

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

Equipos

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

Materiales

- bata desechable para cirujano de manga larga estéril
- puntas con filtro estériles de 10 µL
- puntas con filtro estériles de 200 µL
- puntas con filtro estériles de 1000 µL
- dispensadores con capacidad de 1250 µL
- micro tubos de polipropileno con capacidad de 600 µL
- micro tubos de polipropileno con capacidad de 1500 µL
- micro tubos de polipropileno con capacidad de 2000 µL con tapa de rosca
- gradillas de plástico para tubos de 1500 µL

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-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-IDTM One-Step RT-PCR
- Agua grado biología molecular
- Sondas e iniciadores (sentido y anti-sentido) específicos para:
- Influenza A (Inf A)
- Influenza A porcina (pdm Inf A)
- H1 porcina (pdm H1)
- Influenza B (Inf B)
- RNasa P Humana (RP)
- A H3 estacional (H3 E)

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

- RNase away
- Controles positivos (Influenza A(H1N1)pdm09, Influenza H3 estacional e Influenza B, RP).

Medidas para eliminar contaminación

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

- Mantener áreas separadas entre el lugar de preparación de los reactivos de la mezcla de reacción para el PCR, cargado de ácidos nucleicos y adición de controles positivos.
- Mantener separados los equipos (como pipetas, minicentrífugas y microcentrífugas), y los materiales (como tubos para minicentrífuga, placas para PCR, tapas ópticas y puntas de pipeta) en cada una de las áreas.
- Utilizar una bata de laboratorio desechable y guantes de nitrilo, en cada una de las diferentes áreas.
- Se recomienda que por cada placa completada con los extractos de material genético se utilicen guantes nuevos, o en su defecto limpiar con abundante alcohol al 70% o solución de ARNsa-Away los guantes ya utilizados, con el fin de evitar contaminación cruzada o cada vez que se sospeche que pudo haberse contaminado.
- 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.
- Descontaminación de las diferentes áreas de trabajo una vez que han sido utilizadas.
- 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.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

Procedimiento

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

- Estuche comercial de Invitrogen Superscript™ III Platinum ® One Step Quantitative Kit y el Estuche comercial de AgPath-ID™ One-Step RT-PCR deben almacenarse a $-20^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, una vez descongelados no debe volverse a congelar.
- Los iniciadores y las sondas liofilizados deben almacenarse a temperatura ambiente. Una vez hidratados deben almacenarse a $-20^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$. Si el uso es continuo puede mantenerse hasta su término de 2 a 8°C para evitar su degradación.

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 $40\text{ pmol}/\mu\text{L}$ y $10\text{ pmol}/\mu\text{L}$ respectivamente.
- Mezclar con la punta de la micropipeta aproximadamente 20 veces y posteriormente mezclar por vortex durante cinco segundos. Ya hidratados los reactivos se almacenan a -20°C o menos en alícuotas de $200\text{ }\mu\text{L}$ o $500\text{ }\mu\text{L}$ si el uso no es tan frecuente, si su uso es muy frecuente se mantienen de 2 a 8°C hasta su término.

3. *Preparación de la mezcla de reacción para RT-PCR 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 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 trabajar, además se debe considerar los controles positivo y

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

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 14, entonces $N=n+1$

Si el número de muestras (n) incluyendo los controles >15, entonces $N=n+2$

- 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) Invitrogen	Volumen (μL) AgPath
Agua grado PCR	5.5	5.0
Iniciador sentido	0.5	0.5
Iniciador antisentido	0.5	0.5
Sonda	0.5	0.5
Enzima	0.5	1.0
Regulador 2X	12.5	12.5
Volumen final (para una muestra)	20.0	20.0

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

Nota importante: El número de marcadores por placa, dependerá del algoritmo propuesto para cada temporada.

4. Adición de moldes a la mezcla de reacción

- Después de haber preparado la mezcla de reacción de acuerdo al cuadro 10 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.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Inf A	A	NTC											
pdm Inf A	B	NTC											
pdm H1	C	NTC											
RP	D	NTC											
Inf B	E	NTC											
H3 E	F	NTC											
	G												
	H												

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

- 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 16).
- 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 "Preparación de Reactivos" (Master Mix) del laboratorio.

- Se elaborarán las hojas de registro de acuerdo al 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.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Inf A	A	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
pdm Inf A	B	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
pdm H1	C	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
RP	D	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
Inf B	E	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
H3 E	F	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
	G												
	H												

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

Figura 2.- Ejemplo de la distribución de los ácidos nucleicos de las muestras, controles positivos y negativos 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 colocará 5 μ L del extracto en el pozo correspondiente, para obtener un volumen final de mezcla de reacción de 25 μ L. 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.
- 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 μ L de los controles positivos (PTC) en el pozo correspondiente.

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 . Antes de introducir la placa al termociclador se centrifuga a 1400 rpm durante 1 min.

5. Procedimiento para realizar corridas de RT-PCR para el diagnóstico de influenza en el equipo Applied Biosystems 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).

