



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud  
Dirección General de Epidemiología

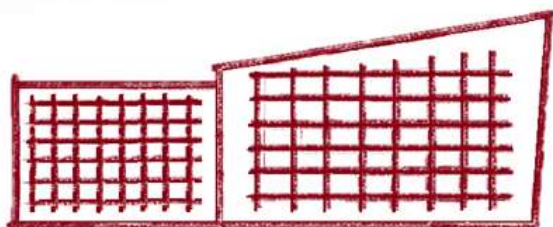
# Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Influenza y otros virus respiratorios



Siendo Referencia Nacional en Salud Pública

**INDRE**

**InDRE**



Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos  
"Dr. Manuel Martínez Báez"

# LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos  
“Dr. Manuel Martínez Báez”

2017

PRIMERA EDICIÓN. 2017

## INFLUENZA-INDRE

ESTE DOCUMENTO FUE AVALADO POR LOS REPRESENTANTES DE LAS INSTITUCIONES QUE CONFORMAN EL GRUPO TÉCNICO INTERINSTITUCIONAL DEL COMITÉ NACIONAL PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (CONAVE).

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE: "INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ". LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS, INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2017"

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

ISBN: EN PROCESO

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"  
FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, D.T. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480,  
CIUDAD DE MÉXICO

LA EDICIÓN ESTUVO A CARGO DE: DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑÓNEZ

EL DISEÑO ESTUVO A CARGO DE: DR. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA

IMPRESO EN MÉXICO. PRINTED IN MEXICO

PARA DUDAS SOBRE EL CONTENIDO DE ESTE LINEAMIENTO PONERSE EN CONTACTO CON LA COORDINACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE INFLUENZA A TRAVÉS DEL CORREO: [gisela.barrera@salud.gob.mx](mailto:gisela.barrera@salud.gob.mx) y [juan.roman@salud.gob.mx](mailto:juan.roman@salud.gob.mx) CON EL ASUNTO: REVISIÓN DE LINEAMIENTOS

## SECRETARÍA DE SALUD

### **Dr. Jorge Alcocer Varela**

SECRETARIO DE SALUD

### **Dra. Asa Cristina Laurell**

SUBSECRETARIA DE INTEGRACIÓN Y DESARROLLO DEL SECTOR SALUD

### **Dr. Hugo López-Gatell Ramírez**

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

### **Dr. José Luis Alomía Zegarra**

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS  
"DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"  
INDRE

**Biól. Irma López Martínez**

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

**Mtra. Lucía Hernández Rivas**

DIRECTORA DE SERVICIOS Y APOYO TÉCNICO

**Lic. Adriana Castro Cabrera**

SUBDIRECTORA DE OPERACIÓN

**Biól. Norma Angélica Montes Colima**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

**Mtra. Dalia Viviana Vallejo Jauffred**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS

**Mtra. Judith Estévez Ramírez**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

**Mtro. Hiram Olivera Díaz**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES EMERGENTES Y URGENCIAS

**Dra. Clara Gorodezky Lauferman**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

**Mtra. Mónica Salas García**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

**Dra. Gabriela Meneses Ruiz**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

## GRUPO DE TRABAJO

**BIÓL. IRMA LÓPEZ MARTÍNEZ**

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

**M. EN C. GISELA BARRERA BADILLO**

COORDINADORA DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA INFLUENZA

JEFA DEL LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

**DR. JOSÉ ERNESTO RAMÍREZ GONZÁLEZ**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS

### INTEGRANTES DEL LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

BIOL. ADRIANA RUIZ LÓPEZ, QFB. JORGE RAFAEL FLORIANI VERDUGO, QBP. TATIANA ERNESTINA NÚÑEZ GARCÍA, QFB. DAYANIRA SARITH ARELLANO SUAREZ, QFB. MARÍA NATIVIDAD CRUZ ORTIZ, M EN C. NERVAÍN BENJAMÍN CONTRERAS GONZÁLEZ, QBP. MIGUEL ÁNGEL FIERRO VALDEZ, TL. ELBIA RODRÍGUEZ GARCÍA, TL. GLORIA BARRADAS HERRERA, AUX. LAB. VIANEY ARÉVALO NARVÁEZ, AUX. LAB. PATRICIA ELIZABETH GÓMORA ROSALES, BIOL MIGUEL ÁNGEL ROSALES CRESPO



# CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	10
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	10
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Influenza	11
3. MARCO LEGAL	13
4. DEFINICIONES OPERATIVAS	15
5. OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
6. RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA INFLUENZA	17
Organización de la Red Nacional de Laboratorio de Salud Pública para la Vigilancia de la Influenza	19
7. FUNCIONES DE LOS LABORATORIOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA INFLUENZA	20
Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública	20
8. TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRAS	23
Tipos de muestras	24
Procedimientos para toma de muestras clínicas	24
Exudado faríngeo	25
Exudado nasofaríngeo	26
Criterios de aceptación y rechazo	27
9. ALGORITMO DIAGNÓSTICO	29
10. CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO	33
11. PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO	37
12. CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LA INFLUENZA	39
13. BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE	40
14. BIBLIOGRAFÍA	41
15. ANEXOS	42
Anexo I. Bioseguridad en el laboratorio de virus respiratorios	42



Anexo II. Técnicas diagnósticas	43
Anexo III: Preparación de reactivos	146
Anexo IV: Formato de envío de muestras positivas y aislamientos al InDRE (referencia)	148
Anexo V: Formato de envío de muestras negativas al InDRE (control de calidad)	150
Anexo VI: Informe semanal. Muestras recibidas para diagnóstico de influenza (USMI)	151
Anexo VII: Captura de resultados en la Plataforma SISVEFLU	153
Anexo VIII: Imágenes de Portada	¡Error! Marcador no definido.
Anexo IX: Reconocimiento del InDRE Centro Nacional de Influenza	158

# INTRODUCCIÓN

La influenza es una infección respiratoria aguda que afecta el tracto respiratorio superior y/o inferior y se acompaña de signos y síntomas sistémicos como fiebre, tos, cefalea, mialgias, artralgias y postración entre otros más.

La influenza se transmite desde individuos infectados a través de gotas en aerosol procedentes de saliva, secreción nasal y bronquial, que son emitidas con la tos, los estornudos o sólo al hablar. También es transmisible por las superficies u objetos contaminados con el virus (fómite).

Esta enfermedad alcanza sus picos de mayor prevalencia durante el invierno, y debido a que el hemisferio norte y el hemisferio sur atraviesan esta estación en diferentes momentos existen dos temporadas de influenza cada año: de octubre a abril en el hemisferio norte y de mayo a septiembre en el hemisferio sur. En el caso de México, la temporada de mayor circulación de influenza inicia en la Semana Epidemiológica (SE) 40 y termina en la SE 20 del siguiente año.

Este es el motivo por el que la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto con los Centros Nacionales de Influenza (CNI), hace recomendaciones para dos formulaciones vacunales cada año: una para cada hemisferio.

Además del clima y la humedad, el estilo de vida de las poblaciones y otros factores están asociados a la aparición de la influenza. Los virus de influenza se dividen en tres tipos llamados A, B y C. Los tipos de influenza A y B son los responsables de las epidemias de enfermedad respiratoria que se producen casi todos los inviernos y que con frecuencia están asociados con un aumento en los índices de hospitalización y de muertes.

Los esfuerzos para controlar el impacto de la influenza se centran en los tipos A y B. Desde el punto de vista de la Salud Pública, el de mayor importancia es el virus de influenza tipo A, que tiene la capacidad de infectar a humanos y algunas especies de animales tales como aves silvestres, aves de corral, cerdos, caballos, tigres, entre otros. El virus de tipo B tiene una tasa de mutación de 2 a 3 veces más baja que el tipo A, por lo que es genéticamente menos diverso. Sin embargo, presenta el suficiente grado de mutación como para impedir la inmunidad completa y definitiva. Está reducida tasa de cambios antigénicos, en combinación con su limitado rango de huéspedes posibles determina la inexistencia de pandemias por este virus.

La OMS ha establecido una red global para la vigilancia de influenza, cuya meta primaria es detectar e identificar nuevas variantes con potencial pandémico emergidas en corto o largo tiempo. El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) “Dr. Manuel Martínez Báez” forma parte de esta red y es reconocido a través del Laboratorio de Virus Respiratorios como CNI.

El Laboratorio de Virus Respiratorios como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) es el órgano rector de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Influenza (RNLSP-Flu) y tiene la obligación de realizar la caracterización de las muestras tomadas a casos ambulatorios y hospitalizados a través de la vigilancia centinela descrita en el Manual de Vigilancia Epidemiológica de la Influenza, estas son enviadas a los laboratorios de la RNLSP-Flu para su diagnóstico mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa en Tiempo Real (qRT-PCR).

Los resultados son notificados al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SiNaVE) por medio del Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de la Influenza (SISVEFLU). Finalmente las muestras que cumplen con las características descritas en este documento son enviadas por la RNLSP-Flu al LNR para caracterizar mediante aislamiento y secuenciación, dando prioridad a las muestras de pacientes inmunocomprometidos, hospitalizados y defunciones; así como de muestras de influenza A no subtipificadas con carga viral alta.

Aunque la detección de variantes antigénicas mayores constituye el máximo objetivo de la vigilancia virológica, no hay que descartar ni minimizar las variaciones antigénicas menores que se producen en cada epidemia anual y que constituyen los cambios en la composición de las vacunas. El LNR notifica semanalmente los resultados de la vigilancia al Sistema de Vigilancia Mundial de influenza (FluNet) de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

## ANTECEDENTES

### Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) es el conjunto de laboratorios con objetivos específicos que permiten unificar métodos de diagnóstico, criterios de interpretación de resultados, transferencia tecnológica, generación de conocimiento y formación de recursos humanos

que garanticen procedimientos técnico-administrativos que produzcan información de laboratorio útil para la vigilancia epidemiológica y la operación de los programas preventivos.

Es el soporte técnico-científico útil para la vigilancia epidemiológica, genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas.

La RNLSP está integrada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) como órgano rector de la red, los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE). Se encuentra estructurada en tres niveles: nacional, estatal y local o sus equivalentes para otras instituciones. El nivel nacional está representado por el InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).

Tiene fundamento legal en el reglamento Interior de la Secretaría de Salud y la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica y se encuentra definida en los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica.

En la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública se cuenta con el diagnóstico de Influenza y otros virus respiratorios.

### **Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Influenza**

La Secretaría de Salubridad y Asistencia (actualmente Secretaría de Salud) se interesó en el estudio de los virus respiratorios a partir de la pandemia de influenza asiática de 1957. En ese mismo año se logró el aislamiento e identificación del virus de la Influenza a partir de muestras clínicas provenientes de pacientes del Distrito Federal y Baja California, confirmándose la presencia del nuevo subtipo de virus de Influenza A/Asian/57 (H2N2).

El laboratorio de virus respiratorios se trasladó a diferentes sedes, durante este tiempo logró además identificar, por medio de estudios serológicos al adenovirus tipo 2. En 1974, el laboratorio de virus respiratorios se instaló finalmente en el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET), sus funciones consistían en realizar el diagnóstico de influenza por inmunofluorescencia indirecta y el aislamiento viral, sin embargo no se contaba con una red de diagnóstico como tal.

Hasta 1997 dio inicio un proyecto piloto de búsqueda intencionada de casos en 23 unidades centinelas (Centros de Salud) en el Distrito Federal, estos resultados demostraron la circulación del virus de influenza en México en 10 aislamientos. Esto dio lugar a que en 1998 se incorporaran 170 unidades centinelas en el Distrito Federal y cinco Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) para dar inicio a la Red Nacional de Laboratorios para el Diagnóstico de Influenza. Las unidades centinelas del Distrito Federal enviaban las muestras al InDRE y el diagnóstico en los LESP se realizaba por inmunofluorescencia indirecta.

Para el año 2004 la Red ya contaba con 13 LESP. En 2008, las unidades centinelas cambiaron su nombre por el de unidades de salud monitoras de influenza (USMI). Los LESP que realizaban el diagnóstico por inmunofluorescencia indirecta ya eran 24 y 16 de ellas notificaban directamente sus resultados de diagnóstico a las áreas de vigilancia epidemiológica estatal. Ese mismo año se inició el control de calidad en el LNR para los LESP que realizaban el diagnóstico con inmunofluorescencia indirecta.

En 2009 se inició en la RNLSP-Flu la implementación de RT-PCR en tiempo real como técnica de diagnóstico para influenza en lugar de la inmunofluorescencia indirecta. Durante ese año la RNLSP-Flu se amplió a 37 laboratorios, 33 de los cuales efectuaban el diagnóstico por RT-PCR en tiempo real, además de cuatro LESP que realizaban el diagnóstico por RT-PCR convencional. En el LNR se implementó la vigilancia de otros virus respiratorios mediante RT-PCR multiplex, en la RNLSP-Flu esta vigilancia se lleva a cabo por medio de inmunofluorescencia indirecta.

En 2011, se transfiere a los Laboratorios miembros de la RNLSP-Flu el RT-PCR en tiempo real para la identificación de linajes de influenza B. Durante 2013, se realizó la transferencia de la técnica RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza a la RNLSP-Flu. Para 2014 el Hospital General de México se integra como miembro de la Red. En 2015 el LESP de San Luis Potosí es el primer laboratorio en implementar el diagnóstico de otros virus respiratorios por RT-PC en tiempo real.

Actualmente el LNR brinda a toda la RNLSP-Flu los servicios de *Referencia y Control de calidad* a los laboratorios y esporádicamente realiza *Diagnóstico* como apoyo a los laboratorios de la RNLSP-Flu que en algún momento no

cuentan con reactivos, infraestructura o no aprueban el Panel de Evaluación Externa del Desempeño enviado semestralmente.

## MARCO LEGAL

### Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. Diario Oficial de la Federación 05/11/1917, Última Reforma D.O.F. 15/11/2012.

### Leyes

- Ley Federal de Responsabilidades Administrativas de los Servidores Públicos. D.O.F. 13/033/2012. Última reforma en D.O.F. 28/05/2009
- Ley General de Salud, México. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Última reforma publicada DOF 07/06/2012.
- DECRETO por el que se expide la Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción; la Ley General de Responsabilidades Administrativas, y la Ley Orgánica del Tribunal Federal de Justicia Administrativa. D.O.F. 18/07/2016.
- DECRETO por el que se expide la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados. D.O.F. 13/12/2016.

### Reglamentos

- Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. México. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 19 de enero de 2004. Última reforma publicada en el DOF del 10 de enero de 2011. Reforma aplicable: Decreto que reforma, adiciona y deroga diversas disposiciones del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. DOF 2 de febrero de 2010.

- Reglamento Sanitario Internacional (2005) 2da edición. Ginebra Suiza 2008. Organización Mundial de la Salud.

### Normas Oficiales Mexicanas

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de febrero de 2013.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. D.O.F. 27/03/2012
- Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA3-2012. En materia de información en salud
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. D.O.F. 22/10/1993; Modificación D.O.F. 23/06/2006.
- Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo. D.O.F. 09/10/2015.
- Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999 para la atención a la salud del niño.
- Norma Oficial Mexicana NOM-167-SSA1-1997 para la atención a menores y adultos mayores.

### Planes y Programas

- Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018. D.O.F. 20/05/2013.
- Secretaría de Salud. Programa Sectorial de Salud 2013-2018. D.O.F. 12/12/2013.
- Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico 2013-2018. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, primera edición 2014.
- Centro Nacional para la Prevención y Control de Enfermedades. Programa de Acción Específico: Prevención y Control de las Enfermedades Respiratorias e Influenza 2013-2018. México: Secretaría de Salud; 2013.

## Lineamientos y Manuales

- Manual de Vigilancia Epidemiológica de la Influenza; Dirección General de Epidemiología. México: Secretaría de Salud; 2012.
- Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para programas de evaluación externa del desempeño de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para la Gestión del Riesgo Biológico; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para el reconocimiento a la competencia técnica de los laboratorios que apoyan a la vigilancia epidemiológica; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez. México: Secretaría de Salud; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015

## DEFINICIONES OPERATIVAS

El manejo de definiciones operacionales dentro de un sistema de vigilancia epidemiológica, coadyuva a realizar una medición estandarizada de las características que deben cumplir los pacientes ingresados a dicho sistema. Estas se encuentran descritas en el Manual de Vigilancia Epidemiológica de la Influenza:

- **Caso sospechoso de influenza:** se considera caso sospechoso de influenza a todo caso o defunción que cumpla con los criterios de Enfermedad Tipo Influenza (ETI) o Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG).
- **Enfermedad Tipo Influenza (ETI):** persona de cualquier edad que presente o refiera haber tenido fiebre mayor o igual a 38°C, tos y cefalea; acompañadas de uno o más de los siguientes signos o síntomas: rinorrea,



coriza, artralgias, mialgias, postración, odinofagia, dolor torácico, dolor abdominal, congestión nasal o diarrea.

**Importante:**

- En menores de cinco años de edad, se considera como un signo cardinal la irritabilidad, en sustitución de la cefalea.
  - En mayores de 65 años o en pacientes inmunocomprometidos, no se requerirá la fiebre como síntoma cardinal
- 
- **Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG):** persona de cualquier edad que presente dificultad al respirar, con antecedente de fiebre mayor o igual a 38°C y tos, con uno o más de los siguientes síntomas: ataque al estado general, dolor torácico o polipnea.
    - Tiene como objetivo incluir las neumonías relacionadas a infección por influenza y las influencias exacerbadas por enfermedades crónicas.
    - En paciente inmunocomprometidos o con manejo terapéutico con antipiréticos no se presentará el pico febril descrito en la definición operacional.
    - Así mismo en pacientes con apoyo respiratorio automatizado no se requerirá la tos como signo indispensable para su ingreso como sospechoso a influenza.
  - **Caso confirmado de influenza:** cualquier individuo que cumpla con el criterio de caso sospechoso de influenza y que se tenga una muestra con resultado positivo a cualquier virus de influenza. El resultado debe ser otorgado por un laboratorio certificado por la RNLSP.
  - **Caso de influenza confirmado por asociación epidemiológica:** aquel paciente sintomático que cumpla con la definición operacional de caso sospechoso de influenza (ETI o IRAG) y que haya estado en contacto con un caso confirmado en un periodo de hasta por 7 días, posterior al inicio de los síntomas del caso confirmado a influenza.
  - **Caso descartado de influenza:** se considera caso descartado de influenza, al que tenga muestra con resultado negativo a ese virus otorgado por un laboratorio certificado por la RNLSP. Defunción por neumonía grave con sospecha de influenza: Toda defunción que cumpla con los criterios de IRAG según se define en el párrafo anterior y que no se tenga resultado confirmatorio de influenza.
  - **Defunción por influenza:** en virtud a la dificultad para determinar si un caso con resultado positivo a influenza falleció como consecuencia a la infección o por

alguna otra enfermedad preexistente, se hace necesario establecer un criterio metodológico para determinar el origen de la causa de ésta, con el fin de contabilizar únicamente las muertes causadas por la infección de influenza.

Por lo anterior se definirá como defunción POR influenza a:

- Todo paciente fallecido que haya cumplido con la definición operacional de ETI/IRAG y que cuente con resultado positivo a influenza por laboratorio avalado por la RNLSP y que en su certificado de defunción contenga como causa básica el diagnóstico de Influenza o neumonía.
- **Defunción CON influenza:** Todo paciente fallecido que haya cumplido con la definición operacional de ETI/IRAG y que cuente con resultado positivo emitido por uno de los laboratorios avalado por la RNLSP; y que en su certificado de defunción contenga como causa básica un diagnóstico diferente a influenza o neumonía

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Establecer y dar a conocer a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Influenza (RNLSP-Flu) los procesos estandarizados de diagnóstico, control de calidad y referencia de las muestras, para un diagnóstico oportuno y de calidad, que garantice la confiabilidad diagnóstica

### Objetivos específicos

- Garantizar la calidad del diagnóstico influenza y otros virus respiratorios.
- Ser el documento guía para el soporte técnico-científico de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Influenza.

## RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA INFLUENZA

La RNLSP-Flu está constituida por el LNR como órgano rector, 31 LESP (Figura 1) y 5 Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE) de diferentes instituciones del Sistema Nacional de Salud (Figura 2) distribuidos de la siguiente manera:

- 2 Institutos Nacionales de Salud:
  - Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria (INER)
  - Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ)
- Un Hospital Federal de Referencia: Hospital General de México (HGM)
- El Laboratorio Central de Epidemiología del IMSS y
- Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE

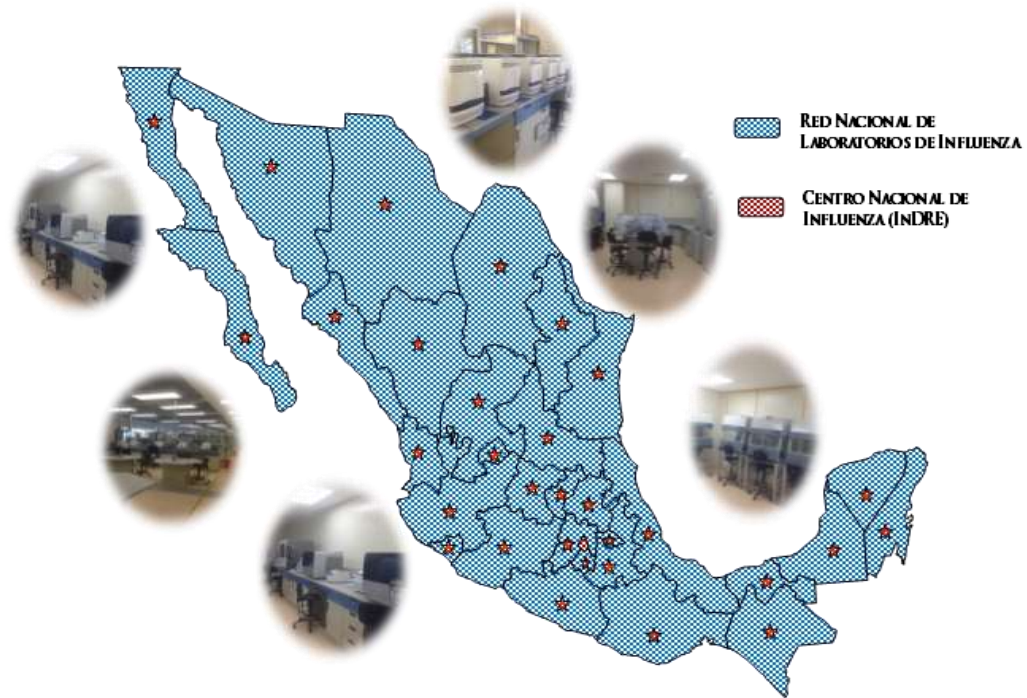


Figura. 1. Distribución de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia de la Influenza (RNLSP-Flu)

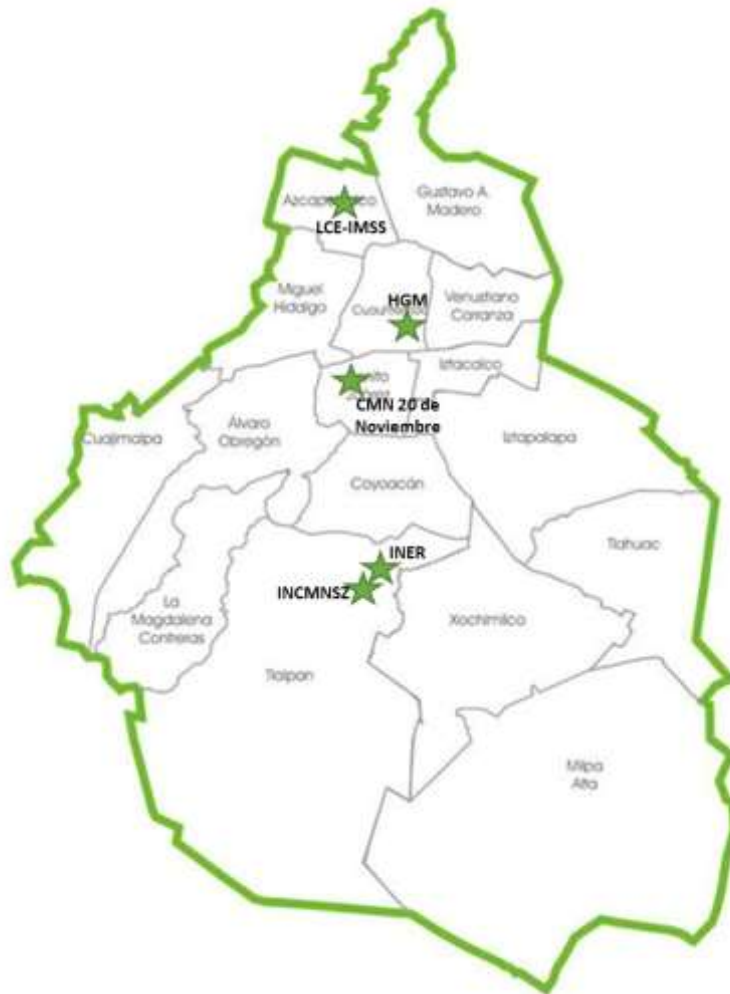


Figura. 2. Distribución de los LAVE en la Ciudad de México

### Organización de la Red Nacional de Laboratorio de Salud Pública para la Vigilancia de la Influenza

La RNLSP-Flu está basada en los siguientes niveles de organización, en donde se llevan a cabo determinadas pruebas diagnósticas que se describen de acuerdo a la función:

- LNR representado por el Laboratorio de Virus Respiratorios del InDRE
- LESP: 31 entidades federativas
- LAVE: Institutos Nacionales de Salud, Hospitales Federales de Referencia, IMSS e ISSSTE

# FUNCIONES DE LOS LABORATORIOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA INFLUENZA

## Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública

- Realizar el diagnóstico de influenza A (H1N1)pdm09, AH3 estacional e influenza B por RT-PCR en tiempo real de acuerdo con la plataforma estandarizada (Protocolo del CDC, Atlanta, GA). Estándar del servicio, 72 horas (3 días hábiles).
- Realizar la identificación de linajes de influenza B (Victoria y Yamagata) por RT-PCR en tiempo real. (Realizar captura en la plataforma después de la identificación de linajes).
- Realizar la vigilancia de otros virus respiratorios no influenza por RT-PCR en tiempo real (técnica del CDC, Atlanta, GA) a los casos negativos a influenza de casos graves, inmunocomprometidos y defunciones.
- Realizar el diagnóstico diferencial para otros virus respiratorios mediante inmunofluorescencia indirecta a los casos negativos a influenza de casos graves, inmunocomprometidos y defunciones (*Light Diagnostic (Viral Screen* catalogo No. 5007, Adenovirus catalogo No. 5000, Parainfluenza 1 catalogo No. 5003, Parainfluenza 2 catalogo No. 5004, Parainfluenza 3 catalogo No. 5005, VSR catalogo No. 5006) Chemicon). **Nota:** es obligatorio mientras tanto no se implemente el RT-PCR en tiempo real.
- Realizar la captura de resultados de las muestras para diagnóstico en la plataforma del SISVEFLU con un estándar de servicio 72 horas en días hábiles. En caso de procesar muestras que no estén registradas en plataforma, notificarlas al InDRE semanalmente (Anexo VII).
- Capacitar al personal de las USMI que llevará a cabo la toma, envío y manejo de la muestra anualmente o cada que se incremente el índice de rechazo en una USMI.
- Enviar **semanalmente** al InDRE el **100% de las muestras positivas a influenza A no subtipificables** sin importar el valor de Cq; así como de las muestras positivas a influenza A (H1N1)pdm09, influenza A estacional subtipo H3 e influenza B que tengan valor de Cq menor o igual a 32 para aislamiento viral. Las muestras positivas que se envían para referencia (**EN EL OFICIO DE ENVÍO DEBE DECIR "REFERENCIA DE INFLUENZA"**) deben mantenerse en congelación desde que se reciben en el laboratorio y hacer el envío lo más pronto posible (**no más de una semana**) en hielo seco si los laboratorios tienen la posibilidad de hacerlo, si no es posible, realizar el envío con suficientes refrigerantes para evitar ciclos de congelación y descongelación. Dichas muestras (**1.5-2.0 ml**) deberán ser enviadas al InDRE junto con el formato de envío (Anexo IV) en el cual se incluirán los valores de Cq de cada uno de los marcadores. En caso de que los laboratorios de la red no puedan

realizar el llenado del formato de envío (Anexo IV), imprimir la cintilla de la plataforma de influenza que arroja al momento de reportar el resultado, debido a que esta cintilla incluye el nombre del paciente, edad, estatus, técnica utilizada, resultado y Cq. Colocar observaciones, si las hay.

- Enviar **semanalmente** al InDRE el 10% de muestras negativas de casos graves, inmunocomprometidos y defunciones para control de calidad (**EN EL OFICIO DE ENVÍO DEBE DECIR “CONTROL DE CALIDAD” y únicamente será para aquellos laboratorios que NO aprueben el Panel Externo de Evaluación de Desempeño semestral, los laboratorio que aprueben el panel NO deben enviar muestras de control de Calidad**). Dichas muestras (1.5-2.0 ml) deberán mantenerse en congelación desde que se reciben en el laboratorio y hacer el envío lo más pronto posible (**no más de una semana**) en hielo seco si los laboratorios tienen la posibilidad de hacerlo, si no es posible, realizar el envío con suficientes refrigerantes para evitar ciclos de congelación y descongelación. Las muestras deben ser enviadas al InDRE junto con el formato de envío (Anexo V) en el cual se incluirán los valores de Cq de RP. En caso de que los laboratorios de la red no puedan realizar el llenado del formato de envío (Anexo V), imprimir la cintilla de la plataforma de influenza que arroja al momento de reportar el resultado, debido a que esta cintilla incluye el nombre del paciente, edad, estatus, técnica utilizada, resultado y Cq. Colocar observaciones, si las hay.
- Enviar **semanalmente** al InDRE las muestras positivas a otros virus respiratorios no influenza que tengan valor de Cq menor o igual a 32 para aislamiento viral. Las muestras positivas que se envían para referencia (**EN EL OFICIO DE ENVÍO DEBE DECIR “REFERENCIA DE OTROS VIRUS RESPIRATORIOS”**) deben mantenerse en congelación después de que han sido procesadas en el laboratorio y hacer el envío lo más pronto posible (**no más de una semana**) en hielo seco si los laboratorios tienen la posibilidad de hacerlo, si no es posible, realizar el envío con suficientes refrigerantes para evitar ciclos de congelación y descongelación. Dichas muestras (**1.5-2.0 ml**) deberán ser enviadas al InDRE junto con el formato de envío (Anexo IV) en el cual se incluirán los valores de Cq de cada uno de los marcadores. En caso de que los laboratorios de la red no puedan realizar el llenado del formato de envío (Anexo IV), imprimir la cintilla de la plataforma de influenza que arroja al momento de reportar el resultado, debido a que esta cintilla incluye el nombre del paciente, edad, estatus, técnica utilizada, resultado y Cq. Colocar observaciones, si las hay. Enviar semanalmente al correo [laboratoriovirusrespiratorios@yahoo.com.mx](mailto:laboratoriovirusrespiratorios@yahoo.com.mx) el informe semanal. Muestras recibidas para diagnóstico de influenza (USMI y NO USMI) (Anexo VI y VII).
- Enviar **semanalmente** al correo [laboratoriovirusrespiratorios@yahoo.com.mx](mailto:laboratoriovirusrespiratorios@yahoo.com.mx) el informe de los indicadores de servicio.

