

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante 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 vortex
- 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
- dispensadores con capacidad de 1250 μL
- microtubos de polipropileno con capacidad de 1500 μL
- microtubos de polipropileno con capacidad de 600 μL
- microtubos de polipropileno con capacidad de 2000 μL con tapa de rosca
- gradillas de plástico para tubos de 1500 μL

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante 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

- Estuche comercial de Invitrogen Superscript™ III Platinum ® One Step Quantitative Kit
- Estuche comercial de AgPath-ID™ One-Step RT-PCR
- Agua grado biología molecular
- Sondas e iniciadores (sentido y anti-sentido) específicos para:
 - ✓ Virus Sincicial Respiratorio (RSV)
 - ✓ Metapneumovirus (HMpV)
 - ✓ Parainfluenza (HPIV) 1, 2, 3 y 4
 - ✓ Coronavirus (HCoV)s 229E, OC43, HKU1, NL63
 - ✓ Adenovirus (HAdV)
 - ✓ Rhinovirus (HRV)

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

- ✓ Enterovirus (HEV)
- ✓ Bocavirus (HBoV)
- ✓ RNasa P Humana (RP)
- RNase away
- Controles positivos para: Virus Sincial Respiratorio (RSV), Metapneumovirus (HMPV), Parainfluenza (HPIV) 1, 2, 3 y 4, Coronavirus (HCoV) 229E, OC43, HKU1, NL63, Adenovirus (HAdV), Rhinovirus (HRV), Enterovirus (HEV), Bocavirus (HBoV) y RNasa P Humana (RP).
- Estuche de Validación (NATtrol Respiratory Validation Panel 3). Estuche. ZeptoMetrix Corporation No. Catálogo: NATRVP-3.
- Etanol al 70%

Medidas de bioseguridad

Para el desarrollo de esta técnica deberán tomarse en cuenta las siguientes consideraciones:

- Contar con áreas separadas para la preparación de las mezclas de reacción, colocación de ácidos nucleicos en la placa, adición de controles positivos y de instrumentación.
- Contar con equipos como pipetas, vórtex y microcentrífugas, con materiales como tubos para minicentrífuga, placas para PCR, tapas ópticas y puntas de pipeta, en cada una de las áreas, para evitar contaminaciones y resultados erróneos.
- Utilizar el equipo de protección personal. El equipo de protección personal 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 los guantes ya utilizados con abundante alcohol al 70% o solución de

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

RNase-Away, con el fin de evitar contaminación cruzada o cada vez que se sospeche que pudo haberse contaminado.

- Evitar el uso prolongado de los reactivos para no propiciar su degradación por calor ni luz ni contaminación por aerosoles.
- Mantenga los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos cuanto le sea posible
- Cada vez que se coloque un extracto por pozo, debe cambiarse la punta para micropipeta empleada.
- Descontaminar de las áreas de trabajo utilizadas antes y después de su uso.
- Asegurarse de que las tapas ópticas se encuentren perfectamente bien selladas después de adicionar los extractos y controles positivos, antes de introducir la placa al termociclador, para evitar evaporación de la mezcla de reacción y un consiguiente resultado erróneo.
- El material de desecho generado debe ser colocado en el contenedor para manejo especial con bolsa transparente para su eliminación.

Procedimiento

1. *Condiciones de almacenamiento de los reactivos para RT-PCR en tiempo real*

- Estuche comercial de Invitrogen Superscript™ III Platinum® One Step Quantitative Kit, debe almacenarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Estuche comercial de Ambion, AgPath-ID™ One-step RT-PCR Kit, debe almacenarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Los iniciadores y las sondas liofilizados deben almacenarse de 2 a 8 °C. Una vez hidratados deben almacenarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si el uso es continuo puede mantenerse hasta su término de 2 a 8° C para evitar su degradación.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

2. *Rehidratación de iniciadores y de sondas*

- Los iniciadores y sondas se reciben liofilizados. Previo a su uso deben hidratarse con agua grado biología molecular, la cantidad de agua dependerá de la concentración inicial de los iniciadores y sondas para obtener una concentración de trabajo de acuerdo al protocolo. Mezclar con la punta de la micropipeta y posteriormente mezclar por vórtex durante cinco segundos a una velocidad media. Ya hidratados, se almacenan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de 100 μL , las cuales serán las que se irán tomando como soluciones de trabajo. Pueden mantenerse de 2 a 8 $^{\circ}\text{C}$ o a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- La preparación de los reactivos debe anotarse en el formato correspondiente.

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

NOTA: 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 lleva a cabo en el área del laboratorio asignada para “*Master Mix*”. Se realiza de acuerdo al cuadro 1, los valores en el cuadro solo son para una reacción, se deberán de realizar los cálculos de acuerdo al número de muestras que se requiera trabajar, además se debe considerar los controles positivo y negativo por cada corrida de PCR, tomando en cuenta que es necesario que se prepare en exceso la mezcla de reacción, por ejemplo:
- 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 $n+5$.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

- Si el número de muestras (n) incluyendo los controles > a 75, es n+6.
- Todos los cálculos realizados para la preparación de la mezcla de reacción se registrarán en el formato correspondiente.

Cuadro 1.- Reactivos para RT-PCR en tiempo real

Reactivo	Volumen (µL)
Agua grado PCR	5.0
Iniciador sentido	0.5
Iniciador antisentido	0.5
Sonda	0.5
Enzima Superscript™ III Platinum ® One Step / AgPath-ID™ One-step RT-PCR	1.0
Regulador 2X	12.5
Volumen final (para una muestra)	20.0

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

4. Adición de moldes a la mezcla de reacción

- Después de haber preparado la mezcla de reacción de cada juego de iniciadores y sondas, conforme al cuadro 1, dispensar 20 µL de cada una de ellas con una micropipeta, colocándolas individualmente por pozo de izquierda a derecha de acuerdo con la Figura 1, este procedimiento se debe de hacer para cada una de las mezclas diferentes que se han preparado.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

~

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RSV	A	NTC											
HMpV	B	NTC											
HPIV1	C	NTC											
HPIV2	D	NTC											
HPIV3	E	NTC											
HPIV4	F	NTC											
HAdV	G	NTC											
RP	H	NTC											

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
HRV	A	NTC											
HCoV229E	B	NTC											
HCoV OC43	C	NTC											
HCoV NL63	D	NTC											
HCoV HKU1	E	NTC											
HEV	F	NTC											
HBoV	G	NTC											
RP	H	NTC											

Figura 1.- Llenado de las placas para PCR de 96 pozos para Otros Virus Respiratorios.

- Posteriormente se colocaran 5 μ L de agua grado biología molecular en los pozos 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, esto servirá como control negativo (NTC, **Negative Template Control**) de reactivos de la mezcla de reacción (ver Figura 2).
- Se colocan las tapas ópticas únicamente a los pozos marcados como NTC y se cubre toda la placa con papel aluminio para protegerla de la luz, manteniéndola en red fría (4° C) hasta su uso.

NOTA: Estas actividades también son llevadas a cabo en el área asignada para “Master Mix” del laboratorio.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

- Llenar las hojas de registro para la Realización de master mix de RT-PCR tiempo real, en la cual se colocan las cantidades de reactivos que fueron utilizadas con base en el número de muestras a procesar.
- Llenar el formato correspondiente, de acuerdo al orden en que se colocarán los extractos en las placas (Figura 2), anotando el número que le corresponde a cada extracto de ácidos nucleicos.



		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
No. DE MUESTRA		NTC	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	PTC
RSV	A	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HMpV	B	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HPIV1	C	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HPIV2	D	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HPIV3	E	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HPIV4	F	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HAdV	G	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
RP	H	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
No. DE MUESTRA		NTC	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	PTC
HRV	A	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HCoV 229E	B	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HCoV OC43	C	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HCoV NL63	D	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HCoV HKU1	E	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HEV	F	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HBoV	G	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
RP	H	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC

Figura 2.- Distribución de los ácidos nucleicos de las muestras, controles positivos y negativos en la placa.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

- Al término de la preparación de la mezcla de reacción, la placa cubierta con papel aluminio y en red fría se pasará al área del laboratorio asignada para "**Templados**", en donde se colocará 5 µL del extracto en el pozo correspondiente, para obtener un volumen final de mezcla de reacción de 25 µL. Cabe señalar que conforme se vaya adicionando el extracto a la columna correspondiente, se colocará una tapa óptica, esto se repetirá hasta completar todas las muestras incluyendo el Control de Reactivos de Extracción (CRE). Este paso se realiza en un gabinete de bioseguridad tipo II. (Figura 2)
 - Finalmente se pasará la placa cubierta con papel aluminio y en red fría al área del laboratorio asignada para "**Controles Positivos**", en donde se colocará 5 µL de los controles positivos (PTC) en el pozo correspondiente. (Figura 2)
 - Cabe hacer mención de que los Controles Positivos no necesariamente deben colocarse en los pozos de la columna 12, ya que, si son menos de 10 muestras las que se coloquen en la placa, los controles positivos pueden recorrerse.
 - Posteriormente se deberá de trasladar la placa de microtubos cubierta con el papel aluminio al área donde se encuentren los termocicladores en tiempo real de la marca Applied Biosystems 7500 Fast System. Antes de introducir la placa al termociclador se centrifuga a 1400 rpm durante 1 min para permitir que baje el contenido retenido en las orillas de los pozos, evitando que se quede el líquido en las tapas.
5. Procedimiento para realizar corridas de RT-PCR para el diagnóstico de Otros Virus Respiratorios en el equipo Applied Biosystems 7500 Fast
- Encender la Lap-top y el equipo AB 7500 Fast colocando la clave y contraseña correspondientes, realizar ésta actividad antes de colocar los templados y controles positivos.
 - Abrir el programa 7500 Fast SDS software, haciendo doble clic sobre el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora (Figura 3).