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

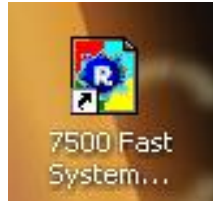


Figura 3.- Reconocimiento del acceso directo al programa

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

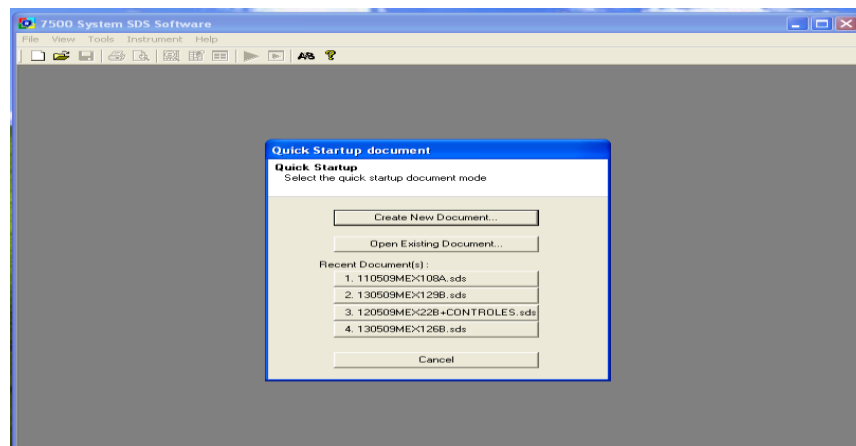


Figura 4.- Ventana de inicio del programa.

- 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.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

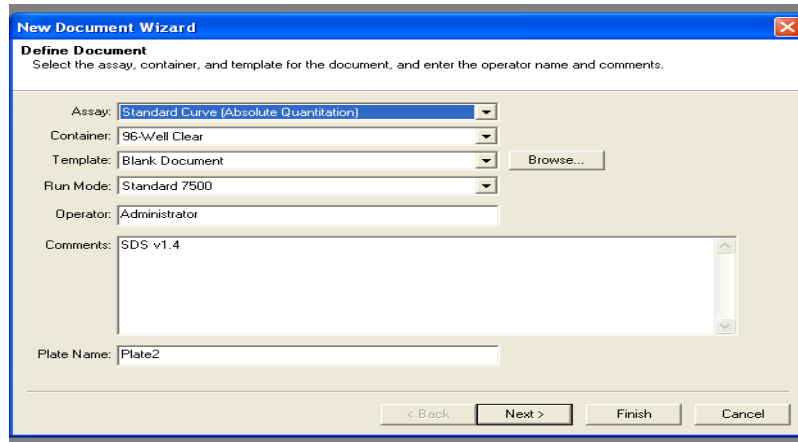


Figura 5.- Ventana para crear un nuevo documento.

- 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 NUMERO 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.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC 1	M1 1	M2 1	1	1	1	1	1	1	1	1	PTC 1
B	NTC 2	M1 2	M2 2	2	2	2	2	2	2	2	2	PTC 2
C	NTC 3	M1 3	M2 3	3	3	3	3	3	3	3	3	PTC 3
D	NTC 4	M1 4	M2 4	4	4	4	4	4	4	4	4	PTC 4
E	NTC 5	M1 5	M2 5	5	5	5	5	5	5	5	5	PTC 5
F	NTC 6	M1 6	M2 6	6	6	6	6	6	6	6	6	PTC 6
G	NTC 7	M1 7	M2 7	7	7	7	7	7	7	7	7	PTC 7
H												

Figura 6.- Programación de las celdas de la plantilla para los 7 marcadores.

- La forma de programar las muestras (figura 20), 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 menús.
- 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 de Influenza del CDC, observar en la figura 7.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

