, tras lo que se incuba con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. El conjugado se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su vez se encuentran unidos a sus sondas específicas) y la actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia del sustrato o-dianisidina, que precipita sobre las zonas del microarray en las que ocurre la hibridación. (12).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

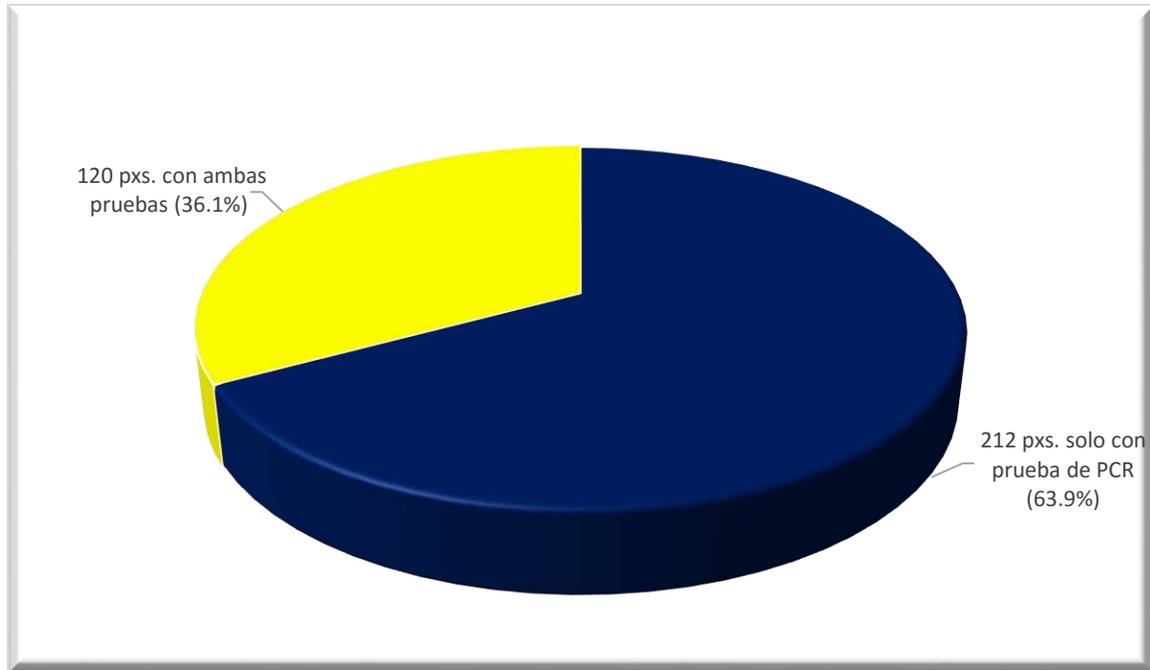
Se utiliza estadística descriptiva para establecer el tipo de virus más frecuente, por población total y por género, así como para establecer la correlación existente entre las pruebas rápidas para detección de influenza y la RT-PCR.

Para la estadística descriptiva se tomará como estándar de oro la prueba por RT-PCR.