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

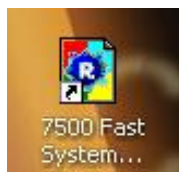


Figura 3.- Reconocimiento del acceso directo al software.

- El software abrirá presentando una ventana con el nombre “*Quick start up document*” (inicio rápido de documento, Figura 4).

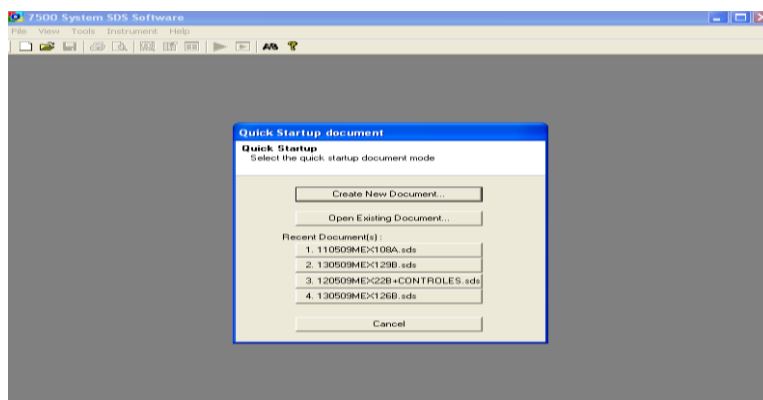


Figura 4.- Ventana de inicio del software.

- En la ventana “*Quick start up document*” (inicio rápido de documento) hacer clic en la opción *Create New Document* (crear nuevo documento).
- Se mostrará la ventana con el nombre de “*New document wizard*” (ventana de nuevo documento), como se observa en la Figura 5.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

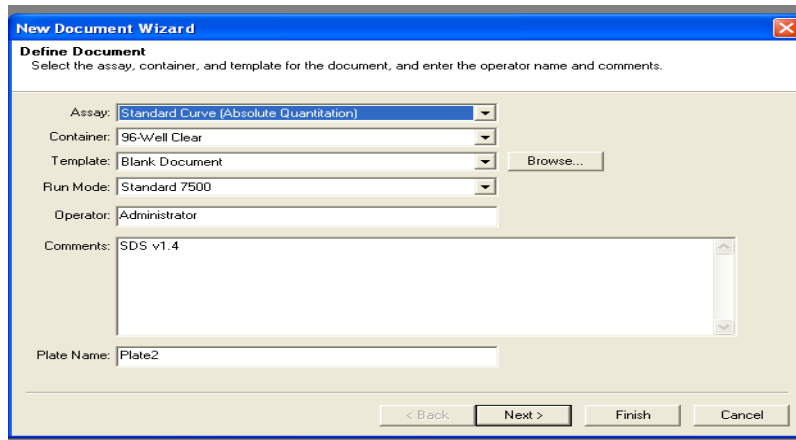


Figura 5.- Ventana para crear un nuevo documento.

- En ésta ventana se inicia la programación de la corrida, para lo cual, en el lado derecho de la opción **Template** (molde o templado), se dará clic en el botón **Browse** (buscar), para localizar y seleccionar la plantilla "**Panel Viral**" previamente programada, la cual se seleccionará haciendo clic en el botón **Open** (abrir).
- En la opción de **Plate name** (nombre de la placa), se coloca el nombre de la corrida a programar, se sugiere que sea de la siguiente forma: FECHA (día-mes-año), espacio, NOMBRE DE LA CORRIDA, espacio, NÚMERO DE LA CORRIDA (número consecutivo).
- Después de verificar que los pasos anteriores se llevaron a cabo correctamente, se da clic en el botón **Finish** (finalizar).
- En la pantalla aparece la plantilla elegida con los marcadores por detectar (Figura 6), en la cual se colocarán los números de los extractos que se analizarán.
- Para ingresar los datos de los extractos a trabajar, debe seleccionarse la pestaña **SETUP** (organización) y seleccionar las celdas de la columna 1 para el control negativo (NTC); posteriormente, seleccionar de la misma manera las celdas de la columna 2 y así sucesivamente hasta completar el número de extractos, de acuerdo a la hoja de

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

registro correspondiente. Ingresar el nombre de los controles positivos en la columna correspondiente (Figura 6 y 7).

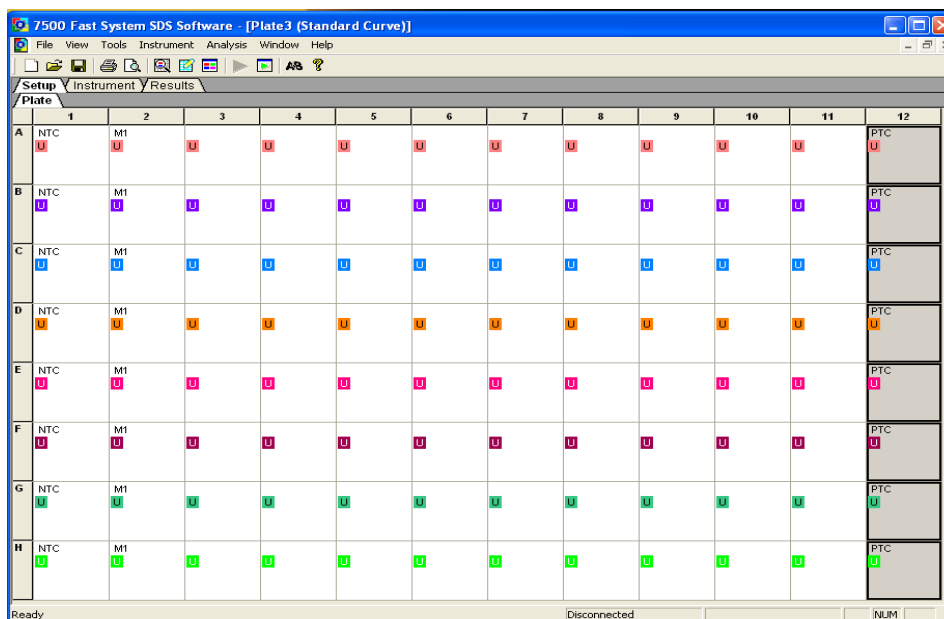


Figura 6.- Ingreso de los extractos a la platilla.

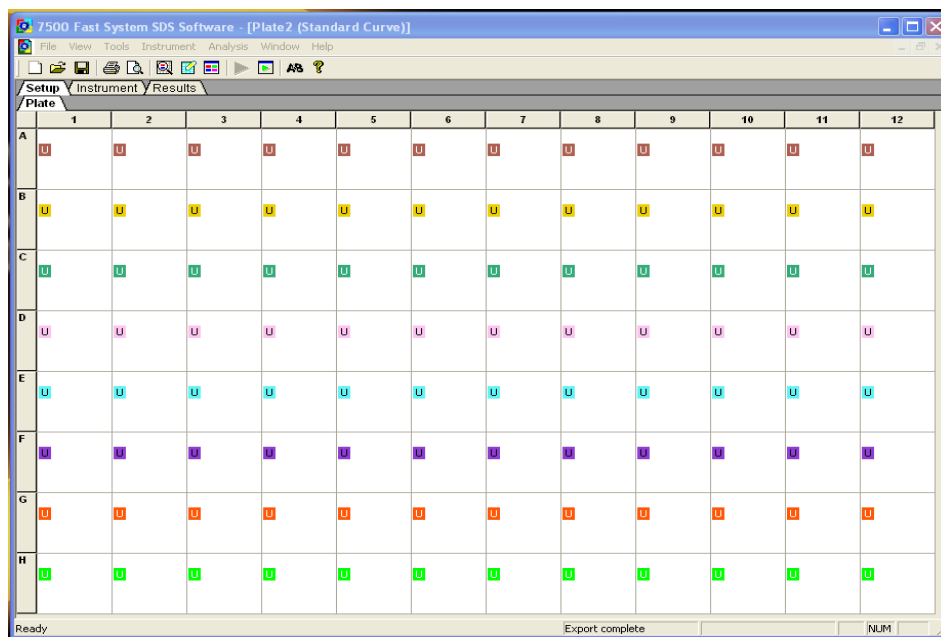


Figura 7.- Ingreso de los extractos a la platilla.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

- Una vez ingresados los datos de los extractos y verificados los marcadores a detectar, se da clic en la pestaña *Instrument* (instrumento) que se encuentra en la parte superior izquierda de la ventana.
- Verificar que las condiciones de termociclado, volumen de la reacción y el modelo en que fue programada la corrida, sean las descritas en el protocolo “Real-Time RT-PCR Assays for Non-Influenza Respiratory Viruses” del CDC (Figura 8).
- Una vez verificadas las condiciones de termociclado se guarda la corrida, presionando el botón **Save** (Guardar), representado con un ícono de diskette de 3 1/2” (Figura 8).
- Dar clic en el botón **Start** (comenzar) que se encuentra en la parte superior izquierda de la ventana (Figura 8). La corrida durará 1 hora con 42 minutos para completarse totalmente.