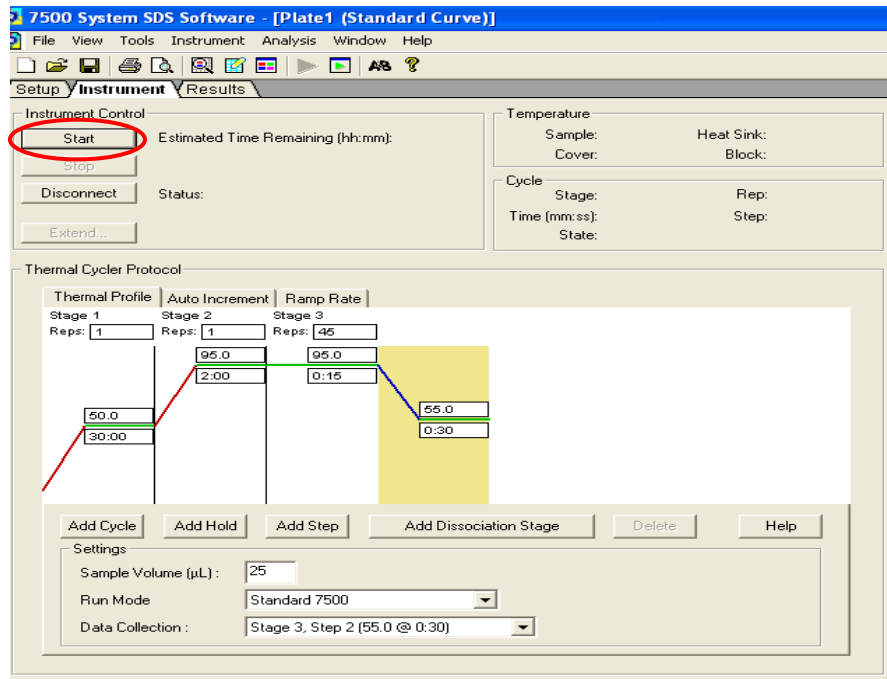


Figura 7.- Programación de las condiciones de corrimiento del termociclador utilizando la enzima Invitrogen Superscript III Platinum

- 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 (figura 8). La corrida dura 1 hora con 45 minutos para completarse totalmente.

6. 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.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

- Toma incorrecta de las muestras (toma de muestra descrita en los Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de Influenza).
- Muestras enviadas en formol.
- 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 modo Fast en lugar del modo Estándar en el termociclador de tiempo real.
- Utilización de equipos y reactivos fuera de los recomendados en el presente protocolo o en el establecido por el CDC.

7. 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.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

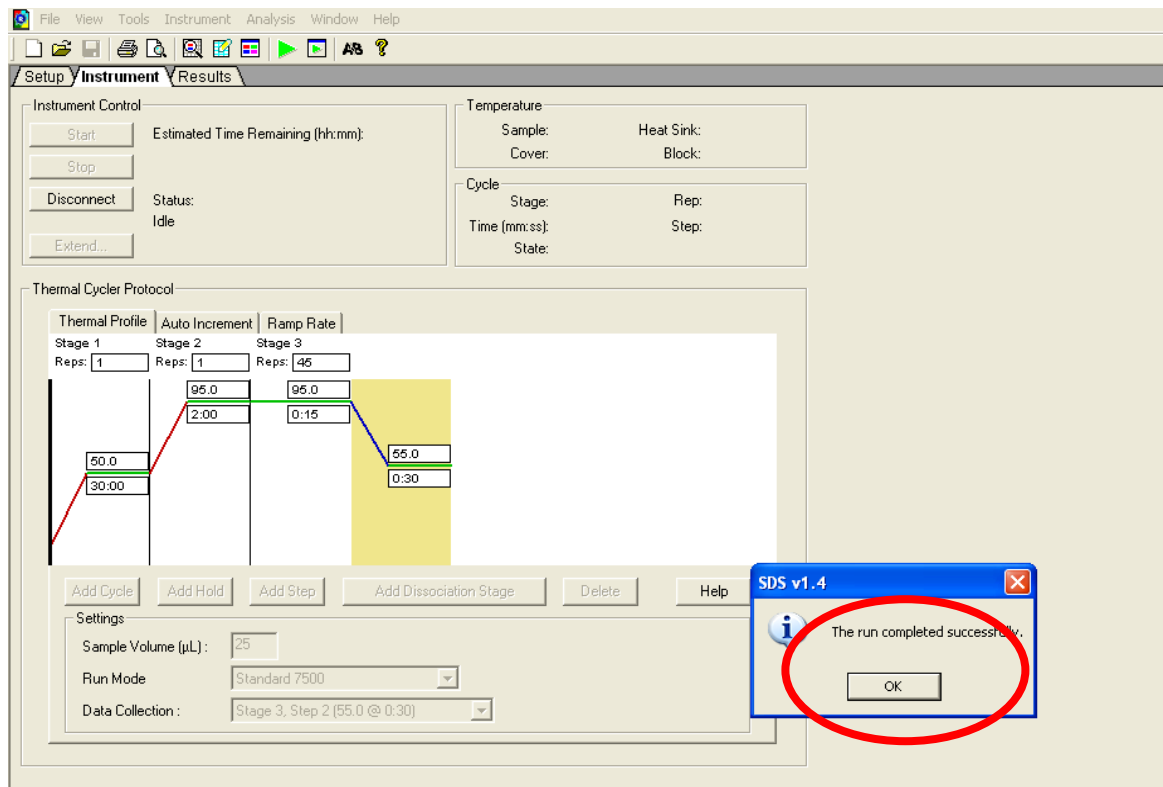


Figura 8.- Finalización de la corrida de qRT-PCR para Influenza.

