

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo
de Berlín

1. PROPÓSITO:

- Proporcionar la metodología para realizar el diagnóstico de las muestras (exudado faríngeo y nasofaríngeo, lavado bronquioalveolar, aspirado traqueal, aspirado nasofaríngeo, lavado nasal y biopsia pulmonar) con caso probable de Enfermedad Respiratoria Aguda y/o Defunción por neumonía con sospecha de infección por SARS-CoV-2, mediante RT-PCR tiempo real.
- Proporcionar un resultado diagnóstico oportuno para la confirmación o nulidad del probable caso de infección por SARS-CoV-2.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Este método se basa en la implementación del protocolo Diagnóstico para la Detección de SARS-CoV-2 por RT-PCR en Tiempo Real, emitido el 17 de Enero de 2020 por la Charité – Universitätsmedizin Berlin, en colaboración con Tib-Molbiol de Alemania, Erasmus MC de Holanda y con Public Health England, de Inglaterra, para la detección de SARS-CoV-2 por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR o RT-PCR en tiempo real). Describe el uso de iniciadores y sondas de hidrólisis (TaqMan®), para la detección cualitativa y caracterización del virus a partir de muestras clínicas obtenidas de vías respiratorias altas y bajas, discriminando la positividad entre SARS-CoV-2 y SARS-CoV, debido a su muy estrecha relación genética, así como el desarrollo de la técnica mediante el uso de la enzima Invitrogen Super Script® III Platinum One-Step qRT-PCR System. Los iniciadores y sondas “E_Sarbeco” están diseñados para la detección del gen de la proteína de envoltura de los Sarbecovirus, como SARS-CoV y SARS-CoV-2.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

3. SISTEMA DE MUESTRA PRIMARIA

Como lo indica el Lineamiento Estandarizado para la Vigilancia Epidemiológica y por Laboratorio de Enfermedad por SARS-CoV-2 respecto a la toma y tipos de muestras, así como el manual REMU-MA-01 para la toma, envío y recepción de muestras para el InDRE y el procedimiento LVIR-P-05, la matriz para SARS-CoV-2 son extractos obtenidos de los siguientes tipos de muestras:

- Exudado faríngeo/nasofaríngeo
- Lavado bronquioalveolar
- Aspirado traqueal
- Biopsia pulmonar

4. TIPO DE CONTENEDOR Y ADITIVOS

Las muestras se colocan en tubos de polipropileno de 16 por 125 mm o 13 por 100 mm con 2.5 mL de medio de transporte viral, los sobrenadantes se colocan en criotubos de 2 mL o en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL y se conservan de 4 a 8° C antes de procesarse. Posteriormente, se almacenan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los extractos se colocan en tubos tipo eppendorf de 0.6 mL o de 1.5 mL y se almacenan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su resguardo. Las muestras deberán estar etiquetadas con el número de folio del LESP o Unidad solicitante y nombre e ir acompañadas del estudio de caso de enfermedades respiratorias virales de la plataforma SISVER.

ESPECIFICACIONES DE DESEMPEÑO

- Para la implementación del protocolo de Berlín del 17 de enero de 2020, se utilizaron tres muestras de casos sospechosos para Coronavirus SARS-CoV-2, las cuales fueron recibidas en el InDRE los días 24 y 28 de enero del año en curso.

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

- 2 de los pacientes cumplían con la definición operacional de caso y el tercero era contacto de uno de los antes mencionados.
- En los 3 casos se obtuvo resultado positivo a otros Virus Respiratorios.
- Estas muestras fueron analizadas en 3 plataformas diferentes para corroborar que la metodología evaluada es compatible en diversos equipos.
- Para evaluar que no existe reacción cruzada con otros Virus Respiratorios y Bacterias Respiratorias, esta metodología también se retó contra controles positivos a estos agentes patógenos, incluyendo MERS-CoV.
- Como control positivo se utilizó SARS-CoV.
- Se evaluó la detección del Control Positivo SARS-Like Wuhan, proporcionado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

Se retó la implementación de la metodología con el uso de las enzimas AgPath-IDTM One-Step RT-PCR de Applied Biosystems y Star Q One-Step RT-qPCR de Genes 2 Life.

Resumen de resultados obtenidos:

Todos los controles y muestras fueron utilizados en 3 equipos diferentes para comprobar la robustez de la metodología en plataformas con las que puede contar la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP), obteniendo los siguientes resultados:

MUESTRA	EQUIPOS UTILIZADOS	REPETICIONES POR EQUIPO	RESULTADO
Zeptomatrix NATtrol Respiratory Pathogen Panel-1 (5 mezclas con virus y bacterias respiratorias)	<ul style="list-style-type: none"> • 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems • CFX96 Real Time System, Bio Rad 	1	No presenta amplificación

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

<ul style="list-style-type: none"> QuantStudio 5 Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems 			
MERS-CoV (Control Positivo)	ABI 7500, CFX96 y QS5	1	No presenta amplificación
Muestra 280 InDRE (Pos HCoV OC43 coinfección con HAdV)	ABI 7500, CFX96 y QS5	1	Negativo
Muestra 386 InDRE (Pos RSV)	ABI 7500, CFX96 y QS5	1	Negativo
Muestra 387 InDRE (Pos HCoV HKU1 coinfección con HAdV)	ABI 7500, CFX96 y QS5	1	Negativo
SARS-CoV (Control Positivo)	ABI 7500, CFX96 y QS5	1	Amplificación positiva
SARS-Like Wuhan	ABI 7500, QS5	1	Amplificación positiva

5. MATERIALES

- Bata blanca.
- Zapatos cerrados con suela antiderrapante.
- Bata desechable para cirujano de manga larga estéril.
- Cubrebocas desechables.
- Guantes de nitrilo.
- Puntas con filtro dual, estéril y libre de pirógenos, marca Eppendorf, de 0.1 - 10 µL, 40 mm, rack de 96 puntas. No. Pedido: 0030 077.512
- Puntas con filtro dual, estéril y libre de pirógenos, marca Eppendorf, de 2 - 20 µL, 53 mm, rack de 96 puntas. No. Pedido: 0030 077.539.
- Puntas con filtro dual, estéril y libre de pirógenos, marca Eppendorf, de 2 - 100 µL, 53 mm, rack de 96 puntas. No. Pedido: 0030 077.547.

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

- Puntas con filtro dual, estéril y libre de pirógenos, marca Eppendorf, de 2 - 200 µL, 55 mm, rack de 96 puntas. No. Pedido: 0030 077.555.
- Puntas con filtro dual, estéril y libre de pirógenos, marca Eppendorf, de 50 - 1000 µL, 76 mm, rack de 96 puntas. No. Pedido: 0030 077.571.
- Puntas con filtro, pre-esterilizadas, libres de RNAsa, DNAsa, DNA y Pirógenos, marca Rainin, de 200 µL, rack de 96 puntas, Catálogo: RT-200F.
- Puntas con filtro, pre-esterilizadas, marca Bioclean Rainin, de 1000 µL, rack de 96 puntas, Catálogo: RT-1000F.
- Microtubos de polipropileno con capacidad de 1500 µL.
- Microtubos de polipropileno con capacidad de 600 µL.
- Microtubos de polipropileno con capacidad de 200 µL.
- Gradillas de plástico para tubos de 1500 µL.
- Papel aluminio.
- Placas de reacción MicroAmp Fast Optical de 96 pozos con código de barras, de 0.1 mL, marca Applied Biosystems, REF: 4346906.
- Tiras tubos de reacción Fast (tiras de 8 tubos), libres de DNA / RNA, de 0.1 mL marca Applied Biosystems, REF: 4358293.
- Tapas ópticas MicroAmp, tira de 8 tapas para placas de 96 pozos MicroAmp Fast Applied Biosystems, REF: 4323032.
- Caja de almacenamiento para criotubos para temperaturas de hasta -100° C.
- Bloque de enfriamiento (IsoTherm-System), para microtubos de polipropileno con capacidad de 0.5 µL, marca Eppendorf, No. De Pedido: 3880 001.160 (0 °C), 3880 001.178 (-21 °C).
- Bloque de enfriamiento (IsoTherm-System), para microtubos de polipropileno con capacidad de 1500 / 2000 µL, marca Eppendorf, No. De Pedido: 3880 001.166 (0 °C), 3880 001.174 (-21 °C).
- Bloque de enfriamiento (PCR-Cooler) para placas y tiras de tubos, marca Eppendorf, No. De Pedido: 3881 000.023 (Rosa), 3881 000.031 (Azul), 3881 000.015 (Kit de inicio 1 Rosa, 1 Azul).
- Bolsas de polipropileno.
- Contenedor para puntas desechables.
- Gasa estéril.
- Marcadores indelebles.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