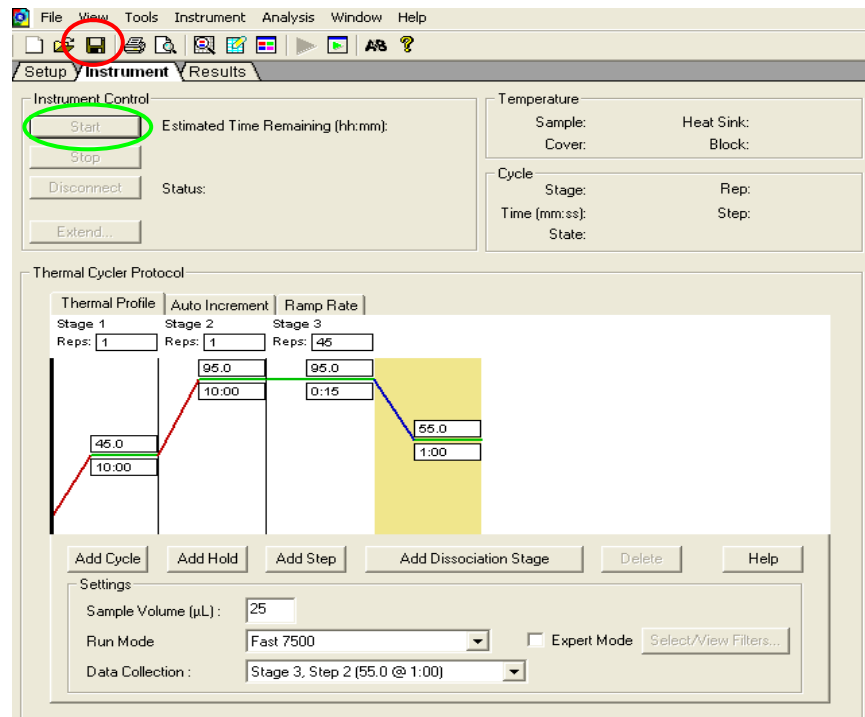


Figura 8.- Programación de las condiciones de corrimiento del termociclador.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

6. Interpretación por el laboratorio

- Después de que la corrida de qRT-PCR se ha completado, se presentará una ventana emergente que indica que la corrida ha finalizado (Figura 9); presionar el botón OK.

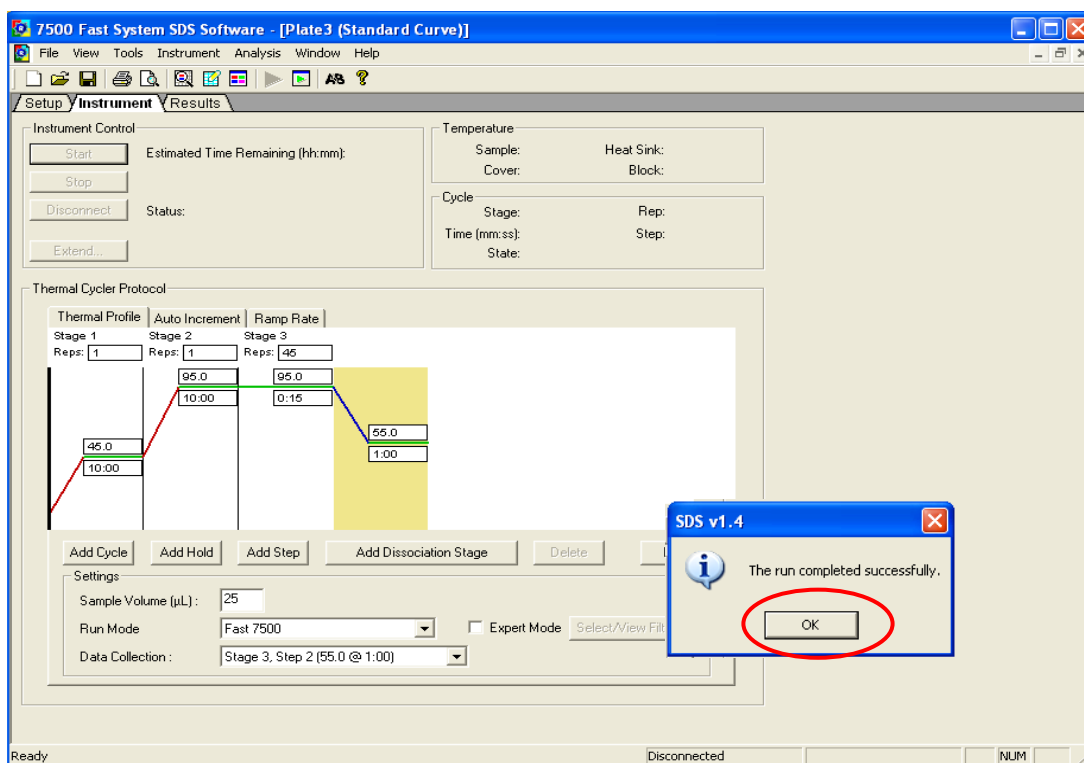


Figura 9.- Pantalla de término de la corrida de qRT-PCR para Otros Virus Respiratorios.

- Seleccionar la pestaña **Results** (resultados), en ésta opción se presentarán las pestañas **Plate** (plantilla), **Spectra** (espectro), **Component** (componente), **Amplification Plot** (panel de amplificación), **Standard Curve** (curva estándar), **Dissociation** (disociación), **Report** (reporte). (Figura 10).

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC U Undet.	1775 U Undet.	1776 U Undet.	1777 U Undet.	1779 U Undet.	1780 U Undet.	1570 U Undet.	PTC U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.
B	NTC U Undet.	1775 U Undet.	1776 U Undet.	1777 U Undet.	1779 U Undet.	1780 U Undet.	1570 U Undet.	PTC U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.
C	NTC U Undet.	1775 U Undet.	1776 U Undet.	1777 U Undet.	1779 U Undet.	1780 U Undet.	1570 U Undet.	PTC U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.
D	NTC U Undet.	1775 U Undet.	1776 U Undet.	1777 U Undet.	1779 U Undet.	1780 U Undet.	1570 U Undet.	PTC U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.
E	NTC U Undet.	1775 U Undet.	1776 U Undet.	1777 U Undet.	1779 U Undet.	1780 U Undet.	1570 U Undet.	PTC U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.
F	NTC U Undet.	1775 U Undet.	1776 U Undet.	1777 U Undet.	1779 U Undet.	1780 U Undet.	1570 U Undet.	PTC U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.
G	NTC U Undet.	1775 U Undet.	1776 U Undet.	1777 U Undet.	1779 U Undet.	1780 U Undet.	1570 U Undet.	PTC U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.
H	NTC U Undet.	1775 U Undet.	1776 U Undet.	1777 U Undet.	1779 U Undet.	1780 U Undet.	1570 U Undet.	PTC U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.	U Undet.

Figura 10.- Inicio de revisión de resultados, pestaña de **Results** subpestaña **Plate**.

- En la subpestaña **Plate** se observan los números de las muestras programados al inicio de la corrida, en todas las celdas se observa la leyenda de **Undet** (indeterminado), esto es porque la detección del virus de Influenza, en el protocolo propuesto por el CDC, 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 la cantidad de material genético presente en cada muestra y el equipo envía en automático dicha leyenda (figura 10).
- Dar clic en la subpestaña **Amplification Plot**, en donde se observa el registro de la fluorescencia emitida durante la amplificación del material genético de interés, de acuerdo al ciclo de termociclado; en la parte inferior de la ventana de **Amplification Plot** se encuentra una hoja parecida a una de Excel, indicando la plantilla de trabajo. Se seleccionan las celdas de los controles negativos (columna 1) y las celdas de los

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

controles positivos (columna 12 o donde se hayan colocado) al mismo tiempo, como se muestra en la figura 11.