- Se selecciona la pestaña de **Results** (resultados), la cual se encuentra debajo de la barra de menús de la ventana (ver figura 9), en esta opción se observaran varias subpestañas con el nombre de **Plate** (plantilla), **Spectra** (espectro), **Component** (componente), **Amplification Plot** (panel de amplificación), **Standard Curve** (curva estándar), **Dissociation** (disociación), **Report** (reporte). Encontrándose únicamente activa la subpestaña **Plate**.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC Undet.	2667 Undet.	2668 Undet.	2669 Undet.	2670 Undet.	2671 Undet.	2672 Undet.	2673 Undet.	2674 Undet.	2675 Undet.	CRE Undet.	PTC Undet.
B	NTC Undet.	2667 Undet.	2668 Undet.	2669 Undet.	2670 Undet.	2671 Undet.	2672 Undet.	2673 Undet.	2674 Undet.	2675 Undet.	CRE Undet.	PTC Undet.
C	NTC Undet.	2667 Undet.	2668 Undet.	2669 Undet.	2670 Undet.	2671 Undet.	2672 Undet.	2673 Undet.	2674 Undet.	2675 Undet.	CRE Undet.	PTC Undet.
D	NTC Undet.	2667 Undet.	2668 Undet.	2669 Undet.	2670 Undet.	2671 Undet.	2672 Undet.	2673 Undet.	2674 Undet.	2675 Undet.	CRE Undet.	PTC Undet.
E	NTC Undet.	2667 Undet.	2668 Undet.	2669 Undet.	2670 Undet.	2671 Undet.	2672 Undet.	2673 Undet.	2674 Undet.	2675 Undet.	CRE Undet.	PTC Undet.
F	NTC Undet.	2667 Undet.	2668 Undet.	2669 Undet.	2670 Undet.	2671 Undet.	2672 Undet.	2673 Undet.	2674 Undet.	2675 Undet.	CRE Undet.	PTC Undet.
G	NTC Undet.	2667 Undet.	2668 Undet.	2669 Undet.	2670 Undet.	2671 Undet.	2672 Undet.	2673 Undet.	2674 Undet.	2675 Undet.	CRE Undet.	PTC Undet.
H												

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 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 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 seleccionan las celdas de los controles negativos (columna 1) y las celdas de los

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

controles positivos (columna 12 o donde se hayan colocado) al mismo tiempo, como se muestra en la figura 10.

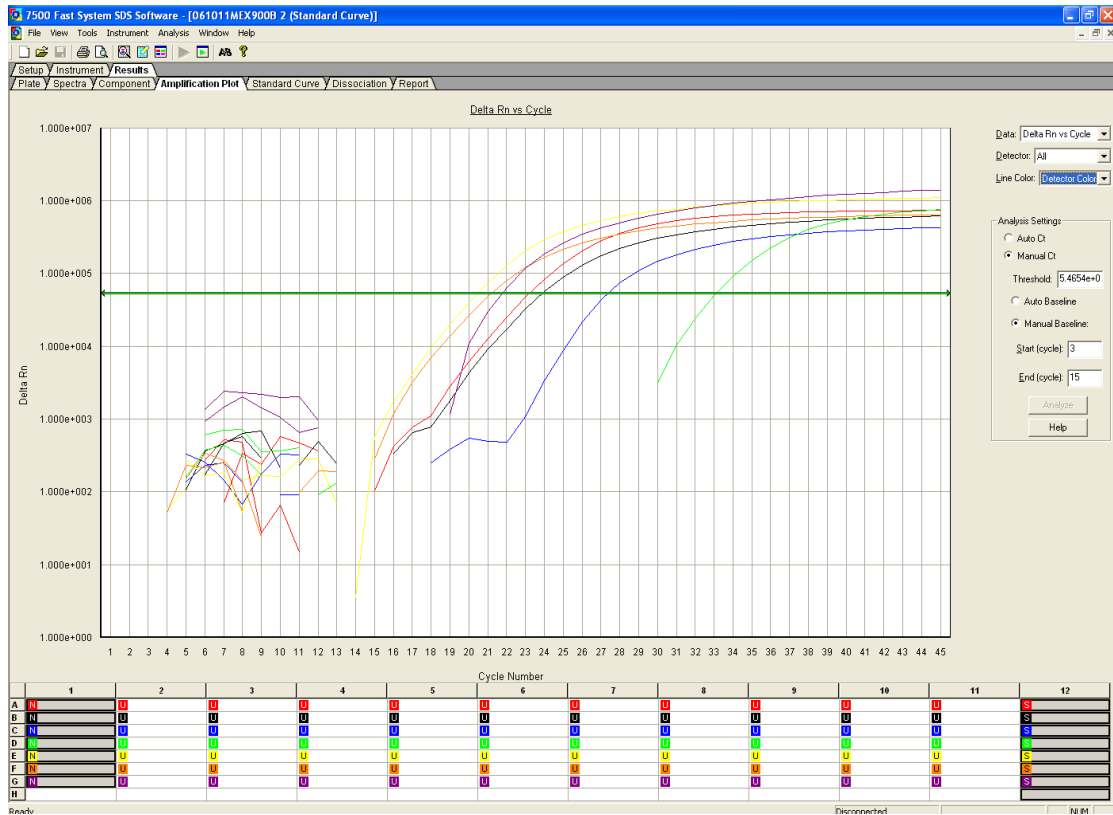


Figura 10.- Observación de las curvas de amplificación de los 7 marcadores en los pozos de controles positivos (arriba de la línea de threshold) y negativos (abajo de la línea de threshold) de la qRT-PCR.

