

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

Equipos

- termociclador AB7500 Fast Real-Time PCR System
- gabinete de bioseguridad tipo II
- estación de trabajo para PCR
- micropipetas automáticas de intervalo 0.5 a 10 μL
- micropipetas automáticas de intervalo 1 a 10 μL
- micropipetas automáticas de intervalo 20 a 200 μL
- micropipetas automáticas de intervalo 100 a 1000 μL
- centrífuga para placas
- microcentrífuga
- agitador tipo vórtex
- ultracongelador
- congelador
- refrigerador

Materiales

- bata desechable para cirujano de manga larga estéril
- puntas con filtro estériles de 10 μL
- puntas con filtro estériles de 200 μL
- puntas con filtro estériles de 1000 μL
- microtubos de polipropileno con capacidad de 600 μL
- microtubos de polipropileno con capacidad de 1500 μL
- microtubos de polipropileno con capacidad de 2000 μL con tapa de rosca
- gradillas de plástico para tubos de 1500 μL

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

- guantes de nitrilo
- papel aluminio
- placas de 96 pozos *Fast* o estándar
- tiras de 8 tubos *Fast* de 0.1 ml
- tiras de tapas ópticas
- caja de almacenamiento para criotubos para temperaturas de hasta -100 °C
- bloque de enfriamiento para microtubos de polipropileno con capacidad de 1500 µL
- bloque de enfriamiento para placas y tiras de tubos
- bolsas de polipropileno
- contenedor para puntas desechables
- gasa estéril
- marcadores indelebles

Reactivos y materiales biológicos

- Kit de QIAgen OneStep RT-PCR (no. de Catalogo 210212)
- Estuche comercial de Invitrogen Superscript™ III Platinum ® One Step Quantitative Kit
- Agua grado biología molecular (libre de RNasa y Nasa)
- Iniciadores (sentido y antisentido) específicos para el gen de Influenza B (25 µM);
 - BHA-188F forward primer
 - BHA270R reverse primer
- Sondas marcadas específicas para Yamagata (YAM) y Victoria (VIC) (10 µM, 200nM final).
 - Sonda VIC2-VIC

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

- o Sonda YAM2-FAM
- RNase away
- Controles positivos (Influenza B Victoria, Influenza B Yamagata).

Medidas de bioseguridad

Para el desarrollo de esta técnica se deben de tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- Mantener como áreas separadas, los lugares destinados para la extracción del material genético, preparación de la mezcla de reacción, el lugar donde se colocarán los extractos del material genético y la colocación de los controles positivos, así como el área donde se encuentran los equipos.
- Debe tenerse en cuenta que el área designada inicialmente para colocar el material genético extraído, no debe ser utilizada para colocar los controles positivos de la reacción, así como es indispensable realizar de manera adecuada, la descontaminación pertinente del gabinete utilizado, cada vez que haya culminado la actividad.
- Asegurarse de contar con equipos y materiales exclusivos de cada área, como pipetas, minicentrífugas y microcentrífugas, así como tubos para minicentrífuga, placas para PCR, tapas ópticas y puntas para cada tipo de pipeta que se utilice.
- Utilizar el equipo de protección personal, el cual debe ser exclusivo para cada una de las áreas.
- Se recomienda que por cada placa completada con los extractos de material genético se utilicen guantes nuevos, o en su defecto, limpiar con abundante alcohol al 70% o solución de ARNsa-Away los guantes ya utilizados, con el fin de evitar contaminación cruzada o cada vez que se sospeche de algún tipo de contaminado.
- Mantener los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos el mayor tiempo posible.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

- Mantener la cadena fría en todo momento, para minimizar la degradación de los reactivos utilizados.
- También cabe mencionar que cada vez que se coloque la muestra (material genético) por microtubo en la placa, debe cambiarse la punta y tapar los pozos inmediatamente después de colocar el material genético.
- Al terminar de colocar los extractos, tapar la placa nuevamente con el papel aluminio con el que fue proporcionada inicialmente.
- El material de desecho generado de ésta actividad, debe ser colocado en el contenedor para manejo especial, en el cual se coloca una bolsa transparente para el depósito de éstos.
- Después de haber colocado todos los extractos de ácidos nucleicos, se debe de cambiar de gabinete de bioseguridad o gabinete de PCR para colocar el control positivo, asegurándose de que todas las tapas ópticas de los microtubos de la placa se encuentren perfectamente bien selladas.
- Se utilizará bata desechable nueva, guantes libres de talco nuevos y al igual que en el área limpia, no podrán salir de esta área el equipo y materiales que aquí se utilicen.

Procedimiento

1. *Condiciones de almacenamiento de los reactivos*

- Estuche comercial de QIAgen OneStep RT-PCR, debe almacenarse a -20 °C.
- Estuche comercial de Invitrogen Superscript™ III Platinum ® One Step Quantitative Kit.
- Los iniciadores y las sondas liofilizados deben almacenarse. Una vez hidratados deben almacenarse a -20 °C ± 10 °C. Si el uso es continuo puede mantenerse a 4 °C para evitar su degradación hasta su término.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

2. *Rehidratación de iniciadores y de sondas*

NOTA: Llevar a cabo ésta actividad dentro del Área de Master Mix.

- Hidratar los iniciadores y sondas liofilizados con agua grado biología molecular, según las especificaciones del fabricante, a modo de obtener las concentraciones que se requieren 25 μ M (500 nM) para los iniciadores y 10 μ M (200 nM) para las sondas; mezclar con la punta de la micropipeta aproximadamente 20 veces y posteriormente mezclar por vortex durante cinco segundos. Una vez rehidratados, realizar alícuotas de 100 μ L y almacenar a -20 °C o menos si el uso no es tan frecuente, si su uso es muy frecuente se mantienen de 2 a 8 °C hasta su término.
- Colocar en una gradilla fría todos los reactivos protegiéndolos de la luz.

Todos los reactivos deben mantenerse a una temperatura de 2-8 °C durante su uso.

- Descongelar las alícuotas de los iniciadores y las sondas. Una vez descongeladas no se deben de volver a congelar.

3. *Preparación de la mezcla de reacción para el RT-PCR en tiempo real*

NOTA: Llevar a cabo ésta actividad dentro del Área de Master Mix, la cual se encuentra dentro del Laboratorio y Mantener todos los reactivos en bloques de enfriamiento para tubos durante todo el montaje de la prueba.

La preparación de la mezcla de reacción se realiza de acuerdo al cuadro 11, los valores en la tabla solo son para una reacción, se deberán realizar los cálculos de acuerdo al número de muestras que se requiera trabajar, así como los controles, un control positivo y un control negativo por cada corrida de PCR, tomando en cuenta que es necesario que prepare en exceso la mezcla de reacción, considerando el error de pipeteo, así como el remanente en la punta utilizada, por ejemplo:

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

- Si el número de muestras (n) incluyendo los controles = 1 a 25, es n+3.
- Si el número de muestras (n) incluyendo los controles = 25 a 50, es n+4.
- Si el número de muestras (n) incluyendo los controles = 50 a 75, es n+5.
- Si el número de muestras (n) incluyendo los controles > a 75, es n+6.