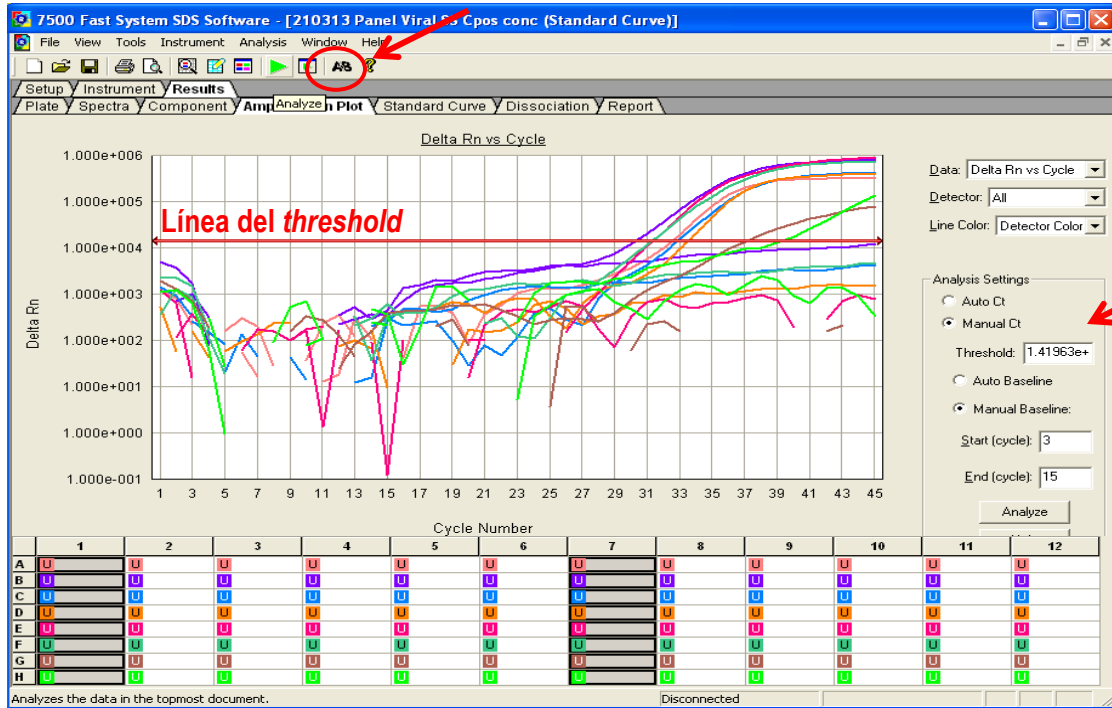


Figura 11.- Ajuste de Threshold y de parámetros para la lectura.

- Una vez seleccionados los controles se verifica que los parámetros que se encuentran en la parte derecha de la ventana estén debidamente programados para realizar una adecuada lectura de los resultados de la qRT-PCR, de acuerdo a lo siguiente:

- Parámetro **Data**: elegir la opción de **Delta Run** vs. **Cycle**
- Parámetro **Detector**: elegir la opción de **All**
- Parámetro **Line Color**: elegir la opción de **Detector Color**.

- Antes de realizar el análisis de los resultados, es necesario establecer el **threshold** (umbral de detección de fluorescencia) para eliminar el ruido de fondo de los reactivos. Se da clic en la línea horizontal que aparece

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

en la ventana de amplificación (cuando se encuentra por definir, la línea es de color rojo, una vez fijado el *threshold* ésta línea cambia a color verde), se coloca la línea de *threshold* por encima de las amplificaciones del control negativo sin sobrepasar la fase geométrica de las curvas de amplificación de los controles positivos, manteniendo presionado el botón izquierdo del mouse mientras se ajusta la línea, se recomienda establecer el *threshold* en la expresión logarítmica de las curvas de amplificación.

- El *threshold* se fija dando clic en el botón **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 ver flecha derecha de la figura 11. Cada vez que se realice alguna modificación sobre la corrida es necesario seleccionar “*analizar*” para que los cambios sean aplicados.
- Posteriormente se cambia la escala de las curvas de amplificación de logarítmica a lineal, con la finalidad de evidenciar de mejor forma las curvas sigmoideas de amplificación. Esto se logra haciendo doble clic en el eje de las “Y” (*Delta Run*), apareciendo un cuadro de diálogo con nombre **Graph Settings** (ajuste de la gráfica), en éste cuadro se localizará la parte **Post Run Settings** (ajuste post-corrida), donde existe un parámetro denominado Y-Axis, en éste se encontrará activada la opción **Log**, será necesario activar la opción Linear (la cual se encuentra arriba de la opción **Log**) para poder observar las curvas sigmoideas de amplificación, al dar clic en esta opción; presionar el botón **Apply** (aplicar), para que se guarden los cambios y finalizar presionando el botón **OK**. Los gráficos de forma sigmoidea se observan en la Figura 12.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

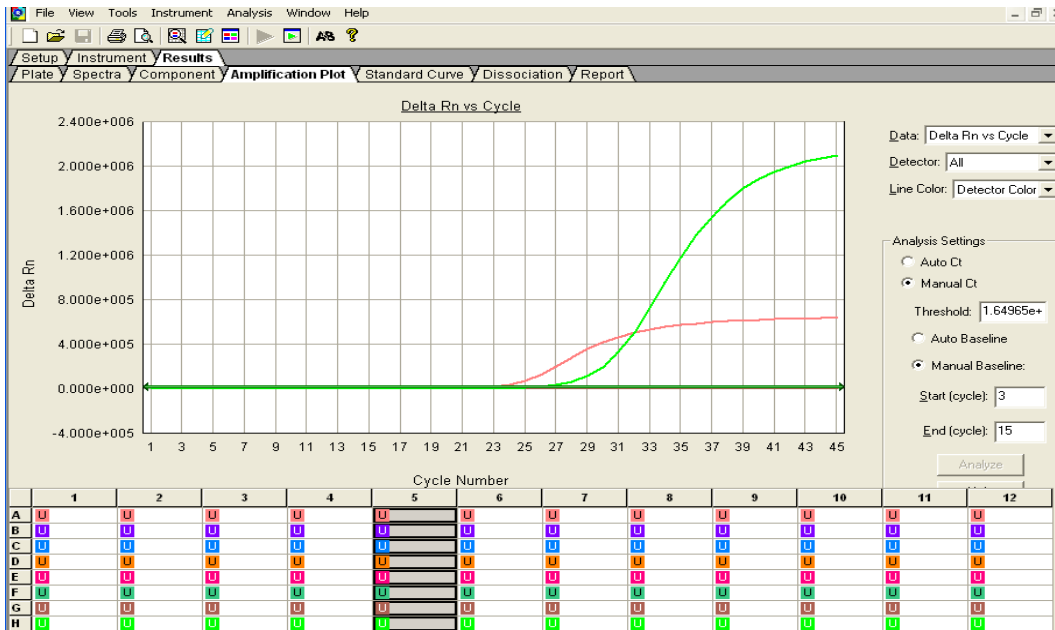


Figura 12.- Forma lineal de las curvas sigmoideas de amplificación y controles positivos

La lectura de las curvas de amplificación de los extractos se realiza por columnas, observar figura 13.

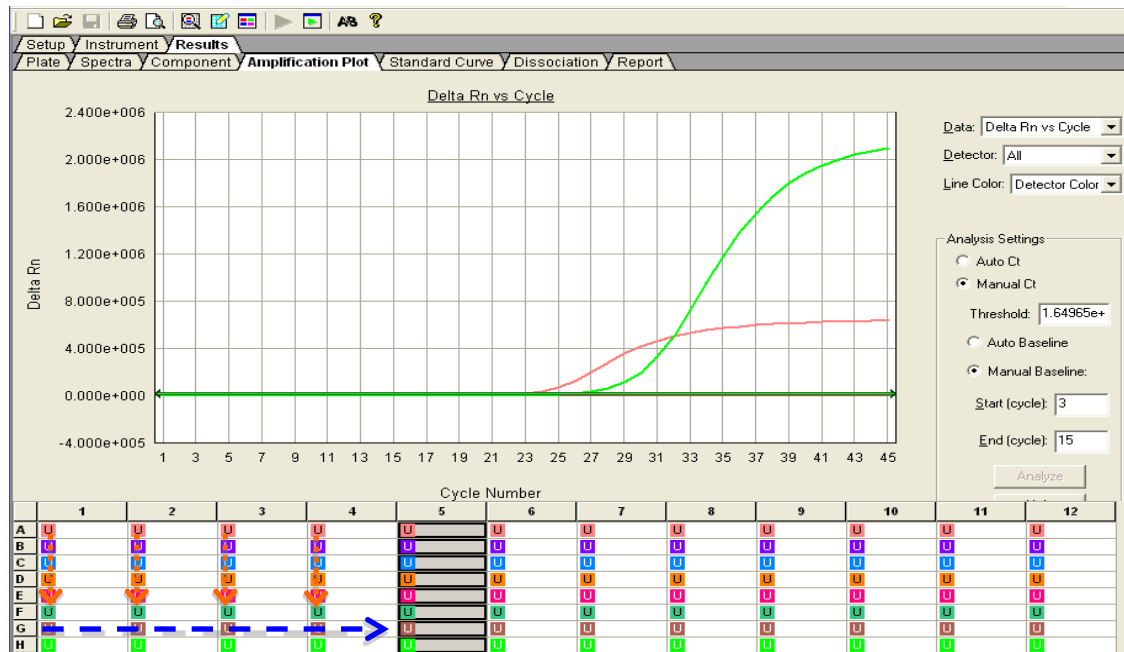


Figura 13.- Representación de la lectura de las amplificaciones obtenidas para el diagnóstico de Otros Virus Respiratorios.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

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, siempre y cuando no afecte la interpretación de los resultados.
- 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.