6. REACTIVOS Y MATERIALES BIOLÓGICOS

- Estuche comercial de Super Script® III Platinum One-Step qRT-PCR System, Invitrogen.
- Estuche comercial de AgPath-IDTM One-Step RT-PCR, Applied Biosystems.
- Estuche comercial de Star Q One-Step RT-qPCR, Genes 2 Life.
- Agua grado biología molecular.
- Sondas e iniciadores (sentido y anti-sentido) específicos para:

Nombre	Sequencia (5' to 3')
E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
E_Sarbeco_P1	FAM- ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG- BHQ1
Rnase P For Primer	AGATTGGACCTGCGAGCG
Rnase P Rev Primer	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT
Rnase P Probe	FAM- TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1

- RNase away No. De catálogo 10328-011, Marca Invotrogen.
- Etanol 70% Marca Hycl, Distribuidor Metrix Laboratorios S.A. de C.V. Numero de catálogo 1822 porrón de 20 litros.
- Hipoclorito de sodio 10% marca Golden Bell Reactivos No. De catálogo 31200, porrón de 19 litros.
- Controles positivos SARS-Like Wuhan (Gen E).
- Gen E Control. Vial con 1010 copias (Liofilizado), OPS/OMS.
- RNasaP Control.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo
de Berlín

7. PROCEDIMIENTO

9.1 Condiciones de almacenamiento de los reactivos para RT-PCR tiempo real

- Estuche comercial de Invitrogen Super Script® III Platinum One-Step qRT-PCR System y Estuche comercial de AgPath-IDTM One-Step RT-PCR deben almacenarse a -20 ± 10 °C.
- Estuche comercial de Star Q One-Step RT-qPCR de Genes 2 Life, almacenarse a -20 ± 10 °C.
- Los iniciadores y las sondas liofilizados deben almacenarse a temperatura ambiente. Una vez hidratados deben almacenarse a -20 ± 10 °C. Si el uso es continuo puede mantenerse hasta su término de 2 a 8° C para evitar su degradación. Se recomienda realizar alícuotas de trabajo.

9.2 Rehidratación de iniciadores y sondas

NOTA: Llevar a cabo ésta actividad dentro del Laboratorio, en el Área de “Mezcla de Reacción”.

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 10 µM. Mezclar con la punta de la micropipeta y posteriormente mezclar por vortex durante cinco segundos. Ya hidratados los reactivos se almacenan a -20 ± 10 °C en alícuotas de 100 µL o 500 µL si el uso no es tan frecuente, si su uso es muy frecuente se mantienen de 2 a 8° C hasta su término.

La preparación de los reactivos debe anotarse en el formato DVIR-F-05.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

9.3 Preparación de la mezcla de reacción para RT-PCR tiempo real

La preparación de la mezcla de reacción se lleva a cabo en el área del laboratorio asignada para “Mezclas de Reacción”. Se realiza de acuerdo a la Tabla 1, los valores en la tabla solo son para una reacción, se deberán de realizar los cálculos de acuerdo al número de muestras que se requiera determinar, además se deben considerar los controles negativos, positivos y de extracción por cada corrida de PCR, tomando en cuenta que es necesario que se prepare una reacción extra de la mezcla de reacción.

NOTA: Mantener todos los reactivos en bloques de enfriamiento para tubos durante todo el montaje de la prueba.

Reactivo	Volumen (μL) por reacción Invitrogen SSIII	Volumen (μL) por reacción Genes 2 Life StarQ	Volumen (μL) por reacción Applied Biosystems AgPath
Agua grado PCR	4.1	4.1	3.6
2x Reaction Mix	12.5	12.5	12.5
MgSO ₄ (50mM)	0.4	0.4	0.4
Primer E_Sarbeco_F1/ RP For (10μM stock solution)	1	1	1
Primer E_Sarbeco_R2/ RP Rev (10μM stock solution)	1	1	1
Primer E_Sarbeco_P1/ RP Probe (10μM stock solution)	0.5	0.5	0.5
Enzima	0.5	0.5	1
Volumen final de la mezcla	20.0	20.0	20.0
RNA	5	5	5
Volumen final	25	25	25

Tabla 1.- Reactivos para el Ensayo de primera línea (Detección del Gen E) y RNasaP.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo
de Berlín

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

9.4 Adición de moldes a la mezcla de reacción

- Después de haber preparado la mezcla de reacción conforme lo descrito en la Tabla 1 para cada juego de iniciadores y sondas, se dispensan 20 µL de esta mezcla de reacción con una micropipeta automática, se colocan en cada pozo y se recomienda hacerlo 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.
- Dependiendo de los marcadores a determinar, se realizará la distribución de los mismos en la placa.

Distribución de la Mezcla de Reacción:

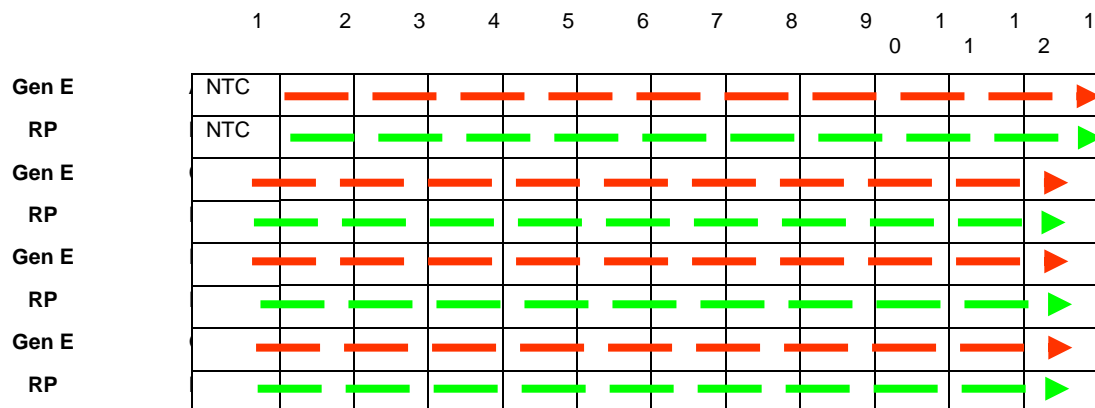


Figura 1.- Ejemplo de una placa de 96 pozos Fast.

- Posteriormente se colocarán 5 µL de agua grado biología molecular en los pozos 1A y 1B, esto servirá como control negativo (NTC, Negative Template Control) de reactivos de la mezcla de reacción (ver Figura 1).

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

- Se colocarán las tapas ópticas únicamente en los pozos marcados como NTC y se cubre toda la placa con papel aluminio para protegerla de la luz, manteniéndola en red fría (4°- 8°C) hasta su uso.

NOTA: Estas actividades también son llevadas a cabo en el área asignada para “Mezcla de Reacción” del laboratorio.

- Se elaborarán las hojas de registro con base en el orden en que se colocarán los extractos en las placas (ver Figura 2), se colocan los números que le corresponden a cada extracto de ácidos nucleicos.

➤ **Adición de templados:**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	1	12
Gen E	A	NTC	4											M43
RP	B	NTC	4											M43
Gen E	C	M1	5											M44
RP	D	M1	5											M44
Gen E	E	M2												CRE
RP	F	M2												CRE
Gen E	G	M3										42	M	PTC
RP	H	M3										42	M	PTC

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

- 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 colocarán 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

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

Reactivos de Extracción (CRE). Este paso se realiza en un gabinete de bioseguridad tipo II.

- Finalmente se pasará la placa cubierta con papel aluminio y en red fría al área del laboratorio asignada para “Controles Positivos”, en donde se colocarán 5 µL de los controles positivos (PTC) en los pozos correspondientes. Cabe hacer mención de que los Controles Positivos no necesariamente deben colocarse en los pozos de la columna 12, ya que, si son menos muestras las que se coloquen en la placa, los controles positivos pueden recorrerse.
- Posteriormente se deberá trasladar la placa de microtubos cubierta con el papel aluminio al área donde se encuentren los termocicladores en tiempo real. Antes de introducir la placa al termociclador se centrifuga a 1400 rpm durante 1 min o en caso de no contar con la centrifuga para placas, se sacude la placa con la mano y con fuerza de arriba hacia abajo las veces necesarias para permitir que baje el contenido retenido en las orillas de los pozos, evitando que se quede el líquido en las tapas o paredes de los tubos de reacción.