- Realizar el diagnóstico diferencial para otros virus respiratorios mediante inmunofluorescencia indirecta y reportar los resultados en la plataforma SINAVE hasta la implementación de la técnica de RT-PCR en tiempo real para los virus respiratorios no influenza (Protocolo del CDC, Atlanta, GA). En el caso de los laboratorios que ya implementaron el RT-PCR en tiempo real para otros virus respiratorios deberán enviar las muestras positivas para corroborar el resultado y estar en posibilidad de la liberación del diagnóstico.

Enviar muestras para diagnóstico al InDRE cuando el LESP haya suspendido su proceso analítico por no aprobación del panel de eficiencia u otro evento previamente notificado y aprobado. El LESP deberá enviar la muestra sin ser procesada y transferirla al InDRE en la plataforma SINAVE cumpliendo las condiciones establecidas para muestras de diagnóstico (cumplimiento de definición operacional, días de evolución, días de tránsito y criterios de aceptación).

### Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia (InDRE)

- Coordinar la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la influenza.
- Realizar el diagnóstico de influenza por RT-PCR en tiempo real para los laboratorios que no cuenten con infraestructura, reactivos y/o insumos o no hayan aprobado el PEED.
- Realizar la captura de resultados de las muestras para diagnóstico en la plataforma del SISVEFLU.
- Realizar la inoculación *in vitro* (cultivo celular) o *in vivo* (huevos embrionados) del 100% de las muestras positivas a influenza A no subtipificables (sin importar el valor de Cq) así como de las muestras positivas de influenza A (H1N1)pdm09, influenza A estacional subtipo H3, e influenza B (Linajes Victoria y Yamagata) con valores de Cq (*Cycle threshold*) menores o iguales a 32 en los marcadores de influenza A, pdm Inf A, pdm H1, H3, influenza B, Linaje Victoria y Linaje Yamagata, provenientes de los laboratorios de la RNLSP-Flu.
- Caracterización de aislamientos virales por RT-PCR en tiempo real y/o inhibición de la hemaglutinación (estuche enviado por los Centros colaboradores de la OMS a los Centros Nacionales de Influenza).

- Caracterización de muestras positivas a influenza A que no pudieron ser subtipificadas aun cuando se procesaron con todos los marcadores por RT-PCR en tiempo real.
- Genotipificación (secuenciación de los genes M, HA y NA) de las muestras positivas con resultado de influenza A no subtipificable de hospitalizaciones, pacientes graves, inmunocomprometidos, defunciones y brotes.
- Llevar a cabo ensayos de resistencia antiviral (genotípica) en las muestras positivas a influenza A (H1N1)pdm09, influenza A H3N2 estacional, e influenza B que presenten Cq entre 15 y 25; así como en los aislamientos de influenza de pacientes hospitalizados, inmunocomprometidos, defunciones y brotes.
- Efectuar ensayos de resistencia antiviral (fenotípica) a los aislamientos de influenza A (H1N1)pdm09, influenza A H3N2 estacional, e influenza B que presenten títulos de hemaglutinación mayor o igual a 1:16.
- Enviar aislamientos caracterizados al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) para su análisis final y consideración en la composición de la vacuna anual del hemisferio norte.
- Realizar el aislamiento de las muestras positivas a otros virus respiratorios no influenza.
- Realizar el diagnóstico de otros virus respiratorios no influenza de las muestras negativas a influenza de pacientes hospitalizados, graves, inmunocomprometidos y defunciones por RT-PCR en tiempo real o plataforma Bio-Plex/Luminex para los laboratorios que no cuenten con infraestructura, reactivos y/o insumos.
- Capacitar a la RNLSP-Flu e instituciones del Sector Salud que lo soliciten, en las diferentes técnicas utilizadas para el diagnóstico de influenza de acuerdo con su nivel dentro de la Red.
- Elaborar y desarrollar programas de supervisión para los laboratorios que pertenecen a la Red y que realizan diagnóstico de influenza. En la supervisión se utiliza una cédula basada en la NMX-EC-15189-IMNC-2015 "*Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia*" e ISO9001:2012.
- Realizar evaluación del desempeño para RT-PCR en tiempo real a través del envío de paneles semestrales a los integrantes de la Red.

## TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRAS

El objetivo del diagnóstico en la vigilancia virológica es confirmar en una muestra representativa la circulación del agente causal, ya sean los tipos de virus de influenza u otros virus respiratorios, la posible aparición de un virus de



influenza desconocido u otro agente respiratorio como causa de brotes o enfermedades emergentes.

En el momento en el cual se presente una pandemia por virus de influenza no se requerirá la confirmación de cada caso sospechoso de influenza para definir tratamiento, implementar medidas de mitigación o evaluación de las mismas. Por lo anterior, los lineamientos de vigilancia epidemiológica establecerán el tipo de poblaciones y porcentaje de muestreo centinela de las USMI. El número de muestras mínimo y máximo será establecido de acuerdo con los lineamientos vigentes para la vigilancia epidemiológica.

Actualmente las USMI toman muestra de influenza al 10% de los pacientes ambulatorios, 100% de hospitalizados y 100% de las defunciones que cumplen con las definiciones operacionales de caso sospechoso de influenza, siempre y cuando se encuentren dentro del periodo adecuado para la toma de muestra; mientras que las no USMI tomarán solamente al 100% de las defunciones que cumplan con las definiciones operacionales y en caso de brotes en comunidades cerradas (escuelas, localidades aisladas, reclusorios, etc.) estas unidades tomarán muestra al 10% de los casos sospechosos.

### **Tipos de muestras**

- En los casos de ETI e IRAG se tomará muestra de exudado faríngeo, nasofaríngeo o lavado bronquioalveolar dentro de los primeros 5 días (De preferencia en las primeras 72 horas) de iniciados los síntomas en pacientes ambulatorios y hasta de 7 días para pacientes graves.
- Si el paciente está intubado, en los primeros 7 días después de iniciados los síntomas se tomará lavado bronquioalveolar, no menos de 2.0 ml (agregar 1ml de medio de transposte viral).
- En caso de defunción en la que se haya dictaminado como causa la neumonía aguda con sospecha de influenza: recuperar especímenes de pulmón, aproximadamente 2.0 cm<sup>3</sup> del parénquima pulmonar visiblemente afectado, aun después de 7 días de iniciados los síntomas. Estos especímenes pueden ser biopsia de tejido fresco, la cual se coloca en el medio de transporte viral.

### **Procedimientos para toma de muestras clínicas**

El éxito del diagnóstico virológico depende principalmente de la calidad de la muestra, así como de las condiciones de su transporte y almacenamiento antes de ser procesada en el laboratorio.

Antes de tomar la muestra es indispensable registrarla en la plataforma única de influenza.

Todas las muestras deben ser colocadas en tubos con medio de transporte viral (ver preparación en Anexo III) y conservarlo (desde su preparación) a temperatura de 2 a 8 °C, los tubos deben mantener un color rojo. Las muestras deberán estar etiquetadas con el número de folio que asigna la plataforma única e ir acompañadas del comprobante que esta proporciona en el momento de la captura. Enviar la muestra inmediatamente al laboratorio para su proceso y evitar mantenerla por más de 5 días en refrigeración.

### Exudado faríngeo

Se recomienda para niños y adultos, la forma adecuada para tomarlo y obtener una buena muestra para la detección de virus respiratorios es la siguiente:

1. La persona que realice la toma debe considerar que todas las muestras deben ser consideradas como altamente infecciosas por lo que tendrá que portar el equipo de protección personal (bata, guantes, googles y mascarilla). Sujetar la lengua del paciente con el abatelenguas y frotar con firmeza la pared posterior de la garganta (orofaringe) con el hisopo estéril con mango de plástico y punta de rayón o dacrón, al frotar se obtendrán células infectadas por el virus; tener cuidado de no tocar la úvula para no provocar el vómito en el paciente. (Figura 3)
2. Introducir el hisopo en el tubo de ensayo (que debe contener 2.5 ml de medio de transporte viral estéril), mantener la parte del hisopo que contiene la muestra dentro del tubo, cortar y desechar el resto. Cerrar el tubo perfectamente y mantenerlo de 2 a 8 °C hasta su recepción en el laboratorio.
3. Marcar cada uno de los tubos con una tela adhesiva (evitar papel engomado, *masking tape* o "*diurex*"), en la cual se escribe el número de folio que asigna la plataforma una vez registrada la muestra.
4. Si van a ser transportadas, mantener los tubos con las muestras en refrigeración o en la hielera con la bolsa refrigerante hasta su procesamiento en el laboratorio.

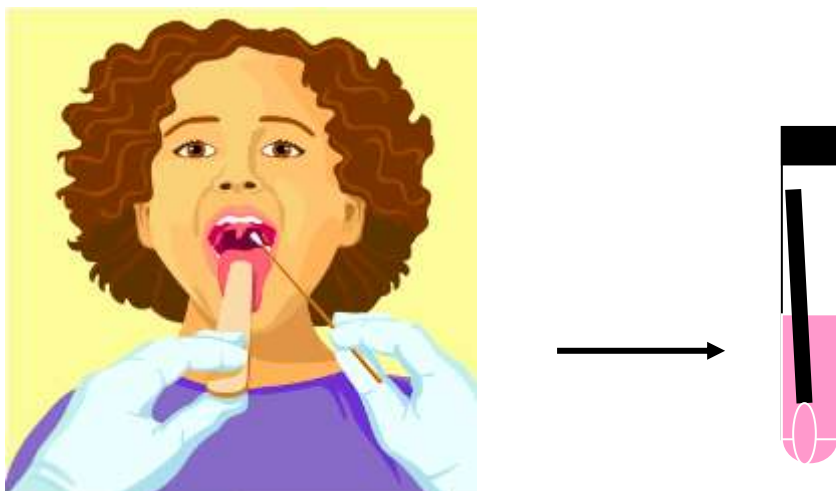
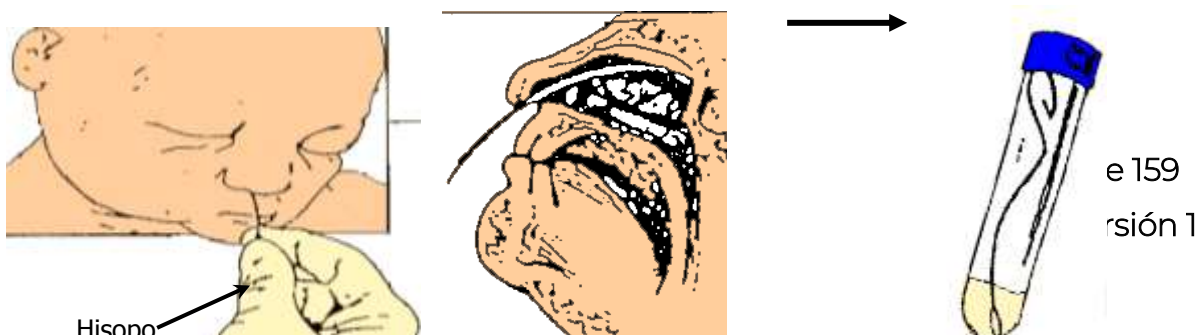


Figura. 3. Toma de muestra de exudado faríngeo

### Exudado nasofaríngeo

Se recomienda para lactantes y niños muy pequeños (preescolares), la forma adecuada para tomarlo y obtener una buena muestra para la detección de virus respiratorios es la siguiente:

1. Recostar al paciente y elevar un poco su cabeza, introducir suavemente el hisopo estéril con mango de alambre flexible (con punta de rayón o dacrón), paralelo al paladar, casi en su totalidad hasta llegar a la nasofaringe (aproximadamente 2.5 cm en adultos y un poco menos en niños); una vez ahí, rotarlo suavemente para frotar la pared de la nasofaringe (al frotar se obtienen células infectadas por el virus), retirarlo cuidadosamente sin dejar de rotar. Repetir el procedimiento en la otra narina con un hisopo nuevo. (Figura 4)
2. Introducir ambos hisopos en el tubo de ensayo (que debe contener 2.5 ml de medio de transporte viral estéril), mantener la parte del hisopo que contiene la muestra dentro del tubo, cortar y desechar el resto. Cerrar el tubo perfectamente y mantenerlo de 2 a 8 °C.
3. Marcar cada uno de los tubos con una tela adhesiva (evitar papel engomado, *masking tape* o "*diurex*"), en la cual se escribe el número de folio que asigna la plataforma una vez registrada la muestra.
4. Si van a ser transportadas, los tubos con las muestras deben mantenerse en refrigeración o en la hielera con la bolsa refrigerante hasta su procesamiento en el laboratorio.



#### Figura. 4. Toma de exudado nasofaríngeo en lactantes y preescolares

##### Criterios de aceptación y rechazo

##### Criterios de aceptación:

- Cuando cumplan con la definición operacional de ETI, IRAG o defunción por y con influenza.
- Que estén registradas en la plataforma única de influenza, en el caso de muestras con alto valor clínico y que no estén registradas en Plataforma se deberá notificar al Laboratorio de Virus Respiratorios vía telefónica que será enviada para su caracterización y no proceda el rechazo.
- Colocadas en medio de transporte viral (color rojo) con volumen de 2.5 ml y perfectamente etiquetadas.
- Tomadas con hisopo estéril con punta de rayón o dacrón y mango de plástico o alambre flexible, según sea el caso.
- En caso de defunción se aceptará biopsia de parénquima pulmonar (2.0 cm) aun después de 7 días de iniciados los síntomas.
- Enviadas a una temperatura de 2 a 8 °C o congeladas.

##### Criterios de rechazo:

- Cuando no cumplan con la definición operacional de ETI o IRAG.
- Sin registro en la plataforma SINAVE.
- Muestras de referencia y control de calidad que no tengan resultado en la plataforma de influenza o que no coincida con el reportado en la solicitud.
- Colocadas en medio de transporte viral con volumen insuficiente, es decir, menos de 2.0 ml.
- Colocadas en solución salina y que tengan más de 24 horas de tomada la muestra.
- Que excedan los días de evolución (5 días en pacientes ambulatorios, 7 días en pacientes graves).
- Que excedan los 5 días naturales de tránsito en áreas locales y 7 días naturales en áreas foráneas.

- Muestras en medio de transporte que presente color amarillo o rosa (medio virado)
- Muestras derramadas.
- Muestras no etiquetadas.
- Tomadas con hisopo de algodón y mango de madera o hisopos de alginato.
- Que no hayan sido enviadas a una temperatura de 2 a 8 °C.
- Muestras de diagnóstico, referencia o control de calidad que no cuenten con oficio de solicitud, formatos de envío (Anexos IV y V) o cintilla de la plataforma de influenza con el nombre del paciente, edad, estatus, técnica utilizada, resultado, Cq y observaciones, si las hay.

### **Material para toma de muestras clínicas**

- Tubos de ensayo de 13x100 mm de poliestireno o vidrio con tapa de rosca (estériles), con 2.5 ml de medio de transporte viral (color rojo).
- Gradilla (para exudados faríngeos y nasofaríngeos).
- Hisopos estériles con mango de plástico (con punta de rayón o dacrón) y abatelenguas, también estériles, para exudados faríngeos.
- Hisopos estériles con mango de alambre flexible (con punta de rayón o dacrón), para exudados nasofaríngeos.
- Hielera que contenga hielo o una bolsa refrigerante para mantener las muestras a temperatura de 2 a 8 °C.
- Guantes, cubrebocas o mascarilla, batas, tela adhesiva y bolígrafo.

### **Muestras de alto valor**

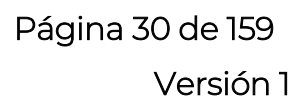
Es aquella que se recibe en el laboratorio y que no cumple con alguno de los criterios de aceptación pero que por las características de evolución del paciente se considera una muestra de alto valor epidemiológico.

Cuando el laboratorio opta por procesar la muestra de alto valor se debe asegurar que en el informe de resultados se indique la naturaleza del problema y se especifique que se requiere precaución cuando se interprete el resultado.

## ALGORITMO DIAGNÓSTICO

El algoritmo para el diagnóstico de influenza y otros virus respiratorios implementado en la RNLSP-Flu se describe a continuación en la figura 5, en la figura 6 el algoritmo propuesto para la secuenciación de los virus de influenza

InDRE  
Mayo 2017



**INTERPRETACION RT-PCR TIEMPO REAL:**

a)

Marcadores A , B y H3							Resultado
Inf A	pdmInfA	PdmH1	Inf B	H3	H1	RP human	
+	-	-	-	-	-	+	Inf luenza A
+	+	+	-	-	-	+	Influenza A(H1N1)pdm09
-	-	-	+	-	-	+	Inf luenza B
+	-	-	-	+	-	+	Influenza A H3
+	-	-	-	-	+	+	Influenza A H1
-	-	-	-	-	-	+	Negativo
+	+	-	-	+	-	+	H3N2v
+	+	-	-	-	+	+	H1N2v
-	-	-	-	-	-	-	NA

•Si existe duda en algún resultado se repite la prueba, un resultado similar en la repetición se reporta como NA (No Adecuada)

b)

Marcador B				Resultado
Inf B	B Victoria	B Yamagata	RP human	
+	-	-	+	Linaje no determinado
+	+	-	+	Linaje Victoria
+	-	+	+	Linaje Yamagata

Figura. 5. Algoritmo diagnóstico de RT-qPCR (RNLSP-Flu) 1A1500004. RT-PCR Tiempo real para muestras de influenza A y B, 1A1501002. Aislamiento a partir de muestras faríngeas (exudados, lavados), 1A2420001



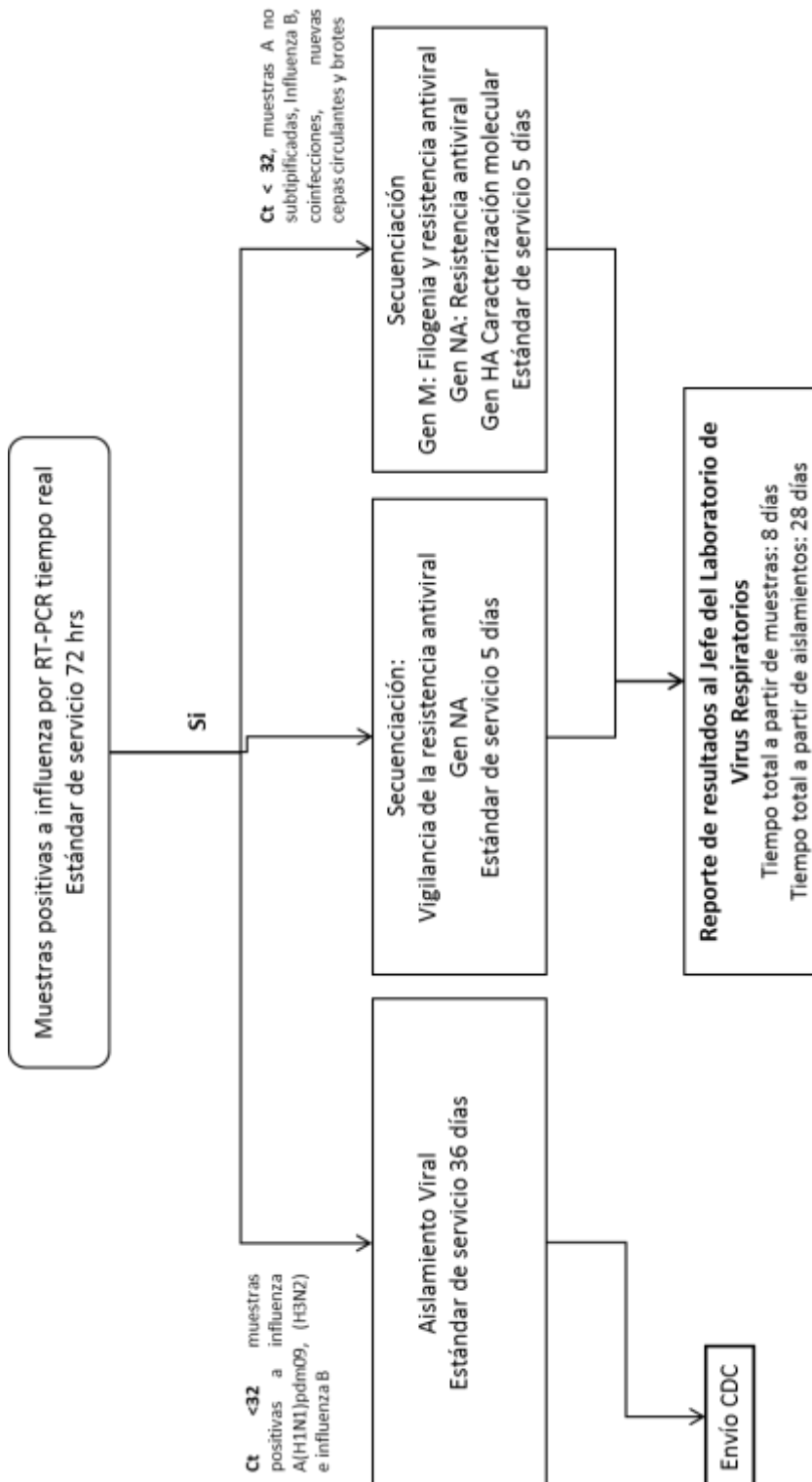


Figura.6 Algoritmo para realizar secuenciación de influenza. Clave de tabulador: IJ635123

A partir de la temporada 2016-2017 (semana epidemiológica 40 de 2016) ya no se reprocesaran las muestras de referencia por RT-PCR en tiempo real, es decir todas las muestras positivas enviadas por la RNLSP-Flu que cumplan con los criterios de aceptación se procesaran primeramente por aislamiento y únicamente las que muestren título viral por hemaglutinación se confirmarán por RT-PCR en tiempo real. Por lo tanto, los resultados de las muestras de referencia que se aislen incluirán el resultado de aislamiento, inhibición de la hemaglutinación (si el título de hemaglutinación es mayor o igual a 32) y el resultado de la confirmación de RT-PCR en tiempo real, mientras que los resultados de las muestras no aisladas solo reportaran el resultado de aislamiento y el resultado de RT-PCR en tiempo real del Laboratorio que lo proceso, debido a que en nuestro sistema (INFOLAB) se debe concluir como positivo a influenza.

## CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO

De acuerdo con la *NOM-035-SSA3-2012, En materia de información en salud*, el contar con información oportuna y de calidad permite coadyuvar a la planeación del Sistema Nacional de Salud para reforzar las acciones de atención a los problemas sanitarios y factores que condicionen y causen daño a la salud.

Para cumplir con los estándares de calidad en la RNLSP-Flu es indispensable apegarse a los *Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica*, implementar y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad en apego a los requisitos de las normas ISO (*International Organization for Standardization*) 9001:2015 *Sistemas de Gestión de la Calidad, Requisitos* e ISO 15189:2015 *Requisitos de la calidad y competencia*.

Además, alinearse a los requisitos establecidos en el *Manual Caminando a la Excelencia*, los criterios de liberación de pruebas diagnósticas y cumplir con los indicadores de calidad en el servicio diagnóstico establecidos para la RNLSP-Flu:

**Fase pre-analítica:** Estos indicadores (Oportunidad en la toma, el envío y porcentaje de rechazo) comprenden actividades propias del área de vigilancia epidemiológica que inciden en la calidad de la muestra.

- **Oportunidad en la Toma:** Días transcurridos entre la toma de la muestra y la fecha del inicio de los síntomas menor a 7 días naturales después de la fecha de inicio de síntomas.
- **Oportunidad en el envío:** Días transcurridos entre la toma de la muestra y la recepción de la misma en el laboratorio de procesamiento menor a

5 días hábiles a partir de la fecha de toma y hasta 7 días cuando proviene de zonas foráneas de difícil acceso.

- **Porcentaje de rechazo:** Proporción de muestras rechazadas que no cumplen con las especificaciones de calidad para el procesamiento de las mismas. Cuando se registre  $\geq 10\%$  del rechazo, el laboratorio deberá comunicar al área de vigilancia epidemiológica las áreas de oportunidad registradas para que esta se encargue de reducirlas.

Los indicadores de la fase analítica (estándar del servicio o proceso analítico) y fase post-analítica (oportunidad en la emisión del resultado) competen a la RNLSP-Flu e inciden en la obtención de un resultado confiable y oportuno.

- **Estándar del Servicio:** 3 días hábiles a partir de la recepción de la muestra en laboratorio. la cantidad de muestras a procesar por semana dependerá de la cantidad de equipos con los que cuente el laboratorio
- **Oportunidad en la emisión del resultado:** medirá el tiempo transcurrido entre el término del análisis por RT-PCR en tiempo real y la llegada de la información a la plataforma SISVEFLU. Todos los laboratorios que realizan diagnóstico de influenza para esta red deben informar los resultados por día de proceso y no acumularlos para su captura en el sistema de información general. El tiempo que transcurre entre el término del procesamiento, captura del resultado y envío de la información debe ser dentro de las primeras 24 horas de terminado el proceso.

A continuación se describe la evaluación de cada indicador y las acciones a seguir de acuerdo al valor obtenido:

#### Cuadro 1. Criterios de evaluación de los indicadores de calidad en el servicio diagnóstico.

Criterios de evaluación para el índice de rechazo

Índice de rechazo	7 a 9%	Alarma, enviar documento de advertencia al área con solicitud de respuesta inmediata con medidas correctivas.
	$>10\%$	No cumple, medida de corrección para la USMI u otra unidad de salud que envía la muestra. Mediante correo electrónico u oficio paralelo a epidemiología estatal, director del LESP y director o subdirector de servicios de salud del estado, se

		notifica al área correspondiente. Se espera que la medida de corrección comience a funcionar en las dos semanas siguientes.
--	--	---

Criterios de evaluación para la oportunidad de la toma de muestra

Oportunidad de la toma de la muestra	0-5 días	Óptimo (prueba tomada adecuadamente).
	6-7 días	Aceptable (prueba que cumple una toma adecuada y puede ser procesada).
	>7 días	Crítico (la muestra no fue tomada adecuadamente por lo que no es aceptada). Este punto de corte dispara una medida de corrección para la USMI que envía la muestra. Mediante correo electrónico, oficio paralelo a epidemiología estatal, director o subdirector de servicios de salud del estado, se notifica al área correspondiente. Se espera que la medida de corrección comience a funcionar en las dos semanas siguientes.

Criterios de evaluación para la oportunidad en el envío de la muestra (Áreas locales)

Oportunidad en el envío de la muestra	0-2 días	Adecuado
	3-5 días	Alarma, se revisa con la institución o jurisdicción el problema del retraso y se indican medidas de corrección inmediatas.
	>5 días	Crítico, no se acepta la muestra y se revisa con la institución o jurisdicción el problema del retraso y se indican medidas de corrección inmediatas. Se envía oficio al servicio de epidemiología estatal, director de LESP y subdirector o subsecretario de servicios de salud de estado.

Criterios de evaluación para la oportunidad en el envío de la muestra (Áreas foráneas)

Oportunidad en el envío de la muestra	0-5 días	Adecuado (prueba tomada adecuadamente)
	6-7 días	Alarma, se revisa con la institución o LESP el problema del retraso y se indican medidas de corrección inmediatas (prueba que cumple una toma adecuada y puede ser procesada).
	>7 días	Crítico, no se aceptan las muestras, se revisa con la institución o LESP el problema de retraso

		y se indican medidas de corrección inmediatas. Se envía oficio al servicio de epidemiología estatal, director del LESP, subdirector o subsecretario de servicios de salud del estado.
--	--	---

#### Criterios de evaluación para el índice de rechazo

Índice de rechazo	7 a 9%	Alarma, enviar documento de advertencia al área con solicitud de respuesta inmediata con medidas correctivas.
	>10%	No cumple, medida de corrección para la USMI u otra unidad de salud que envía la muestra. Mediante correo electrónico u oficio paralelo a epidemiología estatal, director del LESP y director o subdirector de servicios de salud del estado, se notifica al área correspondiente. Se espera que la medida de corrección comience a funcionar en las dos semanas siguientes.

#### Criterios de evaluación del índice de oportunidad del proceso analítico

Índice de oportunidad del proceso analítico	0 a 1 días	Adecuado
	2 a 3 días	Límite aceptable
	>3 días	Crítico. (Excepto cruce de fines de semana sin situación de emergencia). Se analizará todo el proceso en el laboratorio para identificar el obstáculo, se implementarán las medidas correctivas con las que se espera alcanzar el nivel "aceptable" en un término no mayor a dos semanas. En caso de no conseguirlo se suspenderá el diagnóstico por un mes o hasta lograr la corrección del problema. Se documentará todo el proceso mediante oficio al director del LESP correspondiente, a epidemiología estatal, director o subsecretario de servicios de salud y al secretario de salud estatales.

#### Criterios de evaluación de la oportunidad en la emisión de resultados

	<=1día	Adecuado
--	--------	----------

Oportunidad en la emisión de resultados	2 a 3 días	Alarma, se solicita informe y medida de corrección por escrito al director del LESP, a cumplir en tiempo y forma en una semana. Si persiste el problema se suspende el diagnóstico por dos semanas, se notifica por escrito al director del LESP, epidemiólogo, director o subdirector y secretario de salud estatales.
	>3 días	Crítico. Se revisa el área y se otorga una semana para corrección y de no obtener mejora, se suspende el diagnóstico y se notifica por escrito al director del LESP, epidemiólogo, director o subdirector y secretario de salud estatales con copia a la Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud.

La fuente de información de los indicadores es la plataforma del SINAVE del SISVEFLU. El seguimiento de los indicadores en el InDRE será revisado por el Laboratorio de Virus Respiratorios semanalmente, excepto el de desempeño técnico cuya evaluación será trimestral.

## PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO

Los laboratorios integrantes de la RNLSP-Flu deben participar en el programa de evaluación externa del desempeño organizado por el LNR.

**Objetivo:** Evaluar el desempeño diagnóstico de los laboratorios de la red e identificar a aquellos con áreas de oportunidad por fallas técnicas u operativas para colaborar en su mejora continua.

Los laboratorios de la RNLSP-Flu reciben semestralmente un panel de evaluación y con base en los resultados obtenidos, se evalúa su desempeño y se define si continúa con el diagnóstico liberado (por lo menos el 90% en la calificación).

### Procedimiento:

#### Envío del panel

- Se envían los viales que forman el panel de evaluación en contenedores de plástico o bolsa de plástico
- Se colocan refrigerantes en cada una de las paredes de la hielera para acomodar el contenedor de plástico o bolsa de plástico con los viales en el

centro y cubrir con hielo seco, poner un refrigerante en la parte superior (sistema básico de triple embalaje).

- Sellado de la hielera e introducirla en una caja de cartón etiquetada con los datos del remitente y del destinatario, en la cual se encuentra el oficio de envío y el formato de resultados del panel de evaluación del desempeño de acuerdo a las especificaciones enviadas por parte de la CRNLSP.

### Recepción del panel en el laboratorio y envío al LNR

- Recepción de los resultados en el tiempo establecido en el oficio de envío del panel.
- Análisis de los resultados enviados al correo del laboratorio: [laboratoriovirusrespiratorios@yahoo.com.mx](mailto:laboratoriovirusrespiratorios@yahoo.com.mx)
- Envío de resultados a la RNLSP-Flu en el tiempo establecido en el oficio de envío de panel, se envía el oficio de resultados del panel, el informe general de la red y el informe particular de acuerdo a lo establecido por parte de la CRNLSP.

### Criterios de Evaluación

- Concordancia entre 90 y 100%. Mantiene este tipo de evaluación. Cabe mencionar que los laboratorios aprobados en el panel de evaluación externa del desempeño que pueden continuar con el diagnóstico, están obligados a continuar con el envío semanal al InDRE del 100% de las muestras positivas a influenza A no subtipificables; así como de las muestras positivas a influenza A (H1N1)pdm09, influenza A estacional subtipos H3 e influenza B que tengan valor de Cq menor o igual a 32 para la vigilancia estrechas del virus de influenza (Referencia).
- Concordancia entre 76 y 89.9 %. Requiere comprar un nuevo panel, el costo del panel de evaluación se establecerá de acuerdo con el tabulador vigente. Cabe mencionar que la calificación obtenida en este panel no será tomada en cuenta para el Boletín Caminando a la Excelencia, el objetivo de este panel es verificar nuevamente el desempeño técnico del laboratorio. El panel deberá ser solicitado dentro de los siguientes 10 días hábiles, después de haber recibido los resultados. Los laboratorios con panel de evaluación externa del desempeño no aprobado deberán establecer nuevamente el envío de muestras para realizar diagnóstico en el InDRE hasta comprobar nuevamente su desempeño. Una vez aprobado el panel de Evaluación Externa el laboratorio podrá retomar el diagnóstico y reanudar el envío de muestras como lo marcan los lineamientos (muestras positivas con Cq menor o igual a 32 y 100% de A no subtipificables para referencia y el 10% de

muestras negativas de pacientes graves, inmunosuprimidos y defunciones para control de calidad.

- Concordancia de 0 a 75.9%. Requiere de capacitación y mantener el envío de muestras para realizar diagnóstico en el InDRE. Una vez que el personal reciba la capacitación, deberán comprar un nuevo panel, el costo del panel de evaluación se establecerá de acuerdo con el tabulador vigente. Cabe mencionar que la calificación obtenida en este panel no será tomada en cuenta para el Boletín Caminando a la Excelencia, el objetivo de este panel es verificar el desempeño técnico del laboratorio.
- Concordancia menor a 90% en el primer panel comprado. Requiere de capacitación y mantener el envío de muestras para realizar diagnóstico en el InDRE. Una vez que el personal reciba la capacitación, deberán comprar un segundo panel, el costo del panel de evaluación se establecerá de acuerdo con el tabulador vigente. Cabe mencionar que la calificación obtenida en este panel no será tomada en cuenta para el Boletín Caminando a la Excelencia, el objetivo de este panel es verificar el desempeño técnico del laboratorio.
- Una vez aprobado el panel de Evaluación Externa el laboratorio podrá retomar el diagnóstico y reanudar el envío de muestras como lo marcan los lineamientos.

## CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LA INFLUENZA

La liberación de cada laboratorio de la RNLSP-Flu representa la autonomía diagnóstica, es decir, la autorización de la metodología para realizar el diagnóstico. Esta se basará en el cumplimiento de los siguientes criterios:

- Cumplir satisfactoriamente las visitas de auditoría (cédula basada en la NMX-EC-15189-IMNC-2015 “Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia”) y en la ISO9001:2012 Sistemas de Gestión de la Calidad)
- Enviar oportunamente un plan de acciones correctivas para solucionar las observaciones realizadas en las auditorías.
- Contar con las áreas adecuadas para realizar el diagnóstico de influenza por RT-PCR en tiempo real (tratamiento e inactivación, extracción de ácidos nucleicos, preparación de placas, colocación de templados, colocación de control positivo e instrumentación).
- Contar con medidas de bioseguridad Nivel II.
- Procedimientos documentados.



- Contar con capacitación en el proceso de diagnóstico de influenza avalado por el InDRE.
- Contar con equipos con mantenimiento y calibración, reactivos con caducidad vigente e insumos avalados por el InDRE para el diagnóstico de influenza.
- Obtener una calificación mayor o igual al 90% en los paneles de evaluación.
- Mantener un porcentaje de concordancia con las muestras de control de calidad y referencia mayor o igual al 90%.

## BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL INDRE

### Almacenamiento de muestras clínicas positivas a influenza y a otros virus respiratorios y, aislamientos de influenza

Las muestras positivas a influenza y a otros virus respiratorios así como los aislamientos de influenza perfectamente identificados se almacenan en criotubos de 2.0 ml o tubos tipo eppendorf de 1.5 ml en cajas de polipropileno para 100 criotubos, con dimensiones de 132 x 132 x 52 mm, con 100 divisiones (10 x 10). Las cajas son almacenadas preferentemente en ultracongeladores de -70 °C, en caso de no contar con este equipo pueden almacenarse en congeladores de -20 °C. Las muestras positivas son almacenadas por tiempo indefinido. Las cajas deben estar identificadas con el rango de números de muestras contenidas. Es indispensable mantener un inventario del material biológico almacenado.

### Almacenamiento de muestras negativas a influenza y otros virus respiratorios

Las muestras negativas a influenza y a otros virus respiratorios se almacenan en criotubos de 2.0 ml o tubos tipo eppendorf de 1.5 ml en cajas de polipropileno para 100 criotubos, con dimensiones de 132 x 132 x 52 mm, con 100 divisiones (10 x 10). Las cajas son almacenadas en congeladores de -20 °C. Las muestras negativas son almacenadas por dos años o puede ser menos tiempo, esto dependerá de la disponibilidad del espacio en los congeladores. Las cajas deben estar identificadas con el rango de números de muestras contenidas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. "Caminando a la Excelencia". Manual para la Evaluación del desempeño. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez". México 2014.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Modern Methods for Influenza and Subtyping, Atlanta Georgia. Association of Public Health Laboratories. 2004: 81-84.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Protocol of real-time RT-PCR for swine influenza A (H1N1). Atlanta Georgia. 2009, revision 1.
4. Chosewood C & Wilson DE. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – 5th ed. CDC-NIH; 2009.
5. Duwe S, Schweiger B. A new and rapid genotypic assay for the detection of neuraminidase inhibitor resistant influenza A viruses of subtype H1N1, H3N2, and H5N1. J Virol Methods. 2008 Nov; 153(2):134-41.
6. European Committee for Standardization. CWA 15793:2011 Laboratory biorisk management standard. Brussels: CEN; 2011.
7. Guidelines for Biosafety Laboratory Competency. *MMWR*. Supplement / Vol. 60; 2011.
8. Manual del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Influenza (SISVEFLU) editado en colaboración InDRE/DGE; 2014.
9. IATA. Infectious Substances & Shipping Guidelines, 9th Edition. 2009.
10. Influenza A (H1N1) virus resistance to oseltamivir - 2008/2009 influenza season, northern hemisphere. Disponible en: [http://www.who.int/csr/disease/influenza/H1N1webupdate20090318%20ed\\_ns.pdf](http://www.who.int/csr/disease/influenza/H1N1webupdate20090318%20ed_ns.pdf)
11. Lycett SJ, Ward MJ, Lewis FI, Poon AF, Kosakovsky Pond SL, Leigh Brown AJ. Detection of mammalian virulence determinants in highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: multivariate analysis of published data. J Virol. 2009 Jul 22. [Epub ahead of print]
12. Manual para la toma, envío y recepción de muestras para Diagnóstico (REMU-MA-01). Segunda edición 2015.
13. Miller MJ, et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. *MMWR Surveill Summ*. 6; 61:1-102; 2012.
14. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en Laboratorio 3a. Edición. 2005.
15. The role of National Influenza Centres (NICs) during interpandemic, pandemic alert and pandemic periods.

16. WHO guidelines for investigation of human cases of avian influenza A (H5N1). Disponible en: [http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_EP\\_R\\_GIP\\_2006\\_4/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_EP_R_GIP_2006_4/en/index.html)
17. WHO case definitions for human infections with influenza A (H5N1) virus.
18. WHO Information for Laboratory Diagnosis of New Influenza A (H1N1) Virus in Humans. Disponible en: [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO\\_Diagnostic\\_RecommendationsH1N1\\_20090521.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf)
19. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014; Geneva: WHO Press; 2012.
20. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual – 3rd ed. Geneva: WHO Press; 2004.

## ANEXOS

### Anexo I. Bioseguridad en el laboratorio de virus respiratorios

Para el desarrollo de estas técnicas se deben de tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- El riesgo biológico determinado para estos patógenos, es de nivel tipo II.
- Antes y después de utilizar los gabinetes, los equipos, las micropipetas y las mesas de trabajo, debe realizarse una limpieza de los mismos, utilizando etanol al 70% o RNase-Away diariamente. Realizar una limpieza exhaustiva de lo antes mencionado una vez cada 15 días, utilizando hipoclorito de sodio al 10%, seguido de etanol al 70% y eliminar inmediatamente residuos con agua destilada.
- Mantener 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 (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, de acuerdo al procedimiento de Gestión Ambiental.
- Desechar el frasco del buffer vacío y los viales del Detection Enhancer de acuerdo a lo establecido en el procedimiento de gestión ambiental, así como colocar la etiqueta correspondiente con base en lo establecido en el formato de gestión ambiental.
- En caso de ocurrir algún derrame, deberá atenderse conforme en lo establecido en el procedimiento de gestión ambiental.
- El almacenamiento de los extractos de trabajo se lleva a cabo en un ultracongelador de  $-70^{\circ}$  a  $-80^{\circ}$  C, en el cual, sólo personal autorizado puede tener acceso, ya que estos ejemplares se encuentran bajo llave.

## Anexo II. Técnicas diagnósticas

### A. Extracción del ARN viral por medio del kit QIAamp viral ARN

#### Propósito

Esta técnica describe la forma para extraer ARN viral de muestras clínicas y aislamientos virales en cultivos celulares o huevo embrionado para el diagnóstico de influenza mediante la técnica del RT-PCR tiempo real o punto final.

#### Material y equipo

- tubos eppendorf estériles de 1.8 ml
- guantes desechables de neopreno

- micropipetas de volumen variable con capacidad de 20 a 200  $\mu\text{L}$
- micropipetas de volumen variable con capacidad de 100 a 1000  $\mu\text{L}$
- microcentrífuga
- agitador tipo vórtex
- kit de extracción de ARN viral QIAGEN [camisas (tubo colector)], columnas, solución amortiguadora concentrada AW-1, solución amortiguadora concentrada AW-2, solución amortiguadora de lisis AVL, acarreador, solución amortiguadora de elusión.
- gases estériles (en frasco)
- tubos cónicos de 50 ml
- gradilla para tubos Eppendorf
- puntas para pipeta de 20 a 200  $\mu\text{L}$  con filtro estériles
- puntas para pipeta de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  con filtro estériles
- vaso de precipitados estéril de 1000 ml (para desechos)
- etanol absoluto grado biología molecular
- etanol al 70% para desinfectar (atomizador)

## Preparación de reactivos del kit QIAamp viral ARN

### 1. *Solución amortiguadora AVL con acarreador*

- Acarreador: Disolver el acarreador liofilizado adicionando 310  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora obteniendo una solución de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Enseguida guardar en alícuotas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No descongelar por más de 3 veces.
  - Solución amortiguadora AVL. Incubar a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  si hay presencia de precipitado.
- Mezclar el acarreador con la solución amortiguadora AVL.
  - Calcular la cantidad necesaria de AVL y acarreador para las muestras que se vayan a extraer.

Calcular de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$n \times 0.56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 10 \mu\text{L} / \text{ml} = z$$

$n$ = número de muestras para extraer

$y$ = volumen calculado de AVL

$z$ = volumen calculado de acarreador

- Mezclar suavemente por inversión 10 veces para evitar aerosoles.
- Guardar el exceso de AVL con acarreador a 4 °C por unos días.

**Cuadro 7. Cálculo de volúmenes de solución amortiguadora AVL con acarreador de acuerdo con el número de muestras.**

Número de muestras	Vol. AVL (ml)	Vol. Acarreador (μl)	Número de muestras	Vol. VAL (ml)	Vol. Acarreador (μl)
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.40	84.0
4	2.24	22.4	16	8.96	89.6
5	2.80	28.0	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.20	112.0
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.60	56.0	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

## 2. Solución amortiguadora AW1

- Colocar con una pipeta 25 ml de etanol absoluto en un tubo cónico de 50 ml.
- Agregar 19 ml de solución amortiguadora concentrada AW-1 para obtener 44 ml de solución final.

- Tapar perfectamente y mezclar
- Rotular como "AW-1", fecha de preparación, quién elaboró y guardar a temperatura ambiente.

## 3. Solución amortiguadora AW2

- Colocar con una pipeta 30 ml de etanol absoluto en un tubo cónico de 50 ml.
- Agregar 13 ml de solución amortiguadora concentrada AW-2 para obtener 43 ml de solución final.
- Tapar perfectamente y mezclar.

- Rotular como “AW-2”, fecha de preparación, quién elaboró y guardar a temperatura ambiente.

4. *Solución de elusión AVE*. Esta lista para usarse

5. *Etanol grado biología molecular*. No provisto en el material del kit. Usarlo a 4 °C.

#### Método para la extracción de ácido nucleico

- a) Atemperar las muestras (sobrenadantes de exudado faríngeo, nasofaríngeo, lavado bronquio alveolar y biopsia).
- b) Colocar 560 µL de solución amortiguadora AVL mezclada con el acarreador de ARN en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Adicionar 140 µL de muestra a la solución amortiguadora AVL del paso anterior, mezclar en el vórtex durante 15 segundos.
- c) Preparar un control de reactivos de extracción (CRE) con 140 µL de medio de transporte viral y 560 µL de solución amortiguadora AVL mezclado con el acarreador de ARN, mezclar en el vortex durante 15 segundos.
- d) Incubar a temperatura ambiente por 10 min. En este paso se inactiva cualquier agente infeccioso.
- e) Agregar 560 µL de etanol grado biología molecular a la muestra y mezclar en el vórtex durante 15 segundos. Después de mezclar, centrifugar a 8000 rpm ó 6000 x g por 1 minuto para desprender las gotas de la tapa.
- f) Colocar cuidadosamente 630 µL de la solución del paso anterior a una columna del kit QIAamp (contenida en un tubo colector de 1.5 ml nuevo) al colocar el volumen se debe tener la precaución de no mojar el borde, tapar y centrifugar a 8000 rpm ó 6000 x g por 1 minuto. Colocar la columna dentro de un adaptador de 1.5 ml nuevo y desechar el tubo que contiene el filtrado. Si la solución no ha pasado completamente por la columna, centrifugar a una mayor velocidad. La centrifugación a altas velocidades no afecta la pureza del ARN viral.
- g) Abrir cuidadosamente la columna y repetir el paso del inciso f.
- h) Abrir cuidadosamente la columna y agregar 500 µL de solución amortiguadora AW1, cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm ó 6000 x g por 1 minuto. Colocar la columna dentro de un tubo colector nuevo, desechar el tubo que contiene el filtrado.
- i) Abrir cuidadosamente la columna y agregar 500 µL de solución amortiguadora AW2, cerrar la tapa y centrifugar a 14,000 rpm ó 20,000 x g por 3 minutos. Retirar la columna y colocarla en un tubo colector nuevo, desechar el tubo que contiene el filtrado.

- j) Colocar nuevamente la columna en un tubo colector de 1.5 ml nuevo y centrifugar a 20 000 x g por 1 minuto para eliminar el exceso de solución amortiguadora. Si es necesario repetir este paso para garantizar que la columna quede seca. La solución amortiguadora AW2 puede causar problemas después, se debe evitar un frenado rápido de la centrífuga en este punto.
- k) Retirar la columna y colocarla en tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo, desechar el tubo que contiene el filtrado.
- l) Abrir cuidadosamente la columna y colocar 60 µL de solución amortiguadora AVE, cerrar la tapa e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 8000 rpm ó 6000 x g por 1 minuto. La elución con AVE garantiza la recuperación del 90% del ARN, una doble elución con 2 X 40 µL de solución amortiguadora AVE incrementa hasta un 10% la recuperación. Volúmenes menores a 30 µL no incrementan la concentración final de ARN.
- m) El ARN viral es estable hasta por un año cuando es almacenado a -20 o -70 °C.
- n) Manejar los lavados como residuos CRIT.

## B. Extracción del ARN viral por medio de la tecnología MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation

### Propósito

La tecnología MagNA Pure LC 2.0 permite la extracción y purificación automatizada de ADN, ARN total y ácidos nucleicos de virus a partir de diferentes tipos de material biológico como: sangre completa, suero, células sanguíneas, cultivos celulares, tejidos, bacterias, hongos, etc., de forma rápida, segura y con una adecuada calidad para su posterior utilización en procedimientos de análisis por PCR. El principio magnético de esta técnica está dado por el uso de esferas magnéticas. Las muestras son lisadas por incubación con un amortiguador especial que contiene sales y proteinasa K que produce la lisis celular y permite la liberación de los ácidos nucleicos mientras que las nucleasas son desnaturalizadas y la proteinasa K digiere las proteínas. Los ácidos nucleicos totales son adheridos a la superficie de las perlas magnéticas por fuerzas iónicas debido a las condiciones de sales e isopropanol. Las perlas magnéticas unidas a los ácidos nucleicos son magnéticamente separadas de los residuos de la muestra lisada y posteriormente son lavados repetidamente con solución amortiguadora de



lavado para remover las sustancias no unidas [por ejemplo proteínas (nucleasas)], membrana celular, e inhibidores de PCR tales como hemoglobina o heparina y para reducir la concentración de sales. Las sustancias no adheridas son removidas por varios pasos de lavado, entonces los ácidos nucleicos purificados son eluidos de las perlas magnéticas en los pozos de elución mientras que, las perlas magnéticas son retenidas y descargadas.

## Material




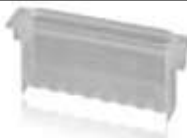
La tecnología *MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation* requiere el uso del Kit de reactivos que está especialmente diseñado para ser usado con el *MagNA Pure LC Instrument LC2.0*.

Cuadro 8. Contenido del Kit de reactivos

Identificación	Nombre	Contenido y función
Frasco tapa color negro Número 1	Amortiguador de lavado I	2 frascos de 100 ml (cada uno) para remover inhibidores de PCR
Frasco tapa color azul Número 2	Amortiguador de lavado II	1 frasco de 100 ml para remover sales, proteínas, etc.
Frasco con tapa color roja Número 3	Amortiguador de lavado III	2 frascos de 100 ml (cada uno) para remover sales
Frasco con tapa color verde Número 4	Amortiguador de lisis y unión	1 frasco de 100 ml para la lisis celular y la unión de los ácidos nucleicos totales
Frasco con tapa color rosa Número 5	Proteinasa K	6 frascos liofilizados para digestión de proteínas
Frasco con tapa color caramelo número 6	Partículas magnéticas (MGPs)	6 frascos con 6 ml de suspensión (cada uno) para la unión de ácidos nucleicos

Frasco con tapa color amarillo número 7	Amortiguador de elución	1 frasco de 100 ml para la elución de los ácidos nucleicos totales, para la dilución (opcional), para la reconstitución de la proteinasa K
---	-------------------------	--

Cuadro 9. Accesorios y plásticos consumibles para el MagNA Pure Instrument LC 2.0:

	Ubicación	Nombre y función
	1 10 11	<i>Sample Cartridge</i> Cartucho de elución y depósito de ácidos nucleicos. Hay tres posiciones en el <i>Reagent /Sample Stage</i> donde deben ser colocados.
		<i>Cartridge Seal</i> Película protectora de contaminación o evaporación de los ácidos nucleicos.
	2 (b)	<i>Reagent Tub Small</i> Recipiente de reactivos con capacidad de 3.5 ml. Se colocan en la posición señalada en la foto del robot.
	2 (b)	<i>Reagent Tub Medium 20</i> Recipiente de reactivos con capacidad de 20 ml.

		Se coloca en la posición señalada en la foto del robot.
	2 (b)	<p><i>Reagent Tub 30</i></p> <p>Recipiente de reactivos con capacidad de 30 ml.</p> <p>Se coloca en la posición señalada en la foto del robot.</p>
	2(a)	<p><i>Reagent Tub Large</i></p> <p>Recipiente de reactivos con capacidad de 100 ml.</p> <p>Se coloca en la posición señalada en la foto del robot.</p>
	2 (b)	<p><i>Tub Lid (Small-Medium)</i></p> <p>Tapa para los recipientes <i>Small</i> y <i>Medium</i>, evita la pérdida de volumen de los reactivos por evaporación.</p>
	2(a)	<p><i>Tub Lid (Large)</i></p> <p>Tapa para el recipiente <i>Large</i> evita la pérdida de volumen de los reactivos por evaporación.</p>
		<p><i>Tub Lid Seal</i></p> <p>Se usa para prevenir la contaminación de los reactivos durante el movimiento del brazo del robot, evitando el goteo de las puntas.</p>
	9	<p><i>Processing Cartridge</i></p> <p>Es aquí donde el robot coloca los reactivos requeridos en los diferentes pasos del proceso</p> <p>Se coloca en la posición indicada en la foto del robot.</p>
	3	<p><i>Reaction Tips (Large)</i></p> <p>Se usan para dispensar los reactivos, transferir la muestra y separación de perlas magnéticas.</p> <p>Se colocan como indica la foto del robot.</p>

	4	<p><i>Reaction Tips (Small)</i></p> <p>Se usan para transferir el material genético en la <i>Post Elution</i>.</p> <p>Se colocan como indica la foto del robot.</p>
		<p><i>Tip Stand</i></p> <p>Son depósitos temporales de las puntas en cada paso del proceso.</p> <p>Se colocan en la posición indicada en la foto del robot.</p>
	7	<p><i>Waste Bottle</i></p> <p>Depósito de desechos líquidos del robot.</p> <p>Colocarlo en la posición indicada en la foto del robot.</p>
		<p><i>Reagent Reservoir Rack</i></p> <p>En él se colocan los recipientes de reactivos. Tiene dos posiciones para recipientes grandes y seis para recipientes pequeños, se coloca a su vez en el área de reactivos del robot.</p>
		<p><i>Cooling Block, Reaction Tubes</i></p> <p>Es adecuado para colocar 32 tubos de reacción de 1.5 ml y tapa de rosca que son llenados automáticamente usando la función de <i>post-elución</i>.</p> <p>Se coloca en la unidad de enfriamiento 2 en el área de <i>post-elución</i> del robot.</p>
		<p><i>Waste Box, Waste Box Lid</i></p> <p>Sostiene la bolsa de desechos en donde las puntas de reacción son descartadas por el robot.</p>

		<p><i>Waste Bottle Tray</i></p> <p>Sostiene el depósito de desechos líquidos del robot.</p>
		<p><i>Liquid Waste Funnel</i></p> <p>Sirve para transportar los desechos líquidos dentro del bote de desechos.</p>
		<p><i>Greasing Set</i></p> <p>Estación para el engrasado automático de los anillos O.</p>
		<p><i>O-ring Exchange Tool</i></p> <p>Con esta herramienta los anillos O pueden ser colocados y retirados del instrumento.</p>
		<p><i>Touch-pen with holder</i></p> <p>Es utilizada para manejar la pantalla sensible al tacto.</p>
		<p><i>Touch-screen with Keyboard Tray and Keyboard</i></p> <p>Permiten el manejo del software del robot.</p>

## Medidas de bioseguridad

### Procedimiento para la extracción de ácido nucleico

#### 1. Preparación de la muestra para extracción automática de ARN

- 1) Recibir las muestras clínicas en tubos Eppendorf marcados con un número de muestra asignado previamente. Preparar un Control de Reactivos de Extracción (CRE) con 200  $\mu$ L de medio de transporte viral más 300  $\mu$ L de Amortiguador de lisis y unión
- 2) Colocar las muestras en el cartucho de muestra como a continuación se ilustra:

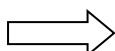




Figura 8. Colocación de la muestra

## 2. Colocación de los consumibles en el robot

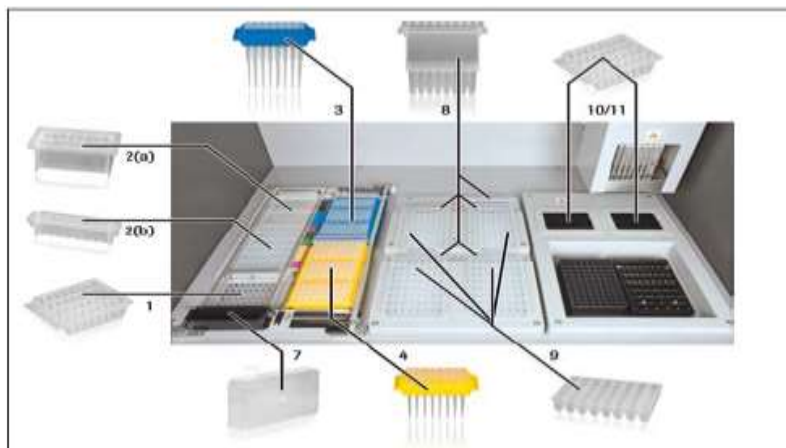


Figura 9.  
los  
en el robot

Colocación de  
consumibles

## 3. Colocación de los reactivos en los recipientes y posiciones adecuados en la charola de reactivos

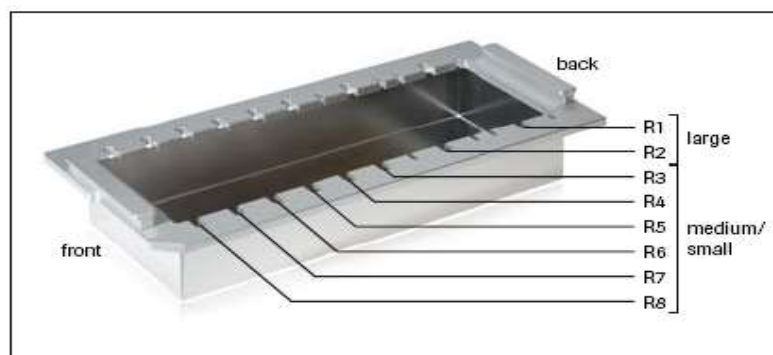


Figura 10. Colocación de los reactivos

**Posición R1.** Recipiente grande que contiene 31.2 ml de amortiguador de lavado I (tapa negra).

**Posición R2.** Recipiente grande con 32.6 ml amortiguador de lavado III (tapa roja).

**Posición R3.** Permanece vacía.

**Posición R4.** Recipiente pequeño con 4.2 ml de solución de proteinasa K (tapa rosa). Liofilizado re-suspendido en 5 ml de amortiguador de elución.

**Posición R5.** Recipiente pequeño con 5.8 ml de partículas magnéticas (tapa caramelo).

**Posición R6.** Recipiente pequeño con 6.6 ml de amortiguador de elución (tapa amarilla).

**Posición R7.** Recipiente pequeño con 15.9 ml de amortiguador de lavado II (tapa azul).

**Posición R8.** Permanece vacía.

#### *4. Revisión de los accesorios para desecho*



Figura 11. Revisión de accesorios

No olvidar verificar antes de iniciar la corrida, el volumen de líquidos en el *waste bottle* (bote de desechos), el cual debe ser cambiado regularmente para evitar derrames. Así mismo, verificar que la bolsa de desechos contenida en el *waste box* no se encuentre llena y que ésta y la tapa del contenedor se encuentren posicionadas correctamente como se indica en la figura anterior.