Cuadro 1.- Reactivos para q-RT-PCR (Nacional Influenza Centre for Norway, 2010).

Reactivo	Volumen (µL) por reacción QIAgen OneStep	Volumen (µL) por reacción Invitrogen Superscript™ III Platinum	Volumen (µL) por reacción AgPath-ID™ One-Step RT-PCR
Agua grado Biología Molecular	14.0	7.6	7.6
Buffer (x5) (QIAgen One-Step) / Buffer (x2) (Invitrogen Superscript™ III Platinum)	5.0	12.5	12.5
Mezcla de dNTP QIAgen	1.0	-----	-----
Iniciador sentido BHA-188F 500 nM final	0.5	0.5	0.5
Iniciador antisentido BHA270R 500 nM final	0.5	0.5	0.5
Sonda VIC2	0.5	0.5	0.5
Sonda YAM2	0.5	0.5	0.5
Enzima	1.0	1.0	1.0
Inhibidor de RNasa (ca 40U/ µL)	0.1	-----	-----
Volumen final (para una muestra)	23.1	23.1	23.1

Nota: Utilizar una agitación rápida (2") en vortex a velocidad entre 5-7.

4. Adición de moldes a la mezcla de reacción

NOTA: Llevar a cabo ésta actividad dentro del Área de Templados, la cual se encuentra dentro del Laboratorio.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

- Después de haber preparado la mezcla de reacción de acuerdo al cuadro 1 para cada juego de iniciadores y sondas, con ayuda de una micropipeta automática o de repetición, colocar 23 μ l de la o las mezclas de reacción en los pozos correspondientes. Se recomienda colocar por columna (de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha), como se muestra en la Figura 1.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VIC2-YAM2	A	NTC	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
VIC2-YAM2	B	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
VIC2-YAM2	C	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
VIC2-YAM2	D	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
VIC2-YAM2	E	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
VIC2-YAM2	F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
VIC2-YAM2	G	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
VIC2-YAM2	H	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	PTC

Figura 1.- Ejemplo de una placa de 96 microtubos para PCR.

- Posteriormente se colocaran 2 μ L de agua grado biología molecular en el pozo 1A (Figura 35), esto servirá como control negativo de reactivos (NTC, Negative Template Control), de la mezcla de reacción.
- Se colocan las tapas ópticas únicamente en el pozo marcado como NTC, además, a la placa de microtubos, se le cubre toda su superficie con papel aluminio nuevo y se mantiene a 4 °C mientras no vaya a ser utilizada.
- Una vez organizados los extractos molde se elaborarán las hojas de registro, de acuerdo a la forma en que se colocarán en las placas de microtubos (Figura 2), donde serán ubicados los números correspondientes a cada extracto de ácidos nucleicos.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NTC	M8										M88
M1	M9										M89
M2	M10										M90
M3	M11										M91
M4	M12										M92
M5	M13										M93
M6	M14										M94
M7	M15										PTC

Figura 2.- Ejemplo de la distribución de los ácidos nucleicos molde para la subtipificación de linaje de Influenza B, así mismo la distribución de los controles positivos y negativos en la placa de microtubos para PCR y en la hoja de registro de PCR.

- Una vez con las hojas de registro elaboradas y los extractos de material genético ordenados adecuadamente en una gradilla de plástico fría o en hielo, la placa cubierta con papel aluminio y en red fría se pasará al área del laboratorio asignada para “Templados”, en donde se procederá a colocar 2 μ L del extracto por cada microtubo dentro de la placa o tiras de reacción, para obtener un volumen final por pozo de 25 μ L. Cabe señalar que conforme se vayan adicionando los extractos en los pozos correspondientes, al finalizar la columna, se colocará una tapa óptica, esto se repetirá hasta completar todas las columnas. Este paso se realiza en un gabinete de bioseguridad tipo II o en gabinetes para PCR.
- Finalmente se pasa la placa cubierta con papel aluminio y en red fría al área del laboratorio asignada para “Controles Positivos”, en donde se colocarán 2 μ L por cada microtubo o pozo en la placa de PCR de los controles positivos para Yamagata y Victoria (C+ VIC/YAM) en el mismo pozo “PTC”. Cabe hacer mención que el Control Positivo no necesariamente deben colocarse en el último pozo de la columna 12, ya que, si son menos muestras las que se coloquen en la placa, el control positivo pueden recorrerse.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

Posteriormente, se traslada la placa de microtubos cubierta con el papel aluminio, al área donde se encuentren los termocicladores en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx. Antes de introducir la placa al termociclador se centrifuga a 1400 rpm durante 1 min.

5. Procedimiento para realizar corridas de RT-PCR para la subtipificación de linaje de Influenza B en el equipo Applied Biosystems 7500 Fast.

- Encender la Laptop y el equipo AB 7500 Fast colocando la clave y contraseña correspondiente.
- Abrir el software “Applied Biosystems 7500 Fast Dx Systems”, haciendo doble clic sobre el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora (Figura 3).
- El software abrirá exitosamente presentando una ventana con el nombre “Quick Startup document” (inicio rápido de documento, Figura 4).

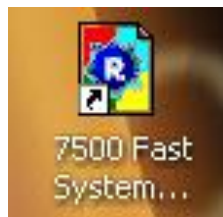


Figura 3.- Reconocimiento del acceso directo al software.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

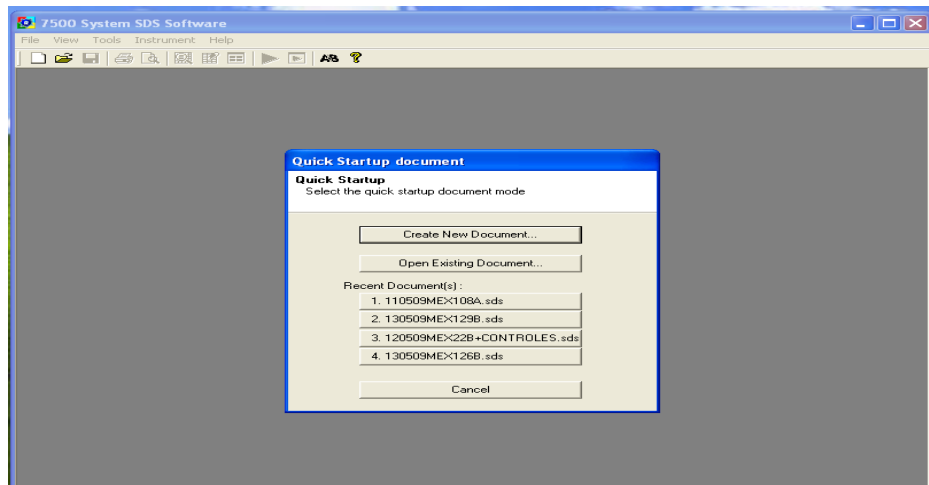


Figura 4.- Ventana de inicio del software.

En la ventana “*Quick Startup document*” (inicio rápido de documento) hacer clic en la opción “*Create New Document*” (crear nuevo documento). Emergerá una ventana con el nombre de “*New Document Wizard*” (ventana de Nuevo Documento), como se observa en la Figura 5.