- 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*

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

- 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 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 10. 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 de 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.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

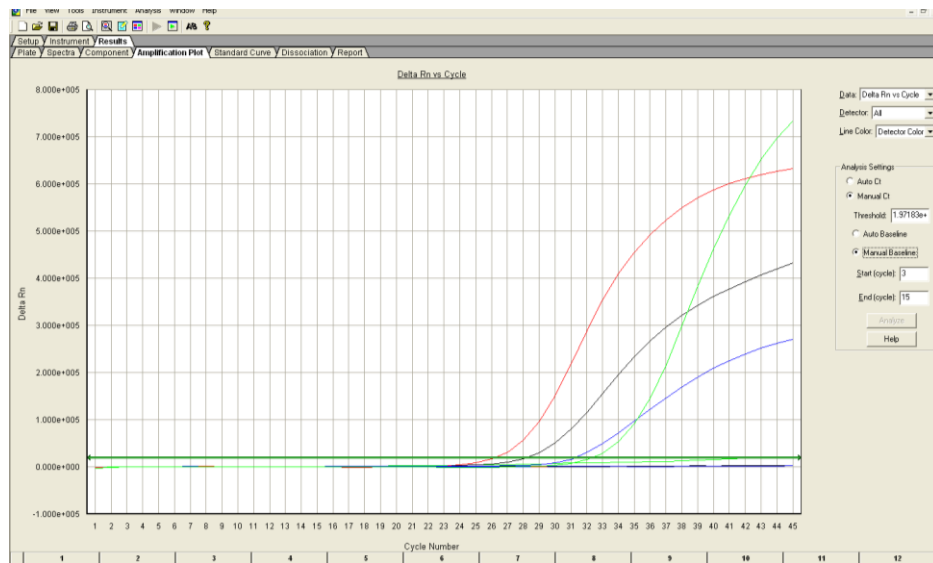


Figura 11.- Forma lineal de las curvas sigmoideas de amplificación, controles negativos y controles positivos.

- La lectura de las curvas de amplificación de los extractos se realiza por columnas, observar figura 12.

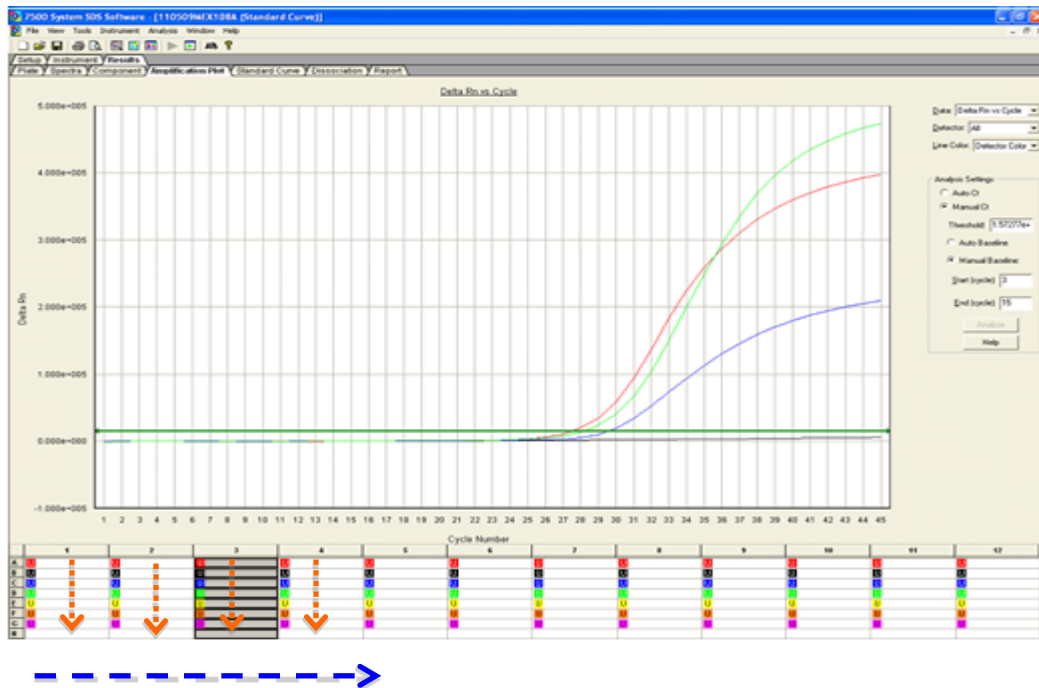


Figura 12.- Las flechas indican la forma de leer los resultados de qRT-PCR para el diagnóstico de influenza.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

Interpretación de las curvas de amplificación

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.

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

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

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 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) **Influenza A(H1N1)pdm09.** Cuando se observe la amplificación o las curvas sigmoideas de los cuatro marcadores, (ver figura 13):

Curva Roja: Marcador para la detección universal de los virus de Influenza tipo A, Inf A.