#### *5. Introducción de información de las muestras, selección de protocolo y parámetros*

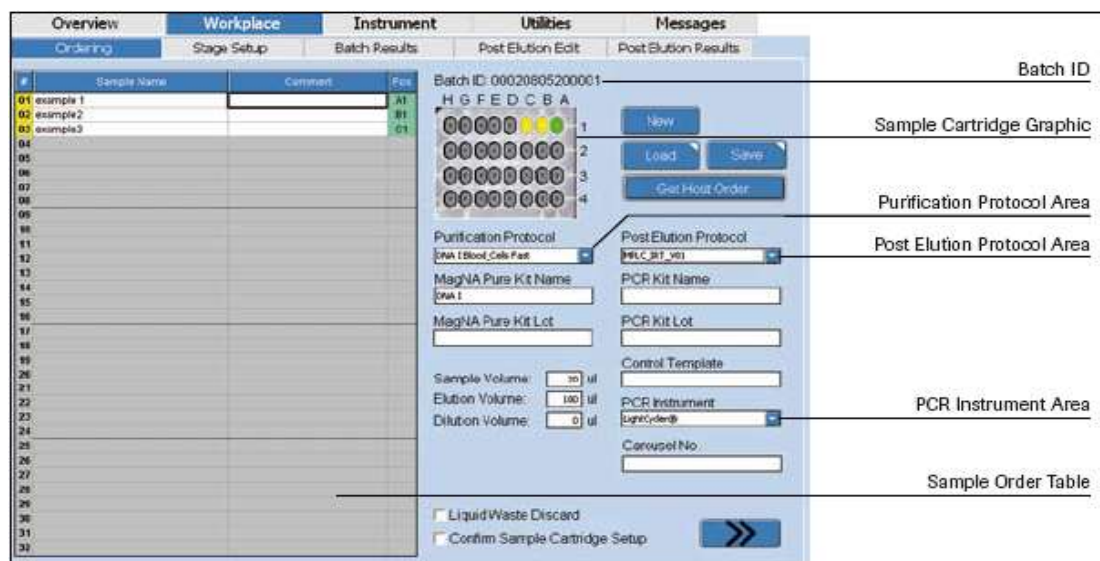


Figura 12. Programación de protocolo

- 1) Abrir la opción *Workplace*.
- 2) Seleccionar *Ordering*, aparecerá la pantalla ilustrada arriba.
- 3) En la tabla introducir los números de identificación de las muestras de acuerdo a su posición.
- 4) Seleccionar el protocolo de purificación adecuado (*Purification Protocol Area*)
- 5) Indicar los volúmenes de muestra y de elución (*Sample volumen, Elution Volumen*).
- 6) Seleccionar el protocolo de *Post Elución* (*Post Elution Protocol Area*).
- 7) Señalar la opción *Liquid Waste Discard*.
- 8) Guardar indicando la fecha y el nombre de la corrida.
- 9) Ir a la siguiente pantalla. Dar clic en la flecha que se encuentra en la parte inferior derecha.

## 6. Inicio de la corrida

El software utiliza la información de las muestras definida en la pantalla anterior para determinar el volumen de reactivos y plásticos requeridos, y despliega esta información en la pantalla *Stage Setup*, (ilustrada abajo). Aquí, en esta pantalla seleccionar los botones que aparecen en amarillo para confirmar el correcto posicionamiento de los reactivos y plásticos. Cuando un reactivo o plástico no son requeridos aparece la leyenda *Not Used*. Presionar el botón de inicio *Start* para iniciar la corrida.



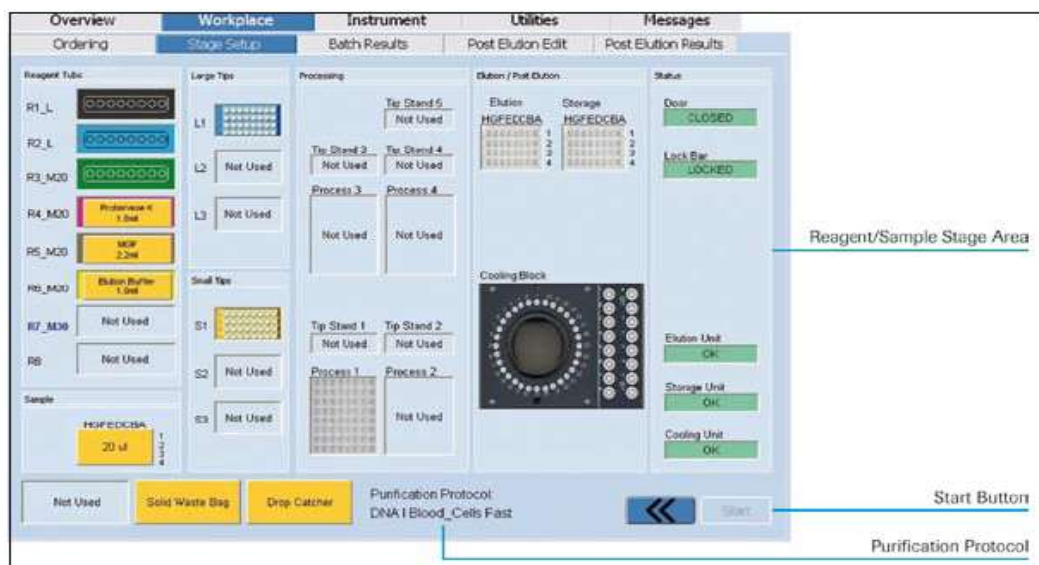


Figura 13. Inicio de corrida

### 7. Monitoreo del proceso de purificación

Durante el proceso de purificación el estado de la corrida es monitoreado en la ventana *Runs Status* ilustrada a continuación.

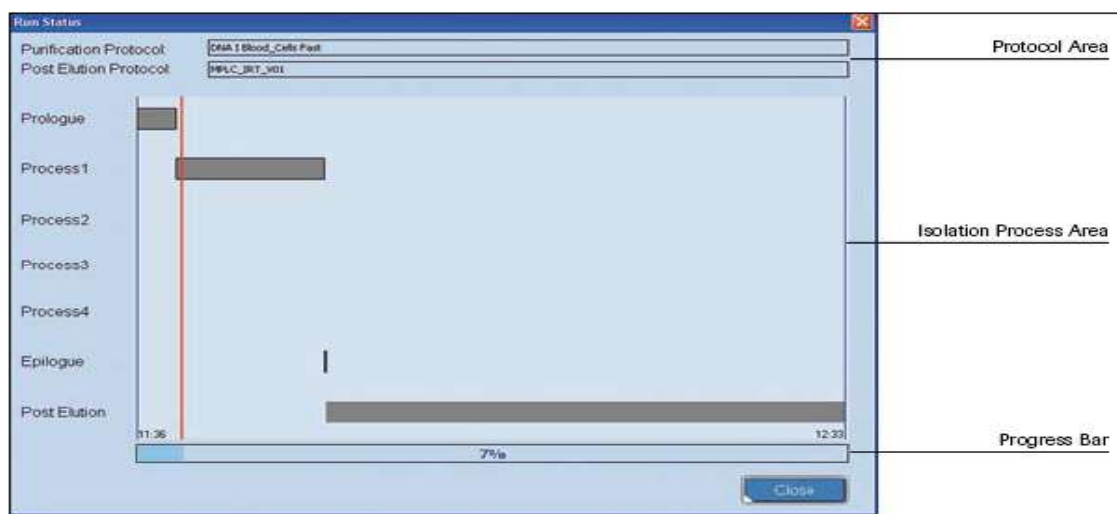


Figura 14. Monitoreo de avance de corrida

### 8. Envasado del material genético purificado

Después del proceso de purificación el material genético es envasado en tubos Eppendorf. Desechar y etiquetar los Residuos químicos.

### C. Extracción del ARN viral por medio del kit QIAamp MinElute Virus Spin kit (Otros virus respiratorios no influenza)

#### Material y equipo

- tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml
- guantes desechables de neopreno
- gasas estériles (en frasco)
- tubos cónicos de 50 ml
- gradillas para tubos Eppendorf
- puntas para pipeta de 1 a 200 µL con filtro estériles
- puntas para pipeta de 100 a 1000 µL con filtro estériles
- vaso de precipitados estéril de 1000 ml
- micropipetas de volumen variable con capacidad de 20 a 200 µL
- micropipetas de volumen variable con capacidad de 100 a 1000 µL
- microcentrífuga hasta 20 000 x g
- agitador tipo vórtex
- termoblock
- kit de extracción de ARN viral QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Kit (tubo colector), columnas, solución amortiguadora concentrada AW-1, solución amortiguadora concentrada AW-2, solución amortiguadora de lisis AVL, Acarreador, solución amortiguadora de elusión)
- etanol absoluto (100%) grado biología molecular
- etanol al 70% para desinfectar (atomizador)

#### Medidas de bioseguridad

##### Preparación de reactivos del KIT QIAamp MinElute Virus Spin

##### 1. *Solución amortiguadora con acarreador AVL*

- Adicionar 310 µL de solución amortiguadora AVE al vial del kit que contenga 310 µg del acarreador de RNA liofilizado.
- Disolver el acarreador de RNA completamente.

- Tomar todo el contenido del tubo y pasarlo al frasco de solución amortiguadora AVL (volumen total 12 ml) y homogenizar (ya con el acarreador la solución amortiguadora se llama AVL).
- Hacer alícuotas en tubos Eppendorf de 1,5 ml con 800 µL de solución amortiguadora AVL con el acarreador de RNA (cada alícuota sirve para 4 muestras).
- Almacenar a – 20 °C.

## 2. *Solución amortiguadora AW1*

- Adicionar 25 ml de etanol (96-100%) grado biología molecular a la botella que contiene 19 ml de solución amortiguadora concentrada AW1 (volumen total 44 ml).
- La solución amortiguadora AW1 es estable por un año cuando se almacena cerrado a temperatura ambiente, o hasta que el kit llegue a su fecha de expiración.
- Hacer alícuotas en tubos cónicos de 50 ml.
- Antes de usar, mezclar por inversión.

## 3. *Solución amortiguadora AW2*

- Adicionar 30 ml de etanol (96-100%) grado biología molecular a la botella que contiene 13 ml de solución amortiguadora concentrada AW2 (volumen total 43 ml).
- Almacenar cerrado a temperatura ambiente, la solución amortiguadora AW2 es estable por un año o hasta que el kit llegue a su fecha de expiración.
- Hacer alícuotas en tubos cónicos de 50 ml.

## 4. *Etanol absoluto*

- Colocar 40 ml de etanol absoluto en un tubo cónico.
- Tapar herméticamente y rotular como *Etanol absoluto de trabajo* con la fecha de preparación y guardar a 4 °C.
- Colocar en hielo para su uso.

## Preparación del gabinete de seguridad

Desinfectar el gabinete con alcohol etílico al 70%, así como todo el material y equipo que se introduce al gabinete (vórtex), encender la luz UV por 10 minutos.

### Procedimiento para la extracción de ácido nucleico

Todas las centrifugaciones son a temperatura ambiente (15-25 °C).

- a) Según el número de muestras, enumerar tubos tipo Eppendorf de 1.5 ml por duplicado.
- b) Colocar 250 µL de la muestra a procesar en el vial correspondiente.
- c) Centrifugar para eliminar moco a 2500 rpm, durante 5 minutos.
- d) Colocar 200 µL de muestra centrifugada en el tubo correspondiente.
- o) Adicionar 200 µL de buffer AVL ya con el acarreador. Preparar un Control de Reactivos de Extracción (CRE) con 200 µL de medio de transporte viral más 200 µL de buffer AVL
- e) Mezclar en el vórtex por 15 segundos.
- f) Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- g) Enseguida incubar a 56 °C en termoblock por 15 minutos.
- h) Dar *spin* para bajar el agua de condensación de la tapa.
- i) Agregar 250 µL de etanol grado biología molecular y mezclar en el vórtex por 15 segundos.
- j) Incubar el lisado con el etanol por 5 minutos a temperatura ambiente (Si la temperatura es mayor a 25 °C el etanol se debe enfriar en hielo y adicionar al lisado).
- k) Dar *spin* para bajar el agua de condensación de la tapa.
- l) Adicionar todo el lisado a la columna.
- m) Centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm (6000 x g).
- n) Desechar el tubo colector con el filtrado y poner la columna sobre un tubo colector nuevo. (Si el lisado no pasa completamente, se repite la centrifugación hasta que la columna esté vacía).
- o) Destapar la columna y agregar 500 µL de AW1 y centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm (6000 x g).
- p) Desechar el tubo colector con el filtrado y colocar la columna en un tubo colector nuevo.

- q) Destapar cuidadosamente la columna y agregar 500 µL de AW2 y centrifugar a 6000 x g durante 1 minuto.
- r) Desechar el tubo colector con el filtrado y poner la columna sobre un tubo colector nuevo.
- s) Destapar cuidadosamente la columna y agregar 500 µL de etanol grado biología molecular.
- t) Centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm (6000 x g) y desechar el tubo colector con el filtrado y poner la columna sobre un tubo colector nuevo.
- u) Centrifugar a 14 000 rpm por 3 minutos, hasta que la columna ya no contenga líquido.
- v) Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml previamente identificado y agregar 55 µL de buffer AVE en el centro de la membrana, cerrar la tapa e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- w) Centrifugar a 14 000 rpm (20 000 x g) por 1 minuto, desechar la columna y etiquetar y almacenar el RNA a -70 °C o a 4 °C si se trabaja inmediatamente.

#### D. 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

## Materialles

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

## 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  $8^{\circ}\text{C}$  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 pmol/ $\mu\text{L}$  y 10 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  $-20^{\circ}\text{C}$  o menos en alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  o 500  $\mu\text{L}$  si el uso no es tan frecuente, si su uso es muy frecuente se mantienen de 2 a  $8^{\circ}\text{C}$  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 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 10.-** 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 15, este procedimiento se debe de hacer para cada una de las mezclas diferentes que se han preparado.

		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 15.- Ejemplo de una placa de 96 pozos Fast.

- Posteriormente se colocaran 5  $\mu$ 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 elaboraran las hojas de registro de acuerdo al orden en que se colocarán los extractos en las placas (ver figura 16), 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												

Figura 16.- 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  $\mu$ L del extracto en el pozo correspondiente, para obtener un volumen final de mezcla de reacción de 25  $\mu$ 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  $\mu$ 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 17).

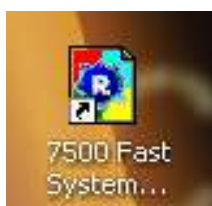


Figura 17.- Reconocimiento del acceso directo al programa

- El software abrirá exitosamente presentando una ventana con el nombre "**Quick start up document**" (inicio rápido de documento, Figura 18).

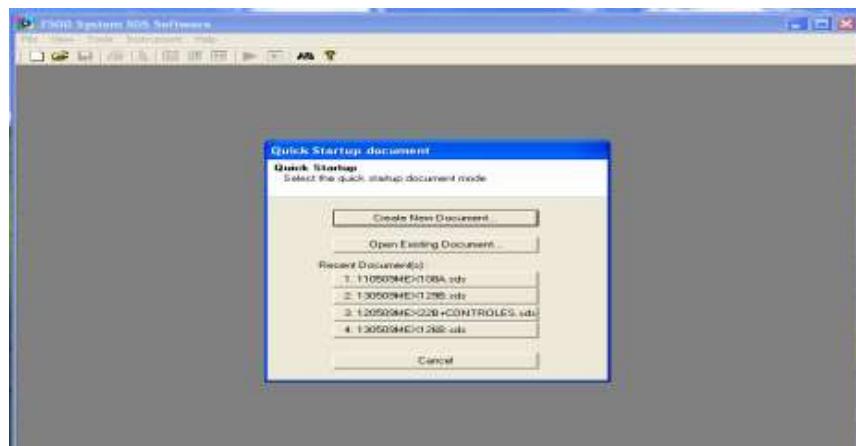


Figura 18.- Ventana de inicio del programa.

- 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 19.

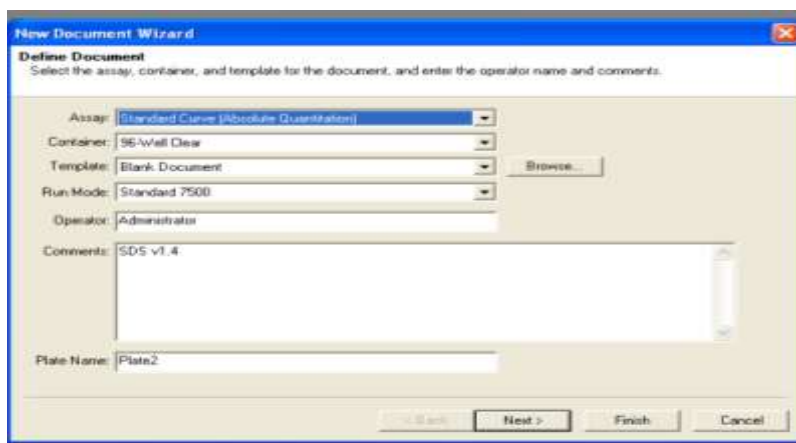


Figura 19.- Ventana para crear un nuevo documento.

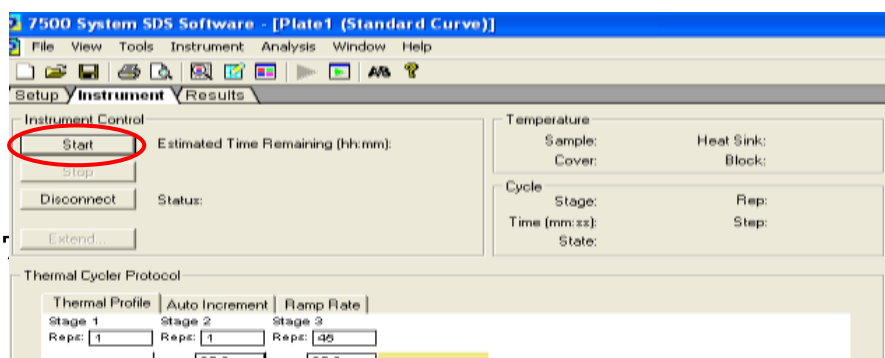
- En esta nueva ventana se inicia la programación de la corrida, para lo cual en el parámetro de **Template** (molde o templado), del lado derecho de esta opción encontraremos el botón de **Browse** (buscar), se da clic para buscar la plantilla previamente programada y posteriormente se selecciona haciendo 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 20, en esta plantilla se programan las claves de los templados o extractos de RNA por analizar.



Figura 20.- 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 21.

InDRE  
Mayo 2017



e 159  
rsión 1

Figura 21.- 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 21). 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.
- 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 22, se da clic en el botón de **OK**, el cual se encuentra en el centro de la pantalla.

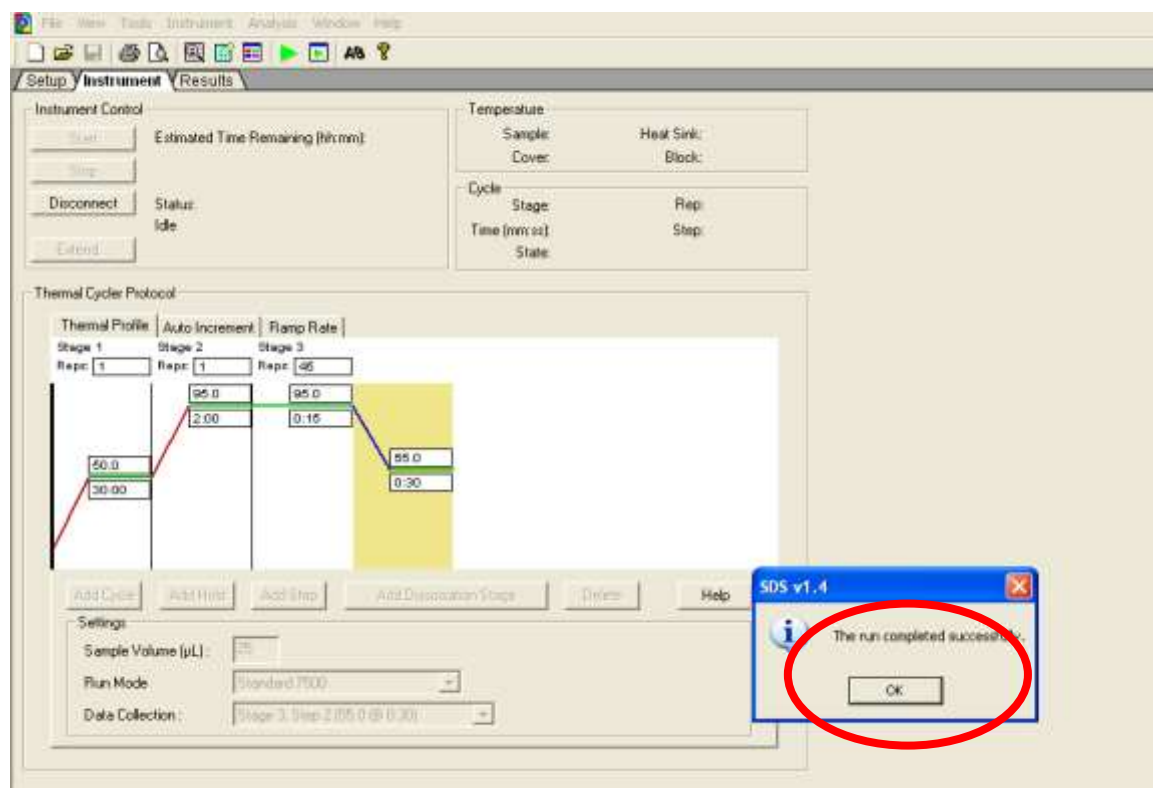


Figura 22.- Finalización de la corrida de qRT-PCR para Influenza.

- Se selecciona la pestaña de **Results** (resultados), la cual se encuentra debajo de la barra de menús de la ventana (ver figura 23), 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**.

A	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
B	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
C	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
D	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
E	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
F	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
G	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
H												
I	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
J	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
K	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet
L	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet	Undet

Figura 23.- 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 23).



- 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 controles positivos (columna 12 o donde se hayan colocado) al mismo tiempo, como se muestra en la figura 24.

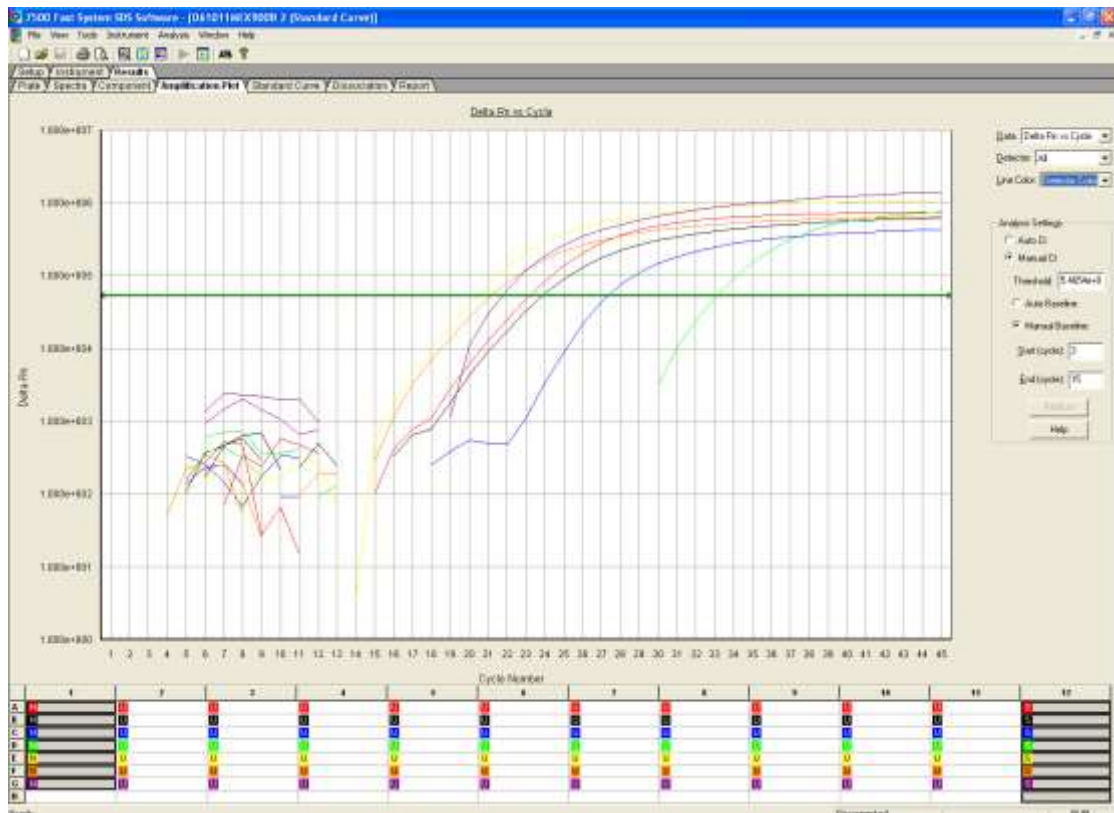


Figura 24.- Observación de las curvas de amplificación de los 7 marcadores en los pozos de controles positivos (arriba de la línea de threshold) y negativos (abajo de la línea de threshold) de la qRT-PCR.

- 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*

- 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 24. 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 25.

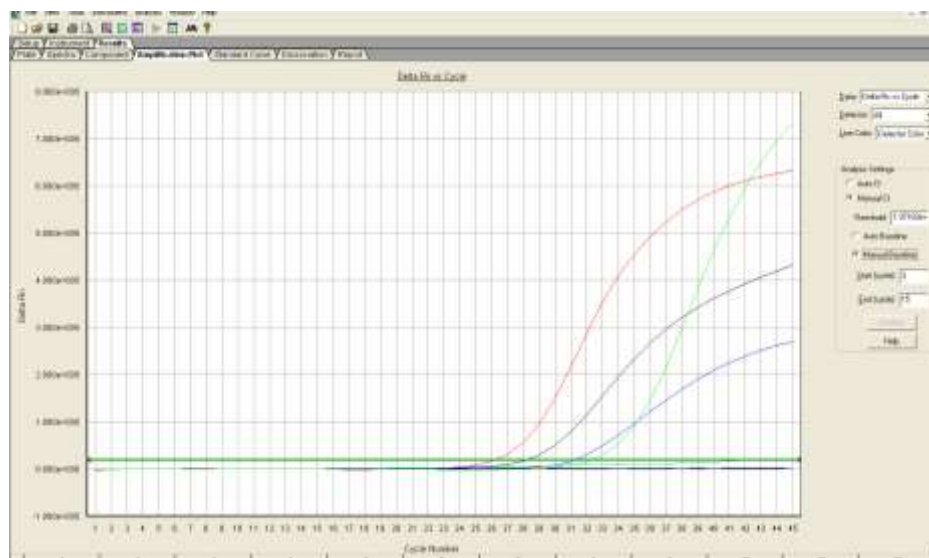


Figura 25.- Forma lineal de las curvas sigmoideas de amplificación, controles negativos y controles positivos.

- La lectura de las curvas de amplificación de los extractos se realiza por columnas, observar figura 26.

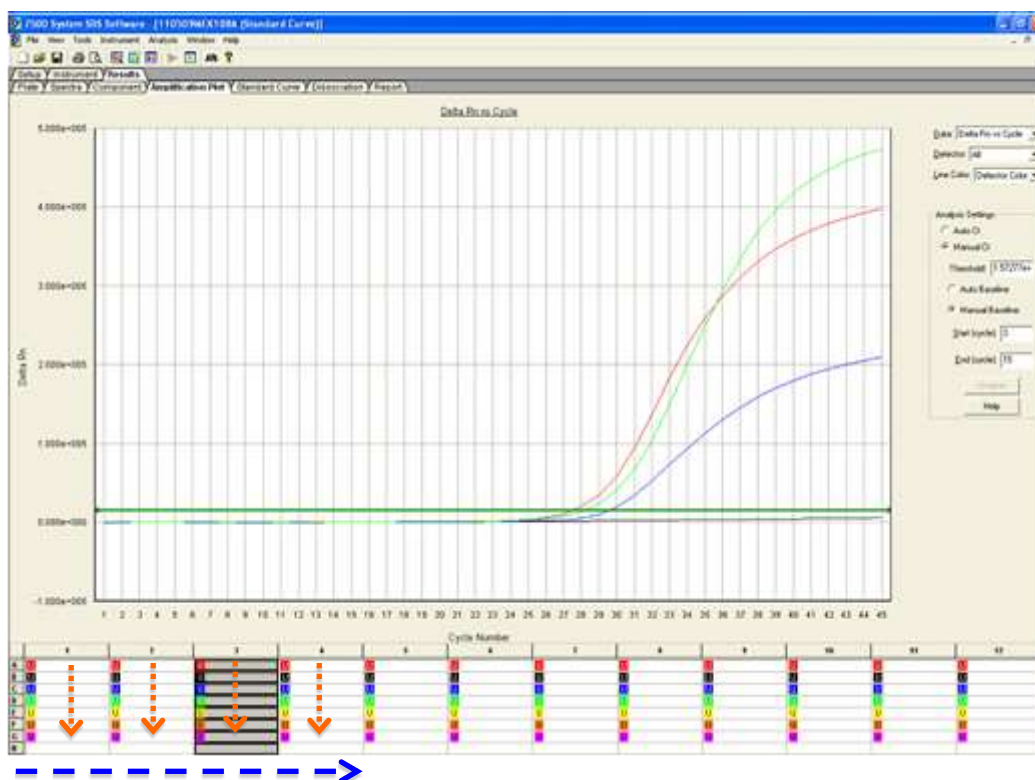


Figura 26.- Las flechas indican la forma de leer los resultados de qRT-PCR para el diagnóstico de influenza.

### *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, 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 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 27):

**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.

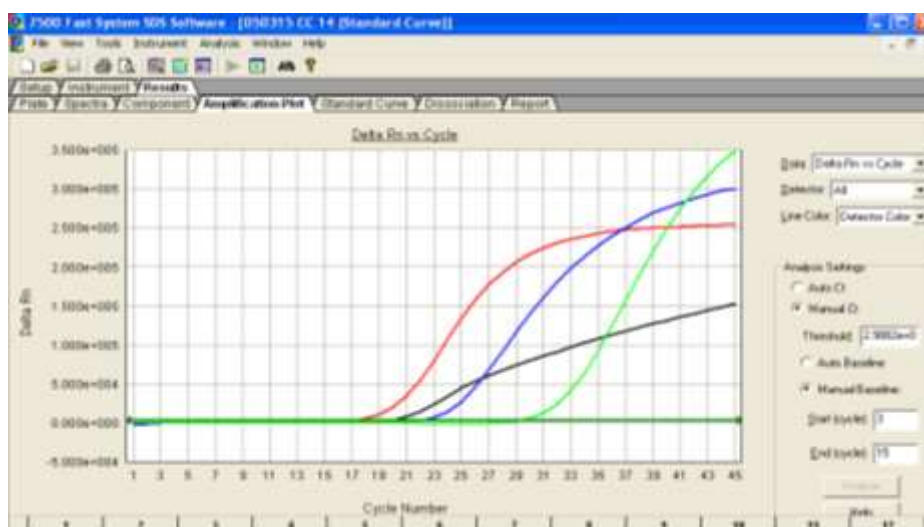


Figura 27.- Muestra positiva a Influenza A (H1N1)pdm09.