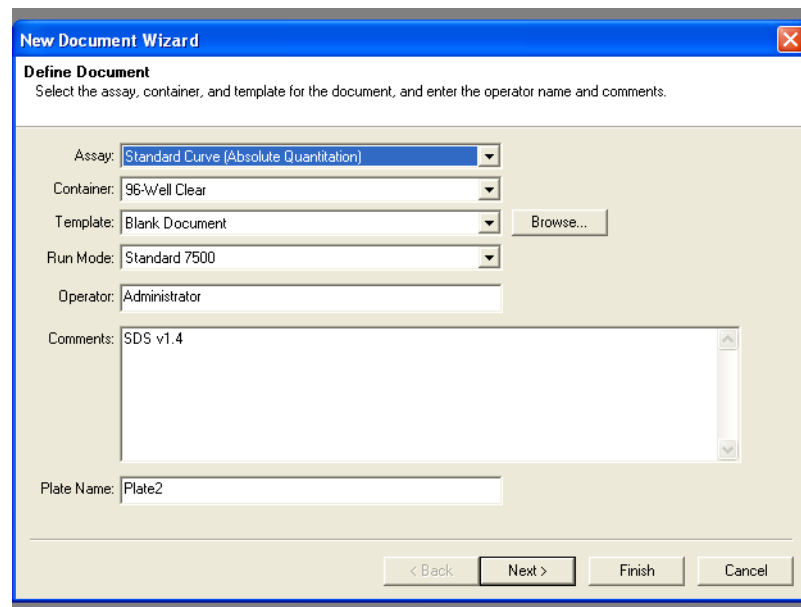


Figura 5.- Ventana para crear un nuevo documento.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

En ésta ventana se programará la corrida, para lo cual se presionará el botón “**Browse...**”, el cual se encuentra del lado derecho del parámetro “**Template**”, lo que dará lugar a la plantilla previamente programada, ejemplos en las Figuras 6 y 7.

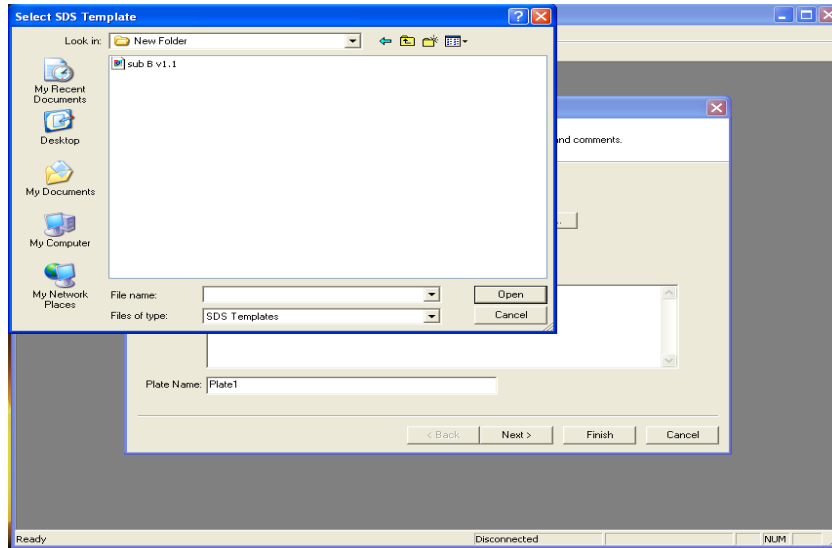


Figura 6.- Localización de la plantilla a utilizar.

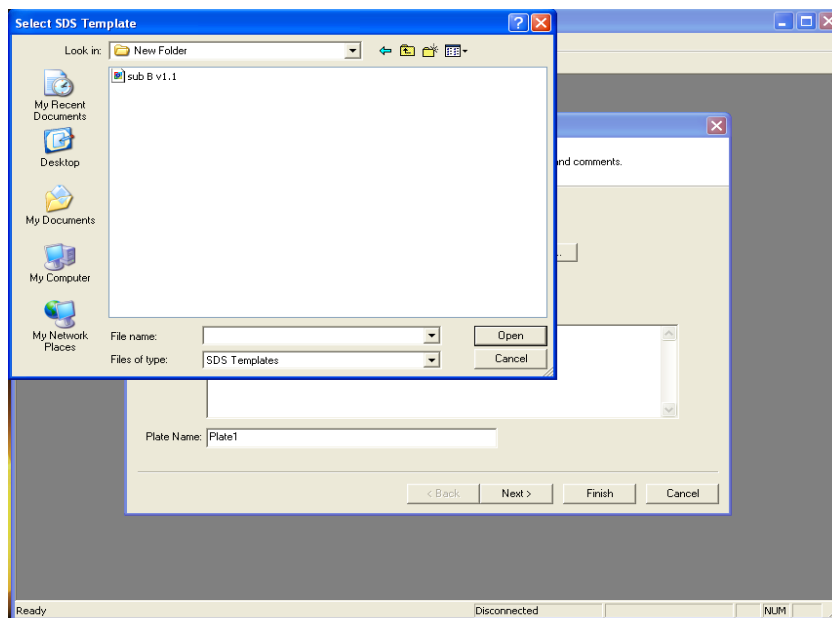


Figura 7.- Selección de la plantilla a utilizar.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

Una vez localizada y seleccionada la plantilla a utilizar, se hará clic en el botón de “**Open**” que se encuentra en la parte inferior derecha de la última ventana que abrimos.

La ventana desaparecerá y en “**New Document Wizard**”, cambiará la opción de Template, por la del nombre de la plantilla que seleccionamos, una vez corroborado este paso en la parte inferior de esta ventana se encuentra la opción de “**Plate Name**”, se colocará el nombre de la corrida que se va a programar, recordar que una de las sugerencias es que sea de la siguiente forma: FECHA (día-mes-año) espacio NOMBRE DE LA CORRIDA espacio NUMERO DE LA CORRIDA.

Posteriormente dar clic en el botón “**Finish**”, el cual se encuentra en la parte inferior derecha de la ventana en la que nos encontramos.

El software hará una pequeña pausa, esto por el reconocimiento y la inicialización del equipo Applied Biosystems 7500 Fast.

Después de que el instrumento haya iniciado, en la pantalla aparecerá la plantilla elegida y programada anteriormente con los marcadores que deseamos (Figura 8), en esta plantilla colocaremos los números de los extractos de RNA que analizaremos.

La forma de ingresar las muestras en la plantilla, será empezando por la columna 1 de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha, cada celda corresponderá a un pozo de la placa de 96 pozos para qRT-PCR, la selección de las celdas se realizará como si se tratara de una hoja de Excel (ejemplo, Figura 8).