RESULTADOS

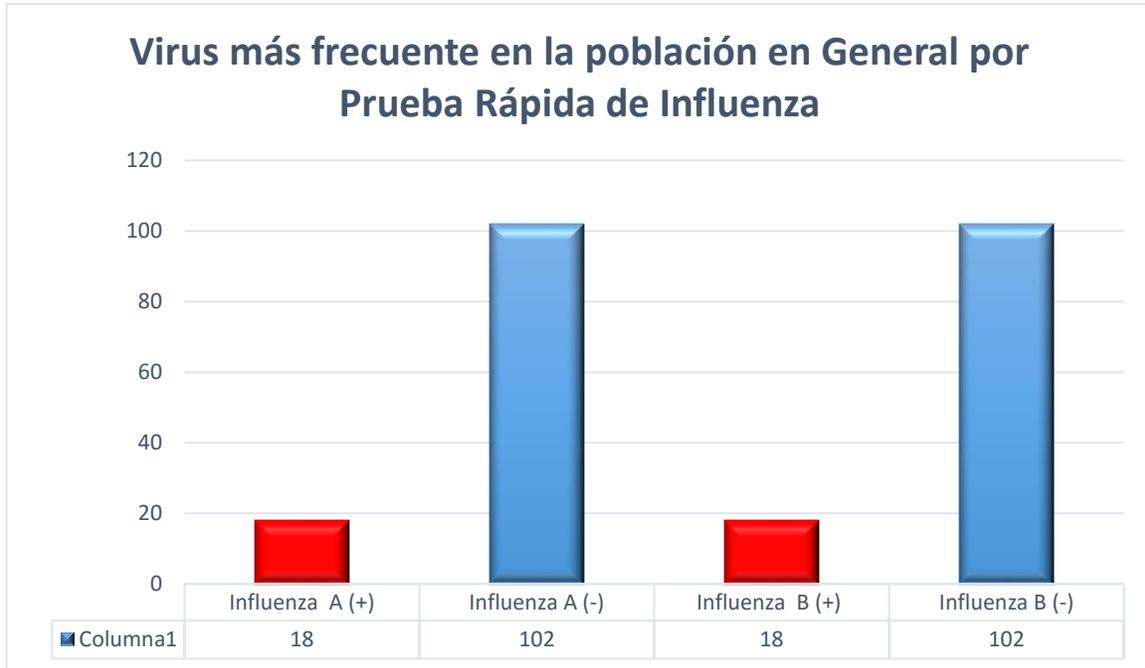
El total de pruebas de RT-PCR que se recibieron en el periodo comprendido del primero de septiembre del 2014 al 29 de abril del 2016 fueron 332, de estos, a 120 pacientes se les solicitó tanto prueba de RT-PCR como prueba rápida de influenza, como se muestra en gráfico 1. Es decir que del 100% de pruebas realizadas para RT-PCR que se pidieron durante el periodo antes mencionado, solo es 36.1% de los pacientes se les realizó ambas pruebas.

GRÁFICO 1



De los 120 pacientes a quienes se les realizaron ambas pruebas, se buscó el tipo más frecuente de virus en la población en general, sin embargo, se presentó el mismo número de casos positivos para el virus tipo A que para el virus tipo B, con 18 pruebas positivas respectivamente, representado en el gráfico número 2.

GRÁFICO 2



Si analizamos la tabla 2, podemos observar que las pruebas rápidas de influenza positivas que no coinciden con la RT-PCR, son todas aquellas que presentan positividad para el virus tipo B o las que tienen tanto positividad para el virus tipo A como para el virus tipo B, en prueba rápida.

Los resultados que coinciden en ambas pruebas, son aquellas que presentan positividad para el virus tipo A, a excepción de dos pruebas, las cuales coinciden con la detección del virus tipo B.

Esto, según información obtenida de la página del Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC-SALUD), se pudo deber principalmente, a la prevalencia del tipo de influenza, y a la sensibilidad y especificidad que presenta la prueba rápida de influenza contra pruebas como la RT-PCR.

Según la CENETEC-SALUD, menciona en su artículo de revisión, que la sensibilidad de la prueba rápida de influenza es de un 50 a 70% y tiene una especificidad del 90 al 95%(13).