NOTA 1: En caso de presentarse una gráfica con interpretación dudosa, deberán utilizarse las herramientas alternativas que presenta el software, las cuales serán de ayuda para descartar falsos positivos en éste tipo de amplificaciones. Estas herramientas se encuentran disponibles en las pestañas de Menú de la gráfica y son *Spectra* y *Component*.

En la herramienta *Spectra*, se comparan los controles Positivo y Negativo contra la muestra dudosa, donde se obtienen tres representaciones gráficas de las amplificaciones, con el color Rojo siempre será representado el Control Negativo, con el color Azul, se representa al Control Positivo y con el Verde, se representa a la muestra en cuestión, al mover con el puntero del mouse hacia la derecha, el cuadro con el que se desplazan los ciclos, se irá observando el movimiento de éstas representaciones, y se observará que el Control Positivo se separará en un ciclo temprano. Para analizar la muestra, se debe seguir desplazando el cuadro de los ciclos, hasta que se observe que la parte baja de la representación, que se encuentra cerca al eje de las "X", rebase por un ciclo,

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

la línea del Control Negativo, en ese momento, se toma en cuenta el ciclo que aparece registrado en la línea de los ciclos y esto, ayudará a descartar entre una muestra positiva y negativa, de acuerdo a los lineamientos.

La herramienta **Component**, nos muestra únicamente por celda, si la amplificación presente es sigmoide, ya que ésta es un criterio primordial para la interpretación adecuada de resultados, si se observa un comportamiento que no sea sigmoide, en ésta herramienta, la amplificación se trata de una contaminación o de fluorescencia emitida por los reactivos, lo cual no será considerado como positivo.

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

“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.

- a) **Virus Sincicial Respiratorio (RSV)**: Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Rosa Pálido”**: Fluorocromo para la detección universal del Virus Sincicial Respiratorio (tipos A y B). **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de la RNasa P de origen humano (RP). (Figura 14).

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO a Virus Sincicial Respiratorio**.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

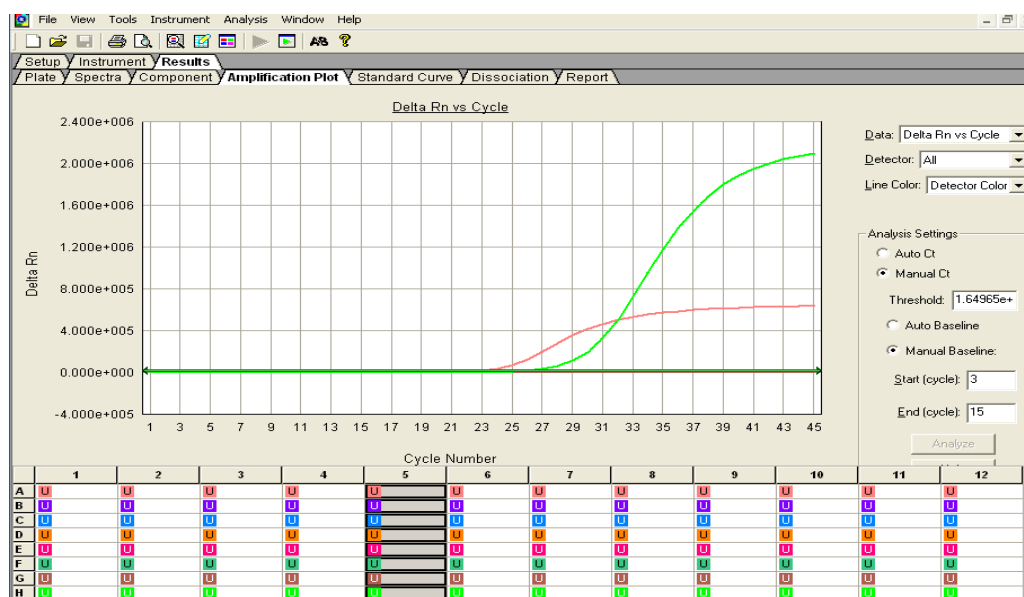


Figura 14.- Muestra positiva para Virus Sincial Respiratorio.

- b) **Metapneumovirus Humano (HMpV)**: Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Violeta”**: Fluorocromo para la detección de Metapneumovirus. **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP. (Figura 15).

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO a Metapneumovirus**.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

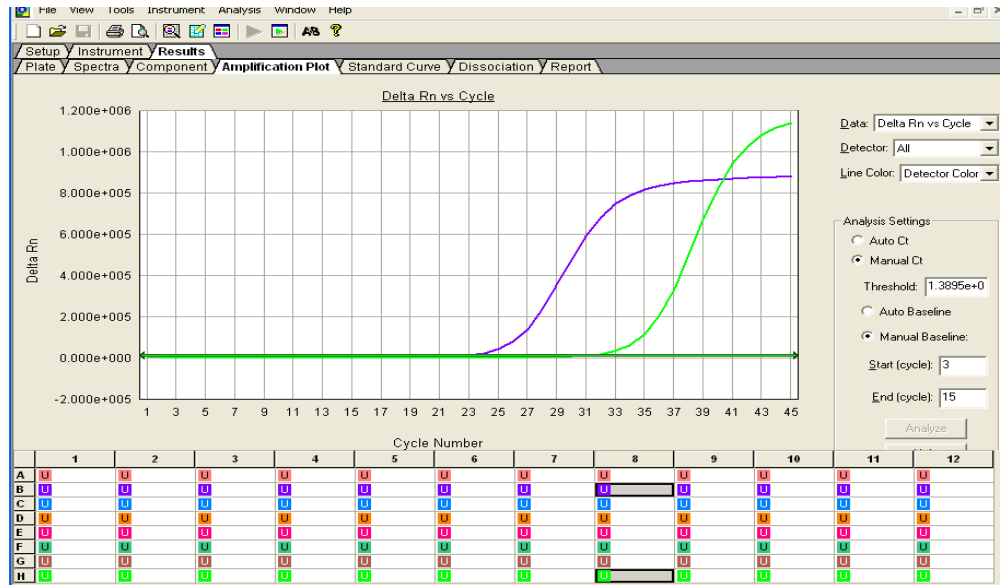


Figura 15.- Muestra positiva para Metapneumovirus (HMPV).

- c) **Parainfluenza 1 (HPIV1)**: Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Azul Claro”**: Fluorocromo para la detección de Parainfluenza 1. **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP. (Figura 16).

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO a Parainfluenza 1**.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

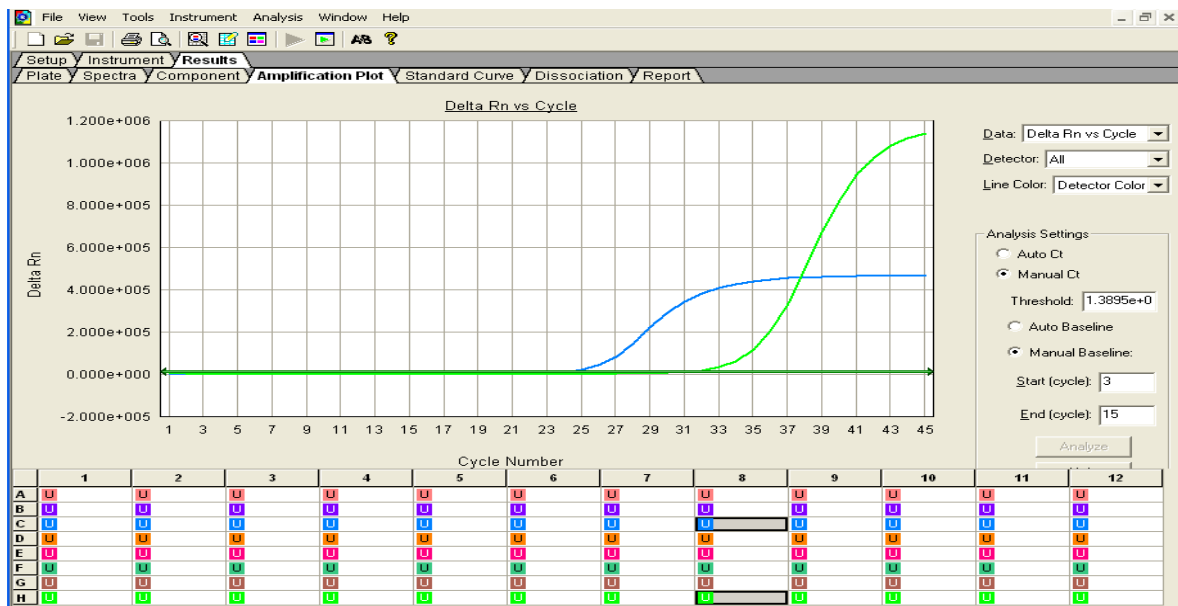


Figura 16.- Muestra positiva a Parainfluenza 1.