9.5 Procedimiento para realizar corridas de qRT-PCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en el equipo AB 7500 Fast.

- Encender la Laptop y el equipo AB 7500 Fast colocando la clave y contraseña correspondiente.
- 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
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo
de Berlín

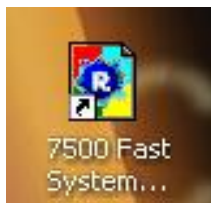


Figura 3.- Reconocimiento del acceso directo al programa

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

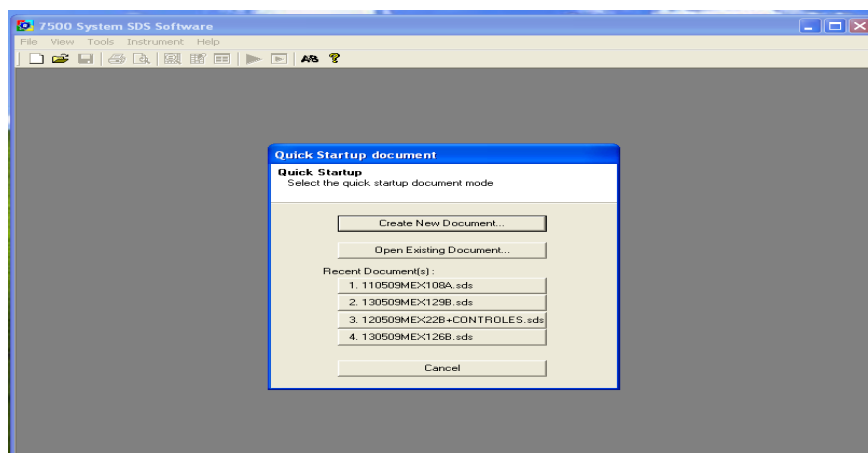


Figura 4.- Ventana de inicio del programa.

- En la ventana “*Quick start up document*” (inicio rápido de documento) hacer clic en la opción *Create New Document* (crear nuevo documento). Posteriormente abajo de la barra de menús en la parte superior derecha se encuentra el ícono de documento en blanco se hace clic en este ícono y aparece la ventana con el nombre de “*New document wizard*” (ventana de nuevo documento), como se observa en la Figura 5.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo
de Berlín

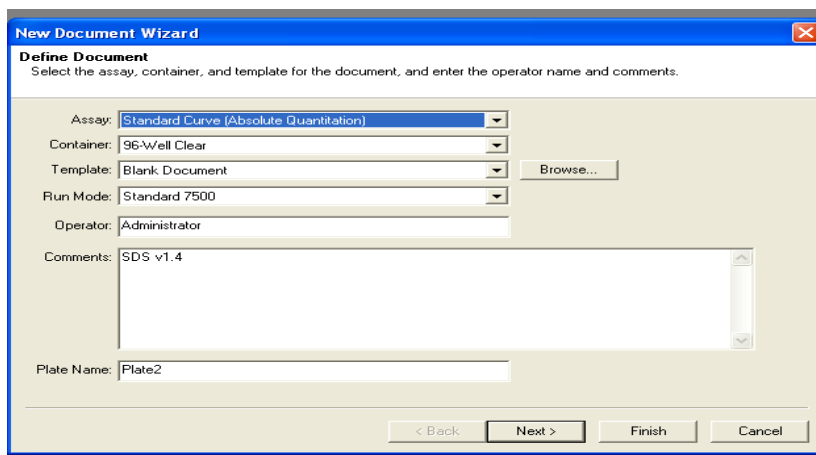


Figura 5.- Ventana para crear un nuevo documento.

- En esta nueva ventana se inicia la programación de la corrida, para lo cual en el parámetro de **Template** (molde o templado), del lado derecho de esta opción encontraremos el botón de **Browse** (buscar), se da clic para buscar la plantilla previamente programada y posteriormente se selecciona haciendo clic en el botón de **Open** (abrir) que se encuentra en la parte inferior derecha de la última ventana que se abrió.
- En la ventana de “*New document wizard*”, cambia la opción de **Template** (plantilla), por la del nombre de la plantilla seleccionada, en la opción de **Plate name** (nombre de la placa), se coloca el nombre de la corrida por programar, se sugiere que sea de la siguiente forma: FECHA (día-mes-año) espacio NOMBRE DE LA CORRIDA espacio NÚMERO DE LA CORRIDA.
- Posteriormente de haber verificado los pasos anteriores se da clic en el botón de **Finish** (finalizar) que se encuentra en la parte inferior derecha de la ventana.
- En la pantalla aparece la plantilla elegida con los marcadores por detectar, como se observa en la figura 6 en esta plantilla se programan las claves de los templados o extractos de RNA por analizar.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

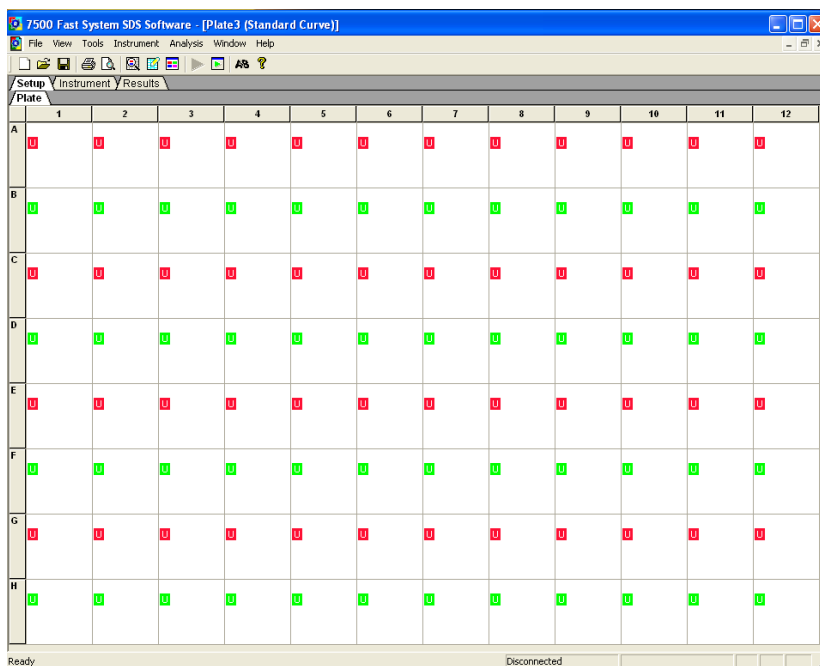


Figura 6.- Programación de las celdas de la plantilla para los 2 marcadores.

- La forma de programar las muestras (figura 6), es abrir la pestaña **SETUP** (organización) y seleccionar las casillas de la columna 1 para el control negativo, las cuales son nombradas como NTC. Ingresar el número de identificación de los extractos de acuerdo a la hoja de registro. Ingresar el nombre de los controles positivos en la columna 12 o donde corresponda.
- Una vez programadas las muestras y verificados los marcadores a detectar, se da clic en la pestaña de **Instrument** (instrumento) que se encuentra en la parte superior izquierda de la ventana por debajo de la barra de menú.
- En esta parte de la programación se verifican que las condiciones de termociclado, volumen de la reacción y el modelo en que fue programada la corrida, correspondan a las descritas en el protocolo establecido, observar en la figura 7 y 7.1.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

Etapa	Ciclos	Temperatura / Tiempo
Retrotranscripción	1	50 °C / 15 min
Activación de la polimerasa	1	95 °C / 2 min
Amplificación y detección	45	95 °C / 15 s
		60 °C / 30 s*

*Recolección de datos de fluorescencia.

Figura 7.- Programación de las condiciones de termociclado utilizando la enzima *Invitrogen Superscript III Platinum* y la enzima *Star Q One-Step RT-qPCR*.

Etapa	Ciclos	Temperatura / Tiempo
Retrotranscripción	1	50 °C / 30 min
Activación de la polimerasa	1	95 °C / 10 min
Amplificación y detección	45	95 °C / 15 s
		60 °C / 30 s*

*Recolección de datos de fluorescencia.