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

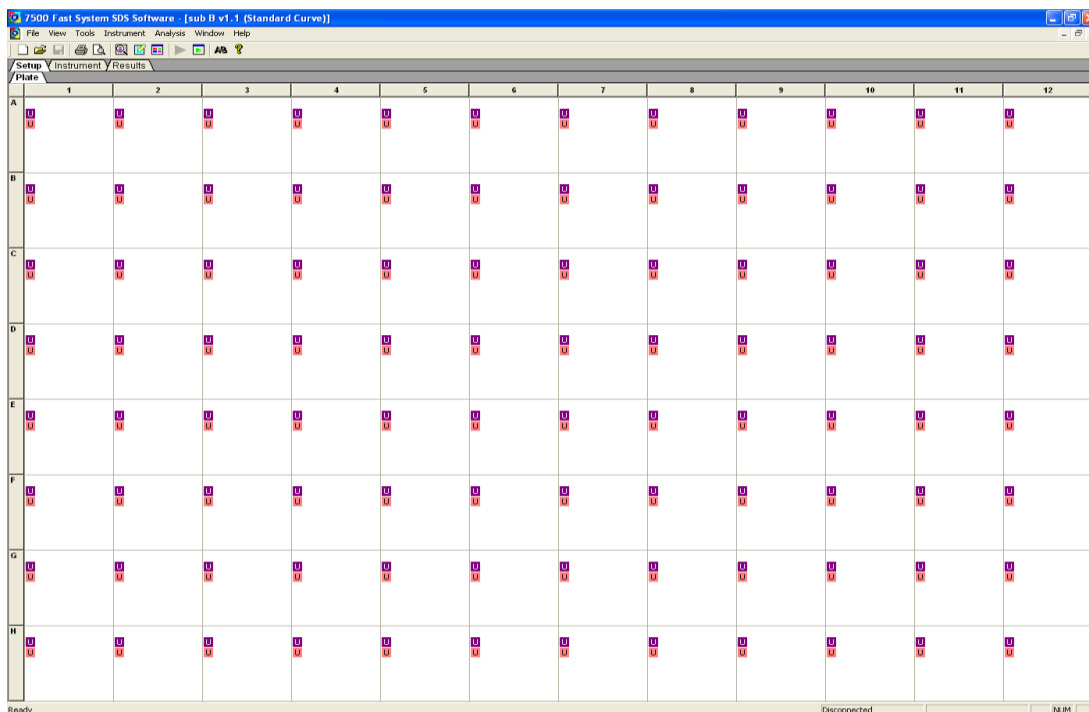


Figura 8.- Programación de las celdas de la plantilla.

Para programar cada muestra, bastará con colocarse, ya sea por medio del ratón o por medio de las flechas de navegación sobre cada celda, escribiendo el número correspondiente, si por error se llegara a escribir un número que no corresponde en alguna celda, se seleccionará la celda correspondiente y se escribirá el número correcto. Estos pasos se repetirán para toda la plantilla. Una vez que las muestras estén programadas dar clic en la pestaña “*Instrument*” que se encuentra en la parte superior izquierda de la ventana por debajo de la barra de menús.

En esta parte de la programación se corroborarán las condiciones de termociclado, las cuales fueron establecidas al momento en que se creó la plantilla; el volumen de la reacción y el modelo en que fue programada la corrida (Figura 9).

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

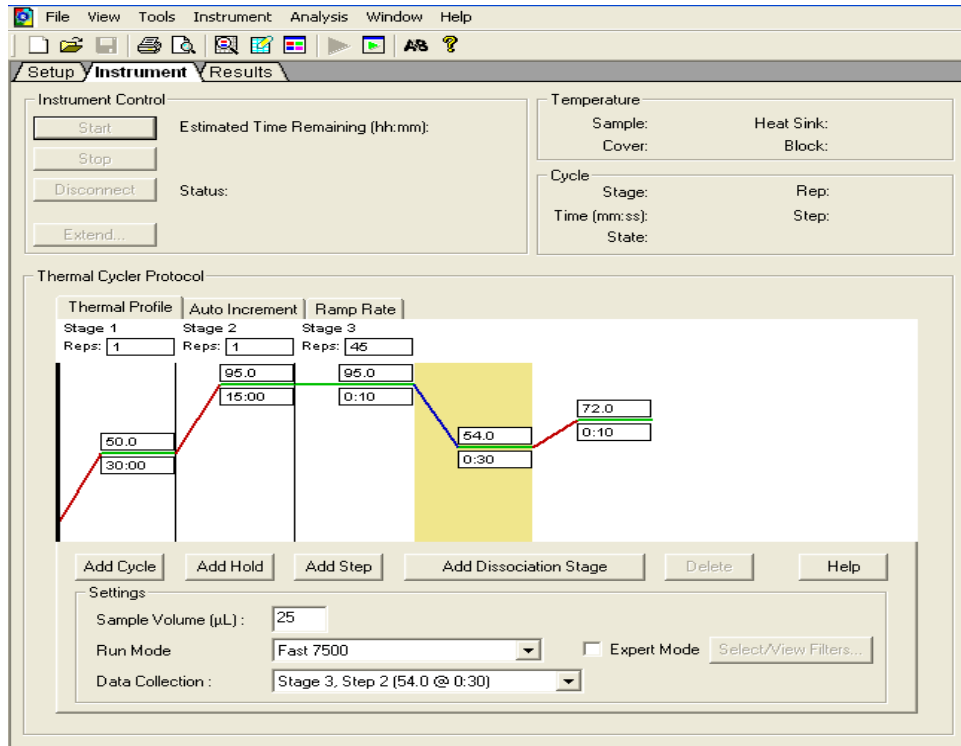


Figura 9.- Programación de los ciclos para la tipificación de linaje de Influenza B.

Una vez verificadas las condiciones de termociclado, se guardará la corrida: en el menú principal, seleccionar **"File"** (Archivo) y elegir la opción **"Save As"** (Guardar como) y almacenar la corrida en la carpeta que se encuentra destinada a acumular todas las corridas realizadas.

Corroborar que la corrida fue guardada, dar clic en el botón **"Start"** que se encuentra en la parte superior izquierda de la misma ventana (Figura 9). La corrida tardará aproximadamente 2 horas con 22 minutos para completarse.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

6. Interpretación por laboratorio

Después de que la corrida de qRT-PCR ha sido completada, aparecerá en la pantalla de la computadora un mensaje que indica el término de la corrida (Figura 10), dar clic en el botón de “OK”, el cual se encuentra en el centro de la pantalla.