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 28, 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

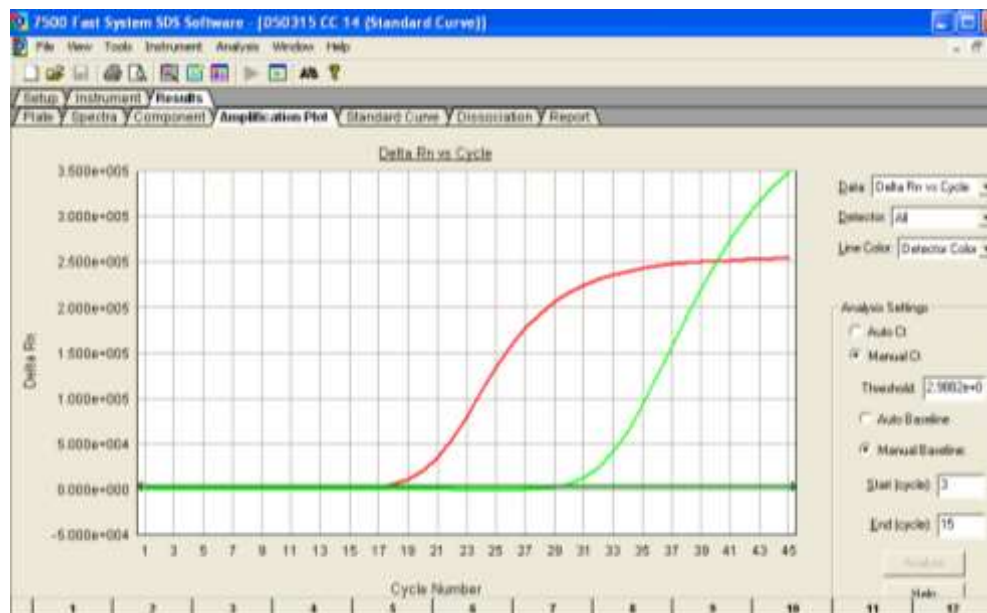


Figura 28.- Muestra positiva a Influenza A No Subtipificable.

Influenza B. Si se observa amplificación de los marcadores para Inf B y RP, curva amarilla y la curva Verde, respectivamente. La figura 29 muestra el resultado: POSITIVA a Influenza tipo B. . En plataforma única de influenza se reporta como B.

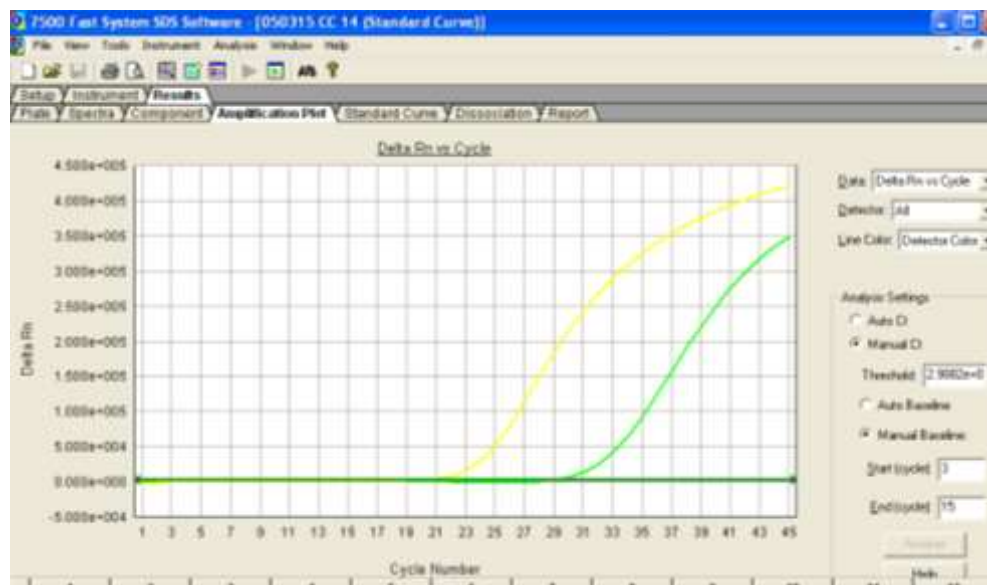


Figura 29.- Muestra positiva a Influenza tipo B.

**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 30).

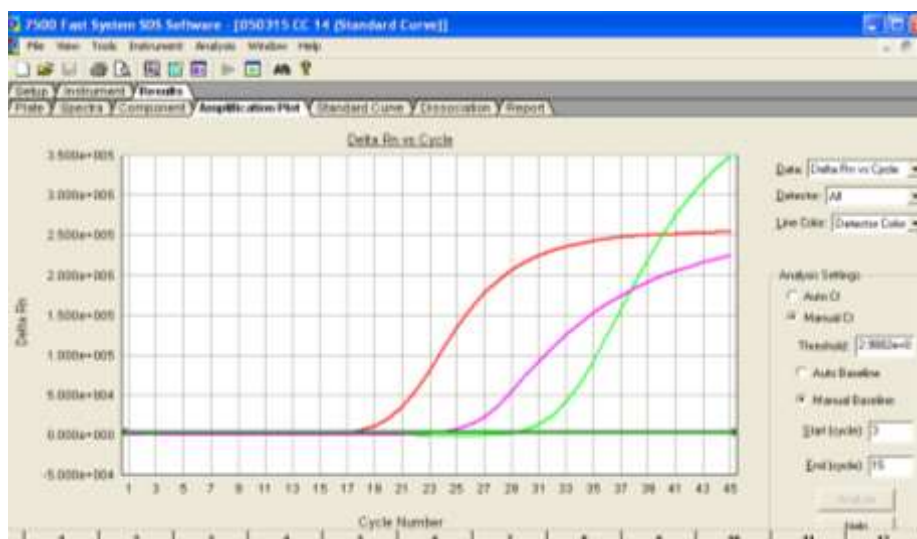


Figura 30.- Muestra positiva a Influenza tipo A H3 Estacional.

**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 31). En plataforma única de influenza se reporta como **NEGATIVO**.



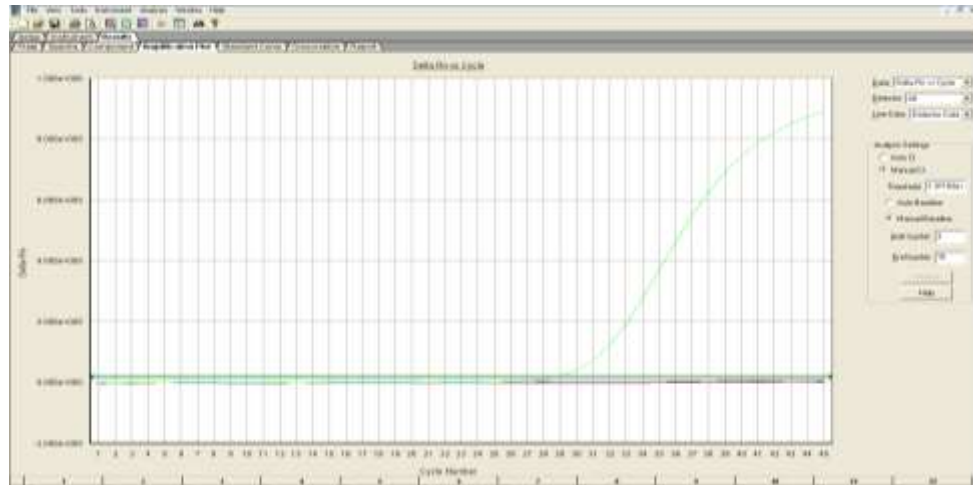


Figura 31.- Muestra con resultado **NEGATIVO**.

**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 32 y 33.

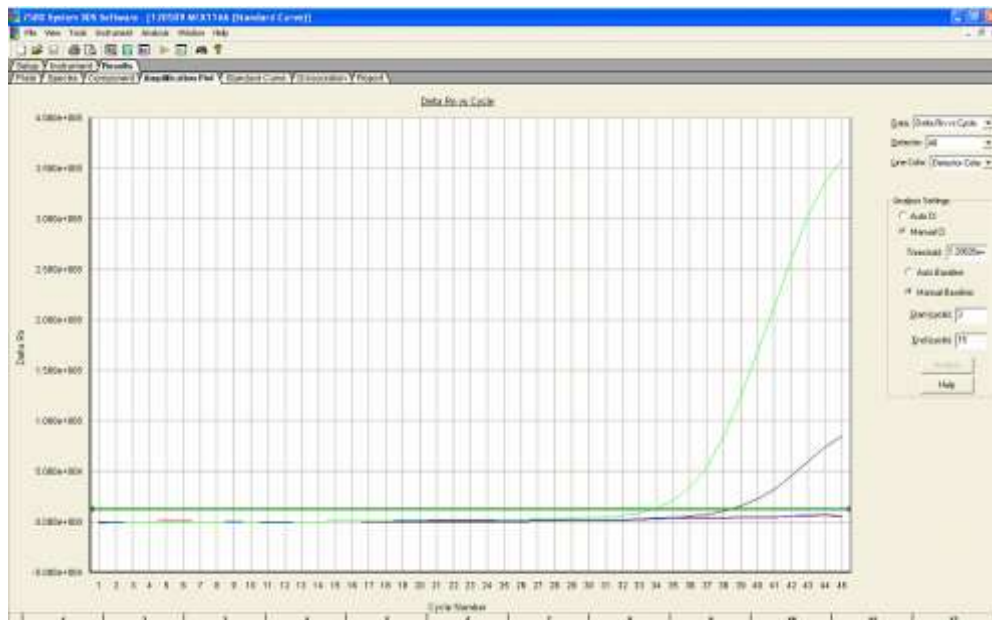


Figura 32.- Muestra con resultado de influencia dudoso.

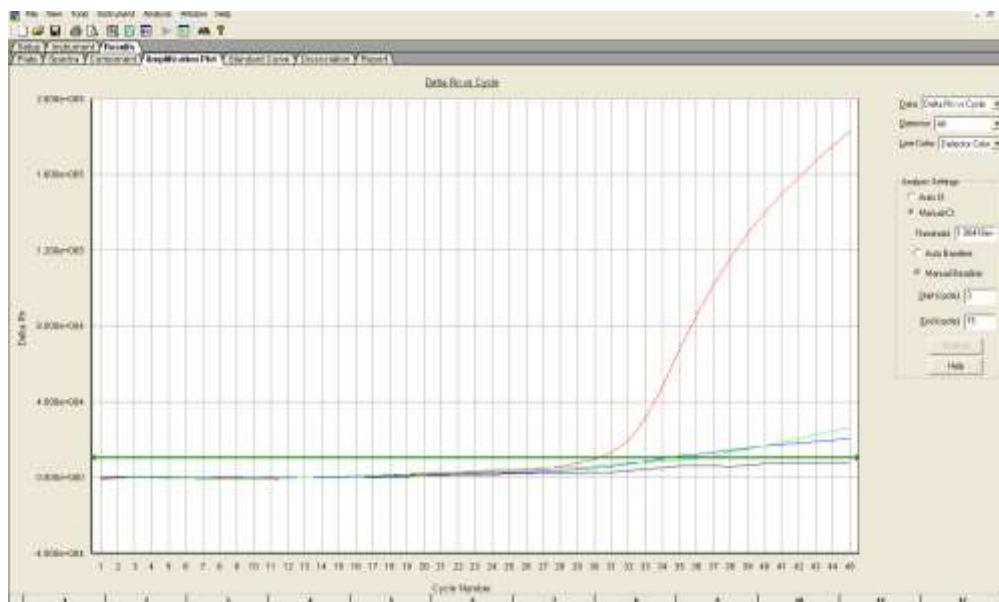


Figura 33.- Muestra con resultado de influenza A dudoso.

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 34. Reportándose el resultado como NA (No Adecuada). En plataforma única de influenza se reporta como NO ADECUADO.



Figura 34.- Muestra que no amplifico, es decir muestra con resultado **NA**.

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

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

#### Equipos

- termociclador AB7500 Fast Real-Time PCR System
- gabinete de bioseguridad tipo II
- estación de trabajo para PCR
- micropipetas automáticas de intervalo 0.5 a 10  $\mu$ L
- micropipetas automáticas de intervalo 1 a 10  $\mu$ L
- micropipetas automáticas de intervalo 20 a 200  $\mu$ L
- micropipetas automáticas de intervalo 100 a 1000  $\mu$ L
- 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  $\mu$ L
- puntas con filtro estériles de 200  $\mu$ L
- puntas con filtro estériles de 1000  $\mu$ L
- microtubos de polipropileno con capacidad de 600  $\mu$ L
- microtubos de polipropileno con capacidad de 1500  $\mu$ L
- microtubos de polipropileno con capacidad de 2000  $\mu$ L con tapa de rosca
- gradillas de plástico para tubos de 1500  $\mu$ L
- 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  $\mu$ L
- bloque de enfriamiento para placas y tiras de tubos
- bolsas de polipropileno
- contenedor para puntas desechables
- gasa estéril
- marcadores indelebles

- Kit de QIAgen OneStep RT-PCR (no. de Catalogo 210212)
- Estuche comercial de Invitrogen Superscript™ III Platinum ® One Step Quantitative Kit
- Agua grado biología molecular (libre de RNasa y Nasa)
- Iniciadores (sentido y antisentido) específicos para el gen de Influenza B (25 µM);
  - BHA-188F forward primer
  - BHA270R reverse primer
- Sondas marcadas específicas para Yamagata (YAM) y Victoria (VIC) (10 µM, 200nM final).
  - Sonda VIC2-VIC
  - Sonda YAM2-FAM
- RNase away
- Controles positivos (Influenza B Victoria, Influenza B Yamagata).

## Medidas de bioseguridad

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

- Mantener como áreas separadas, los lugares destinados para la extracción del material genético, preparación de la mezcla de reacción, el lugar donde se colocarán los extractos del material genético y la colocación de los controles positivos, así como el área donde se encuentran los equipos.
- Debe tenerse en cuenta que el área designada inicialmente para colocar el material genético extraído, no debe ser utilizada para colocar los controles positivos de la reacción, así como es indispensable realizar de manera adecuada, la descontaminación pertinente del gabinete utilizado, cada vez que haya culminado la actividad.
- Asegurarse de contar con equipos y materiales exclusivos de cada área, como pipetas, minicentrífugas y microcentrífugas, así como tubos para minicentrífuga, placas para PCR, tapas ópticas y puntas para cada tipo de pipeta que se utilice.
- Utilizar el equipo de protección personal, el cual debe ser exclusivo para cada una de las áreas.

- Se recomienda que por cada placa completada con los extractos de material genético se utilicen guantes nuevos, o en su defecto, limpiar con abundante alcohol al 70% o solución de ARNsa-Away los guantes ya utilizados, con el fin de evitar contaminación cruzada o cada vez que se sospeche de algún tipo de contaminado.
- Mantener los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos el mayor tiempo posible.
- Mantener la cadena fría en todo momento, para minimizar la degradación de los reactivos utilizados.
- También cabe mencionar que cada vez que se coloque la muestra (material genético) por microtubo en la placa, debe cambiarse la punta y tapar los pozos inmediatamente después de colocar el material genético.
- Al terminar de colocar los extractos, tapar la placa nuevamente con el papel aluminio con el que fue proporcionada inicialmente.
- El material de desecho generado de ésta actividad, debe ser colocado en el contenedor para manejo especial, en el cual se coloca una bolsa transparente para el depósito de éstos.
- Después de haber colocado todos los extractos de ácidos nucleicos, se debe de cambiar de gabinete de bioseguridad o gabinete de PCR para colocar el control positivo, asegurándose de que todas las tapas ópticas de los microtubos de la placa se encuentren perfectamente bien selladas.
- Se utilizará bata desechable nueva, guantes libres de talco nuevos y al igual que en el área limpia, no podrán salir de esta área el equipo y materiales que aquí se utilicen.

## Procedimiento

### *1. Condiciones de almacenamiento de los reactivos*

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

## 2. Rehidratación de iniciadores y de sondas

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

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

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

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

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

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

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

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

Cuadro 11.- Reactivos para q-RT-PCR (Nacional Influenza Centre for Norway, 2010).

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

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

#### 4. Adición de moldes a la mezcla de reacción

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

- Después de haber preparado la mezcla de reacción de acuerdo al cuadro 11 para cada juego de iniciadores y sondas, con ayuda de una micropipeta automática o de repetición, colocar 23 µl de la o las mezclas de reacción en los pozos correspondientes. Se recomienda colocar por columna (de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha), como se muestra en la Figura 35.



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

Figura 35.- Ejemplo de una placa de 96 microtubos para PCR.

- Posteriormente se colocaran 2 µL de agua grado biología molecular en el pozo 1A (Figura 35), esto servirá como control negativo de reactivos (NTC, Negative Template Control), de la mezcla de reacción.
- Se colocan las tapas ópticas únicamente en el pozo marcado como NTC, además, a la placa de microtubos, se le cubre toda su superficie con papel aluminio nuevo y se mantiene a 4 °C mientras no vaya a ser utilizada.
- Una vez organizados los extractos molde se elaborarán las hojas de registro, de acuerdo a la forma en que se colocarán en las placas de microtubos (Figura 36), donde serán ubicados los números correspondientes a cada extracto de ácidos nucleicos.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VIC2-YAM2	A	NTC	M8	↑	↑								M88
VIC2-YAM2	B	M1	M9	↑	↑								M89
VIC2-YAM2	C	M2	M10	↑	↑								M90
VIC2-YAM2	D	M3	M11	↑	↑								M91
VIC2-YAM2	E	M4	M12	↑	↑								M92
VIC2-YAM2	F	M5	M13	↑	↑								M93
VIC2-YAM2	G	M6	M14	↑	↑								M94
VIC2-YAM2	H	M7	M15	↑	↑								PTC

Figura 36.- Ejemplo de la distribución de los ácidos nucleicos molde para la subtipificación de linaje de Influenza B, así mismo la distribución de los controles positivos y negativos en la placa de microtubos para PCR y en la hoja de registro de PCR.

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

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

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

- Encender la Laptop y el equipo AB 7500 Fast colocando la clave y contraseña correspondiente.
- Abrir el software “Applied Biosystems 7500 Fast Dx Systems”, haciendo doble clic sobre el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora (Figura 37).
- El software abrirá exitosamente presentando una ventana con el nombre “Quick Startup document” (inicio rápido de documento, Figura 38).

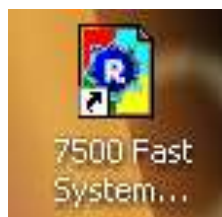


Figura 37.- Reconocimiento del acceso directo al software.



Figura 38.- Ventana de inicio del software.

En la ventana *“Quick Startup document”* (inicio rápido de documento) hacer clic en la opción *“Create New Document”* (crear nuevo documento). Emergerá una ventana con el nombre de *“New Document Wizard”* (ventana de Nuevo Documento), como se observa en la Figura 39.

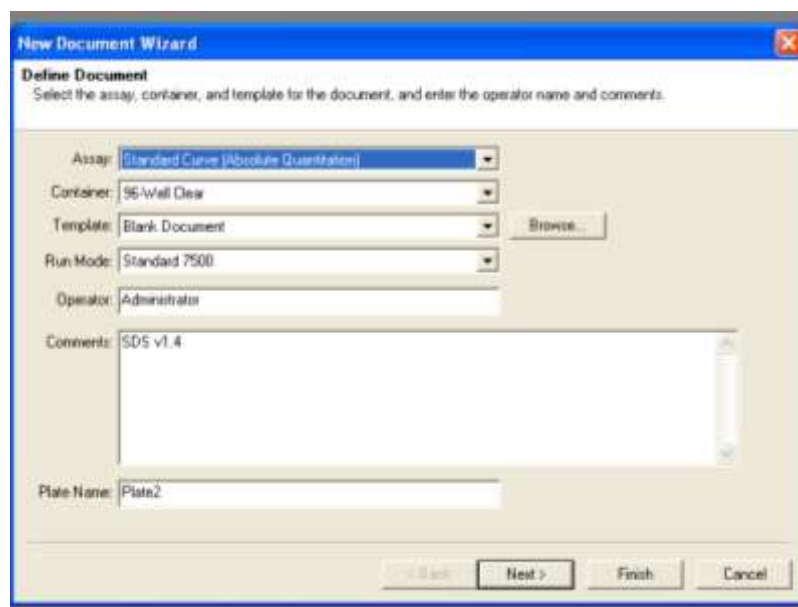


Figura 39.- Ventana para crear un nuevo documento.

En ésta ventana se programará la corrida, para lo cual se presionará el botón “**Browse...**”, el cual se encuentra del lado derecho del parámetro “**Template**”, lo que dará lugar a la plantilla previamente programada, ejemplos en las Figuras 40 y 41.

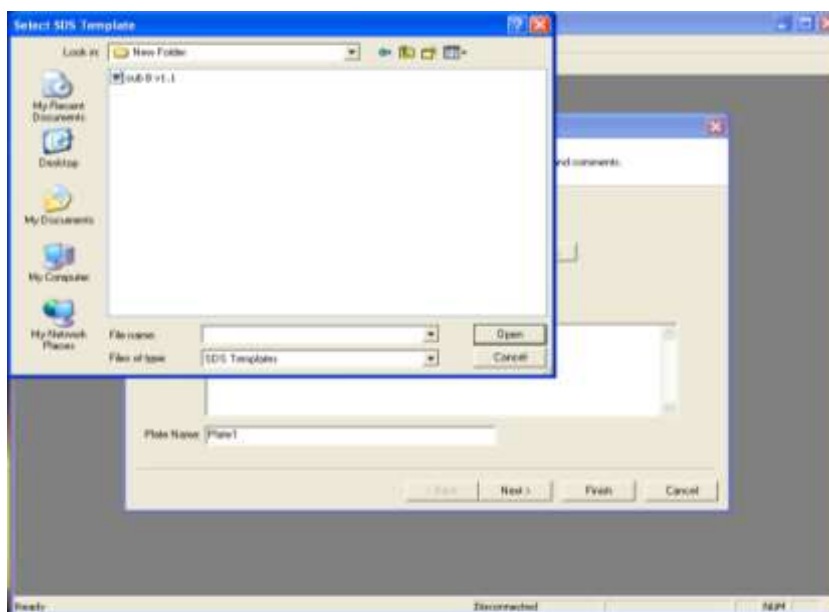


Figura 40.- Localización de la plantilla a utilizar.

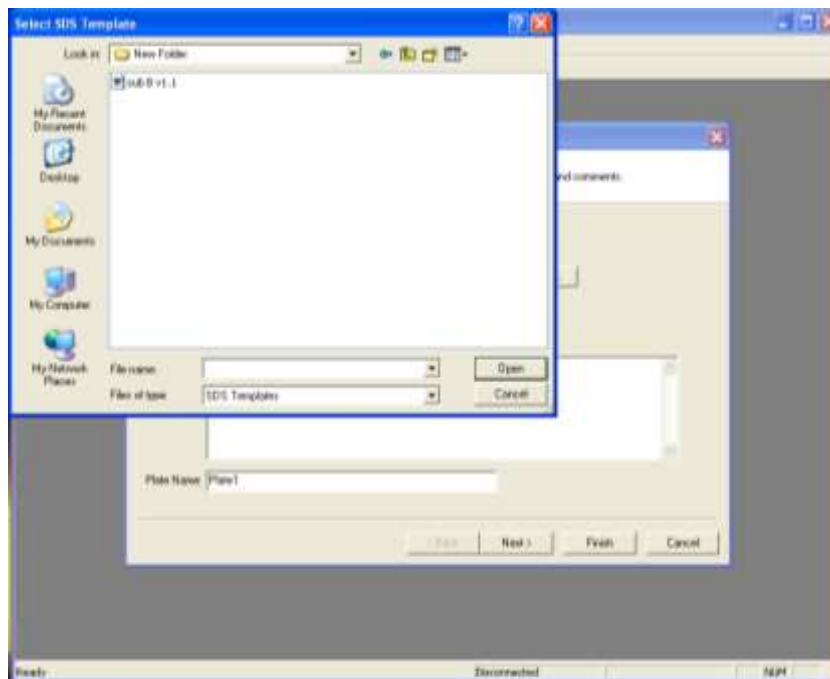


Figura 41.- Selección de la plantilla a utilizar.

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

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

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

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

Después de que el instrumento haya iniciado, en la pantalla aparecerá la plantilla elegida y programada anteriormente con los marcadores que deseamos (Figura 42), en esta plantilla colocaremos los números de los extractos de RNA que analizaremos.

La forma de ingresar las muestras en la plantilla, será empezando por la columna 1 de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha, cada celda corresponderá a un pozo de la placa de 96 pozos para qRT-PCR, la selección de las celdas se realizará como si se tratara de una hoja de Excel (ejemplo, Figura 42).

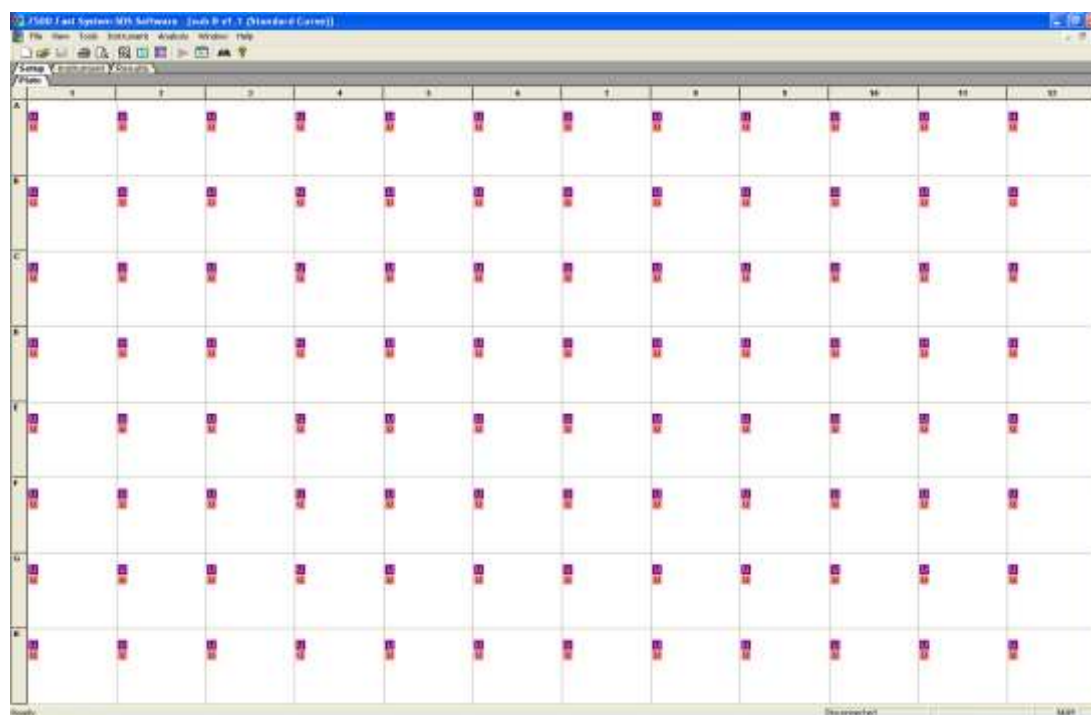


Figura 42.- Programación de las celdas de la plantilla.

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

En esta parte de la programación se corroborarán las condiciones de termociclado, las cuales fueron establecidas al momento en que se creó la plantilla; el volumen de la reacción y el modelo en que fue programada la corrida (Figura 43).

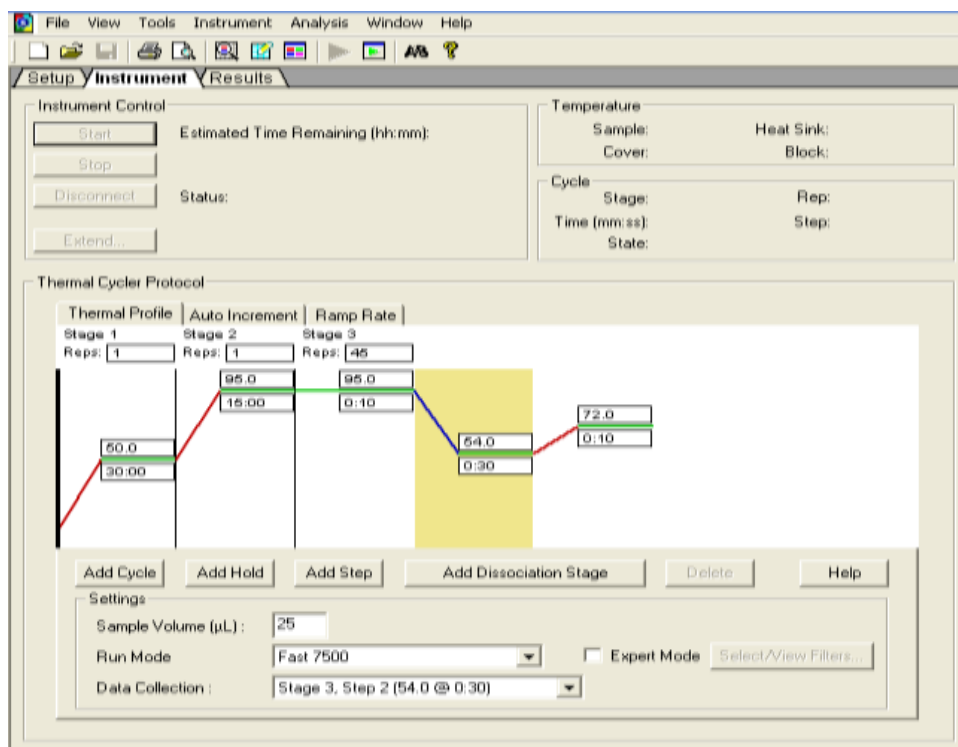


Figura 43.- Programación de los ciclos para la tipificación de linaje de Influenza B.

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

Corroborar que la corrida fue guardada, dar clic en el botón **"Start"** que se encuentra en la parte superior izquierda de la misma ventana (Figura 43). La corrida tardará aproximadamente 2 horas con 22 minutos para completarse.

## 6. Interpretación por laboratorio

Después de que la corrida de qRT-PCR ha sido completada, aparecerá en la pantalla de la computadora un mensaje que indica el término de la corrida (Figura 44), dar clic en el botón de “OK”, el cual se encuentra en el centro de la pantalla.