Figura 7.1- Programación de las condiciones de termociclado utilizando la enzima *Ag Path*, Applied Biosystems.

- Una vez verificadas las condiciones de termociclado se guarda la corrida: en el menú principal, seleccionar **File** (Archivo), elegir la opción **Save as** (Guardar como).
- Posteriormente se da clic en el botón **Start** (comenzar) que se encuentra en la parte superior izquierda de la ventana (figuras 7 y 7.1). La corrida dura 1 hora con 22 minutos aproximadamente para completarse totalmente.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo
de Berlín

8. CONTROL DE CALIDAD

Como parte de los cuidados que se le deben dar al instrumento para un óptimo desempeño, se encuentran las siguientes calibraciones:

- ROI: semestral, determina tiempo de exposición de la placa a la CCD, evalúa regiones de interés.
- Background: mensual después de ROI, evalúa la señal fluorescente del sistema y la elimina de la reacción de PCR.
- Óptica: después de Background, normaliza los filtros de excitación y detección.
- Pure Dyes: semestral, analiza el espectro que cada fluoróforo emite en cada uno de los filtros (Applied Biosystems, 2009).

9. INTERFERENCIAS

- Las señales que exceden el límite de fluorescencia normal, pueden indicar la presencia de contaminantes fluorescentes dentro de la placa o del bloque de muestra. Los contaminantes más comunes incluyen residuos de tinta de los marcadores indelebles, talco de los guantes desechables y polvo (Applied Biosystems, 2009).
- Hisopos de alginato o algodón.
- Toma incorrecta de las muestras (toma de muestra descrita en el Lineamiento Estandarizado para la vigilancia epidemiológica y por laboratorio de enfermedad por 2019-nCoV).
- Transporte inadecuado de la muestra al no mantenerse la cadena fría.
- Extractos de ácido nucleicos y reactivos que no mantengan la cadena fría.
- Utilización de equipos y reactivos fuera de los recomendados en el presente procedimiento.

10. INTERVALO REPORTABLE

Positivo o negativo.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo
de Berlín

11. VALORES DE ALERTA CRÍTICOS

- Obtener muestras con resultado inconcluso o dudoso de SARS-CoV-2. Este tipo de muestras puede indicar la presencia de nuevas variantes que no pueden ser detectadas mediante esta técnica. Por lo que al salir este tipo de muestras se envían a la Unidad de Desarrollo Tecnológico e Investigación Molecular para realizarles secuenciación y descartar alguna mutación.

12. INTERPRETACIÓN POR EL LABORATORIO

- Después de que la corrida de qRT-PCR para influenza, ha sido completada, aparece en la pantalla de la computadora un mensaje de que la corrida termino como se observa en la figura 8, se da clic en el botón de **OK**, el cual se encuentra en el centro de la pantalla.

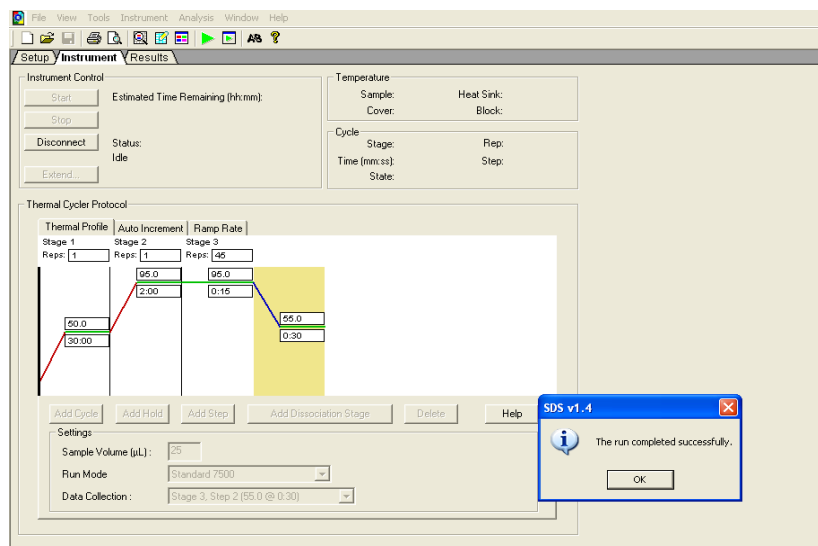


Figura 8.- Finalización de la corrida de qRT-PCR para SARS-CoV-2.

- Se selecciona la pestaña de **Results** (resultados), la cual se encuentra debajo de la barra de menús de la ventana (ver Figura 8), en esta opción se observarán nombre de **Plate** (plantilla), **Spectra** (espectro),

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

Component (componente), *Amplification Plot* (panel de amplificación), *Standard Curve* (curva estándar), *Dissociation* (disociación), *Report* (reporte). Encontrándose únicamente activa la subpestaña *Plate*.

Row	Sample ID	Status	Sample ID	Status	Sample ID	Status	Sample ID	Status	Sample ID	Status	Sample ID	Status
A	15176	Undet	15180	Undet	15184	Undet	15188	Undet	15192	Undet	15196	Undet
B	15176	Undet	15180	Undet	15184	Undet	15188	Undet	15192	Undet	15196	Undet
C	15604 R	Undet	15177	Undet	15181	Undet	15185	Undet	15189	Undet	15193	Undet
D	15604 R	Undet	15177	Undet	15181	Undet	15185	Undet	15189	Undet	15193	Undet
E	15151 R	Undet	15175	Undet	15179	Undet	15183	Undet	15187	Undet	15191	Undet
F	15151 R	Undet	15175	Undet	15179	Undet	15183	Undet	15187	Undet	15191	Undet
G	15176	Undet	15180	Undet	15184	Undet	15188	Undet	15192	Undet	15196	Undet
H	15176	Undet	15180	Undet	15184	Undet	15188	Undet	15192	Undet	15196	Undet

Figura 9.- 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 se lleva a cabo 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 9).
- 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

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

seleccionan las celdas de los controles negativos (columna 1) y las celdas de los controles positivos (columna 12 o donde se hayan colocado) al mismo tiempo, como se muestra en la Figura 10. El ajuste del threshold también puede realizarse por marcador.

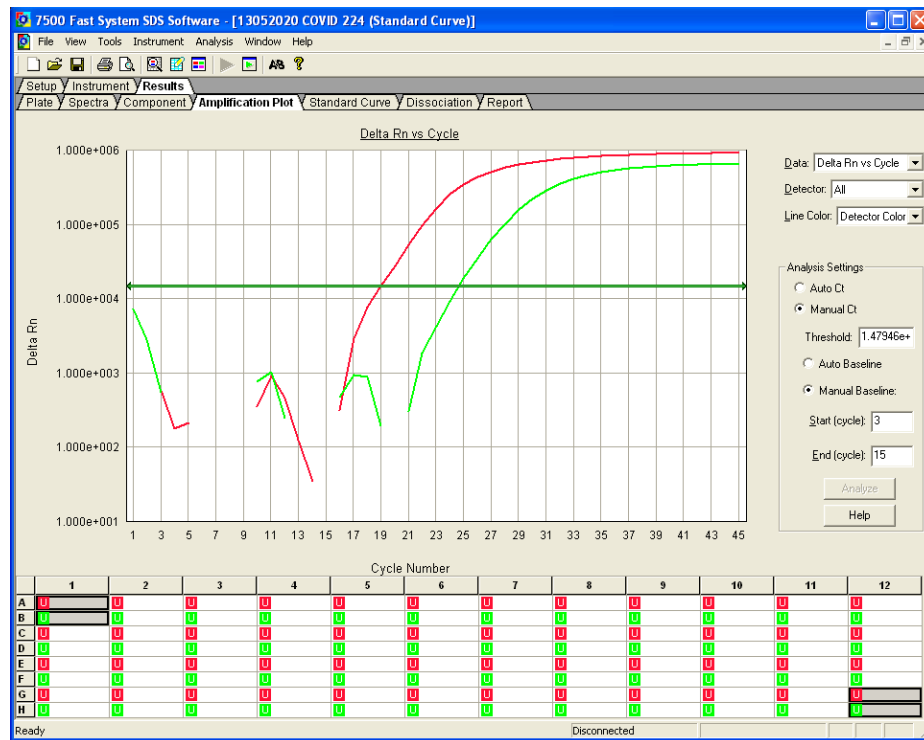


Figura 10.- Observación de las curvas de amplificación de los marcadores en los pozos de los controles positivos (arriba de la línea de threshold) y negativos (abajo de la línea de threshold) de la qRT-PCR.