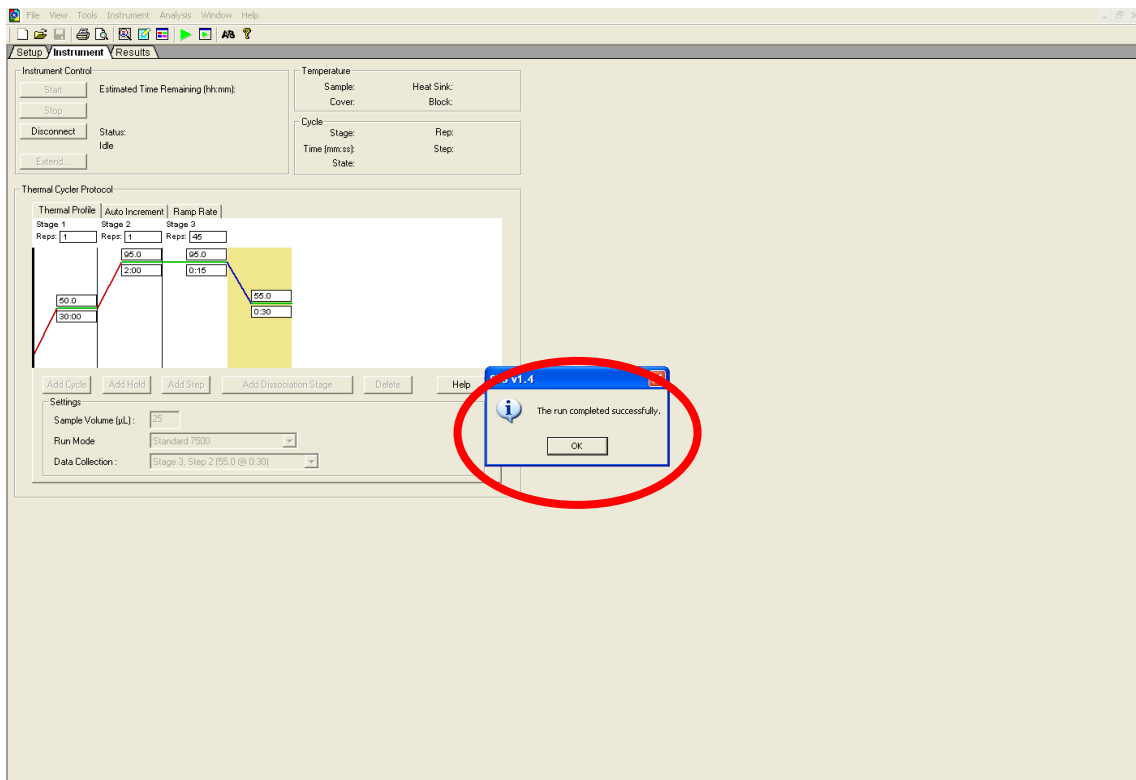


Figura 10.- Término de la corrida de qRT-PCR para la subtipificación de linaje de Influenza B.

Se selecciona la pestaña “**Results**” (Resultados), la cual se encuentra debajo de la barra de menús de la ventana (Figura 11), en esta opción se observaran varias subpestañas con el nombre de **Plate** (plantilla), **Spectra** (espectro), **Component** (componente), **Amplification Plot** (panel de amplificación), **Standard Curve** (curva estándar), **Dissociation** (disociación), **Report** (reporte). Encontrándose únicamente activa la subpestaña **Plate**.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

La subpestaña que aparecerá activa al momento de escoger la pestaña de **Results** será la de **Plate**, aquí podremos observar las celdas con los números de las muestras que programamos al inicio de la corrida, las cuales presentarán la leyenda de **Undet.**, ésta detección es de manera cualitativa y no cuantitativa por lo cual no se ocupa una curva estándar de concentración de RNA del virus por lo tanto no se cuantifica el material genético presente en cada muestra, razón por la cual el equipo emite dicha leyenda (Figura 11).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	146 Undet.	159 Undet.	411 Undet.	521 Undet.	617 Undet.	698 Undet.	769 Undet.	800 Undet.	856 Undet.	996 Undet.	1014 Undet.	
B	44 Undet.	150 Undet.	340 Undet.	412 Undet.	525 Undet.	619 Undet.	699 Undet.	790 Undet.	801 Undet.	857 Undet.	997 Undet.	1016 Undet.
C	141 Undet.	151 Undet.	342 Undet.	414 Undet.	532 Undet.	624 Undet.	700 Undet.	791 Undet.	802 Undet.	858 Undet.	1003 Undet.	1018 Undet.
D	142 Undet.	152 Undet.	343 Undet.	415 Undet.	542 Undet.	626 Undet.	705 Undet.	793 Undet.	803 Undet.	859 Undet.	1005 Undet.	1021 Undet.
E	143 Undet.	153 Undet.	344 Undet.	478 Undet.	543 Undet.	627 Undet.	707 Undet.	795 Undet.	806 Undet.	934 Undet.	1008 Undet.	1022 Undet.
F	144 Undet.	156 Undet.	345 Undet.	480 Undet.	583 Undet.	628 Undet.	709 Undet.	796 Undet.	807 Undet.	936 Undet.	1007 Undet.	1025 Undet.
G	146 Undet.	157 Undet.	356 Undet.	484 Undet.	584 Undet.	629 Undet.	712 Undet.	797 Undet.	847 Undet.	992 Undet.	1009 Undet.	1027 Undet.
H	148 Undet.	158 Undet.	386 Undet.	485 Undet.	585 Undet.	637 Undet.	713 Undet.	799 Undet.	850 Undet.	993 Undet.	1012 Undet.	POS Undet.

Figura 11.- Inicio de revisión de resultados, pestaña de **Results** sub-ventana **Plate**.

Al terminar la corrida, se hará uso de la subpestaña **Amplification Plot**, en la cual se mostrará una ventana en la que se ha registrado la fluorescencia que ha sido emitida por la amplificación que se encuentra en cada pozo de acuerdo al ciclo del termociclado (Figura 12).

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

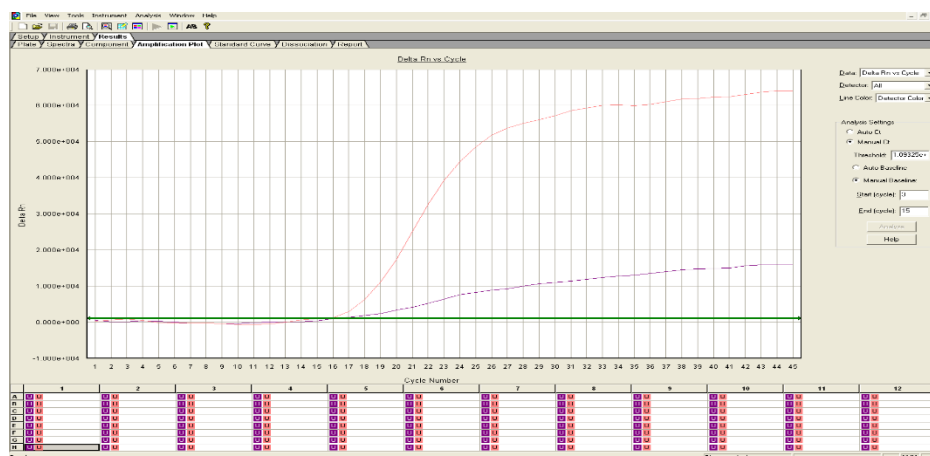


Figura 12.- Observación de las curvas de amplificación de los controles de la qRT-PCR.

En la parte inferior de ésta misma ventana, se encuentra un cuadro con 8 renglones y 12 columnas, de los cuales se seleccionarán las celdas en donde se encuentran los control de la reacción de la qRT-PCR, primero se selecciona el control negativo, el cual se encontrará en la celda A de la columna 1, así como el control positivo, el cual será colocado con base en la cantidad de muestras que se trabajarán, siempre es colocado al final de las muestras; ambos controles se seleccionarán simultáneamente, manteniendo la tecla Control presionada para que sean visualizados (Figura 13).