Curva Negra: Marcador para la detección universal de los virus de Influenza tipo A de origen porcino, pdm Inf A.

Curva Azul: Marcador para la detección del gen de la hemaglutinina de origen porcino, pdm H1.

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

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

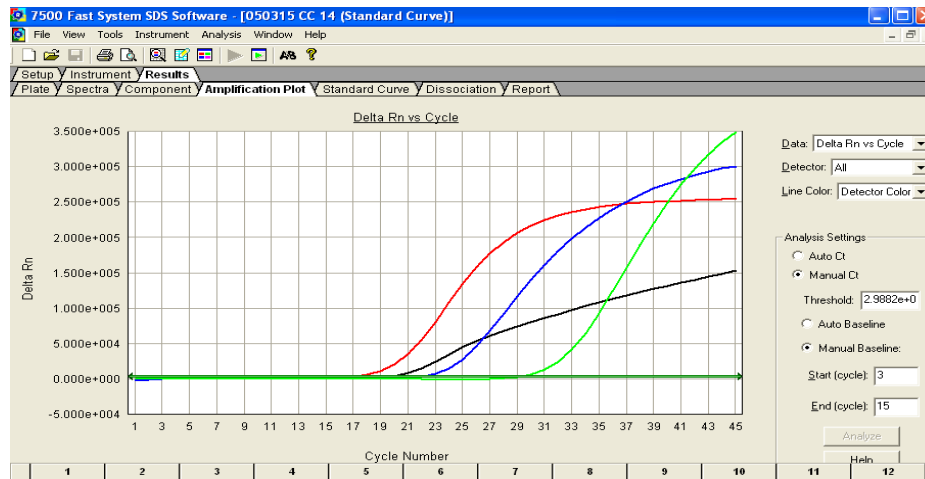


Figura 13.- Muestra positiva a Influenza A (H1N1)pdm09.

La muestra se dará con un resultado de: POSITIVO a Influenza A (H1N1)pdm09. En plataforma única de influenza se reporta como INF AH1N1 PDM.

Influenza A no subtipificable. Se observan la Curva Roja y la Curva Verde únicamente. Ver en la figura 14, esto nos indica que la muestra que se está analizando es POSITIVA a Influenza A No Subtipificable. . En plataforma única de influenza se reporta como NO SUBTIPIFICADO

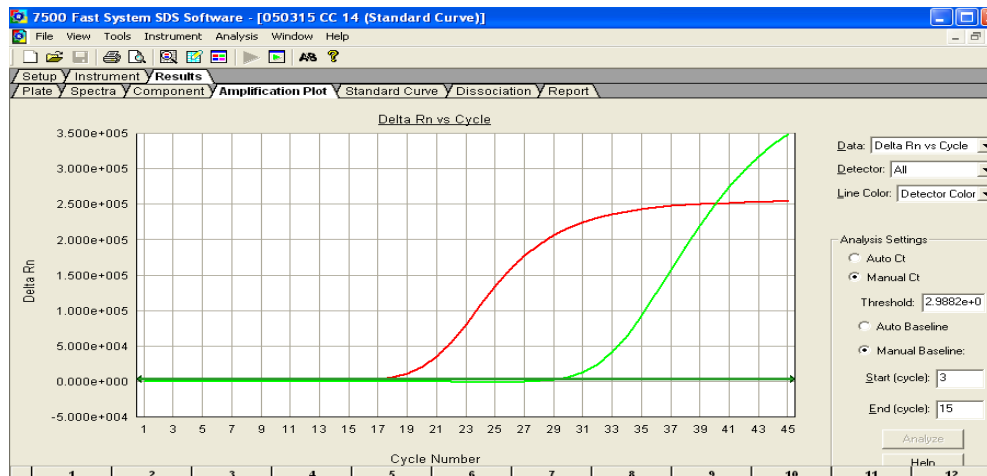


Figura 14.- Muestra positiva a Influenza A No Subtipificable.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

Influenza B. Si se observa amplificación de los marcadores para Inf B y RP, curva amarilla y la curva Verde, respectivamente. La figura 15 muestra el resultado: **POSITIVA a Influenza tipo B.** . En plataforma única de influenza se reporta como B.