- 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:
 - a) Parámetro *Data*: elegir la opción de *Delta Run vs. Cycle*,
 - b) Parámetro *Detector*: elegir la opción de *All*
 - c) Parámetro *Line Color*: elegir la opción de *Detector Color*.

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

- 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 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 en el menú iconográfico de la pantalla de las curvas de amplificación. 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 las cuales se encuentran en escala logarítmica a escala lineal, con la finalidad de evidenciar de mejor forma las curvas sigmoideas de amplificación. Esto se realiza haciendo doble clic en el eje de las “y”, o en el eje de ***Delta Run***, aparece inmediatamente un cuadro con el nombre de ***Graph Settings*** (ajuste de la gráfica), en este cuadro deberemos localizar la parte nombrada como ***Post Run Settings*** (ajuste post-corrida), en esta opción se observa el parámetro llamado ***Y-Axis*** y la opción de ***Log*** que se encuentra activada. Para poder observar las curvas sigmoideas de amplificación es necesario activar la opción Linear la cual está arriba de la opción ***Log***, dando clic en esta opción, posterior a este paso, hacer clic en el botón de ***Apply*** (aplicar), el cual se encuentra en la parte inferior del cuadro, después se hará clic en el botón de ***OK*** el cual se encuentra igualmente en la parte inferior del cuadro. Los gráficos de forma sigmoidea se observan en la figura 11.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo
de Berlín

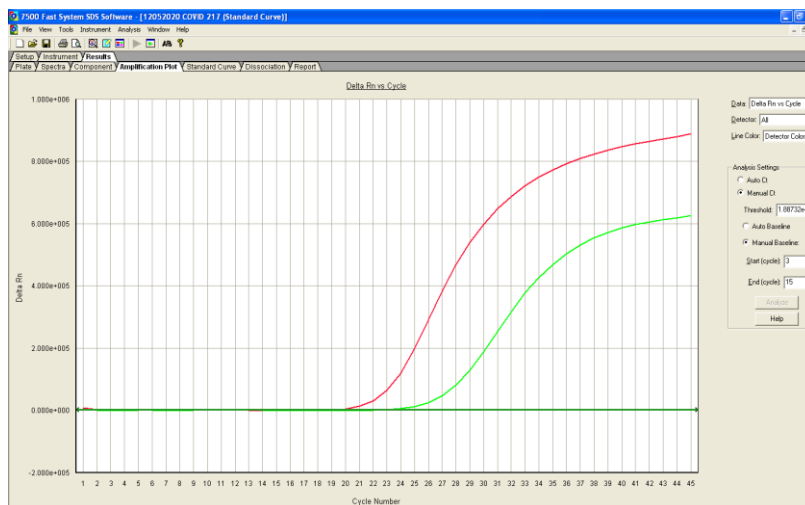


Figura 11.- Forma linear de las curvas sigmoideas de amplificación para SARS-CoV-2.

- La lectura de las curvas de amplificación de los extractos se realiza por columnas.

15.1 Interpretación de las curvas de amplificación

Los resultados serán reportados con base en el formato correspondiente y entregados al responsable de emisión de resultados de acuerdo al LVIR-P-04.

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

- a) Se presente amplificación en los controles negativos y ésta, no permita la interpretación adecuada de los resultados.
- b) Cuando no exista amplificación en uno o más de los Controles Positivos, siempre y cuando no afecte la interpretación de los resultados.
- c) Cuando se presente amplificación en el Control de Extracción y ésta no permita la interpretación adecuada de los resultados.
- d) Cuando algún equipo relacionado con el proceso (termociclador, robot de extracción, etc.) no se encuentre funcionando de manera adecuada o exista falla eléctrica.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo
de Berlín

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, 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 2: 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 de trabajo:

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

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

Los gráficos que a continuación se presentan son representativos de los resultados obtenidos durante las diferentes corridas de qRT-PCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Los valores positivos reportables no deben de exceder el valor de Cq de 38, en cuyo caso el resultado no será confiable.

Marcador	Color
Gen E	Rojo
RP	Verde fosforescente

Tabla 3. Asignación de los colores para cada marcador.

- a) SARS-CoV-2: Cuando se observe la amplificación o las curvas sigmoideas de los dos marcadores, (ver figura12):

Curva Roja: Marcador para la detección de la proteína de envoltura (gen E).

Curva Verde: Marcador para la detección de la RNasa P de origen humano, RP.

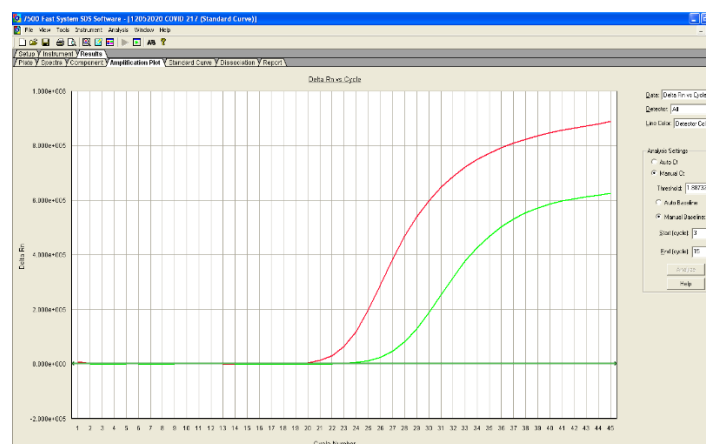


Figura 12.- Muestra positiva a SARS-CoV-2.

La muestra se dará con un resultado: **POSITIVO a SARS-CoV-2.**

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

- b) **NEGATIVO.** Cuando solamente se observa la curva de amplificación VERDE, correspondiendo al marcador RP. La amplificación de la curva verde nos indica que la muestra presenta una toma de muestra y un proceso de extracción adecuado, ya que como se mencionó anteriormente la curva verde nos representa la presencia del mRNA de la RNasa P (ver figura 13).

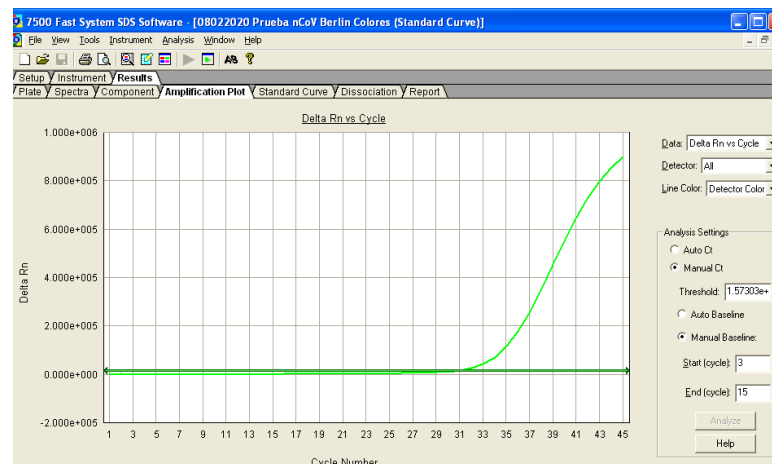


Figura 13.- Muestra con resultado NEGATIVO.

- c) **Muestras para repetir.** Resultados poco comunes en donde solo algunas de las curvas de amplificación se presentan, pero estas no tienen relación entre sí o solo amplifica una curva, pero las demás se quedan como dudosas, mismos que se ejemplifican en la Figura 14.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo
de Berlín

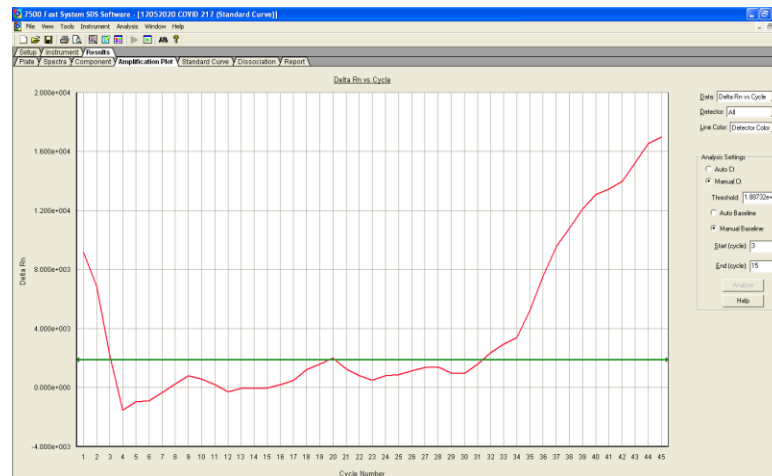


Figura 14.- Muestra con resultado de dudoso, sólo amplifica un marcador.