- d) Parainfluenza 2 (HPIV2): Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Anaranjado Claro”**: Fluorocromo para la detección de Parainfluenza 2. **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP. (Figura 17).

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO** a Parainfluenza 2.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

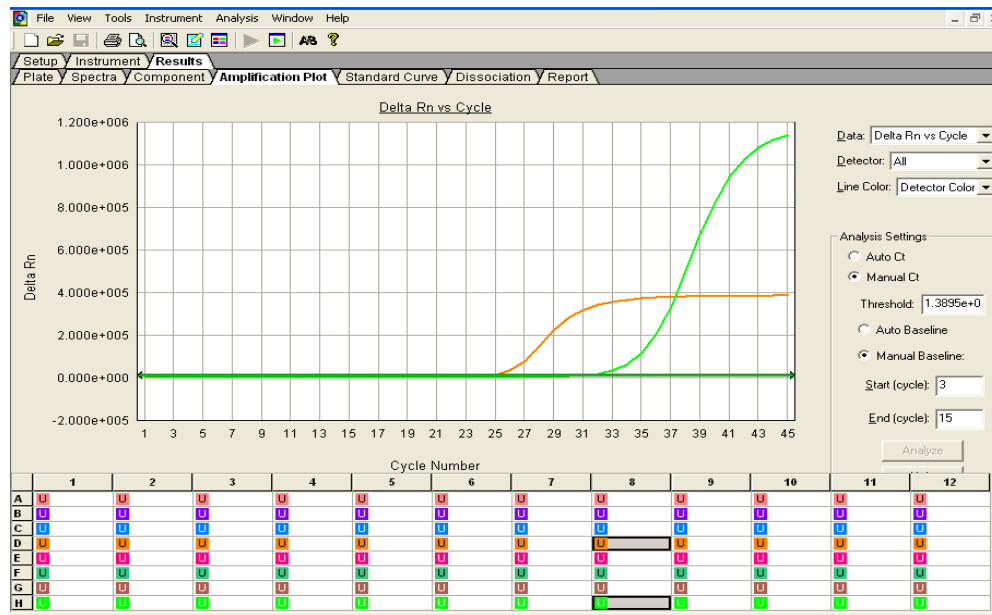


Figura 17.- Muestra positiva para Parainfluenza 2.

- e) **Parainfluenza 3 (HPIV3)**: Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Fucsia”**: Fluorocromo para la detección de Parainfluenza 3. **Curva de Amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP. (Figura 18).

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO** a Parainfluenza 3.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

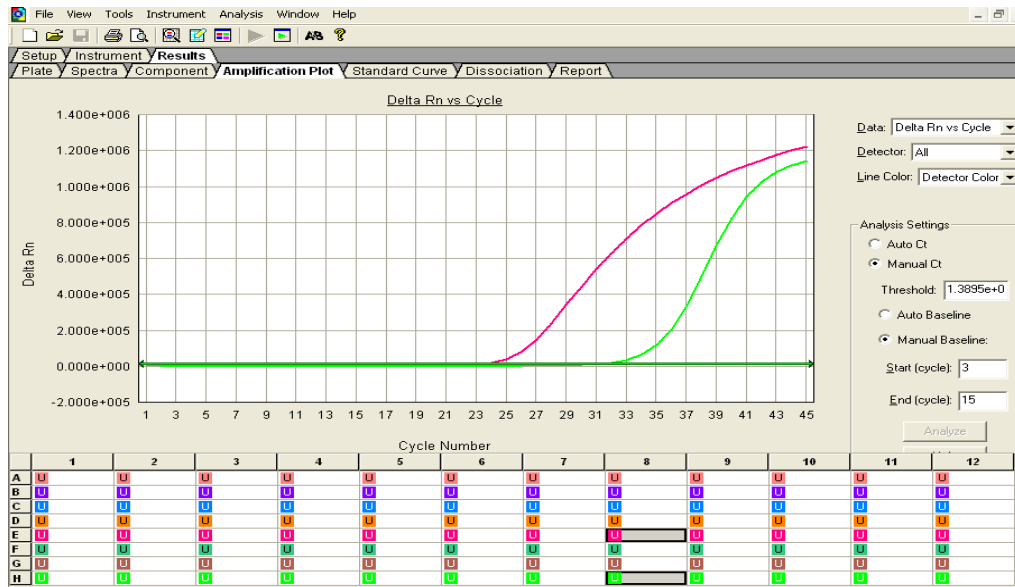


Figura 18.- Muestra positiva para Parainfluenza 3.

- f) Parainfluenza 4 (HPIV4): Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Guinda”**: Fluorocromo para la detección de Parainfluenza 4. **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP.

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO a Parainfluenza 4.**

- g) Coronavirus 229E (HCoV 229E): Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Amarillo Ocre”**: Fluorocromo para la detección de Coronavirus 229E. **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP. (Figura 19).

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO a Coronavirus 229E.**

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

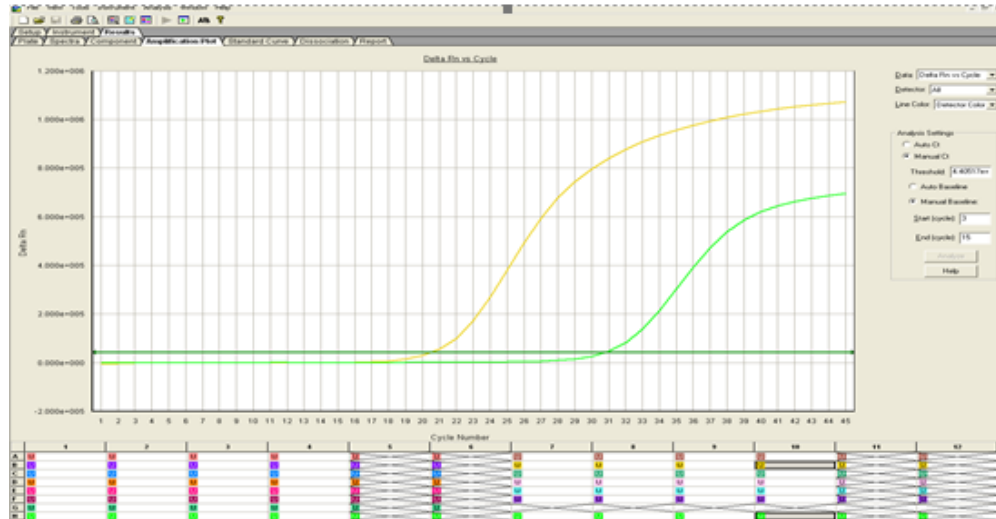


Figura 19.- Muestra positiva para Coronavirus 229E.

- h) **Coronavirus OC43 (HCoV OC43)**: Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Aguamarina Oscuro”**: Fluorocromo para la detección de Coronavirus OC43. **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP. (Figura 20).

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO a Coronavirus OC43**.

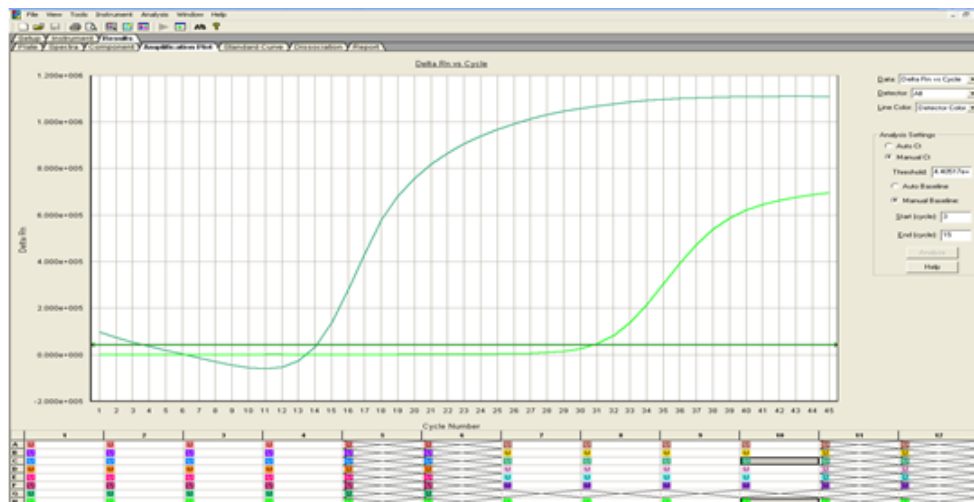


Figura 20.- Muestra positiva para Coronavirus OC43

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

- i) **Coronavirus HKU1 (HCoV HKU1)**: Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Verde Turquesa”**: Fluorocromo para la detección de Coronavirus HKU1. **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP. (Figura 21).