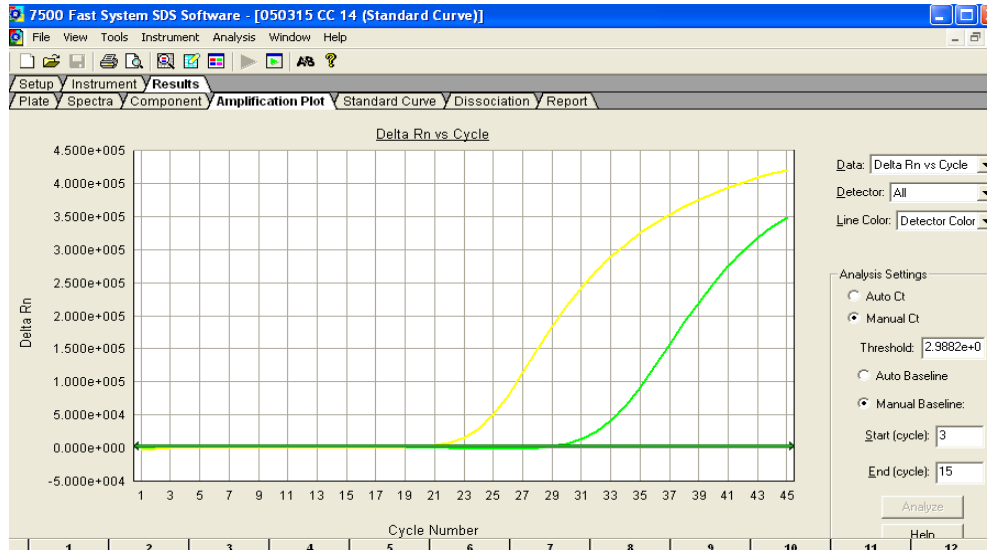


Figura 15.- Muestra positiva a Influenza tipo B.

Influenza A H3 estacional. Hay amplificación de los marcadores RP, Inf A y H3 E, curva verde, la curva roja y curva rosa o morado, respectivamente. Esto nos indica que la muestra que se está analizando es **POSITIVA a Influenza tipo A estacional subtipo H3** (ver figura 16).

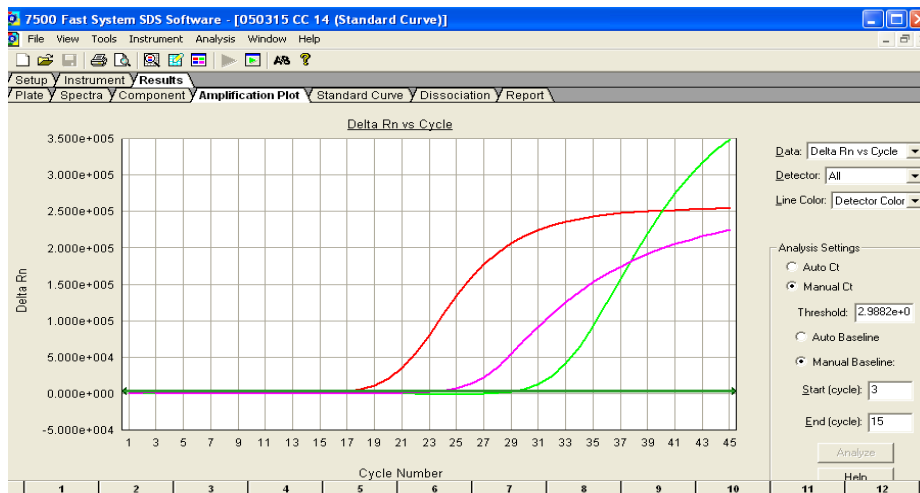


Figura 16.- Muestra positiva a Influenza tipo A H3 Estacional.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

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 17). En plataforma única de influenza se reporta como NEGATIVO.

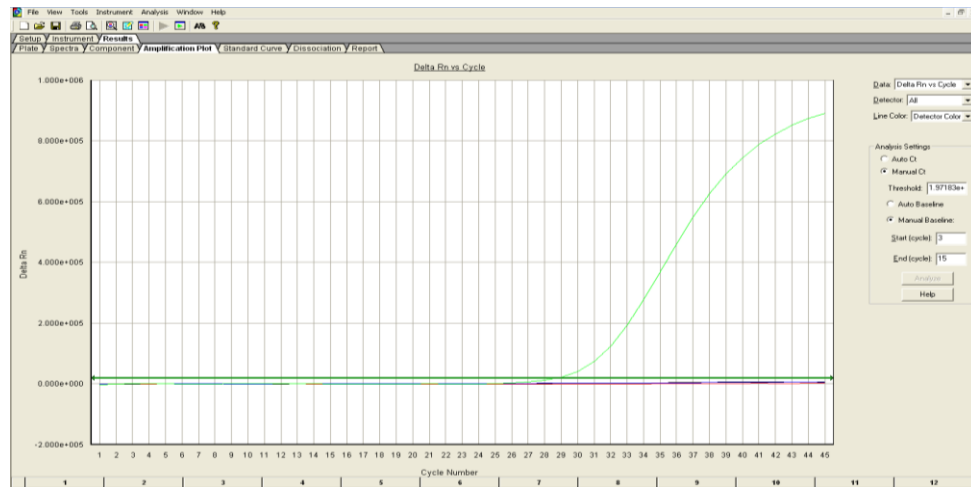


Figura 17.- Muestra con resultado **NEGATIVO**.

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 las figuras 18 y 19.