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

- d) Muestra **No Adecuada**. En este caso, no se observa ninguna curva de amplificación, como se muestra en la figura 15. Se deberá de procesar nuevamente para dar un resultado definitivo. Reportándose el resultado como **NA** (No Adecuada).

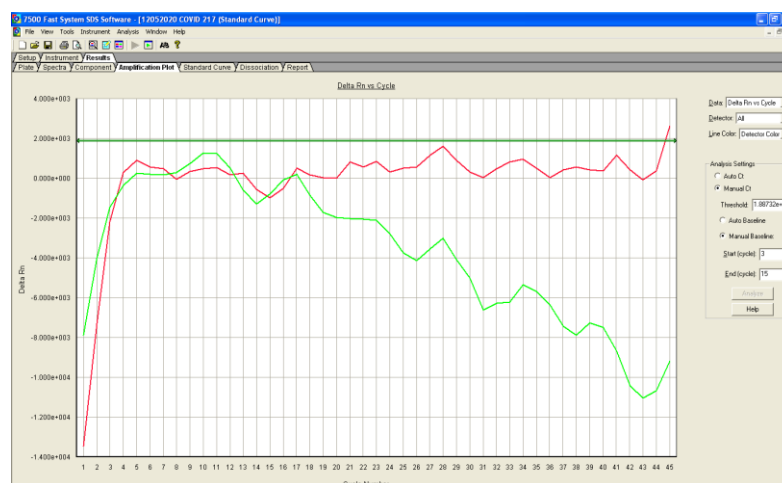


Figura 15.- Muestra que no amplifico, es decir muestra con resultado NA.

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

e) **Muestras para secuenciar:** Las muestras que presenten resultados positivos, dudosos o inconclusos, se envían al área de Genoma de Patógenos (GNMP) para que les sean realizadas pruebas de secuenciación para variabilidad antigénica o filogenia, según sea lo que se busque con dichas muestras. La solicitud para éste servicio, se lleva a cabo mediante la emisión de un memorándum dirigido al jefe del GNMP, solicitando en el asunto el servicio requerido.

Los resultados obtenidos deberán interpretarse de acuerdo a la siguiente tabla:

Gen E	RNasaP	Resultado
+	+	Positivo a SARS-CoV-2
-	+	Negativo a SARS-CoV-2
-	-	No Adecuado

Tabla 4. Interpretación de Resultados

13. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

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

- El riesgo biológico determinado para estos patógenos, es de nivel tipo II, sin embargo, en ésta técnica, únicamente se manejan materiales genéticos sin ningún riesgo, por lo tanto, no hay probabilidad de contagio con este tipo de muestras y reactivos, no obstante, las medidas de seguridad son las utilizadas para un patógeno de riesgo biológico de tipo II.
- Antes y después de utilizar los gabinetes de seguridad biológica, los equipos médicos, las micropipetas y las mesas de trabajo, debe realizarse una limpieza de los mismos, utilizando etanol al 70% o RNase-Away diariamente y realizar la limpieza exhaustiva una vez

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

cada 15 días, utilizando hipoclorito de sodio al 10%, seguido de etanol al 70% y eliminar inmediatamente los residuos con agua destilada.

- Mantener las áreas separadas entre el lugar de preparación de los reactivos de la mezcla de reacción para el PCR, colocación de ácidos nucleicos y adición de controles positivos.
- Mantener separados los equipos médicos (como pipetas, vortex y microcentrífugas), y los materiales (como tubos para minicentrífuga, placas para PCR, tapas ópticas y puntas de pipeta) en cada una de las áreas.
- Realizar la técnica adecuada de lavado de manos, antes y después de realizar las actividades dentro del laboratorio.
- Utilizar el equipo de protección personal (bata blanca y zapatos cerrados) al acceder al laboratorio. Al ingresar a cada área, además del equipo de contención primaria de seguridad, se deberá utilizar bata desechable, guantes y cubrebocas exclusivos 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 RNase-Away los guantes ya utilizados, con el fin de evitar contaminación cruzada o cada vez que se sospeche que pudo haberse contaminado.
- Mantener los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos cuanto le sea posible y en red fría.
- Cada vez que se coloque un extracto por pozo, debe cambiarse la punta para micropipeta empleada.
- Asegurarse que las tapas ópticas se encuentren perfectamente bien selladas después de adicionar los extractos y controles positivos, antes de introducir la placa al termociclador.
- El material de desecho generado debe ser colocado en el contenedor para manejo especial con bolsa transparente para su eliminación.

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

- Desechar el frasco del buffer vacío y los viales del Detection Enhancer de acuerdo a lo establecido en el procedimiento, así como colocar la etiqueta correspondiente con base en lo establecido en el anexo 1 del procedimiento GEAM-P-04.
- El almacenamiento de los extractos de trabajo se lleva a cabo en el congelador de $-30 \pm 10^{\circ}\text{C}$ o en el ultracongelador de -70°C a -80°C , en el cual, sólo personal autorizado puede tener acceso, ya que estos ejemplares se encuentran bajo llave.

14. FUENTES DE VARIABILIDAD

- El desarrollo del proceso debe ser realizado en forma unidireccional para evitar la contaminación de las áreas contiguas.
- Almacenamiento de reactivos inadecuado, contaminación de reactivos, incorrecta preparación de reactivos, contaminación cruzada en áreas.
- No existen interferencias ambientales declaradas por el fabricante.
- Utilización de equipos de amplificación y reactivos para PCR en tiempo real fuera de los evaluados por el InDRE para esta técnica.
- El no seguimiento estricto de los Lineamientos establecidos para el diagnóstico.
- Caducidad de los reactivos.

9.6 Procedimiento para realizar corridas de qRT-PCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en el equipo AB 7500 Fast.

1. Principio

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

El procedimiento para la detección y caracterización de SARS-CoV-2 mediante este kit, es un ensayo de PCR en Tiempo Real de un solo paso, donde los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante la detección por fluorescencia, se puede medir durante la amplificación, la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de cDNA formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Para éste kit las regiones en ORF1ab y el gen N son los blancos de amplificación para la identificación del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2), utilizando iniciadores y sondas específicas para su detección. El reactivo también cuenta con la detección de un control endógeno, que es usado para monitorear el proceso de toma de la muestra, extracción y amplificación de la PCR.

2. Condiciones de almacenamiento

- El kit debe almacenarse a $-20^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$.
- Los reactivos del kit pueden almacenarse a 4°C durante 3 días, el congelar y descongelar repetidamente puede dañar los componentes del kit.

3. Contenido del kit

Kit	Especificaciones	Cantidad	Principales componentes
Reactivos para detección por PCR (96 pruebas por kit)	NC (ORF1ab-VIC / N-FAM) PCR reaction solution A	2x900 µl	Iniciadores específicos, sondas, Tris-HCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 , dNTPs.
	NC (ORF1ab/N) PCR reaction solution B	2x200 µl	Hot Start Taq DNA polimerasa, c-MMLV retrotranscriptasa, Rnasin, etc.

4. Tipo de muestra

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

RNA extraído de muestras o sobrenadantes provenientes de exudados faríngeos, nasofaríngeos, lavado bronquioalveolar, aspirado traqueal, aspirado nasofaríngeo, lavado nasal, biopsia de pulmón y esputo.

5. Preparación de la mezcla de reacción

NOTA: Mantener todos los reactivos en bloques de enfriamiento para tubos durante todo el montaje de la prueba.

- Descongelar el tubo A y el tubo B, centrifugarlos brevemente para eliminar las gotas que puedan quedar en las paredes y tapas.
- La preparación de la mezcla de reacción se lleva a cabo en el área del laboratorio asignada para “Master Mix”. Se realiza de acuerdo a la tabla 1, los valores en la tabla sólo 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 una reacción extra de la mezcla de reacción.