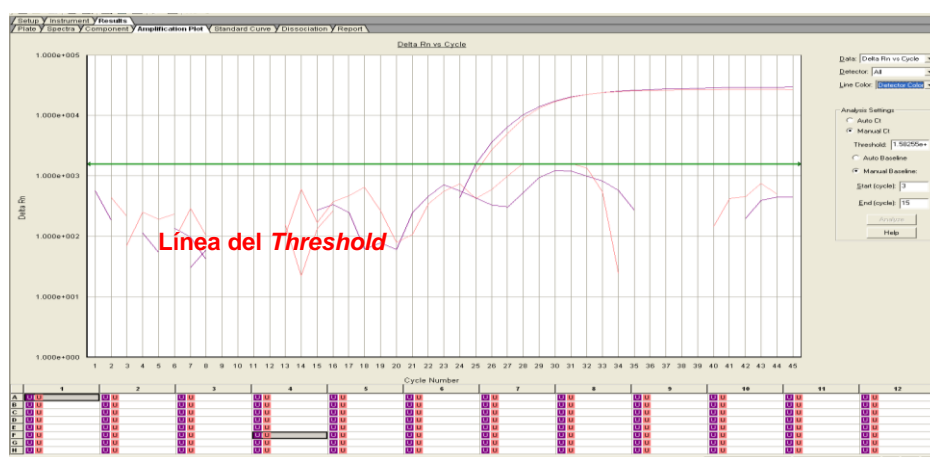


Figura 13.- Observación de las curvas de amplificación de los controles de la qRT-PCR con los colores seleccionados para cada marcador.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

Una vez seleccionados los controles, verificar que los parámetros que se encuentran en la parte derecha de la ventana, se encuentren programados correctamente para poder realizar una adecuada lectura de los resultados de la qRT-PCR, los parámetros antes mencionados son los siguientes:

- En el parámetro *Data*: elegir la opción de *Delta Run* vs. *Cycle*,
- En el parámetro *Detector*: elegir la opción de *All*
- En el parámetro *Line Color*: elegir la opción de *Detector Color*.

Para poder establecer el *threshold* (umbral de detección de fluorescencia) y eliminar el ruido de fondo de los reactivos, colocar la línea del *threshold* por encima de las amplificaciones del control negativo, esto se realiza de manera manual, siempre considerando no sobrepasar la fase geométrica de las curvas de amplificación de los controles positivos, dar clic en la línea horizontal que aparece en la ventana de amplificación (cuando ésta se encuentra apenas por definir, presenta un color rojo, una vez que ya se ha fijado el *threshold*, utilizando la tecla *play* (triángulo verde que se encuentra en el menú principal), la línea cambiará a color verde), se recomienda realizar ésta actividad en la expresión logarítmica de las curvas de amplificación.

Otra manera de fijar el *threshold* una vez que ya se consideró lo anterior, es presionando el botón de *Analyze* (Analizar), el cual se encuentra del lado derecho de la ventana de las curvas de amplificación y por debajo de los parámetros antes establecidos (Figura 48), donde se observará que la línea del *threshold* cambia de color de rojo a verde y el botón de *Analyze* quedara inhabilitado.

Posteriormente se cambiará de escala logarítmica a las curvas de amplificación, a escala lineal, esto para poder evidenciar de mejor manera las curvas sigmoideas de amplificación. Se llevará a cabo de la siguiente manera: dar doble clic en el eje de las “y”, o en el eje de “*Delta Run*”, dando lugar a un cuadro con el nombre de “*Graph Settings*” (Ajuste del a gráfica), en este cuadro se localizará la parte denominada como *Post Run Settings*

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

(Ajuste postcorrida), en la cual podremos observar el parámetro llamado “Y-Axis” y la opción de “**Log**” es la que se encuentra activada.

Para poder observar las curvas sigmoideas de amplificación es necesario activar la opción “**Linear**”, la cual se encuentra arriba de la opción “**Log**”, solo basta con seleccionar esta opción para que el software modifique la escala, posterior a este paso, basta con presionar el botón “**Apply**” (Aplicar), el cual se encuentra en la parte inferior del cuadro, y finalizará la acción presionando el botón “**OK**” el cual se encuentra igualmente en la parte inferior del cuadro.

Una vez realizado el paso anterior, observar que los gráficos que se muestran en la pantalla se presenten de forma sigmoidea (Figura 14).

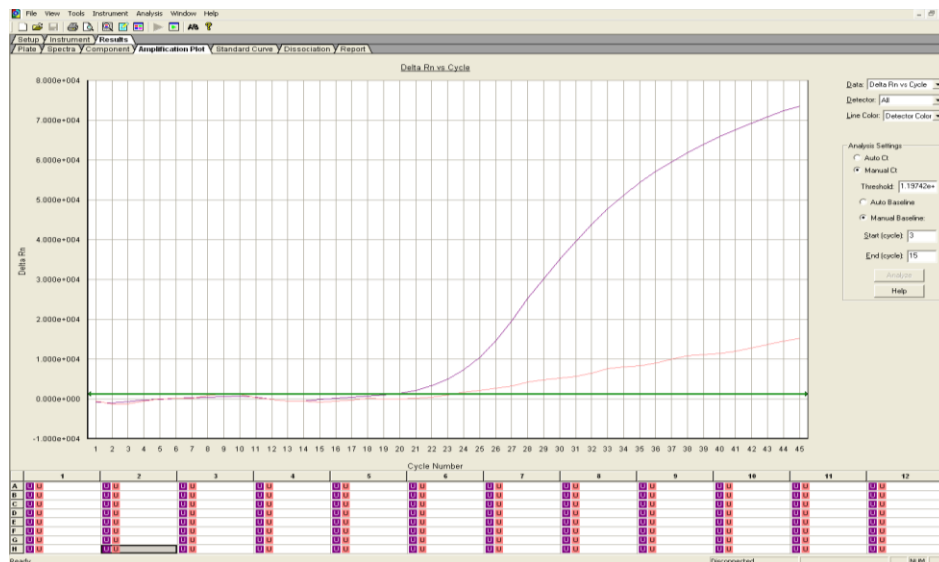


Figura 14.- Forma linear de las curvas sigmoideas de amplificación, Control Negativo y Control Positivo.

Entonces se procederá a la lectura de las curvas de amplificación de las muestras.

La lectura se realizará de la misma manera que como se programó la corrida, así como el llenado del formato correspondiente (Figura 15).