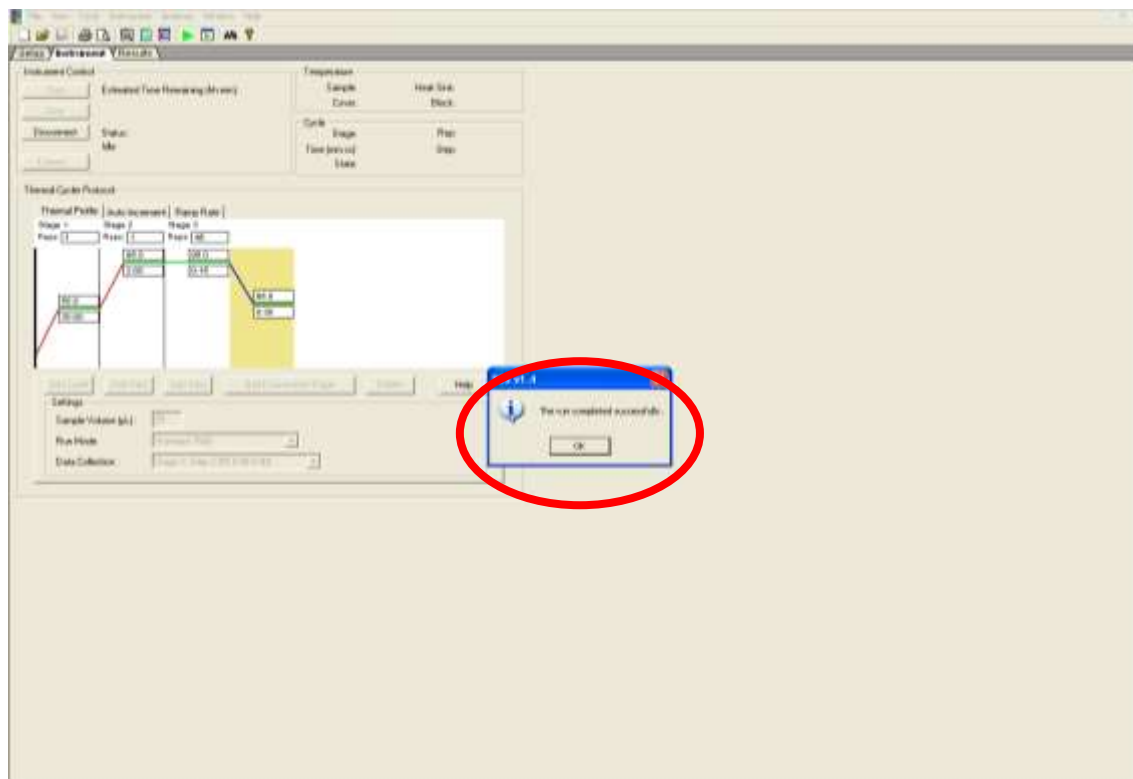


Figura 44.- Término de la corrida de qRT-PCR para la subtipificación de linaje de Influenza B.

Se selecciona la pestaña “**Results**” (Resultados), la cual se encuentra debajo de la barra de menús de la ventana (Figura 45), 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**.



La subpestaña que aparecerá activa al momento de escoger la pestaña de **Results** será la de **Plate**, aquí podremos observar las celdas con los números de las muestras que programamos al inicio de la corrida, las cuales presentarán la leyenda de **Undet.**, ésta detección es de manera cualitativa y no cuantitativa por lo cual no se ocupa una curva estándar de concentración de RNA del virus por lo tanto no se cuantifica el material genético presente en cada muestra, razón por la cual el equipo emite dicha leyenda (Figura 45).

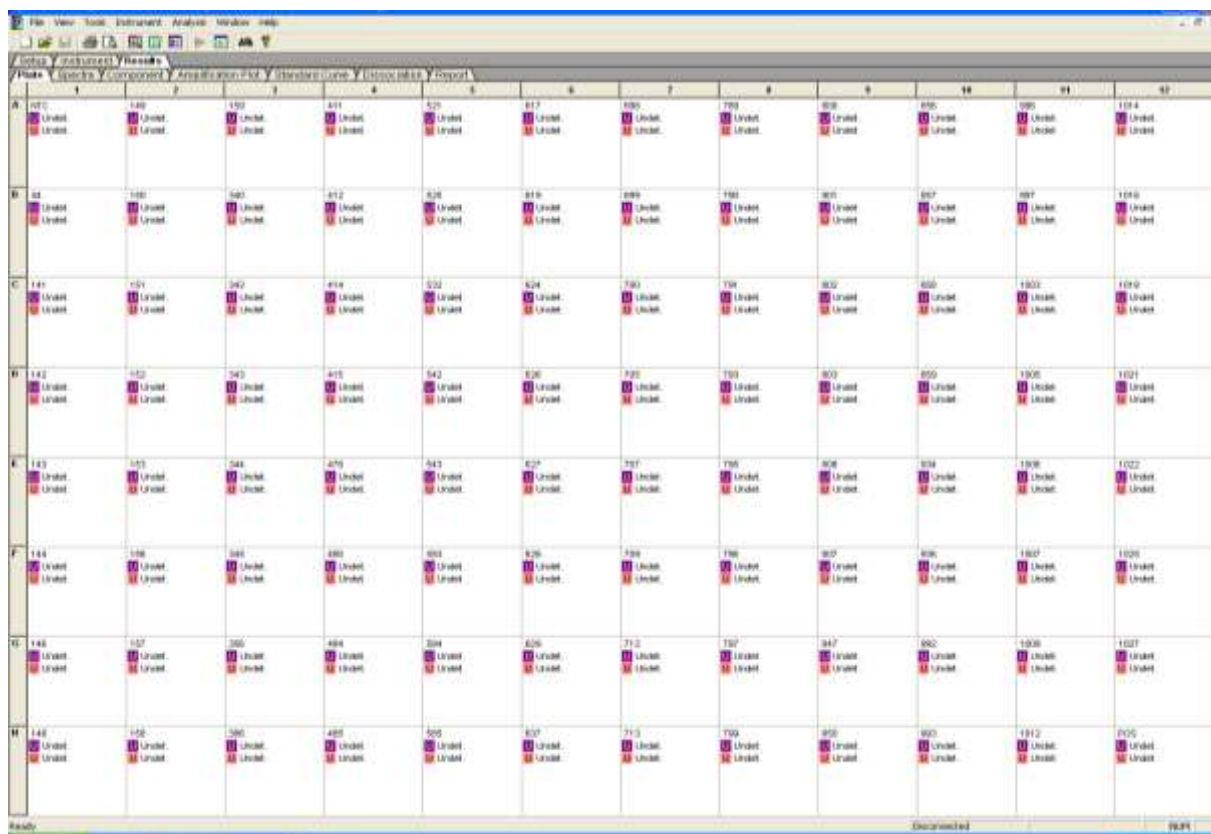


Figura 45.- Inicio de revisión de resultados, pestaña de **Results** subventana **Plate**.

Al terminar la corrida, se hará uso de la subpestaña **Amplification Plot**, en la cual se mostrará una ventana en la que se ha registrado la fluorescencia que ha sido emitida por la amplificación que se encuentra en cada pozo de acuerdo al ciclo del termociclado (Figura 46).

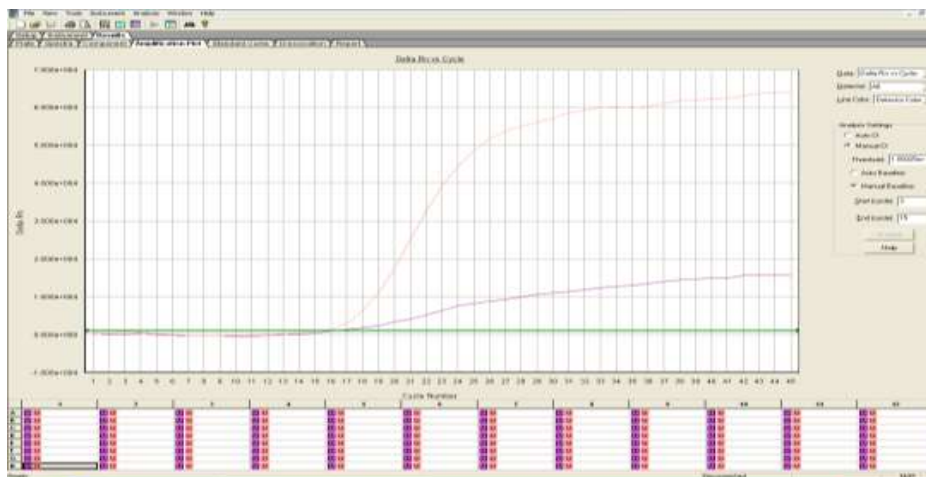


Figura 46.- Observación de las curvas de amplificación de los controles de la qRT-PCR.

En la parte inferior de ésta misma ventana, se encuentra un cuadro con 8 renglones y 12 columnas, de los cuales se seleccionarán las celdas en donde se encuentran los control de la reacción de la qRT-PCR, primero se selecciona el control negativo, el cual se encontrará en la celda A de la columna 1, así como el control positivo, el cual será colocado con base en la cantidad de muestras que se trabajarán, siempre es colocado al final de las muestras; ambos controles se seleccionarán simultáneamente, manteniendo la tecla Control presionada para que sean visualizados (Figura 47).

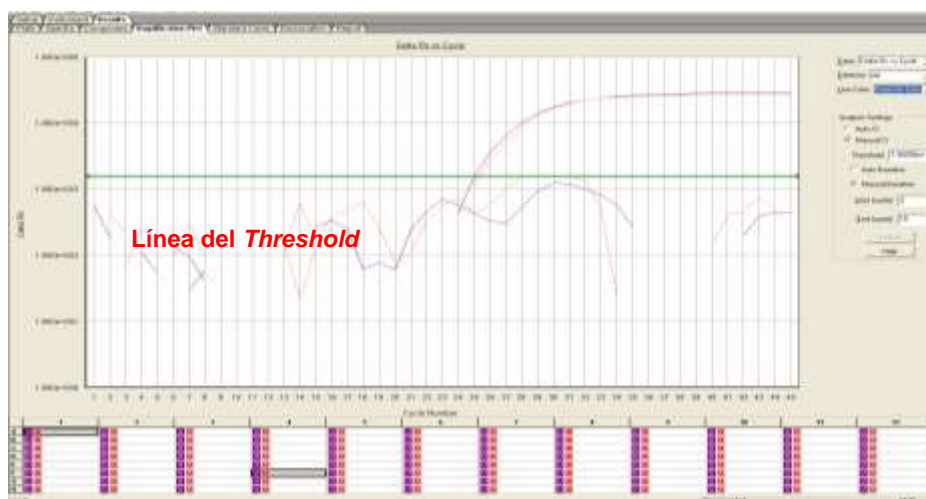


Figura 47.- Observación de las curvas de amplificación de los controles de la qRT-PCR con los colores seleccionados para cada marcador.

Una vez seleccionados los controles, verificar que los parámetros que se encuentran en la parte derecha de la ventana, se encuentren programados

correctamente para poder realizar una adecuada lectura de los resultados de la qRT-PCR, los parámetros antes mencionados son los siguientes:

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

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

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

Posteriormente se cambiará de escala logarítmica a las curvas de amplificación, a escala lineal, esto para poder evidenciar de mejor manera las curvas sigmoideas de amplificación. Se llevará a cabo de la siguiente manera: dar doble clic en el eje de las “y”, o en el eje de “**Delta Run**”, dando lugar a un cuadro con el nombre de “**Graph Settings**” (Ajuste del a gráfica), en este cuadro se localizará la parte denominada como **Post Run Settings** (Ajuste postcorrida), en la cual podremos observar el parámetro llamado “Y-Axis” y la opción de “**Log**” es la que se encuentra activada.

Para poder observar las curvas sigmoideas de amplificación es necesario activar la opción “**Linear**”, la cual se encuentra arriba de la opción “**Log**”, solo basta con seleccionar esta opción para que el software modifique la escala, posterior a este paso, basta con presionar el botón “**Apply**” (Aplicar), el cual se

encuentra en la parte inferior del cuadro, y finalizará la acción presionando el botón “OK” el cual se encuentra igualmente en la parte inferior del cuadro.

Una vez realizado el paso anterior, observar que los gráficos que se muestran en la pantalla se presenten de forma sigmoidea (Figura 48).

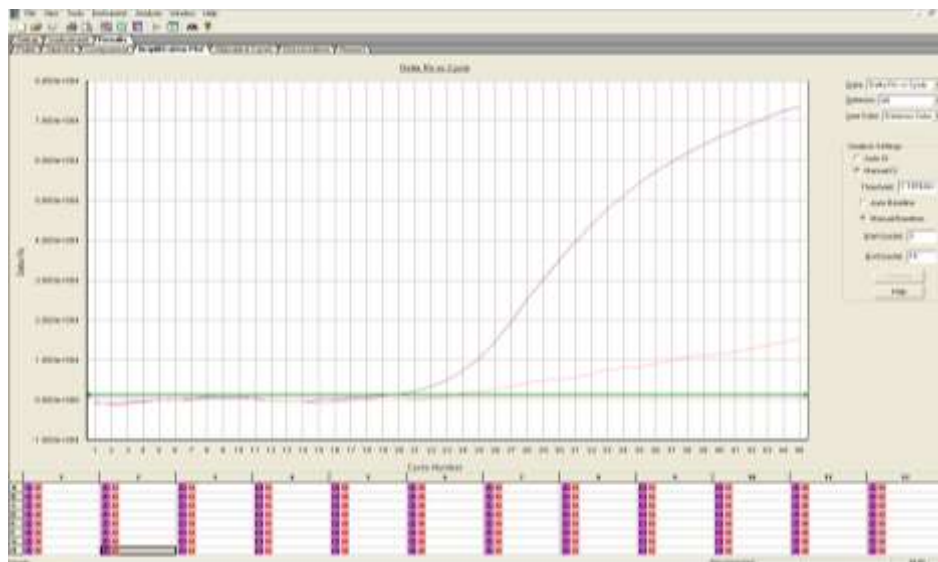


Figura 48.- Forma lineal de las curvas sigmoideas de amplificación, Control Negativo y Control Positivo.

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

La lectura se realizará de la misma manera que como se programó la corrida, así como el llenado del formato correspondiente (Figura 49).

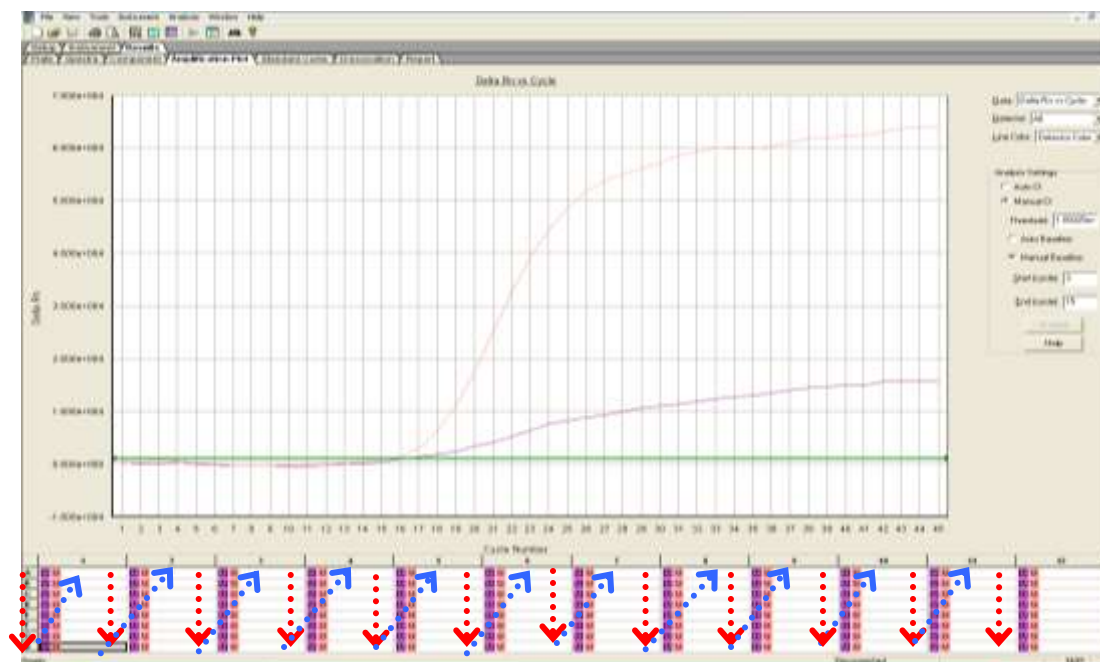


Figura 49.- Forma de leer los resultados de qRT-PCR.

### Interpretación de las curvas de amplificación

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Linaje Victoria:** Marcador para la determinación del linaje Victoria para el virus de Influenza tipo B (*línea violeta*) (Figura 50). El resultado será interpretado como INFLUENZA B LINAJE VICTORIA

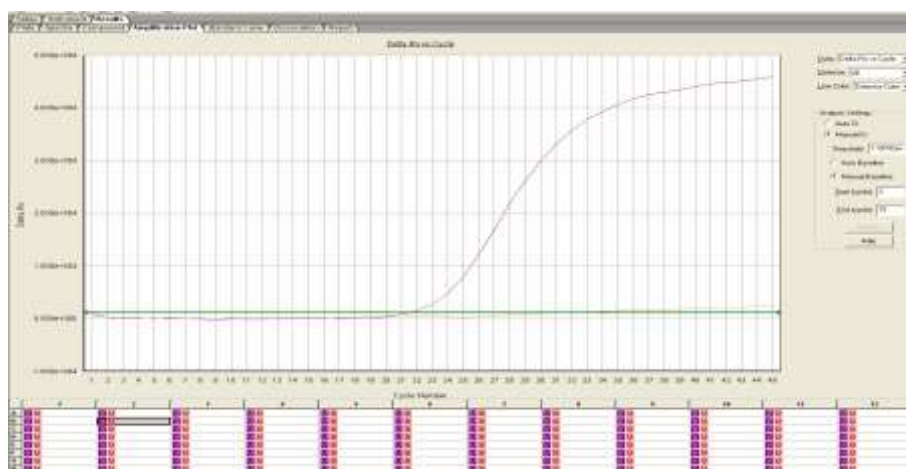


Figura 50.- Muestra de Influenza B de linaje Victoria.

**Linaje Yamagata:** Marcador para la determinación del linaje Yamagata para el virus de Influenza tipo B (*línea rosa*) (Figura 51). El resultado será interpretado como INFLUENZA B LINAJE YAMAGATA

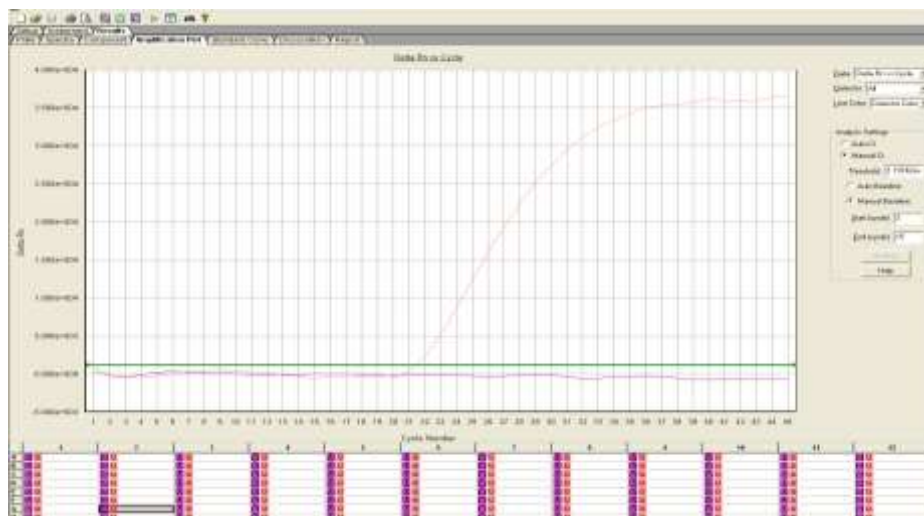


Figura 51.- Muestra de Influenza B de linaje Yamagata.

Existen resultados poco frecuentes, en los cuales no se observan curvas de amplificación, es decir, únicamente se muestra la fluorescencia emitida por los reactivos (Figura 52), por lo tanto, el resultado que se emitirá será “**LINAJE NO DETERMINADO**” (ND). Esto puede ser consecuencia de un mal manejo de la red fría ( $2 - 8^{\circ} \text{C}$ ), desde la determinación de influenza B hasta la adición de los templados.

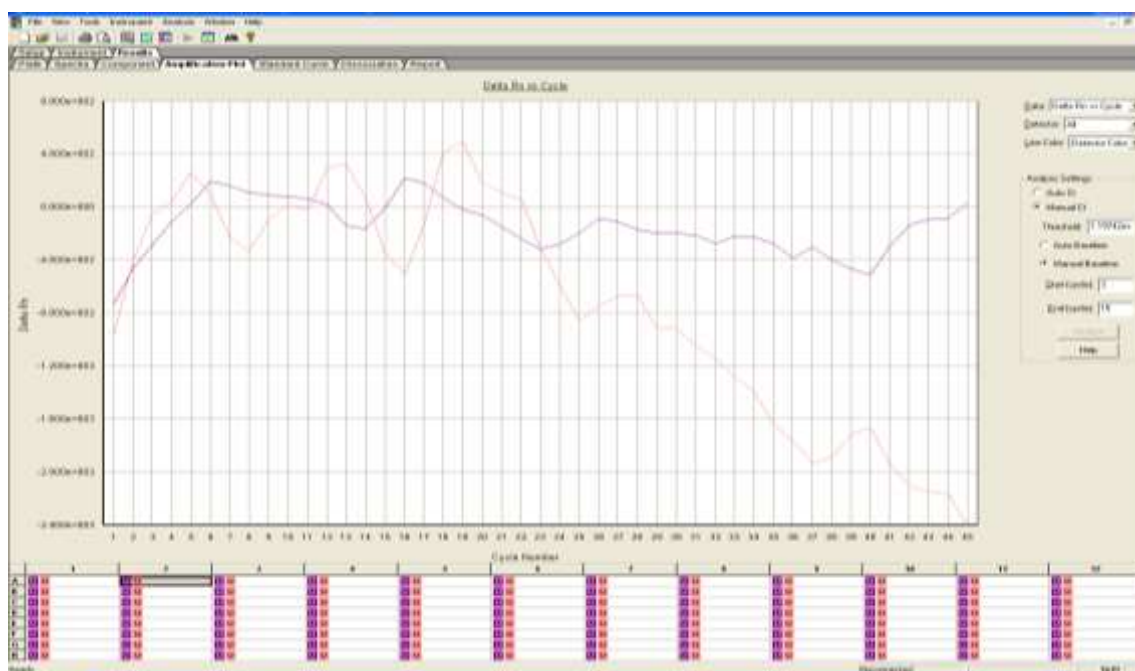




Figura 52.- Ejemplo de una muestra con resultado “**Linaje no determinado**”.

Un resultado que se observa frecuentemente, es cuando se presentan líneas no sigmoideas de amplificación, estas amplifican en Cq´s tardíos (mayores a 37); estos resultados son dudosos, y se repiten para descartar un resultado erróneo; si después de la repetición se confirma el resultado, se interpretará como POSITIVO AL MARCADOR QUE ESTA AMPLIFICANDO. (Figuras 53 y 54).

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

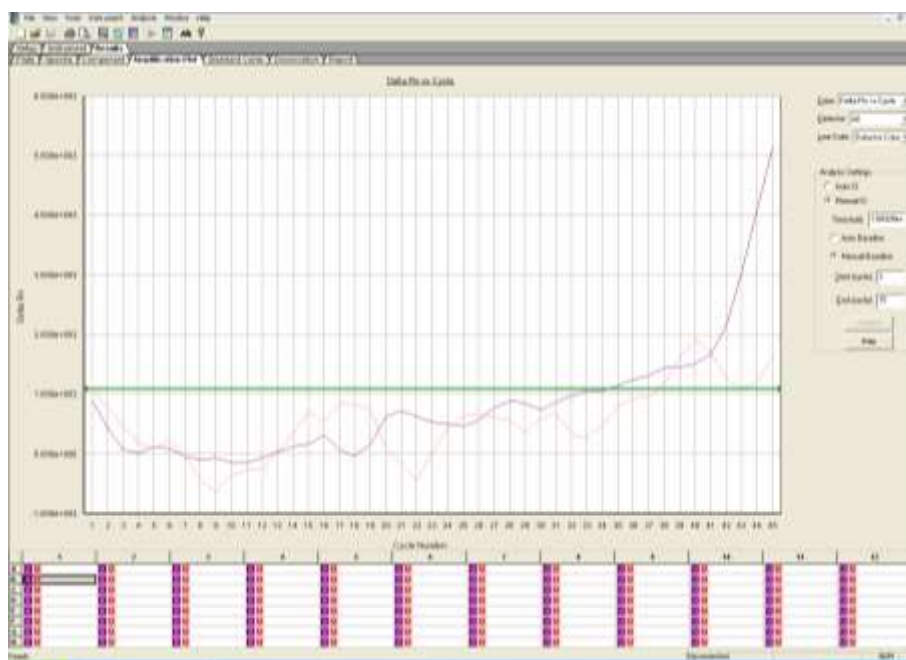


Figura 53.- Muestra dudosa que será sometida a repetición de extracción y qRT-PCR.



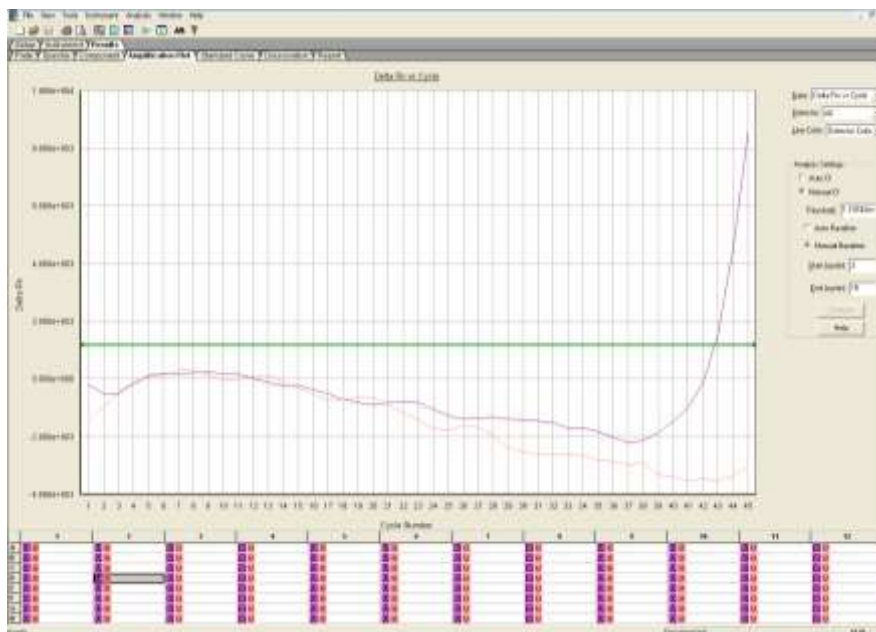


Figura 54.- Muestra sometida a repetición, se confirma el resultado “Positivo a linaje correspondiente”.

#### 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  $\mu$ L
- micropipetas automáticas de intervalo 1 a 10  $\mu$ L
- micropipetas automáticas de intervalo 20 a 200  $\mu$ L
- micropipetas automáticas de intervalo 100 a 1000  $\mu$ L
- 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  $\mu$ L
- puntas con filtro estériles de 200  $\mu$ L
- puntas con filtro estériles de 1000  $\mu$ L
- dispensadores con capacidad de 1250  $\mu$ L
- microtubos de polipropileno con capacidad de 1500  $\mu$ L
- microtubos de polipropileno con capacidad de 600  $\mu$ L
- microtubos de polipropileno con capacidad de 2000  $\mu$ L con tapa de rosca
- gradillas de plástico para tubos de 1500  $\mu$ L
- 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  $\mu$ L
- 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) 229E, OC43, HKU1, NL63
  - ✓ Adenovirus (HAdV)
  - ✓ Rhinovirus (HRV)
  - ✓ Enterovirus (HEV)
  - ✓ Bocavirus (HBoV)
  - ✓ RNasa P Humana (RP)
- RNase away
- Controles positivos para: Virus Sincicial 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

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.

### 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  $\mu\text{L}$ , las cuales serán las que se irán tomando como soluciones de trabajo. Pueden mantenerse de  $2\text{ a }8\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 12, 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.
- 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 12.- Reactivos para RT-PCR en tiempo real

















































































Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
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 12, dispensar 20  $\mu\text{L}$  de cada una de ellas con una micropipeta, colocándolas individualmente por pozo de izquierda a derecha de acuerdo con la Figura 55, este procedimiento se debe de hacer para cada una de las mezclas diferentes que se han preparado.

2

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

- Posteriormente se colocaran 5  $\mu$ 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 55).
- 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.

- 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 56), 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
HPV1	C	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HPV2	D	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HPV3	E	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	CRE	PTC
HPV4	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 56.- 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 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 56)

- 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  $\mu$ L de los controles positivos (PTC) en el pozo correspondiente. (Figura 56)
- 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 57).

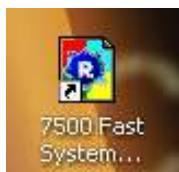
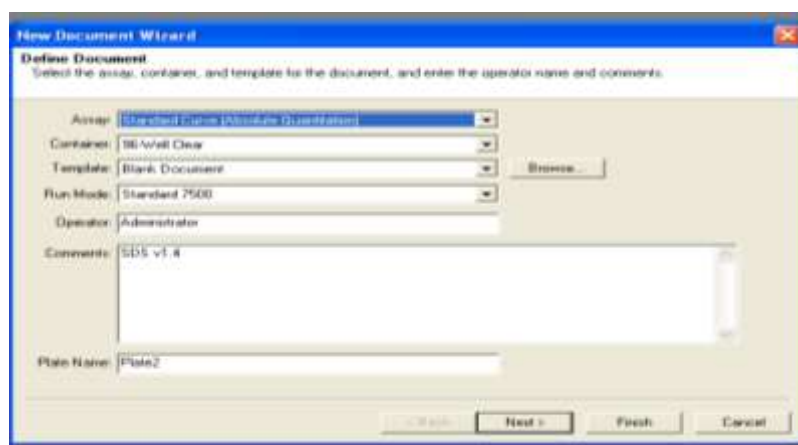


Figura 57.- Reconocimiento del acceso directo al software.

- El software abrirá presentando una ventana con el nombre "**Quick start up document**" (inicio rápido de documento, Figura 58).



- 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 59.



- 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 60), 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 registro correspondiente. Ingresar el nombre de los controles positivos en la columna correspondiente (Figura 60 y 61).