Reactivo	Volumen por 1 reacción
Tubo A	17 µl
Tubo B	3 µl
Volumen total	20 µl

Tabla 1.- Cantidades para la preparación de la mezcla de reacción.

- Mezclar suavemente por pipeteo o vortex y centrifugue brevemente para bajar las gotas que puedan quedar en la pared y tapa del tubo.
- Coloque 20 µl de la mezcla de reacción en los pozos de la placa o tubos de PCR que empleara en el ensayo.
- Posteriormente colocar 5 µL de agua grado biología molecular en el pozo 1A, que servirá como control negativo (NTC, Negative Template Control) de reactivos de la mezcla de reacción.
- Se coloca la tapa óptica únicamente en el pozo marcado 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.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

6. Adición de moldes a la mezcla de reacción

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 o cabina de PCR. (Figura 1)

		1	2	4	5	6	7	8	9	1	1	1
									0	1	2	
IC/N/ORF1	A	N	M									M
ab		TC	8									88
IC/N/ORF1	B	M	M									M
ab		1	9									89
IC/N/ORF1	C	M	M									M
ab		2	10									90
IC/N/ORF1	D	M	M									M
ab		3	11									91
IC/N/ORF1	E	M	M									M
ab		4	12									92
IC/N/ORF1	F	M	M									M
ab		5	13									93
IC/N/ORF1	G	M	M									I
ab		6	14									C
IC/N/ORF1	H	M	M									P
ab		7	15									TC

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

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 del control Interno (IC: NC (ORF 1 ab/N) “negative control”) y del control positivo (PTC: NC (ORF 1 ab/N) “positive control”), proporcionados en el kit de detección, en el pozo correspondiente. (Figura 1)

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

Cabe hacer mención de que el Control Interno y el control positivo no necesariamente deben colocarse en los pozos de la columna 12, ya que, si son menos muestras las que se procesarán en la placa, éstos 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 o en su defecto se sacude la placa con la mano y con fuerza de arriba hacia abajo las veces necesarias para permitir que baje el contenido retenido en las orillas de los pozos, evitando que se quede el líquido en las tapas o paredes de los tubos de reacción.

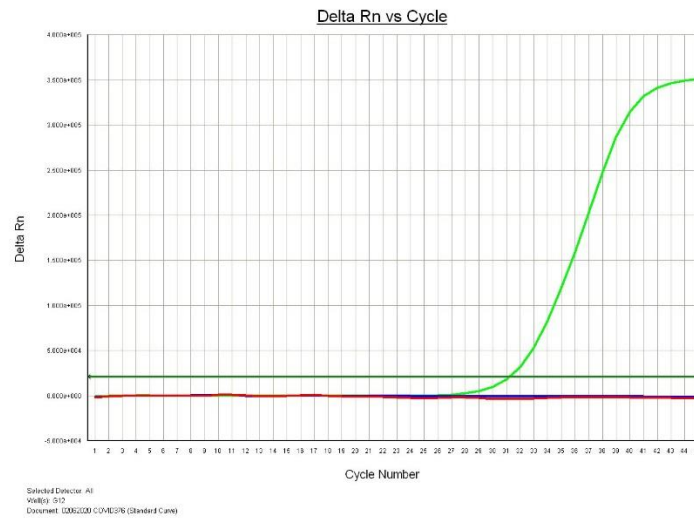
7. Condiciones de amplificación

Etapas	Repeticiones	Temperatura	Tiempo	Colecta de datos
1	1	50	00:15:00	
2	1	95	00:15:00	
3	45	94	00:00:15	
		55	00:00:45	✓

8. Control de calidad

- El control negativo NC (ORF1 ab/N) no debe presentar ninguna curva de amplificación para los canales FAM y VIC, pero debe presentar curva de amplificación para el control endógeno en el canal de CY5. (Figura 2)

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo
de Berlín



➤ Figura 2.- Amplificación del Control Interno.

- El control positivo NC (ORF 1 ab/N) positive control; debe presentar curvas de amplificación para los canales FAM y VIC con un valor de Ct ≤ 32 y puede o no presentar curva de amplificación para el control endógeno en el canal de CY5. (Figura 3)

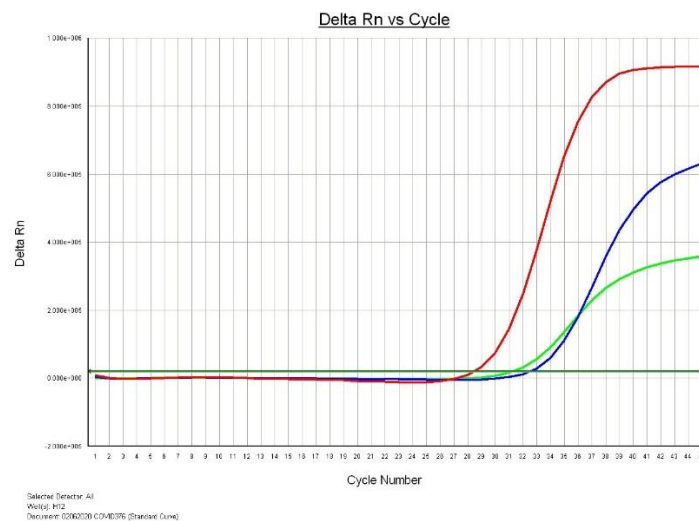


Figura 3.- Amplificación del Control Positivo.

Los controles negativos y positivos deben ser probados en cada experimento. Estos requerimientos deben cumplirse en cada una de las

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

corridas con las muestras, de otra manera, el experimento debe considerarse invalido y deberá correrse de nuevo.

9. Interpretación de 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 SARS-CoV-2. Los valores positivos reportables pueden emitirse con $Ct \leq 40$.

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

Marcador	Color
N (FAM)	Rojo
ORF1ab (VIC)	Azul
Control Interno (CY5)	Verde fosforescente

- Si en la corrida de las muestras no existe una curva de amplificación o estas tienen un valor de $Ct > 40$ en los canales de FAM y VIC, además de presentar una curva de amplificación para el control endógeno en el canal de CY5, la muestra se considera Negativa. (Figura 4)

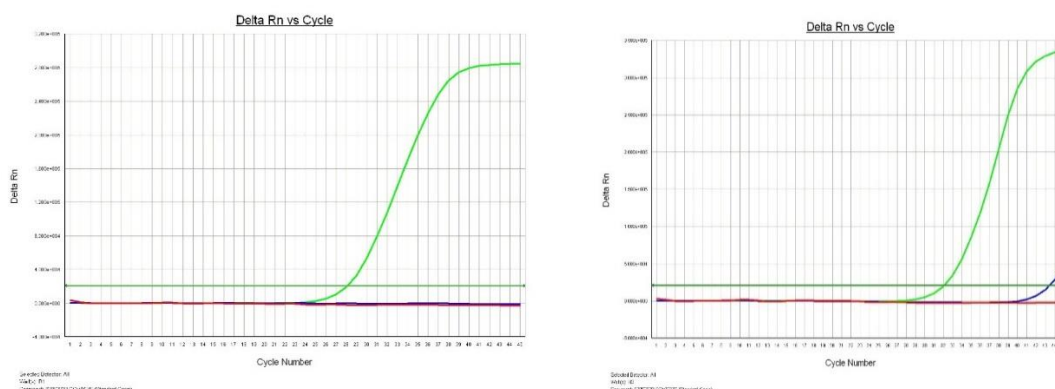


Figura 4.- Ejemplo de muestras Negativa.

- Si la muestra presenta una curva de amplificación en los canales de FAM y VIC o solamente en uno de los dos canales, con valores de $Ct \leq 40$, se considera Positiva. (Figura 5). Cuando la detección en los canales de FAM y VIC son positivos, el resultado del canal de CY5

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

(control endógeno) puede ser negativo debido a la competición en el sistema.