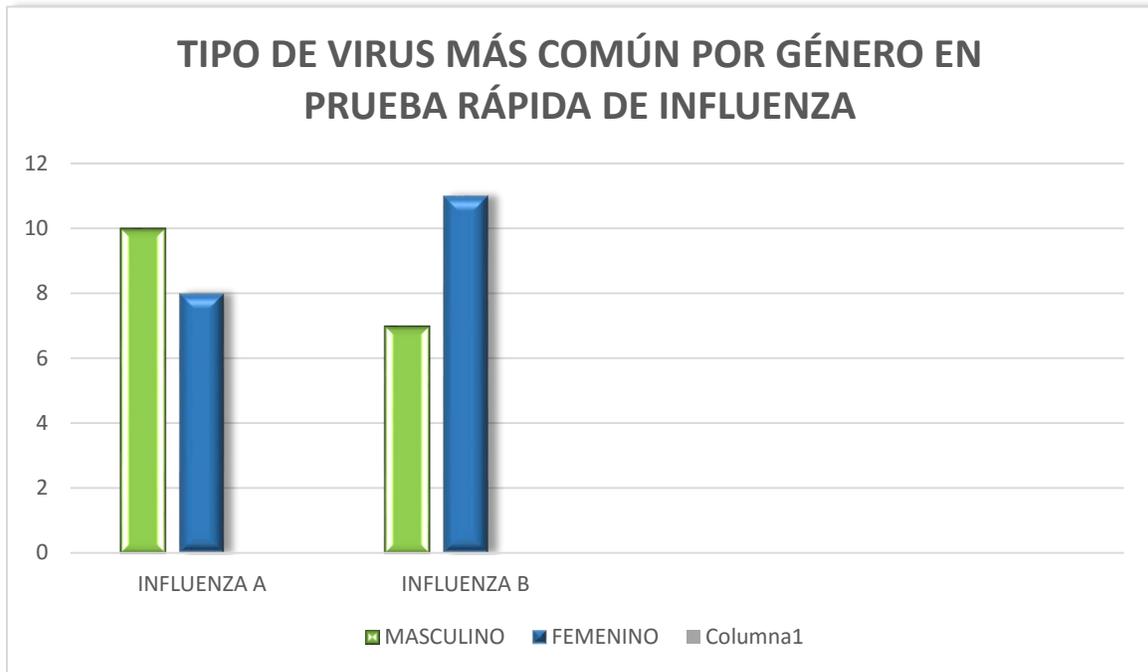
Cuando la prevalencia de la enfermedad es baja, el valor predictivo positivo (VPP) es bajo y los falsos positivos son más probables que se presenten, pero el valor predictivo negativo (VPN) es elevado y los resultados negativos tienen mayor probabilidad de que sean ciertos. (13)

La CENETEC-SALUD, recomienda que cuando la actividad de la influenza es baja, los resultados positivos por pruebas rápidas deben ser confirmados por pruebas de inmunofluorescencia aprobados por FDA, como el cultivo viral o PCR y se manejarán como falsos positivos. (13).

En el gráfico 4, se puede observar cual es el tipo más frecuente de virus por género, en la prueba rápida de influenza.

Así, el virus que con mayor frecuencia se presenta en hombres es el A, y en mujeres es el virus tipo B con 11 pruebas positivas. (Gráfico 4).

GRÁFICO 4



Para analizar la correlación de ambas pruebas, utilizaremos la tabla 2.

De las 120 pruebas que se realizaron para RT-PCR y prueba rápida de influenza, 79 de ellas tienen correlación, es decir que del 100% de las pruebas, el 65.8% de ellas si coinciden.

Sin embargo, existe un 34.2% de las pruebas que no coinciden, es decir, 41 pruebas no presentan correlación entre la prueba rápida de influenza y la RT-PCR.

Dieciséis de las 41 pruebas muestran resultados negativos en la prueba rápida de influenza, pero son positivas en las pruebas por RT-PCR, falsos negativos, y veinticinco pruebas son positivas para prueba rápida de influenza y negativas en la prueba por RT-PCR, falsos positivos.

Esta diferencia en el resultado negativo de las pruebas rápidas de influenza contra las positivas de la RT-PCR, se puede deber principalmente, a la carga viral que presenta en ese momento el paciente, otra posibilidad puede ser por una mala toma de muestra, es decir, que la muestra sea insuficiente y no detectable en el equipo.

Las pruebas que son positivas en las pruebas rápidas y negativas en la RT-PCR, presentan un patrón, todas son positivas para la influenza B, o en el caso de dos pruebas rápidas son positivas para A y para B, es decir, que estas pruebas son falsos positivos, la explicación para esto, es que cuando la prevalencia de la enfermedad es baja, el valor predictivo positivo (VPP) es bajo y los falsos positivos son más probables que se presenten, pero el valor predictivo negativo (VPN) es elevado y los resultados negativos tienen mayor probabilidad de que sean ciertos. (13).

Lo anterior nos da la pauta para poder revisar cuál es el VPP y el VPN de la prueba rápida de influenza, así como su sensibilidad y especificidad, según los datos obtenidos en este trabajo.