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

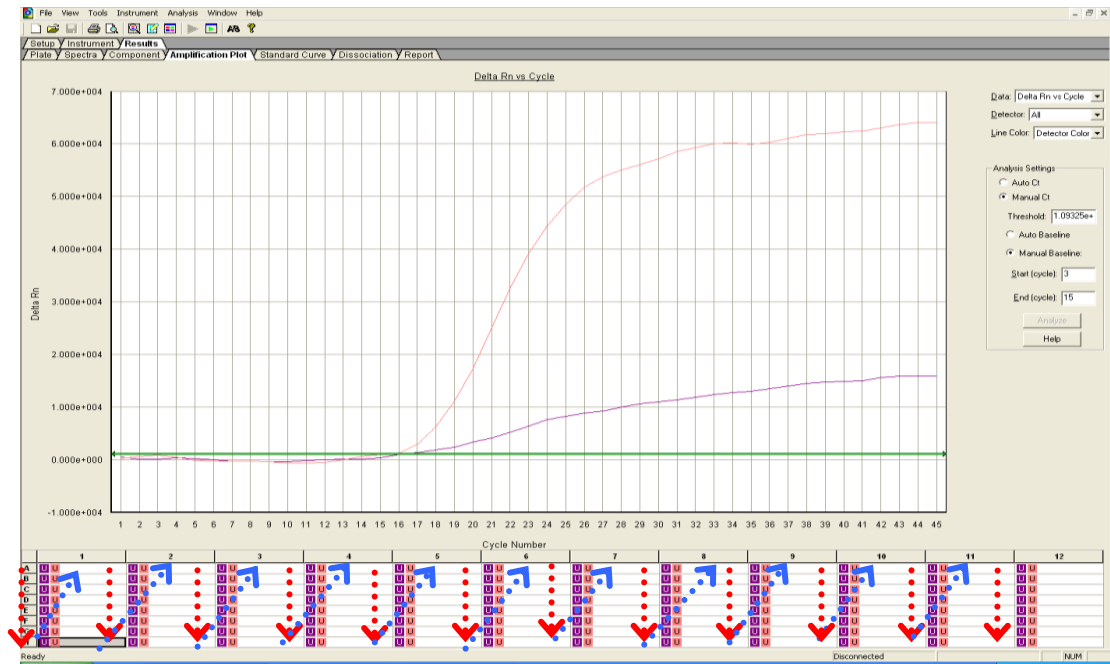


Figura 15.- Forma de leer los resultados de qRT-PCR.

Interpretación de las curvas de amplificación

El ensayo será motivo de repetición cuando exista alguna o varias de las siguientes condiciones:

Se presente amplificación en los controles negativos y ésta, no permita la interpretación adecuada de los resultados.

Cuando no exista amplificación en uno o más de los Controles Positivos.

Cuando se presente amplificación en el Control de Extracción y ésta no permita la interpretación adecuada de los resultados.

Cuando algún equipo relacionado con el proceso (termociclador, robot de extracción, etc.) no se encuentre funcionando de manera adecuada o exista falla eléctrica.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

NOTA: En caso de que se presente una contaminación, que al ser analizada bajo los criterios anteriores y se determine que no interfiere en la interpretación de los resultados, se deberá colocar la siguiente leyenda en las observaciones en los formatos de trabajo.

“La contaminación presente en la placa, no interfiere en la interpretación de los resultados”

Los gráficos que a continuación se presentan son representativos de los resultados obtenidos durante las diferentes corridas de qRT-PCR para el diagnóstico de Influenza. Los valores positivos reportables no deben de exceder el valor de Cq de 37, en cuyo caso el resultado no será confiable.

Cuando se observen las amplificaciones o las curvas sigmoideas de los marcadores, se tienen los siguientes resultados:

Linaje Victoria: Marcador para la determinación del linaje Victoria para el virus de Influenza tipo B (**línea violeta**) (Figura 16). El resultado será interpretado como INFLUENZA B LINAJE VICTORIA

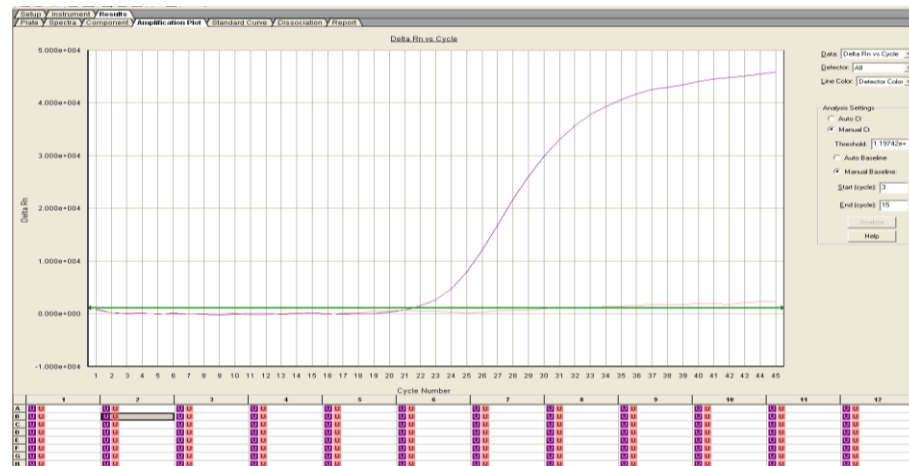


Figura 16.- Muestra de Influenza B de linaje Victoria.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

Linaje Yamagata: Marcador para la determinación del linaje Yamagata para el virus de Influenza tipo B (*línea rosa*) (Figura 17). El resultado será interpretado como INFLUENZA B LINAJE YAMAGATA.

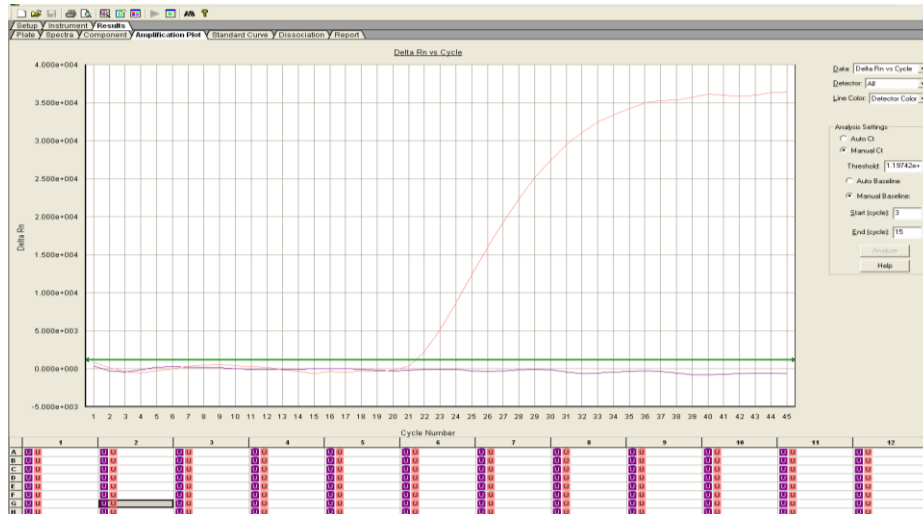


Figura 17.- Muestra de Influenza B de linaje Yamagata.

Existen resultados poco frecuentes, en los cuales no se observan curvas de amplificación, es decir, únicamente se muestra la fluorescencia emitida por los reactivos (Figura 18), por lo tanto, el resultado que se emitirá será "LINAJE NO DETERMINADO" (ND). Esto puede ser consecuencia de un mal manejo de la red fría (2 - 8° C), desde la determinación de influenza B hasta la adición de los templados.