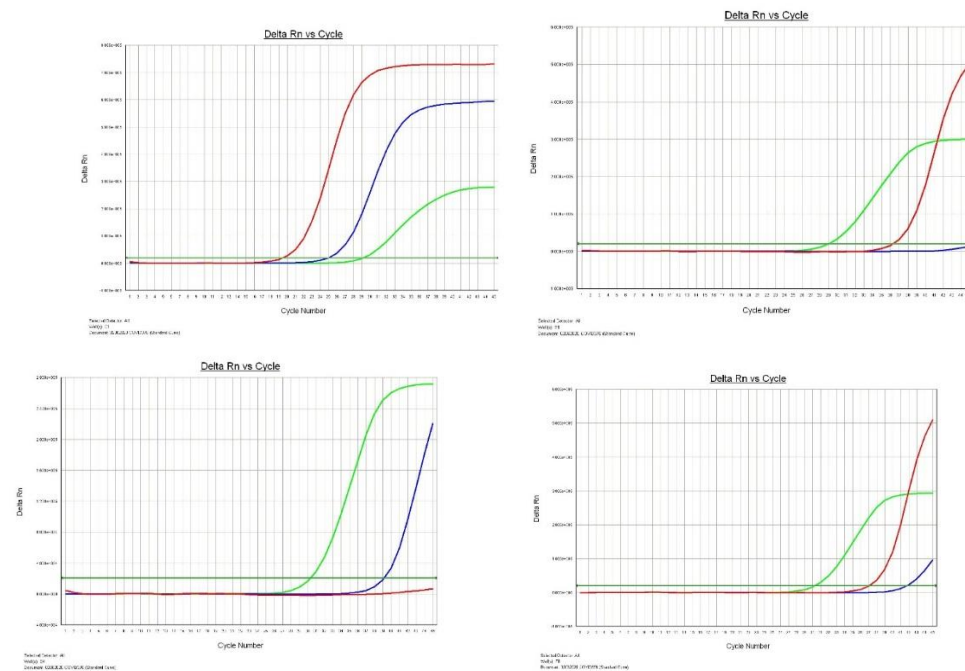
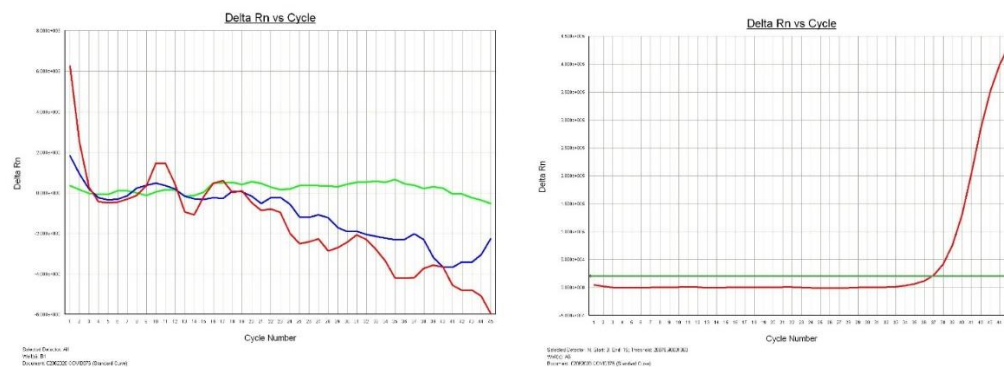


Figura 5.- Amplificación de muestras Positivas.

- Cuando el control endógeno resulta negativo y los canales de FAM y VIC también son negativos entonces indica que la reacción se ha inhibido o existe algún error en el proceso, por lo que la corrida debe ser invalidada, así mismo, si no existe amplificación del control interno, pero sí de FAM o VIC, la muestra deberá ser reprocesada. (Figura 6)



LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

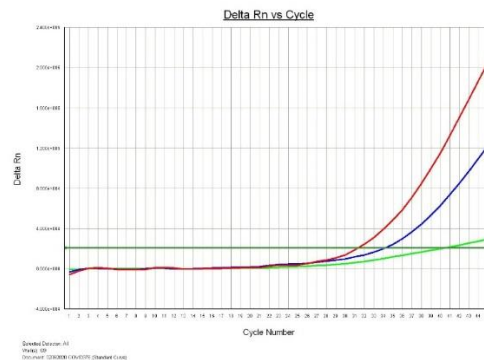


Figura 6.- Ejemplo de muestras para repetición.

10. Valor de corte para muestras positivas

- El fabricante determinó el valor de $Ct \leq 40$ para considerar una muestra como positiva.

11. Medidas de Bioseguridad

- Para el desarrollo de esta técnica se deben de tomar en cuenta las siguientes consideraciones:
- En ésta técnica, únicamente se manejan materiales genéticos sin ningún riesgo, por lo tanto, no hay probabilidad de contagio con este tipo de muestras y reactivos, no obstante, las medidas de seguridad son las utilizadas para un patógeno de riesgo biológico de tipo II.
- Para realizar ésta metodología, el personal debe tener conocimiento del Reglamento de Seguridad, así como de las Hojas de Seguridad Química, para que, en caso de ocurrir un derrame, sepa actuar de manera correcta.
- El flujo de trabajo deberá llevarse a cabo según lo establecido en el reglamento de bioseguridad GABI-L-02 Sección V del Manual de Bioseguridad, donde se hace mención del equipo de protección personal que debe portarse, competencia del personal que trabaja dentro de cada una de las áreas, acceso a áreas restringidas, etc.
- Antes y después de utilizar los gabinetes de seguridad biológica, los equipos médicos, las micropipetas y las mesas de trabajo, debe realizarse una limpieza de los mismos, utilizando etanol al 70% o

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

RNase-Away diariamente y realizar la limpieza exhaustiva una vez cada 15 días, utilizando hipoclorito de sodio al 10%, seguido de etanol al 70% y eliminar inmediatamente residuos con agua destilada.

- Mantener las áreas separadas entre el lugar de preparación de los reactivos de la mezcla de reacción para el PCR, colocación de ácidos nucleicos y adición de controles positivos.
- Mantener separados los equipos médicos (como pipetas, vortex y microcentrífugas), y los materiales (como tubos para minicentrífuga, placas para PCR, tapas ópticas y puntas de pipeta) en cada una de las áreas, por buenas prácticas de laboratorio y para evitar contaminaciones cruzadas.
- Realizar la técnica adecuada de lavado de manos, antes y después de realizar las actividades dentro del laboratorio, según lo establecido en el procedimiento GABI-P-21.
- Utilizar el equipo de protección personal (bata blanca y zapatos cerrados) al acceder al laboratorio. Al ingresar a cada área, además del equipo de contención primaria de seguridad, se deberá utilizar bata desechable, guantes y cubrebocas exclusivos para cada una de las áreas, de acuerdo a lo establecido en el GABI-P-20.
- Evitar abrir o cerrar la puerta cuando algunos de los operarios estén usando la cabina de PCR o de bioseguridad.
- Evitar ingresar en áreas anteriores al proceso, en caso de usar el área Post-PCR, ya no se podrá ingresar a ninguna otra.
- 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 RNase away los guantes ya utilizados, con el fin de evitar contaminación cruzada o cada vez que se sospeche que pudo haberse contaminado y se toman en cuenta las medidas que se establecen en el GABI-P-27 para la formación de aerosoles.
- Mantener los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos cuanto le sea posible y en red fría.
- Cada vez que se coloque un extracto por pozo, debe cambiarse la punta para micropipeta empleada.
- Asegurarse que las tapas ópticas se encuentren perfectamente bien selladas después de adicionar los extractos y controles positivos, antes de introducir la placa al termociclador.
- El material de desecho generado debe ser colocado en el contenedor para manejo especial con bolsa transparente para su eliminación, de acuerdo al procedimiento GABI-P-12.

E. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Protocolo de Berlín

- El almacenamiento de los extractos de trabajo se lleva a cabo en un ultracongelador a -70 ± 10 °C, en el cual, sólo personal autorizado puede tener acceso, ya que estos ejemplares se encuentran bajo llave. Ésta actividad se lleva a cabo conforme lo establecido en el procedimiento LVIR-P-05.
-
- **Fuentes de Variabilidad**
-
- El desarrollo del proceso debe ser realizado en forma unidireccional para evitar la contaminación de las áreas contiguas.
- Almacenamiento de reactivos inadecuado, contaminación de reactivos, incorrecta preparación de reactivos, contaminación cruzada en áreas.
- Utilización de equipos de amplificación y reactivos para PCR en tiempo real fuera de los evaluados por el InDRE para esta técnica.
- El no seguimiento estricto de los Lineamientos establecidos para el diagnóstico.
- Caducidad de los reactivos.
- **Referencias**
- Instruction for Use of Detection Kit for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence Probing), Da An Gene Co., Ltd. of SunYat-sen University. Version 1, January, 2020.