En la tabla 3 se presentan los datos para la obtención del VPP y VPN, así como la sensibilidad y especificidad para influenza tipo A.

Para sacar el VPP se utilizará el Teorema de Bayes.

$$p(B/A) = \frac{p(A/B)p(B)}{p(A/B)p(B) + p(A/B^c)p(B^c)}$$

Donde: $p(A/B) = VP/E$

$p(B) = E/ST$

$p(A/B^c) = FP/NE$

$p(B^c) = NE/ST$

Entonces:

$$p(B/A) = \frac{(VP/E)(E/ST)}{(VP/E)(E/ST) + (FP/NE)(NE/ST)} = \frac{VP/ST}{VP/ST + FP/ST}$$

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

TABLA 3

INFLUENZA A				
PCR				
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
PRUEBA RAPIDA	POSITIVO	14	4	18
	NEGATIVO	10	92	102
	TOTAL	24	96	120
	VPP	77.78%		
	VPN	90.20%		

En la tabla 4 se presentan los datos para la obtención del VPP y VPN, así como la sensibilidad y especificidad para influenza tipo B.

TABLA 4

INFLUENZA B				
PCR				
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
PRUEBA RAPIDA	POSITIVO	2	16	18
	NEGATIVO	6	96	102
	TOTAL	8	112	120
	VPP	11.11%		
	VPN	94.12%		

En la tabla 5 se presentan los datos para la obtención del VPP y VPN, así como la sensibilidad y especificidad para influenza tanto A como B.

TABLA 5

INFLUENZA A + B				
PCR				
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
PRUEBA RAPIDA	POSITIVO	16	25	41
	NEGATIVO	16	63	79
	TOTAL	32	88	120
	VPP	39.02%		
	VPN	79.75%		

Es decir, que la probabilidad de tener influenza cuando una prueba rápida resulta positiva es del 39.02%, por lo tanto, se puede inferir que existe un 60.98% de probabilidad de no tener influenza, aun teniendo resultados positivos, tabla 5.

Con lo anterior se explica que la sensibilidad para la prueba rápida de influenza es del 52%, lo que nos quiere decir que la capacidad de la prueba para detectar pacientes enfermos, en realidad no es alta, ya que, entre más se acerque al 100%, hay una mejor capacidad en la detección de enfermos por medio de la prueba, por tal motivo siempre se recomienda verificar el resultado de esta prueba con pruebas más sensibles como la PCR y de esta manera se evita retrasar tanto el diagnóstico como tratamiento.

No existe un nivel de sensibilidad que determine que una prueba sea aceptable, lo que se sabe es que una sensibilidad baja produce pérdida de casos que pudieran ser tratados, siendo más seria la situación de que, a mayor gravedad del padecimiento se dejarían a pacientes enfermos como fuente de infección en la comunidad, lo que representaría un costo más alto, en la salud pública. (14).

El valor predictivo negativo para la prueba rápida de influenza nos indica la probabilidad de que un resultado sea realmente negativo, es decir que hay un 79.75% de probabilidades de que realmente no se tenga la enfermedad, tabla 5.

Por lo tanto, podemos inferir que la especificidad para la prueba rápida de influenza es buena, ya que se encuentra más cercana al 100%.

Con lo anterior, se demuestra, que la prueba rápida de influenza tiene una mayor especificidad que sensibilidad, es decir, se puede detectar mejor los casos negativos que los positivos.

DISCUSIÓN

El laboratorio clínico es una gran herramienta diagnóstica, sin embargo, la clínica sigue siendo el pilar para la realización de diagnósticos en la medicina actual, pero cada vez más, existen más pruebas de laboratorio que ayudan al diagnóstico de enfermedades.

Se ha puesto especial interés en la influenza, ya que ha sido protagonista de varias pandemias mortales a través de la historia del ser humano.