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO** a Coronavirus HKU1.

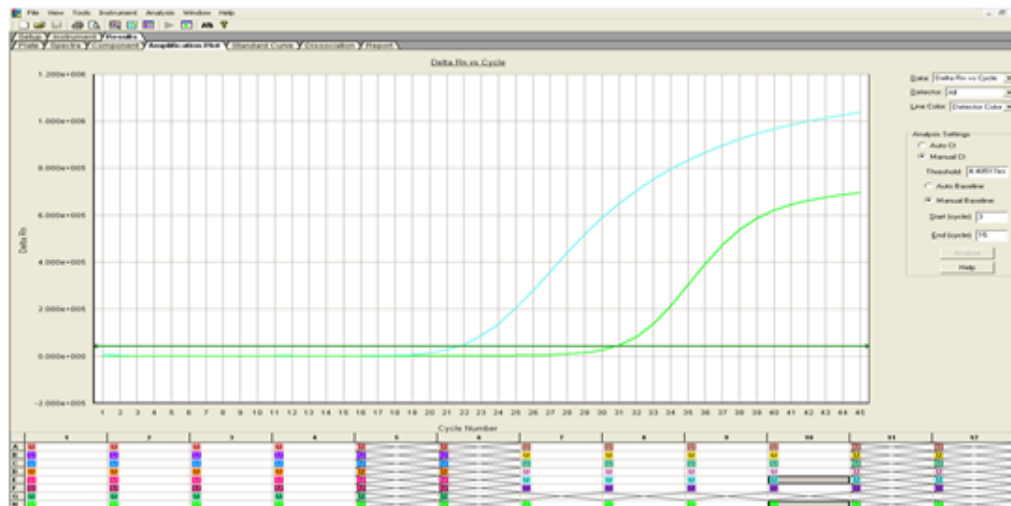


Figura 21.- Muestra positiva para Coronavirus HKU1

- j) **Coronavirus NL63 (HCoV NL63)**: Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Rosa Claro”**: Fluorocromo para la detección de Coronavirus NL63. **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP.

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO** a Coronavirus NL63.

- k) **Adenovirus (HAdV)**: Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Aguamarina”**: Fluorocromo para la detección de Adenovirus. **Curva**

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

de amplificación “Verde Fluorescente”: Fluorocromo para la detección de RP. (Figura 22).

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO** a Adenovirus.

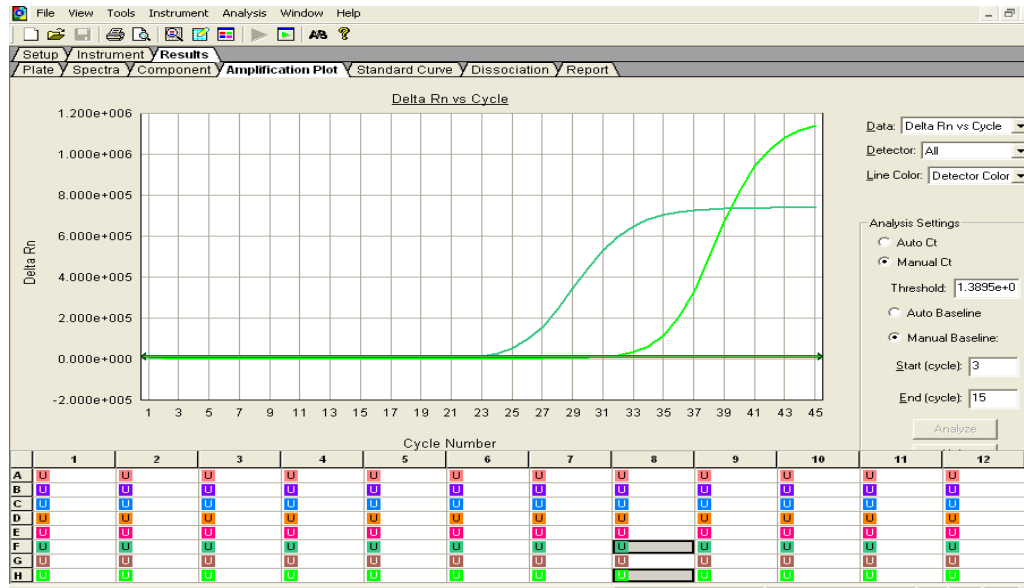


Figura 22.- Muestra positiva para Adenovirus.

- l) **Rhinovirus (HRV)**: Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Café”**: Fluorocromo para la detección de Rhinovirus. **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP. (Figura 23).

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO** a Rhinovirus.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

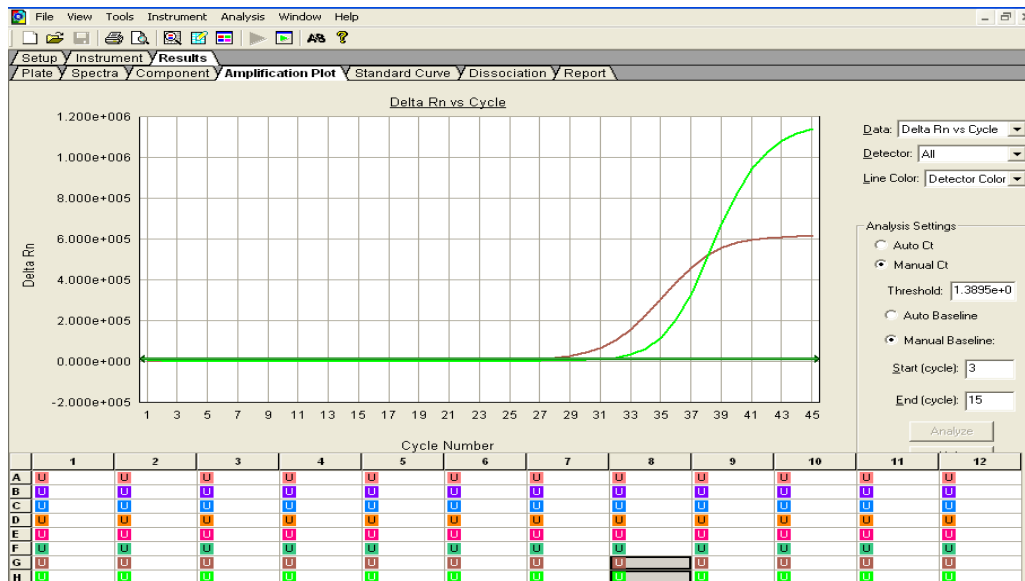


Figura 23.- Muestra positiva para Rhinovirus.

m) **Enterovirus (HEV):** Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación "Púrpura"**: Fluorocromo para la detección de Enterovirus. **Curva de amplificación "Verde Fluorescente"**: Fluorocromo para la detección de RP.

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO a Enterovirus.**

n) **Bocavirus (HBoV):** Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación "Anaranjado"**: Fluorocromo para la detección de Bocavirus. **Curva de amplificación "Verde Fluorescente"**: Fluorocromo para la detección de RP. (Figura 24).