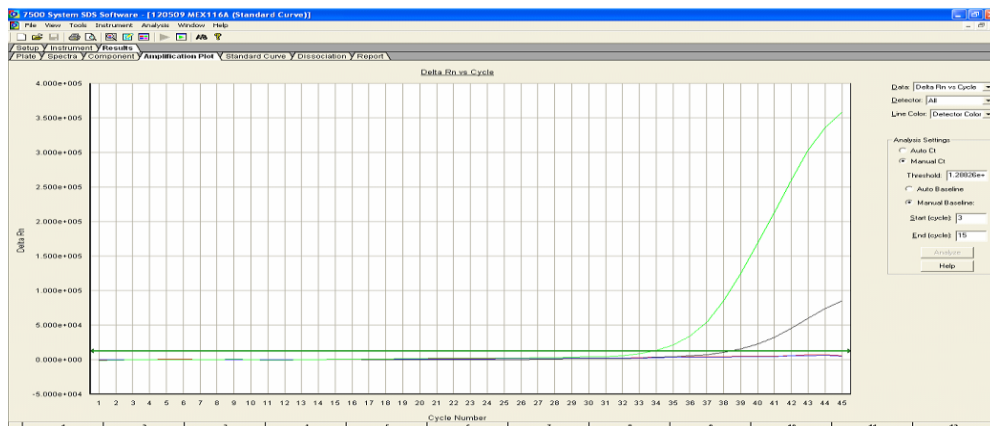


Figura 18.- Muestra con resultado de influenza dudoso.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

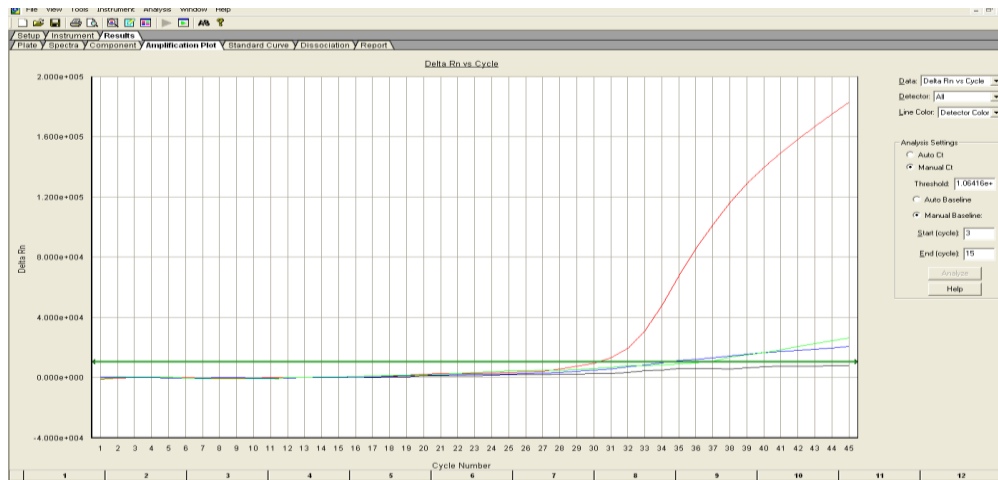


Figura 19.- Muestra con resultado de influenza A dudoso.

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

Muestra No Adecuada. En este caso, no se observa ninguna curva de amplificación, como se muestra en la figura 20. Reportándose el resultado como NA (No Adecuada). En plataforma única de influenza se reporta como NO ADECUADO.

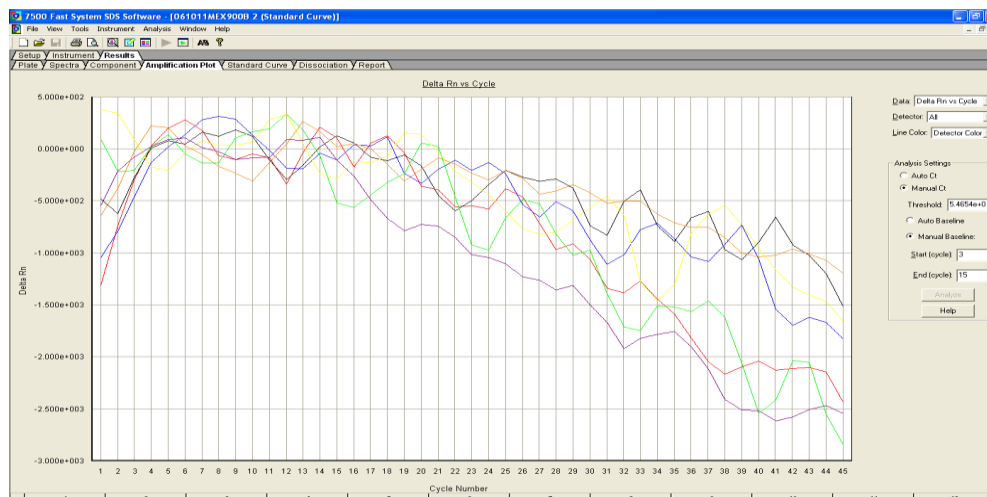


Figura 20.- Muestra que no amplificó, es decir muestra con resultado NA.

B. Diagnóstico de influenza mediante qRT-PCR (tiempo real)

Los resultados se reportarán en la plataforma SISVER en un tiempo estándar de 72 horas.