Las pandemias de influenza son eventos impredecibles pero recurrentes que pueden tener consecuencias graves para la salud humana y el bienestar económico mundial. La planificación y los preparativos anticipados son fundamentales a fin de atenuar el impacto de una pandemia, para eso se debe contar con pruebas fáciles de realizar y de bajo costo, pero que al mismo tiempo sean efectivas, en particular, la prueba rápida de influenza presenta una baja sensibilidad y alta especificidad, por lo que debemos recordar que esta prueba no es confirmatoria, se recomienda siempre corroborar el resultado con pruebas altamente sensibles y específicas como lo es la prueba de detección de influenza por RT-PCR, la cual detecta el ARN del virus.

En este trabajo se demostró que la prueba rápida de influenza en específico SOFIA Influenza A+B FIA, es una buena herramienta para poder detectar los pacientes libres de influenza ya que su valor predictivo negativo es del 79.75%, pero no así para detectar a los que tienen la enfermedad ya que el valor predictivo positivo para dicha enfermedad es tan solo del 39.02%, por lo que se recomienda confirmar resultado con prueba por RT-PCR.

CONCLUSIONES

1.- Para la influenza A, el equipo SOFIA Influenza A+B FIA presenta una sensibilidad y especificidad alta, del 77.78% y 90.20% respectivamente.

2.- Para la influenza B, el equipo SOFIA Influenza A+B FIA presenta una sensibilidad baja del 11.11% y una especificidad del 94.12%.

3.- La prueba rápida de influenza SOFIA Influenza A+B FIA, en general presenta una baja sensibilidad, sobre todo para el virus influenza tipo B.

4.-Por lo mencionado en los puntos anteriores, siempre se deben de corroborar los resultados de la prueba rápida de influenza con pruebas más sensibles y específicas aprobadas por la FDA como la RT-PCR.

5.-Se recomienda revisar las guías para el uso de las pruebas rápidas de influenza por la CDC.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ayora- Talavera Guadalupe; INFLUENZA: HISTORIA DE UNA ENFERMEDAD, Laboratorio de Hematología, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, 1999.
- (2) D. A. Henderson, Brooke Courtney, Thomas V. Inglesby, Eric Toner, and Jennifer B. Nuzzo, PUBLIC HEALTH AND MEDICAL RESPONSES TO THE 1957-58 INFLUENZA PANDEMIC, 2009.
- (3) López Martínez Irma, INFLUENZA A(H1N1) INFLUENZA A (H7N9), laboratorio de virus respiratorios, septiembre 2015.
- (4) Secretaria de Salud, INFLUENZA DOCUMENTO TÉCNICO, Dirección General de Salud, 2014.
- (5) The history of vaccines an educational resource by the college of physicians of Philadelphia, PANDEMIAS DE INFLUENZA, enero 2016.
- (6) López Susana, Arias Carlos F., INFLUENZA A: BIOLOGÍA, VACUNAS Y ORIGEN DEL VIRUS PANDÉMICO A/H1N1, Instituto de Biotecnología/UNAM, Campus Morelos, 2010.
- (7) Boletín Alerta y Respuestas mundiales, ¿Qué es el virus gripal A (H1N1) 2009 pandémico, ¿Organización Mundial de la Salud, 24 de febrero del 2010?
- (8) Manual CLART PneumoVir, CARACTERIZACIÓN DE VIRUS CAUSANTES DE INFECCIONES RESPIRATORIAS HUMANAS MEDIANTE IDENTIFICACIÓN GENÓMICA PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO, julio 2015.
- (9) Secretaría de Salud, LINEAMINETOS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE INFLUENZA, SSA México 2012.
- (10) Guía Práctica Clínica, PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA INFLUENZA ESTACIONAL, 2015.
- (11) Dra. Cuevas R., Psico. Alejo M, VALIDEZ Y FIABILIDAD DE LAS MEDIDAS DE EXPOSICIÓN Y MEDICIÓN, Facultad de Psicología, UNAM, octubre 2010.
- (12) Documento de orientación, PREPARACIÓN Y RESPUESTA ANTE UNA PANDEMIA DE INFLUENZA, Organización Mundial de la Salud 2009.
- (13) Guía para médicos sobre el uso de pruebas de diagnóstico rápido de influenza, CDC, 2015.
- (14) Inserto QUIDEL SOFIA Influenza A+B FIA.