El resultado será emitido de la siguiente manera: **POSITIVO a Bocavirus.**

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

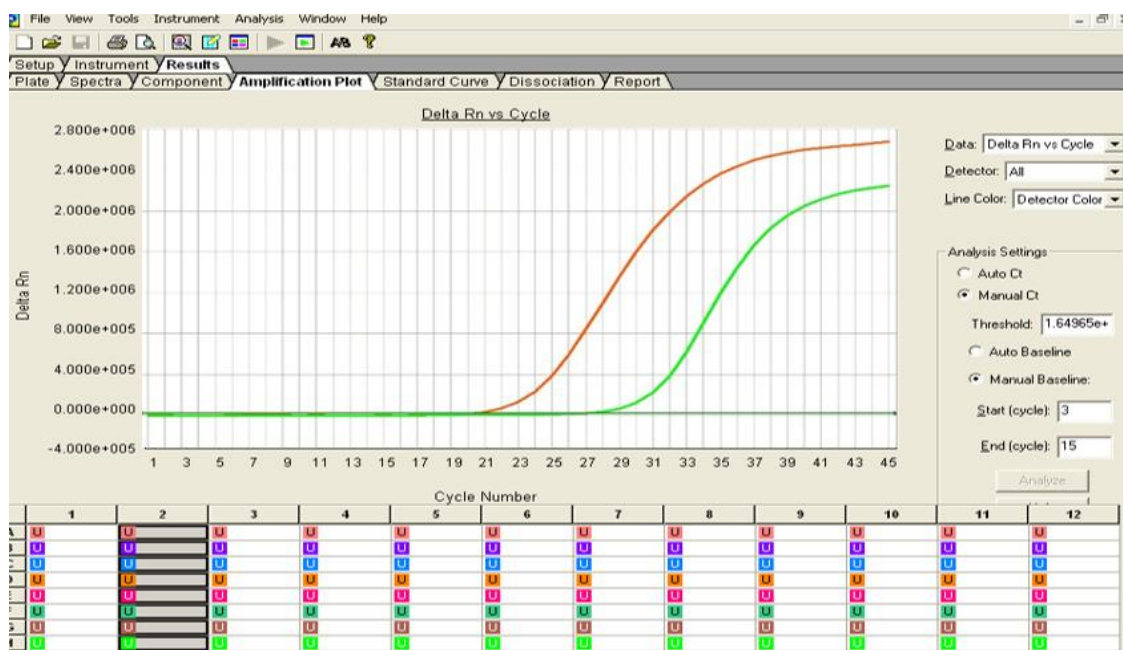


Figura 24.- Muestra positiva para Bocavirus.

- o) **Resultado Negativo:** Se reportará un resultado negativo al observar una sigmoide en el detector de RP Curva de amplificación "Verde Fluorescente". (Figura 25).

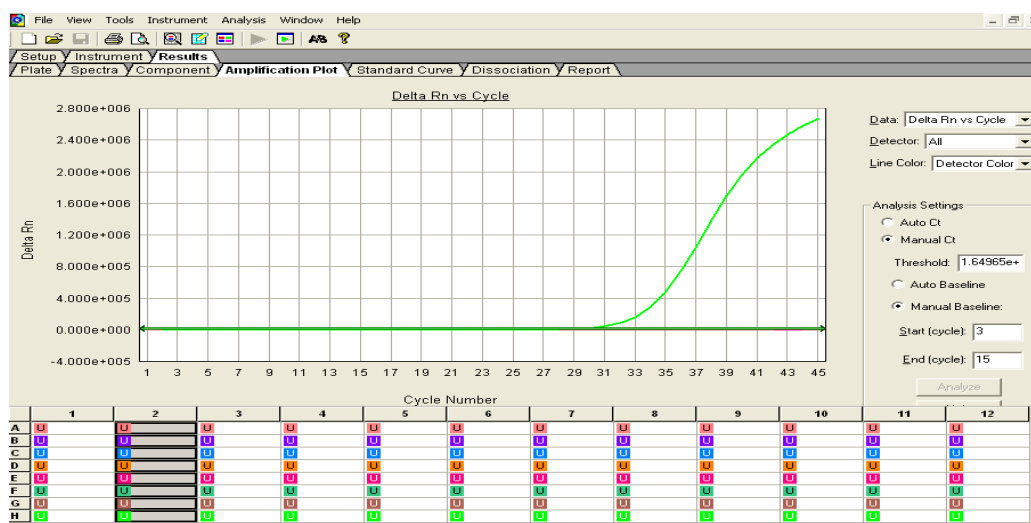


Figura 25.- Muestra con resultado Negativo.

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

- p) **Muestra No Adecuada.** En este caso, no se observa ninguna curva de **amplificación**, como se muestra en la Figura 26. El resultado emitido será de la siguiente manera: **NA** (No adecuada).

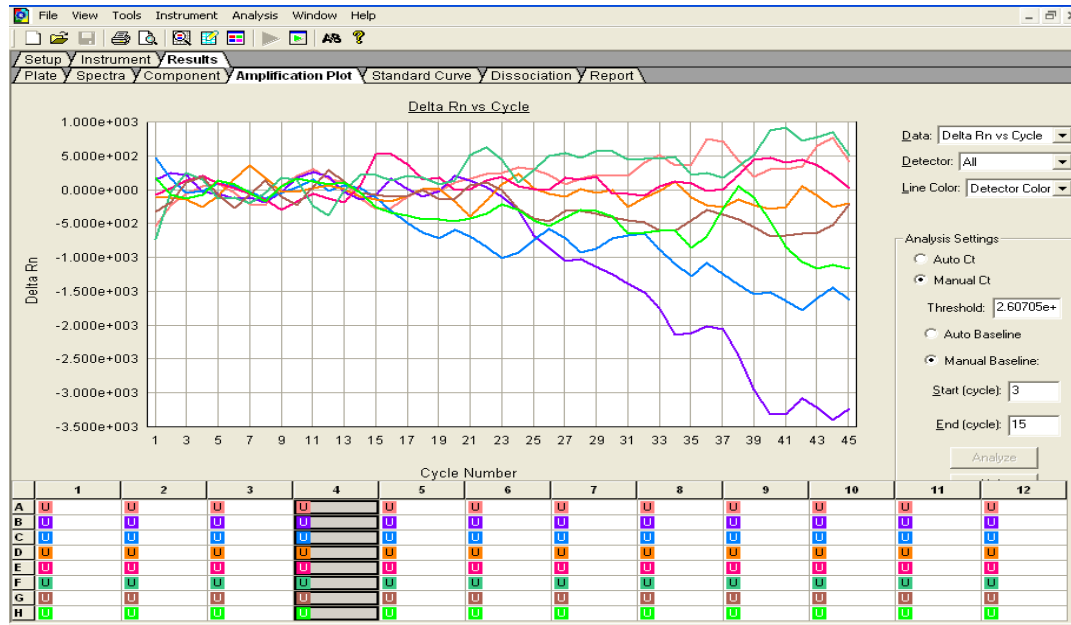


Figura 26.- Muestra con resultado **No Adecuado**.

Las muestras o extractos que presenten este tipo de gráficos se procesan nuevamente a partir de la extracción para dar un resultado definitivo.

- q) **Muestras para repetir.** Serán aquellas en las que se presente alguna amplificación de resultados simultáneos de dos o más virus, propiciando a que su interpretación pudiera ser erróneamente reportada como una **coinfección**; también se considerará la repetición de muestras en las que no se presente amplificación del RP, asimismo, las muestras que no presenten amplificación alguna y que su resultado pudiera sugerir una mala toma de muestra, para confirmar si se tratara de un resultado **No Adecuado**. (Figura 27).

Para éste tipo de muestras se recomienda realizar la repetición mediante extracción manual, ya que ésta nos asegura una mayor

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

D. Diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza mediante RT-PCR tiempo real

concentración del material genético y por lo tanto una mejor detección.

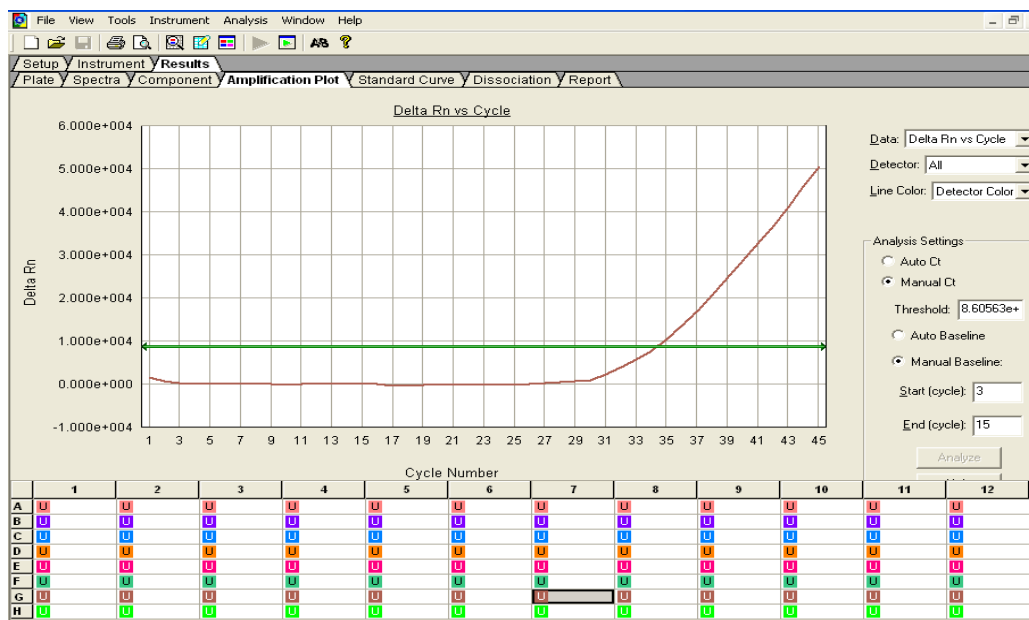


Figura 27.- Muestra con resultado de una **muestra para repetir**.

Los resultados serán reportados con base en el formato de trabajo y entregados al responsable de emisión de resultados.