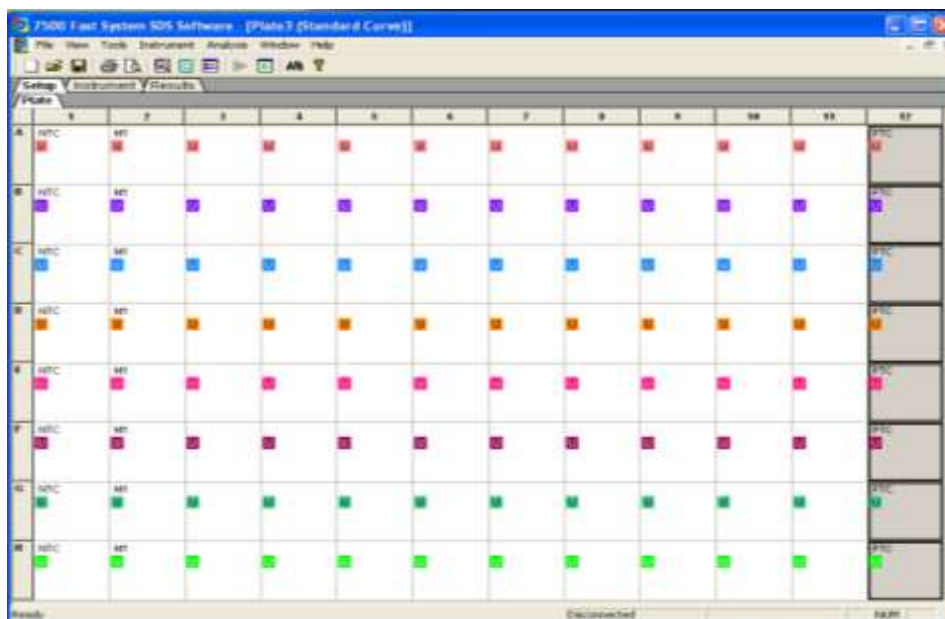


Figura 60.- Ingreso de los extractos a la platilla.

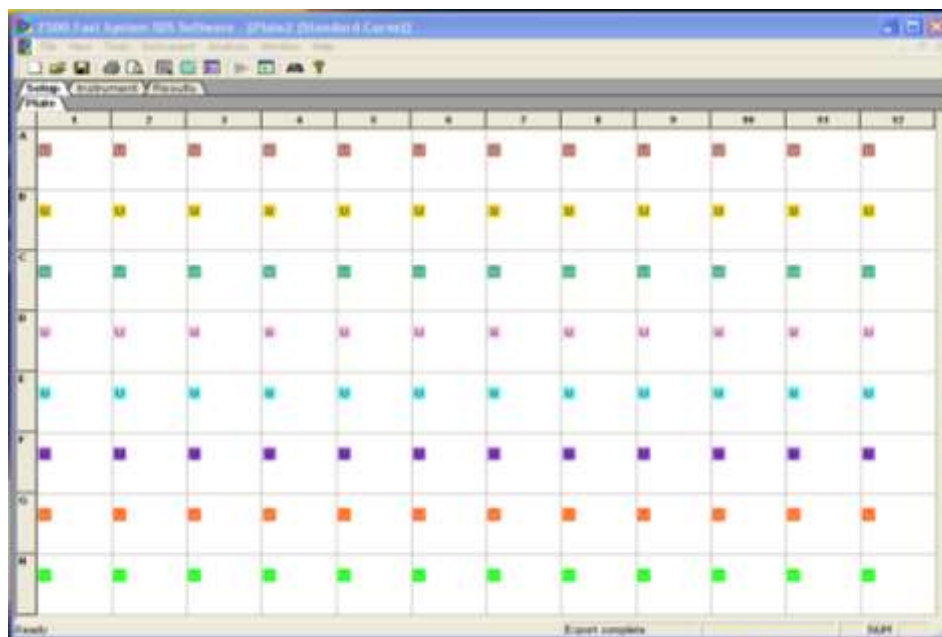


Figura 61.- Ingreso de los extractos a la platilla.

- 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 62).
- 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 62).
- Dar clic en el botón **Start** (comenzar) que se encuentra en la parte superior izquierda de la ventana (Figura 62). La corrida durará 1 hora con 42 minutos para completarse totalmente.

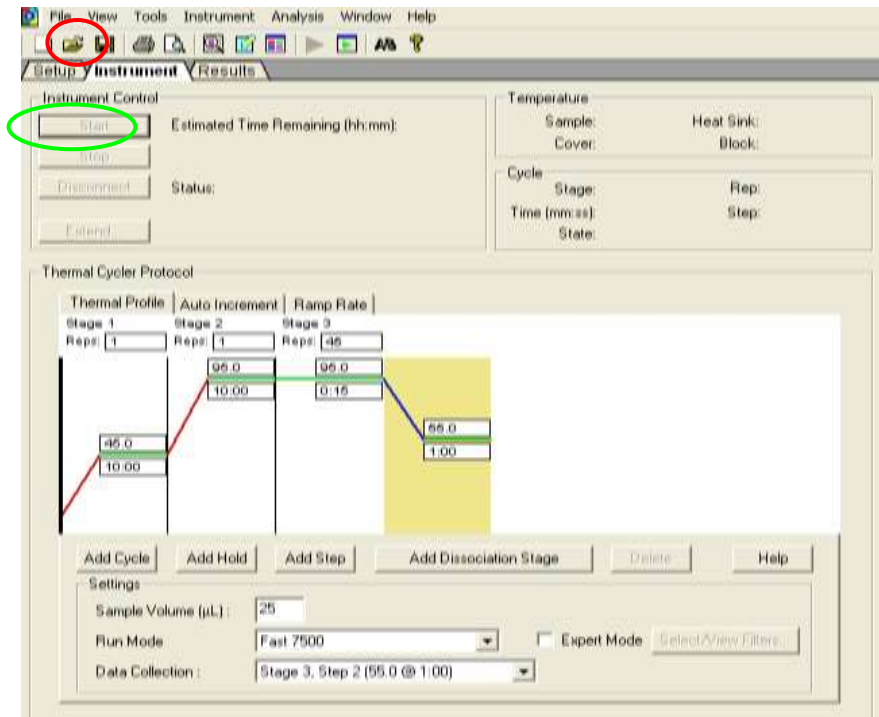


Figura 62.- Programación de las condiciones de corrimiento del termociclador.

## 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 63); presionar el botón OK.

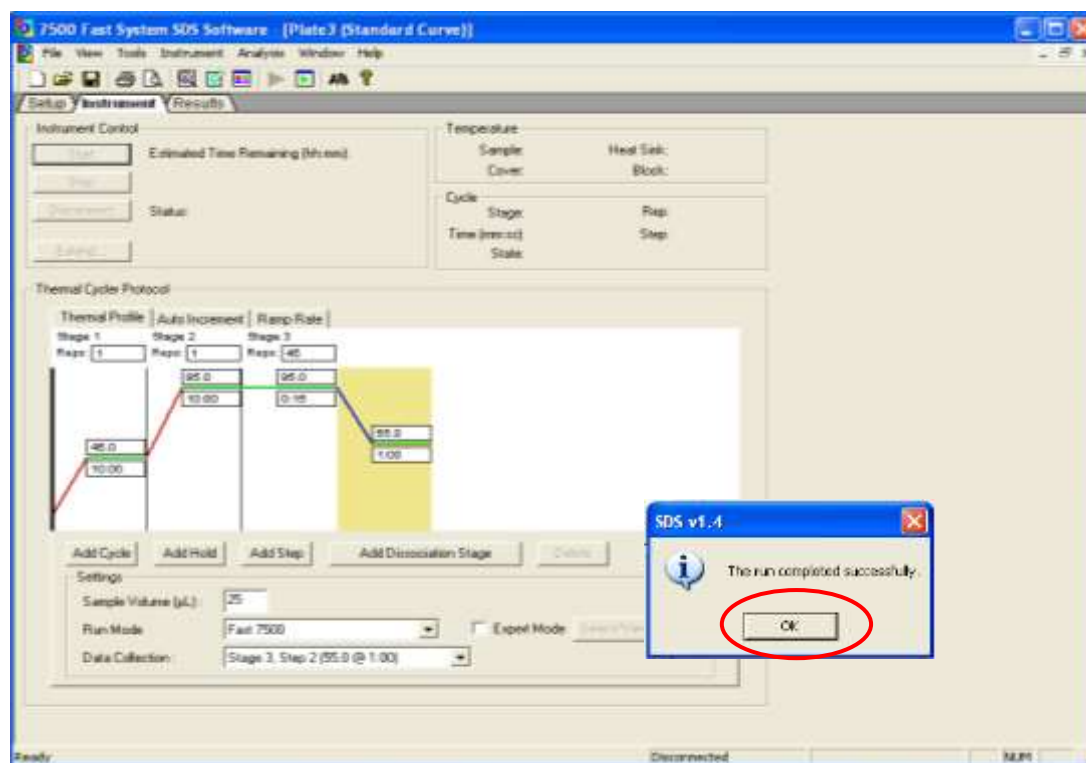


Figura 63.- Pantalla de término de la corrida de qRT-PCR para Otros Virus Respiratorios.

- 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 64).

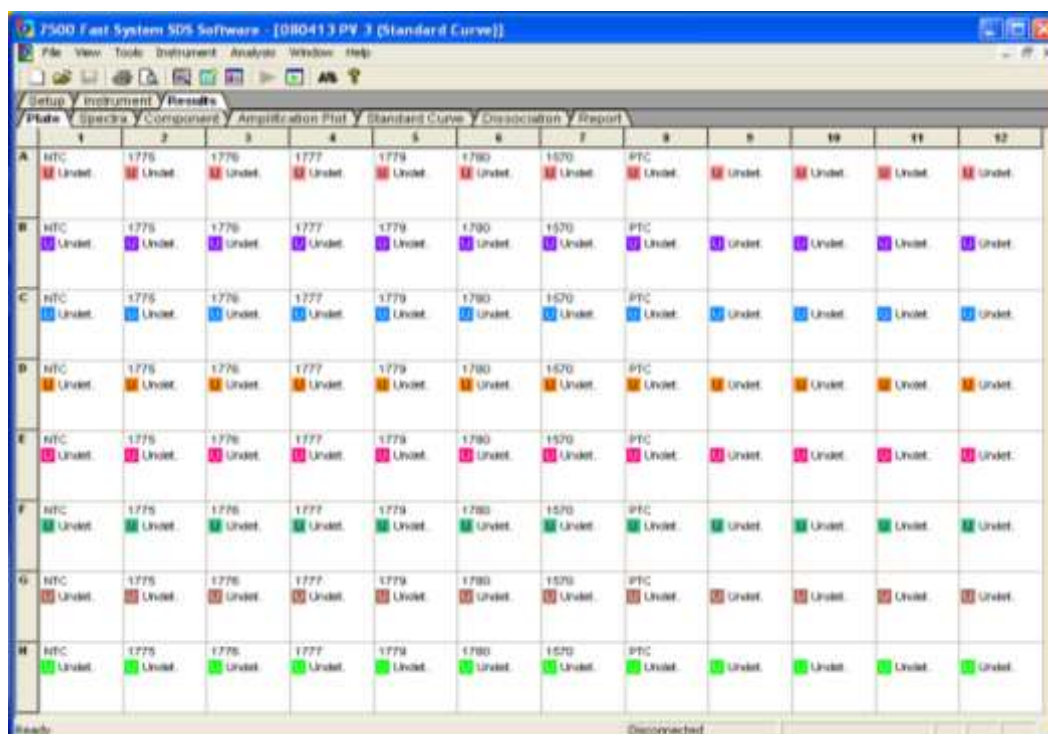


Figura 64.- Inicio de revisión de resultados, pestaña de **Results** subpestaña **Plate**.

- 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 64).
- 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 controles positivos (columna 12 o donde se hayan colocado) al mismo tiempo, como se muestra en la figura 65.



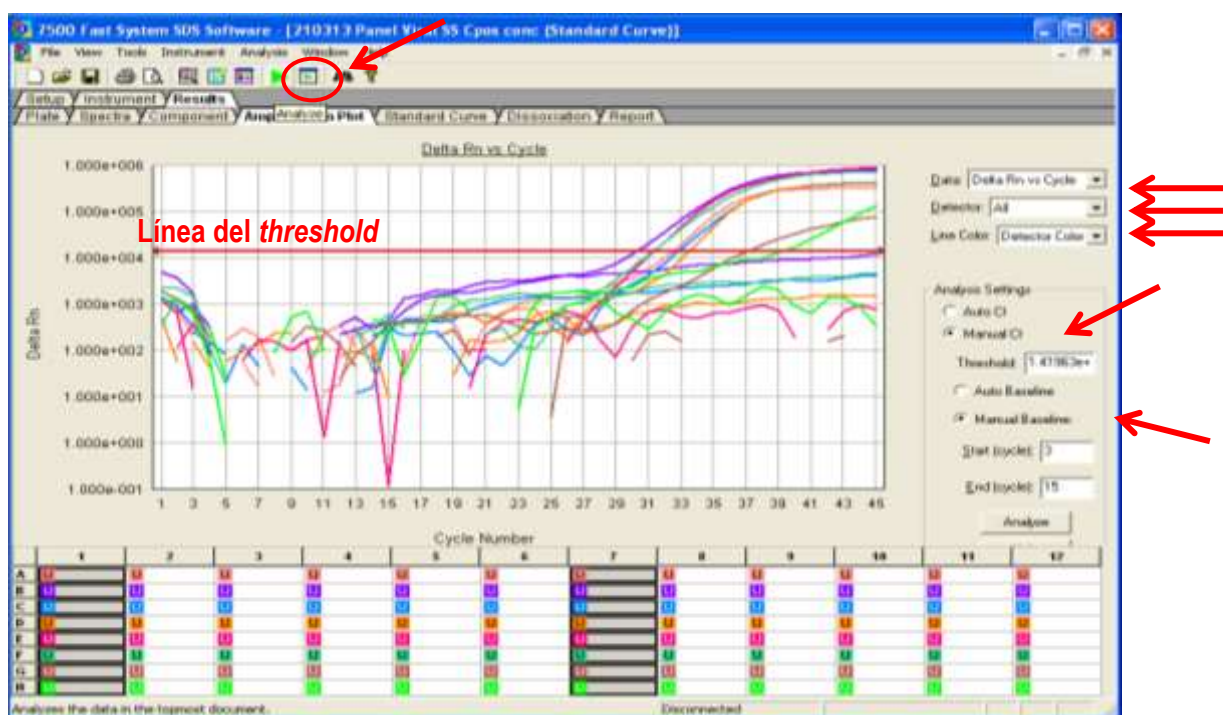


Figura 65.- Ajuste de Threshold y de parámetros para la lectura.

- 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:
  - d) Parámetro **Data**: elegir la opción de **Delta Run vs. Cycle**
  - e) Parámetro **Detector**: elegir la opción de **All**
  - f) 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 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 65. 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 66.

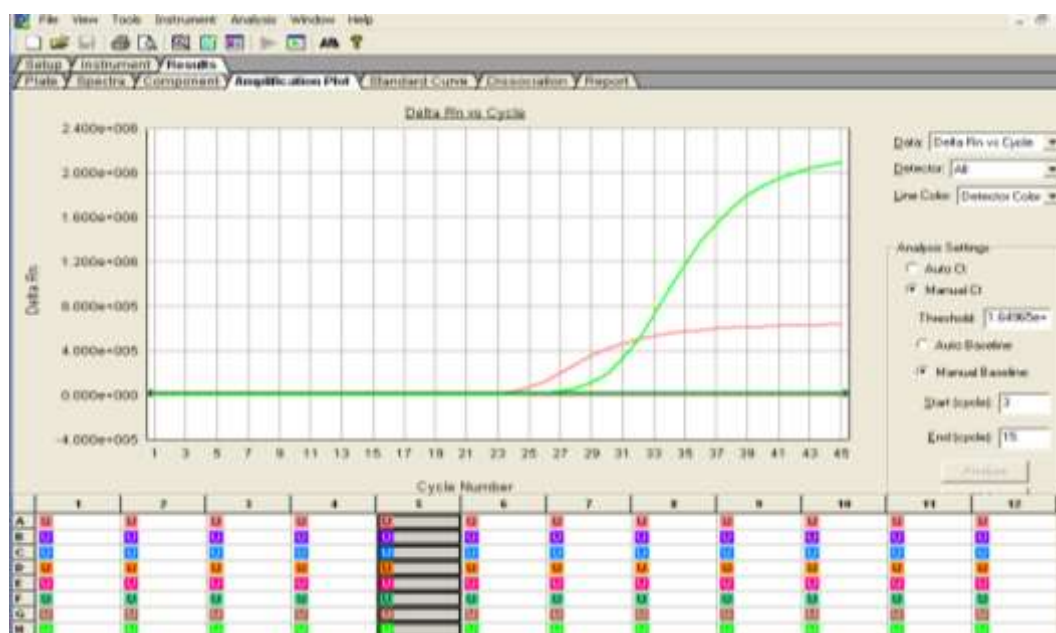


Figura 66.- Forma lineal de las curvas sigmoideas de amplificación y controles positivos

La lectura de las curvas de amplificación de los extractos se realiza por columnas, observar figura 67.

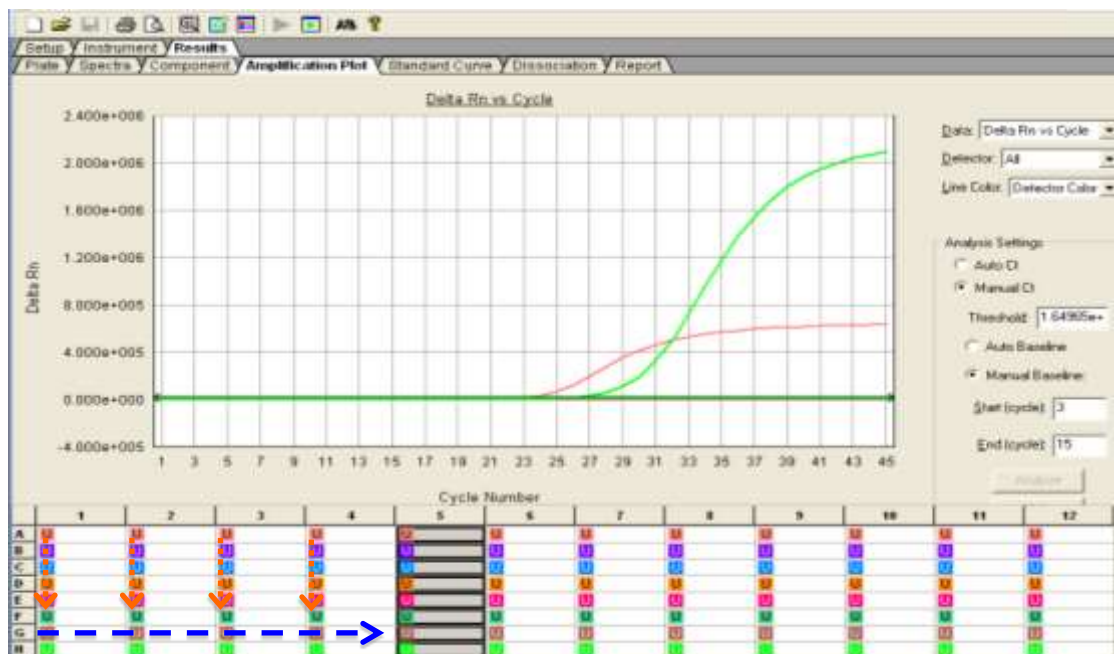


Figura 67.- Representación de la lectura de las amplificaciones obtenidas para el diagnóstico de Otros Virus Respiratorios.

### *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, 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 68).

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

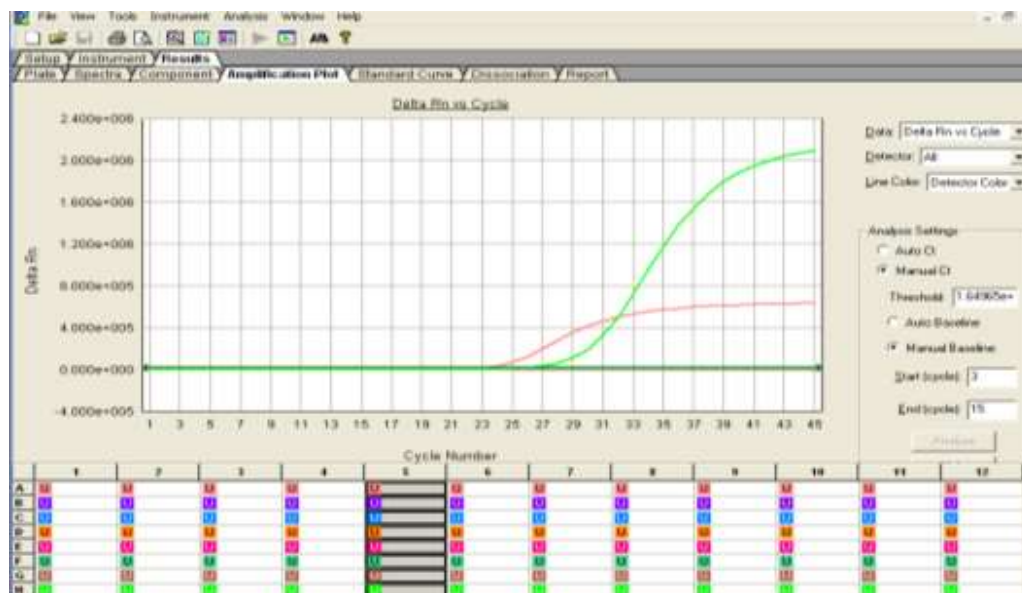


Figura 68.- Muestra positiva para Virus Sincicial Respiratorio.

- 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 69).

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

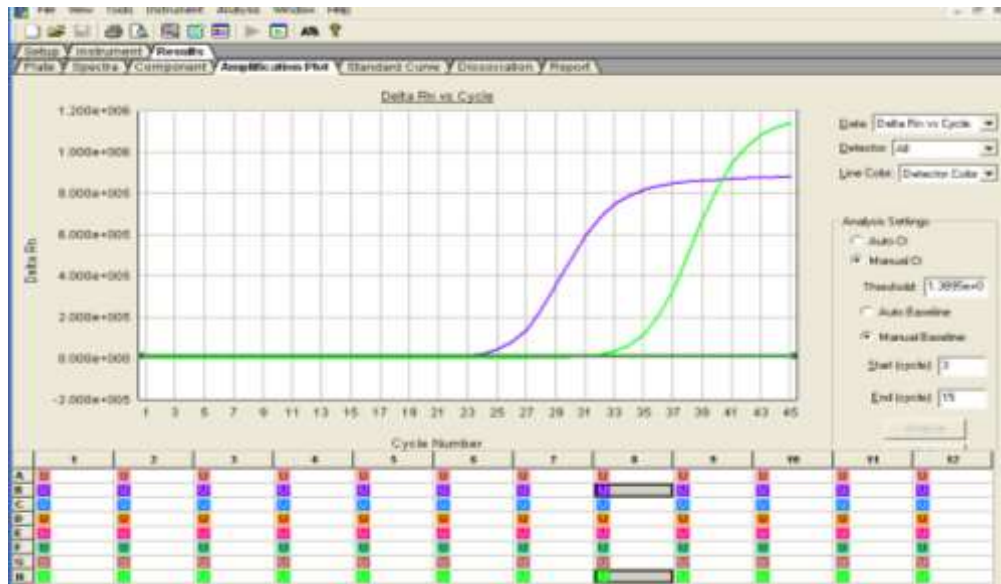


Figura 69.- Muestra positiva para Metapneumovirus (HMPV).

- 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 70).

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

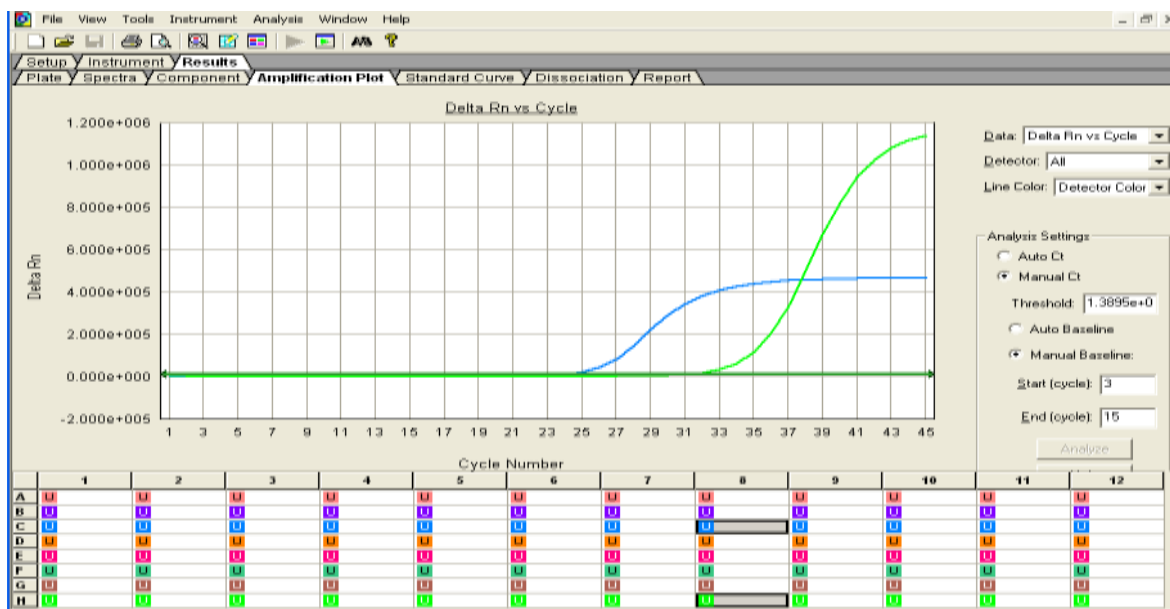


Figura 70.- Muestra positiva a Parainfluenza 1.

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 71).

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

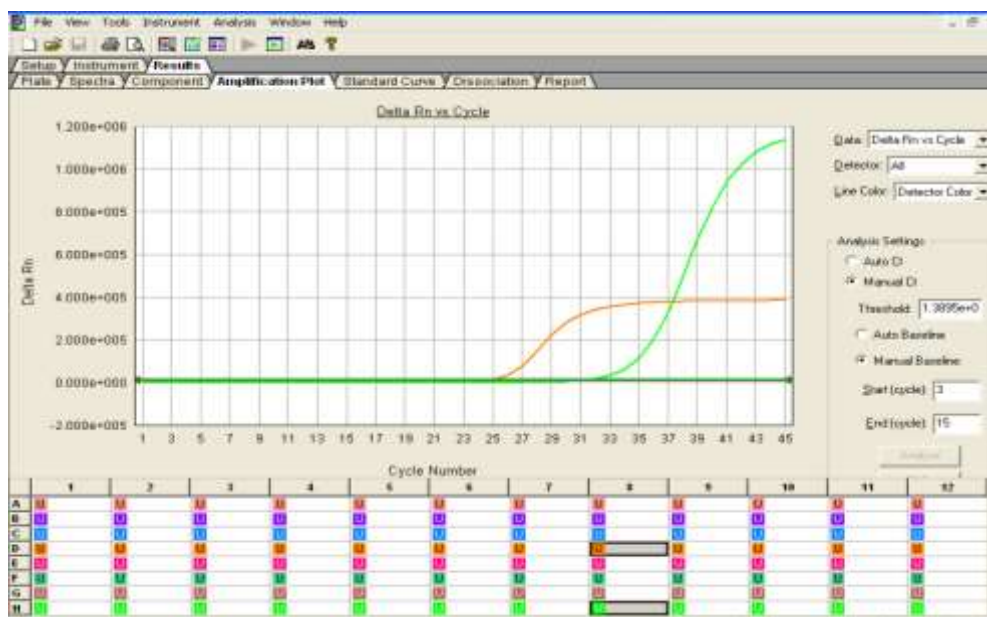


Figura 71.- Muestra positiva para Parainfluenza 2.

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 72).

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



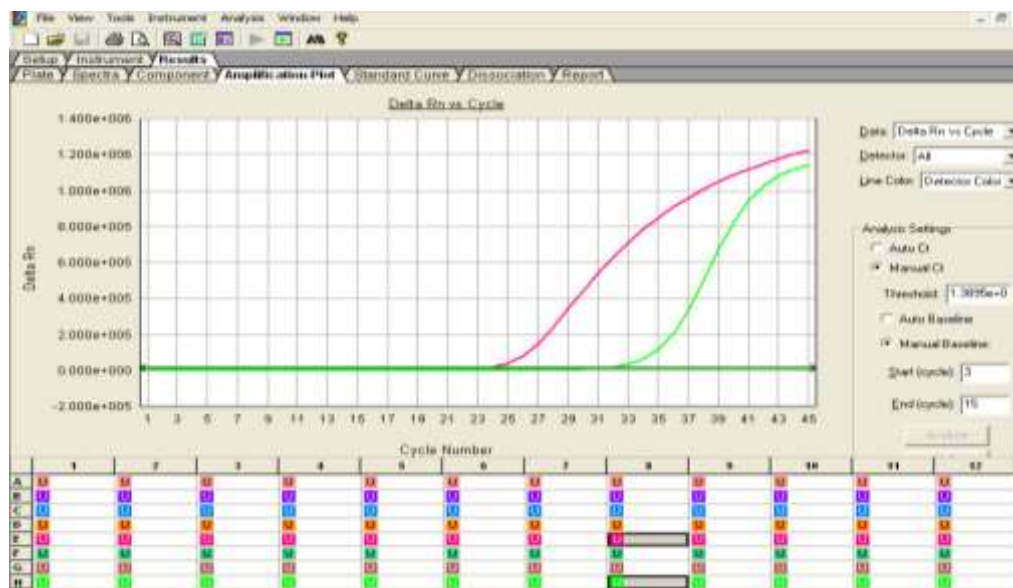


Figura 72.- Muestra positiva para Parainfluenza 3.