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

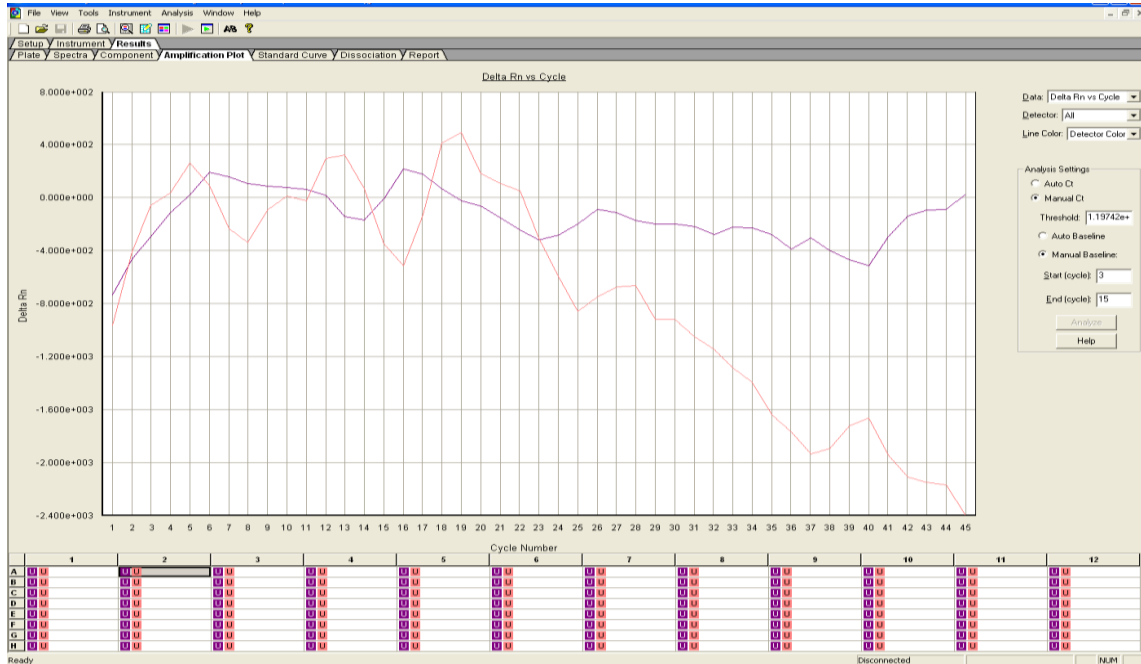


Figura 18.- Ejemplo de una muestra con resultado “Linaje no determinado”.

Un resultado que se observa frecuentemente, es cuando se presentan líneas no sigmoideas de amplificación, estas amplifican en Cq´s tardíos (mayores a 37); estos resultados son dudosos, y se repiten para descartar un resultado erróneo; si después de la repetición se confirma el resultado, se interpretará como POSITIVO AL MARCADOR QUE ESTA AMPLIFICANDO. (Figuras 19 y 20).

Las muestras que presenten este tipo de gráficos serán reportadas hasta que se haya realizado la repetición y haya sido corroborado el resultado.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

C. Determinación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por medio de RT-PCR tiempo real

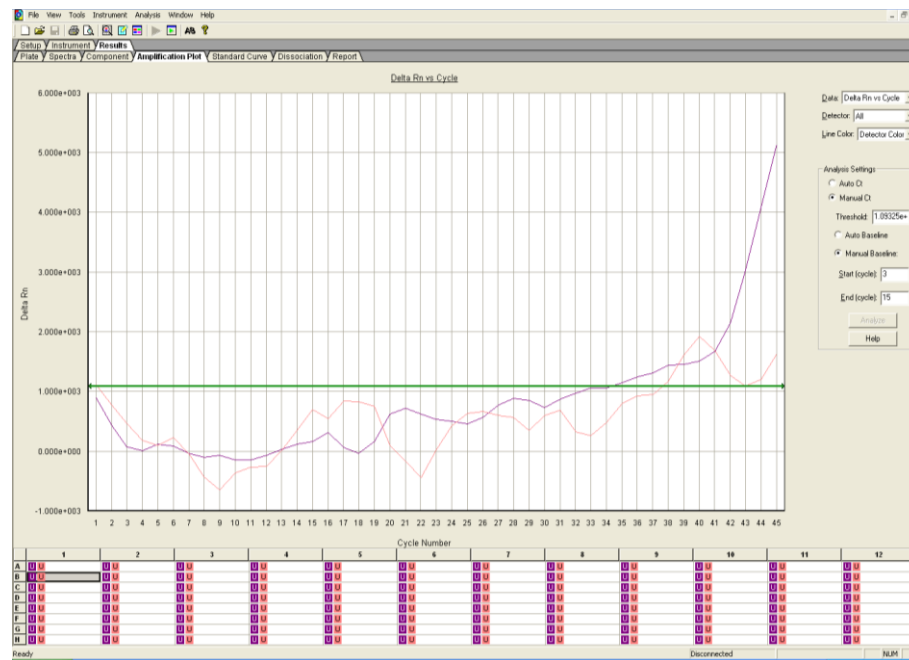


Figura 19.- Muestra dudosa que será sometida a repetición de extracción y qRT-PCR.

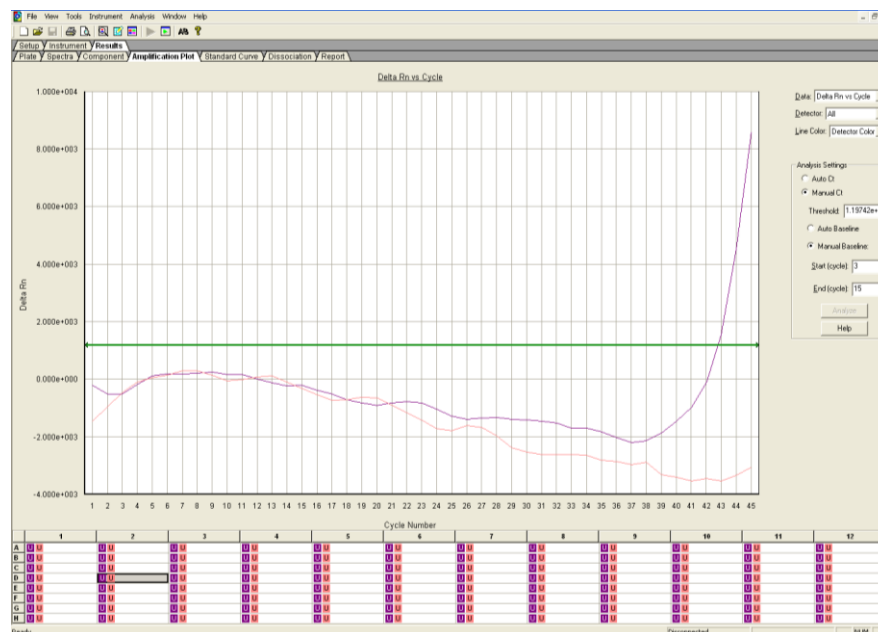


Figura 20.- Muestra sometida a repetición, se confirma el resultado “Positivo a linaje correspondiente”.