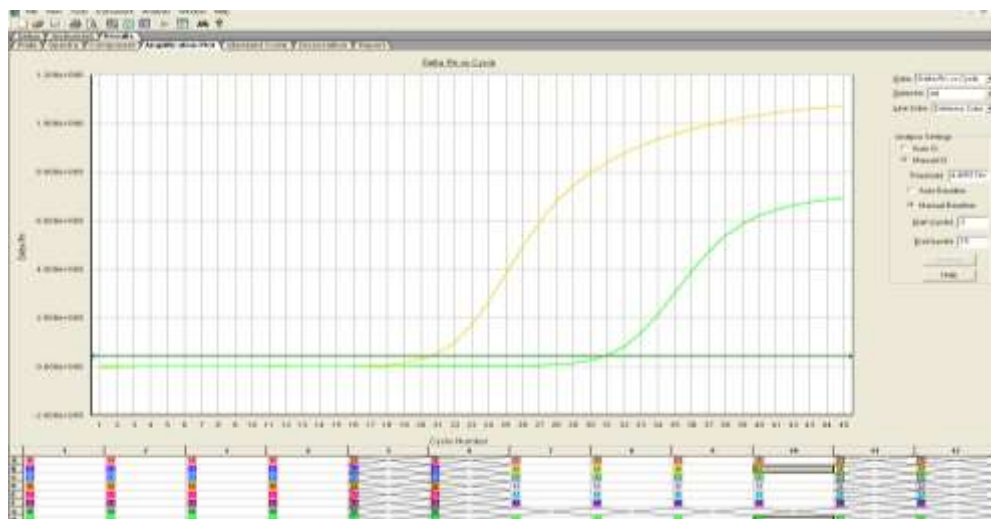
- f) **Parainfluenza 4 (HPIV4):** Se reportará un resultado positivo al observar una sigmoide en los detectores con **Curva de amplificación “Guinda”**: Fluorocromo para la detección de Parainfluenza 4. **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP.

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 73).

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

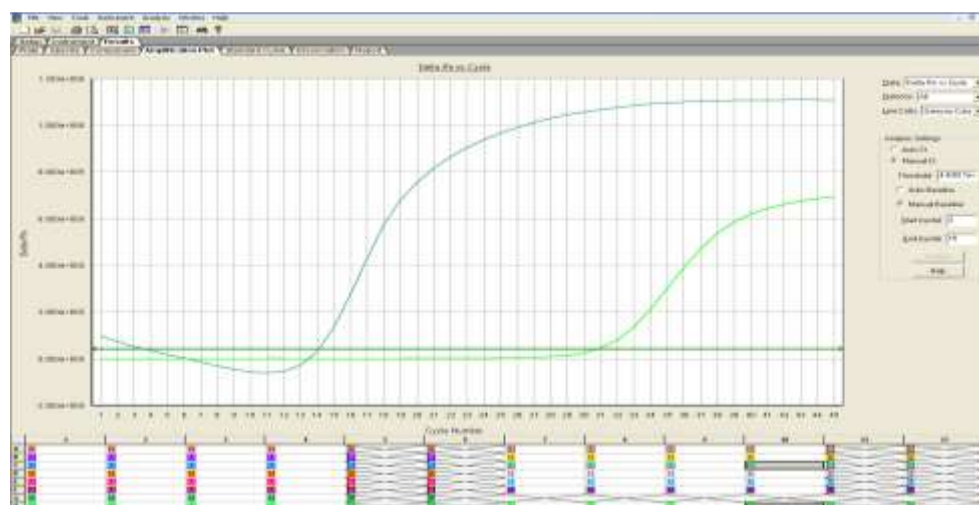




**Figura 73.- Muestra positiva para Coronavirus 229E.**

- 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 74).

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

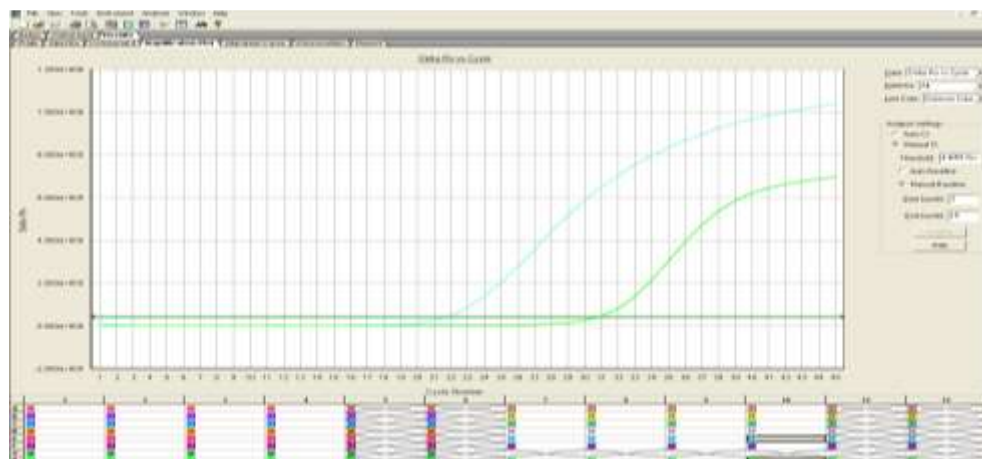


**Figura 74.- Muestra positiva para Coronavirus OC43.**

- 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 75).

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



**Figura 75.- 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 de amplificación “Verde Fluorescente”**: Fluorocromo para la detección de RP. (Figura 76).

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

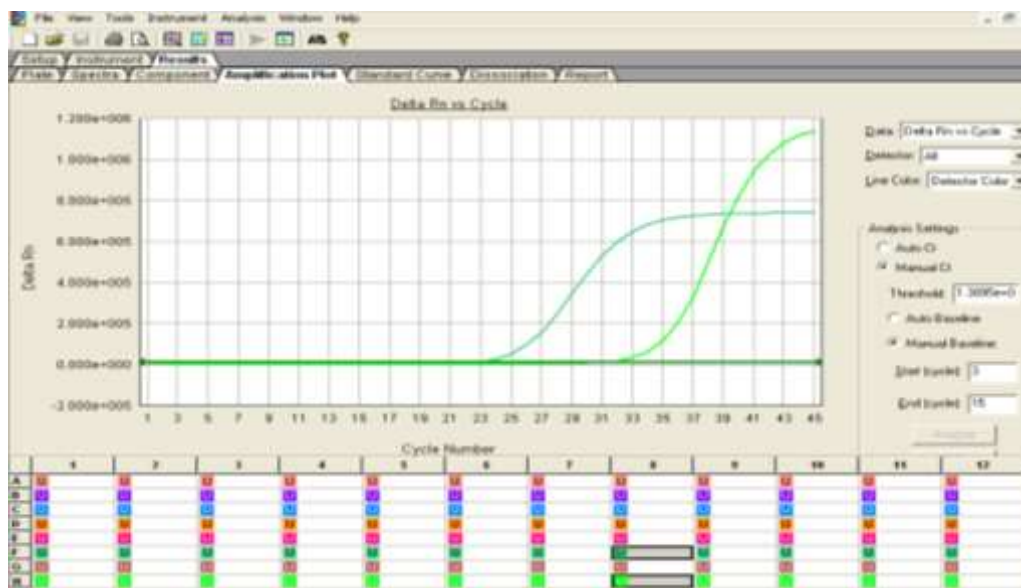


Figura 76.- Muestra positiva para Adenovirus.

- 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 77).

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

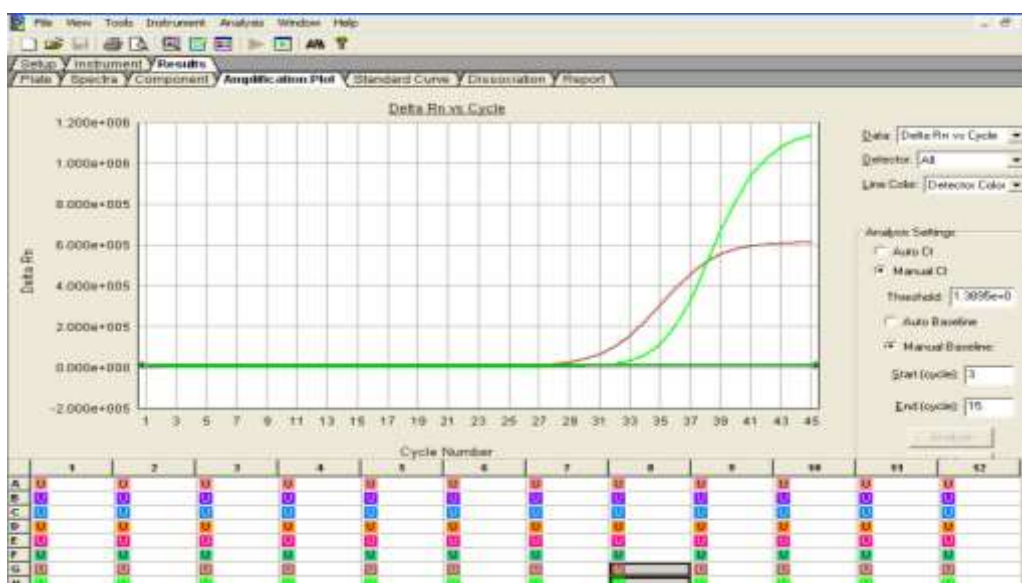


Figura 77.- Muestra positiva para Rhinovirus.

- 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 78).

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

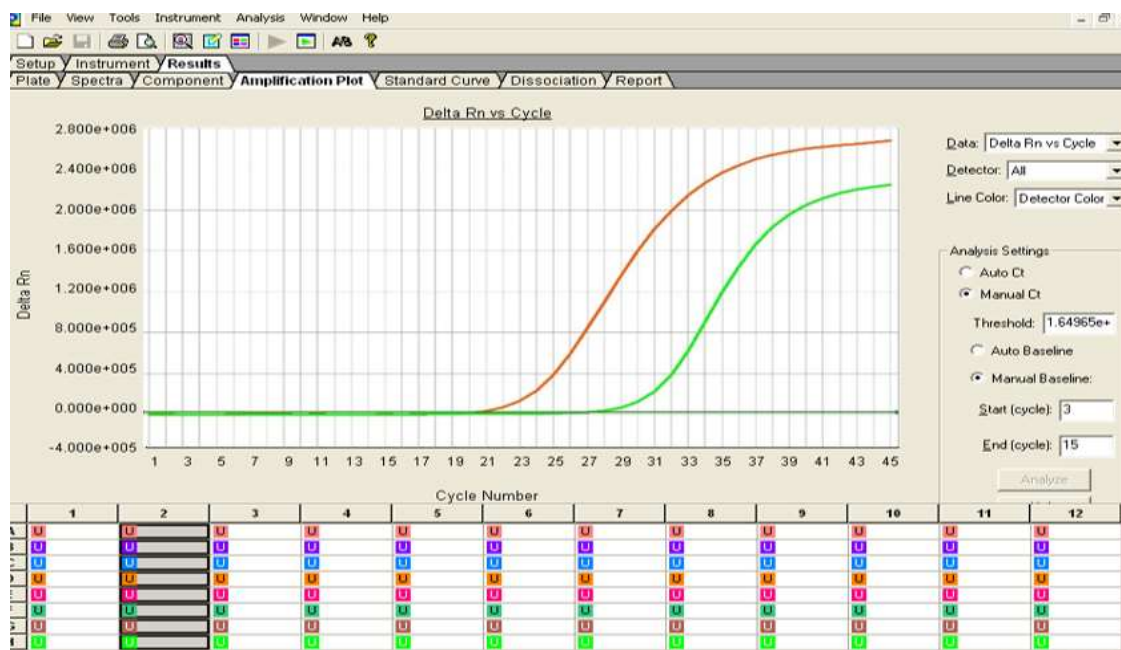


Figura 78.- Muestra positiva para Bocavirus.

- o) **Resultado Negativo**: Se reportará un resultado negativo al observar una sigmoide en el detector de RP **Curva de amplificación “Verde Fluorescente”**. (Figura 79).

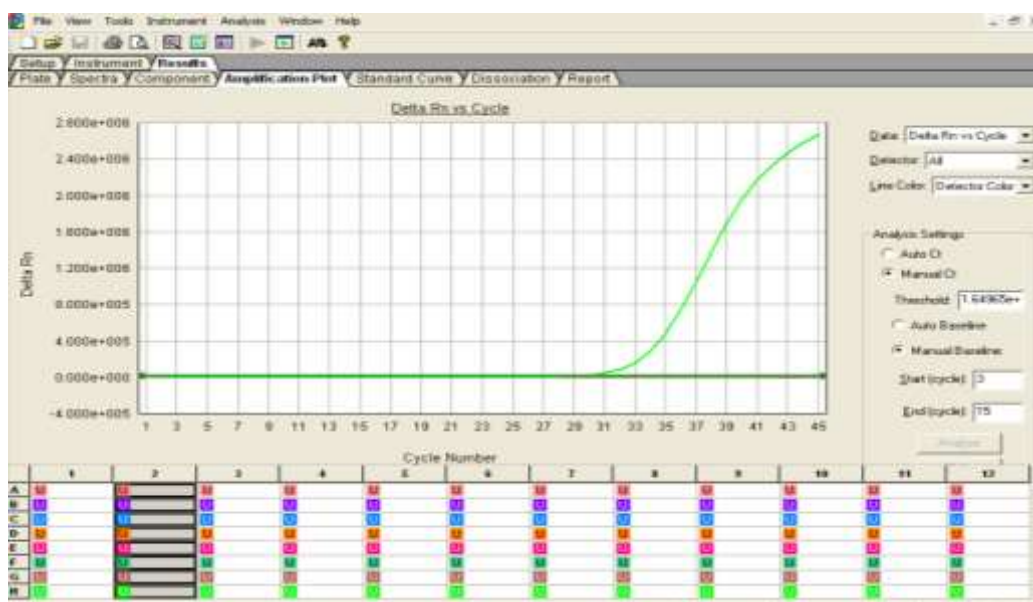


Figura 79.- Muestra con resultado Negativo.

p) **Muestra No Adecuada.** En este caso, no se observa ninguna curva de amplificación, como se muestra en la Figura 80. El resultado emitido será de la siguiente manera: **NA** (No adecuada).



Figura 80.- 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, propiciado a que su interpretación pudiera ser erróneamente reportada como una **coinfeción**; 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 81).

Para éste tipo de muestras se recomienda realizar la repetición mediante extracción manual, ya que ésta nos asegura una mayor concentración del material genético y por lo tanto una mejor detección.

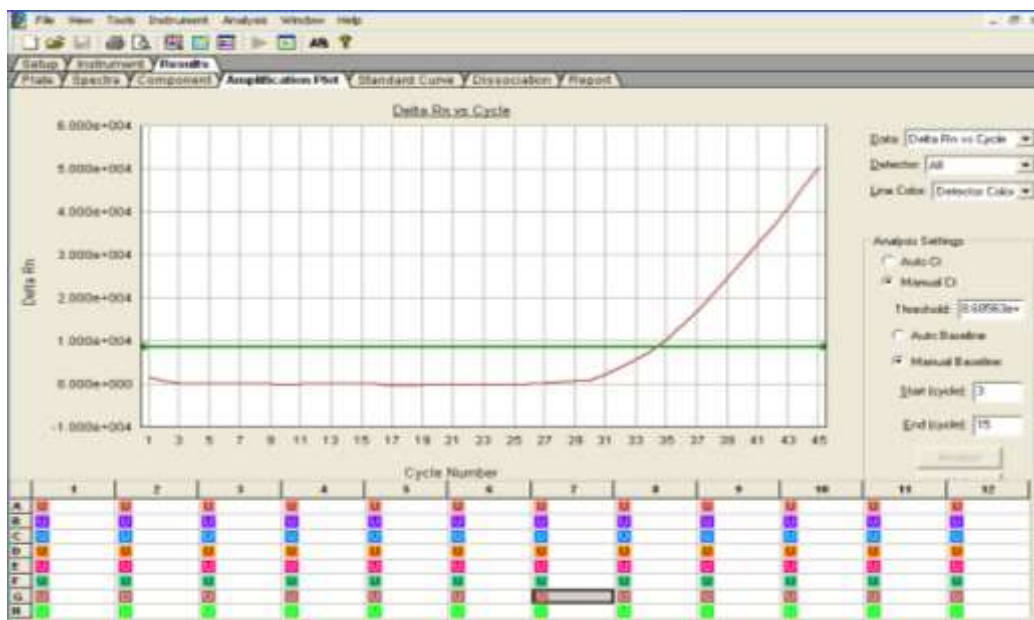


Figura 81.- Muestra con resultado de una **muestra para repetir**.

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

## E. Inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico diferencial de otros virus respiratorios

### Material

- guantes, mascarilla, goggles
- sedimentos de exudados faríngeos y nasofaríngeos
- sedimentos de células inoculadas cosechadas
- micropipeta de 200 µL y puntas
- portaobjetos con cubierta de teflón
- tubos para centrifuga de 15 ml
- cámara húmeda
- estufa a 37 °C
- caja de Coplin
- vaso con hipoclorito de sodio al 10%
- papel secante o papel higiénico
- microscopio de fluorescencia
- centrifuga clínica
- vaso de Coplin con acetona fría

### Reactivos

- PBS para IFA (al 1% de Tween 20). Ver preparación en anexo III
- PBS solución de trabajo pH 7.2. Ver preparación en anexo III
- acetona fría (-20 °C)
- Kit comercial de Inmunofluorescencia indirecta (LIGHT DIAGNOSTICS) para los virus a diagnosticar (Viral Screen, VSR, Parainfluenza y Adenovirus)

- Yoduro de propidio. Ver preparación en anexo III
- Sedimentos de exudados faríngeos y nasofaríngeos
- Sedimentos de células inoculadas cosechadas

## Desarrollo

1. A cada uno de los sedimentos obtenidos del tratamiento de muestras clínicas, agregar 2.0 ml de PBS solución de trabajo pH 7.2 mezclando suavemente.
2. Centrifugar por 5 minutos a 1500 rpm.
3. Decantar el sobrenadante.
4. Agregar 2.0 ml de solución de trabajo de PBS pH 7.2 mezclando suavemente para re-suspender
5. Centrifugar por 5 minutos a 1500 rpm.
6. Repetir el paso 3 y 4 cuantas veces sea necesario (3 veces) dependiendo de la cantidad de moco contenida en la muestra.
7. Eliminar el sobrenadante y re-suspender suavemente la pastilla en 0.2 a 0.5 ml de solución de trabajo de PBS (dependiendo de la concentración botón celular).
8. Rotular los portaobjetos para IFA (con lápiz) con un número progresivo y anotar en una hoja de trabajo la ubicación de la muestra (ver ejemplo)

No. Pozo	Número progresivo	ro ra	IFA	Resultado
1			Screen	
2	69		Adeno	
3	69		Parainfl 1	
4	69		Parainfl 2	
5	69		Parainfl 3	
6	69		VSR	

EJEMPLO:

Portaobjetos No.

InDRE

Mayo 2017

Página 135 de 159

Versión 1



9. Con la micropipeta, colocar cada una de las muestras, por duplicado, en los pozos del portaobjetos (cuidar que se llene el pozo, pero que no escurra) y dejar secar las muestras a temperatura ambiente. Trabajar en un gabinete de bioseguridad
10. Colocar las laminillas con las muestras ya secas dentro del vaso de Coplin que contiene acetona fría (-20 °C), cuidando que queden completamente cubiertas, dejar fijar por 10 minutos a -20 °C.
11. Lavar suavemente con solución de trabajo de PBS cada uno de los portaobjetos para quitar el exceso de acetona (tener cuidado de no aplicar el PBS directamente sobre la muestra fijada) aproximadamente durante 10 segundos, inclinado el portaobjetos de tal forma que escurra sobre un vaso de precipitados con cloro y dejar que sequen a temperatura ambiente.
12. Las laminillas pueden mantenerse en refrigeración a 4 °C si no se van a procesar inmediatamente.
13. Permitir que los reactivos (Kit comercial de Inmunofluorescencia indirecta (LIGHT DIAGNOSTICS) alcancen la temperatura de laboratorio antes de usarlos así como las muestras, si han estado en refrigeración.
14. Colocar una gota del anticuerpo monoclonal de ratón (IgG) como se indicó en el ejemplo: Screen (Pozo 1), anti-adenovirus (Pozo 2), anti-parainfluenza 1 (Pozo 3), anti-parainfluenza 2 (pozo 4), anti-parainfluenza 3 (pozo 5) y VSR (pozo 6) asegurarse que el reactivo cubra toda el área del pozo.
15. Incubar el portaobjetos a 37 °C por 30 minutos en cámara húmeda. No permitir que el reactivo se seque sobre la muestra fijada, esto podría causar tinción inespecífica.
16. Lavar a chorro con PBS para IFA suavemente (tratando de no aplicar el PBS directamente sobre la muestra fijada) durante 15 segundos, sacudir y quitar el exceso de PBS con papel absorbente alrededor de los pozos (cuidando de no tocar los pozos ya que se pueden desprender las células epiteliales fijadas).

Nota: Evitar que los pozos se sequen, esto podría causar tinción inespecífica.

17. Agregar una gota del conjugado Anti-IgG de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a cada pozo.
18. Incubar a 37 °C por 30 minutos en una cámara húmeda.
19. Lavar con PBS para IFA suavemente, (tratando de no aplicar el PBS directamente sobre la muestra fijada) durante 15 segundos, sacudir y quitar el exceso de PBS con papel absorbente alrededor de los pozos (cuidando de no tocar los pozos ya que se perderían las células epiteliales fijadas).
20. Colocar una gota de yoduro de propidio en cada pozo, incubar en cámara húmeda y en oscuridad durante 5 minutos.
21. Lavar con PBS para IFA para quitar el exceso de yoduro de propidio, colocar el líquido producto del lavado en un contenedor de residuos químicos
22. Secar a temperatura ambiente y mantenerlos en oscuridad.
23. Colocar los cubreobjetos usando una gota de líquido de montaje, verificar que no se formen de burbujas de aire y conservarlos en la oscuridad.
24. Observación al microscopio

Se recomienda que para mejores resultados las muestras se observen al microscopio inmediatamente después de la tinción, pero pueden almacenarse entre 2-8 °C de temperatura, en oscuridad, hasta por 72 horas.

#### **Para la observación al microscopio:**

- a) Encender la fuente del microscopio 15 minutos antes de iniciar.
- b) Observar cada una de las muestras y los controles positivo y negativo con el objetivo de 10X.
- c) El control positivo debe presentar células con fluorescencia de color verde manzana, ya sea nuclear y/o citoplásmica, la cual contrasta con un fondo de color rojo de células no infectadas (contraste con azul de Evans).
- d) El control negativo presentará células de color rojo, no deberá presentar fluorescencia de color verde como en el control positivo.
- e) En los pozos con las muestras problema, las células infectadas presentan fluorescencia de color verde manzana, ya sea nuclear y/o citoplásmica, las células no infectadas se observarán de color rojo, observándose claramente los núcleos celulares de color anaranjado debido a la presencia de yoduro de propidio.

#### **Interpretación por el laboratorio**

El diagnóstico es positivo si una o más células en la muestra, presentan el patrón típico de fluorescencia descrito anteriormente.

- Adenovirus: la fluorescencia puede estar presente en el núcleo solamente o en el núcleo y el citoplasma, o en el citoplasma solamente.
- Parainfluenza 1, 2 y 3: La fluorescencia puede estar presente en el citoplasma solamente.
- Virus Sincicial Respiratorio: La fluorescencia puede estar presente en el citoplasma solamente.
- El diagnóstico es negativo si las células en la muestra, presentan coloración roja debido al colorante de contraste azul de Evans.

## **Lineamientos para solicitar insumos para el diagnóstico de influenza**

La CRNL (Coordinación de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública) del InDRE tiene como política proporcionar un servicio de calidad y respuestas oportunas para los laboratorios integrantes de la RED, así como de los particulares que requieren de los servicios que les proporciona el InDRE, la coordinación está integrada al sistema de gestión de calidad, observa los procedimientos vigentes y busca la mejora continua de su servicio. Para cumplir con este propósito los Laboratorios Estatales y el Área Técnica observarán los siguientes lineamientos.

### **Laboratorios Estatales de Salud Pública**

1. Solicitar sus insumos de forma explícita (insumos que requieren y cantidad) para el diagnóstico de Influenza a través de un oficio en original, en hoja membretada dirigido a la Dirección General Adjunta del InDRE, con atención al Responsable de la Coordinación de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública y enviar por mensajería.
2. Enviar guía prepagada de la mensajería de su preferencia, o algún mensajero propio para recoger el material directamente en el InDRE.
3. La CRNL realiza un oficio para dar respuesta a la solicitud de insumos de acuerdo al tabulador vigente, en el caso de los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) se verifica la suficiencia presupuestal del Ramo 12. De no tenerla se solicita que realice el depósito del costo correspondiente del insumo requerido con base en el tabulador vigente. En el caso de los laboratorios particulares el pago se realizará al banco y número de cuenta establecidos en el oficio de respuesta.
4. Una vez realizado el pago de los insumos se envía por mensajería o se entrega al solicitante el paquete embalado junto con el original del oficio de respuesta.
5. El solicitante deberá asegurar que el servicio de mensajería que se utiliza tengan un tiempo de entrega de 24 horas para las solicitudes de reactivos.

6. El solicitante deberá verificar que los envíos sean de no más de 48 horas para insumos como plásticos u otros no perecederos. Se sugiere a los laboratorios que utilizan los servicios de mensajería considerar que si el envío se planea en miércoles y no lo recolectan, este se hará hasta la semana siguiente.
7. El solicitante será responsable de sancionar a la mensajería contratada y si fuera el caso, recuperar el costo de los daños ocasionados, en caso de retraso y/o extravío del insumo solicitado.

Nota: En caso de solicitudes urgentes (brotes, contingencias o emergencias sanitarias), el oficio de solicitud de insumos deberá identificarse como tal, colocando en éste la palabra urgente con letras mayúsculas con tinta de color rojo (URGENTE), y de forma extraordinaria se recibirán notas informativas, firmadas por el Director del LESP cuando él no este facultado para recibir oficios. En estos casos el mismo día del envío de los insumos, la CRNL informará al LESP vía correo electrónico, que el paquete no lleva consigo el oficio de respuesta firmado, señalando que se enviará lo más pronto posible, por lo que el objetivo de que el personal del LESP tenga conocimiento del material enviado, dentro de la casa que contiene los insumos solicitados se anexará una copia del oficio de respuesta sin firma, ni sellos oficiales señalando la leyenda “documento no oficial” en marca de agua. Finalmente en cuanto se tenga el oficio de solicitud firmado, deberá enviarse el original firmado, deberá enviarse el original a través del Servicio Postal Mexicano (Mexpost)

### Anexo III.

Infraestructura por área para el diagnóstico de influenza y otros virus respiratorios. Es obligatorio que cada uno de los dispositivos médicos utilizados en el diagnóstico de influenza y otros virus respiratorios no influenza, cuenten obligatoriamente con un programa anual de mantenimiento (calibración y/o verificación según corresponda).

#### 1. Área para tratamiento e inactivación de muestras

- gabinete de bioseguridad tipo II
- agitador tipo vórtex
- micropipetas de 100-1000 µL
- micropipetas de 20-200 µL
- refrigerador (4 a 8 °C)
- congelador (-20 °C)

#### *a) Extracción manual*

- gabinete de bioseguridad tipo II
- congelador
- micropipetas de 10-100  $\mu\text{L}$
- micropipetas 20-200  $\mu\text{L}$
- micropipetas 100-1000  $\mu\text{L}$
- pipetor automático
- agitador tipo vórtex
- microcentrífuga
- refrigerador (4 a 8 °C)
- congelador (-20 °C)
- termoblock

#### *b) Extracción automática*

- MagNA Pure LC Instrument LC 2.0 ó QIAcube
- gabinete de bioseguridad tipo II
- congelador (-20 °C)
- micropipetas de 20-200  $\mu\text{L}$
- micropipetas 100-1000  $\mu\text{L}$
- pipetor automático
- agitador tipo vórtex
- refrigerador (4 a 8 °C)

### 1. Área para RT-PCR tiempo real

#### *a) Preparación de mezcla de reacción*

- gabinete de bioseguridad tipo II o cabina de PCR (En el caso de los laboratorios que cuentan con un GenLab no es indispensable la cabina de PCR, siempre y cuando se demuestre que las placas no presenten contaminación)
- micropipetas de 1-10  $\mu\text{L}$
- micropipetas 2-20  $\mu\text{L}$
- micropipetas 20-200  $\mu\text{L}$
- micropipetas 100-1000  $\mu\text{L}$
- refrigerador (4 a 8 °C)
- congelador (-20 °C)
- agitador tipo vórtex
- minispín
- bloque de enfriamiento

#### *b) Colocación de templados*

- gabinete de bioseguridad tipo II o cabina de PCR

- micropipeta de 0.5-10  $\mu\text{L}$
- ultracongelador (-70 °C)
- bloque de enfriamiento

#### *c) Colocación de control positivo*

- gabinete de bioseguridad tipo II o cabina de PCR
- micropipeta de 0.5-10  $\mu\text{L}$
- ultra-congelador (-70 °C)
- bloque de enfriamiento

#### *d) Instrumentación qRT-PCR*

- centrífuga para placas
- bloque de enfriamiento
- termociclador AB 7500 Real Fast Time

### Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

- gabinete de bioseguridad tipo II
- agitador tipo vórtex
- micropipetas de 20-200  $\mu\text{L}$
- micropipetas de 100-1000  $\mu\text{L}$
- refrigerador (4 a 8 °C)
- congelador (-20 °C)
- ultracongelador (-70 °C)
- centrífuga clínica refrigerada
- incubadora (37 °C)
- potenciómetro
- balanza analítica
- microscopio de epifluorescencia

### Plataformas a utilizar

La instrumentación del PCR en tiempo real no estaría completa sin un hardware de computación y un software de análisis de datos apropiados.

Los protocolos descritos para RT-qPCR fueron optimizados en el InDRE utilizando enzimas de un paso para RT-PCR (Invitrogen Superscript™ III Platinum® One Step Quantitative Kit, AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents) en sistemas termocicladores con formato de 96 pozos, tales como el sistema de RT-PCR de tiempo real de Applied Biosystems TM (7300 y 7500).

Así mismo se han probado plataformas como la de ROCHE con su termociclador de la marca “Light Cycler” modelo 480 y Plataforma de Bio-Rad CFX96 Real Time System las cuales se pueden emplear siempre y cuando se utilicen los iniciadores (*primers*) y las sondas de la plataforma estandarizada (Técnica del CDC, Atlanta, GA), solo estos modelos son recomendados para la confirmación de los virus de Influenza en la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública. Es importante mencionar que el panel de evaluación para esta técnica será preparado por el InDRE con distintos valores de Cq (Cq del inglés *cycle threshold*, cuya traducción es ciclo umbral), utilizando los termocicladores descritos. Por ello no se recomienda el uso de termocicladores diferentes a los modelos descritos en el párrafo anterior.

## Tratamiento de muestras clínicas

### Material

- gabinete de bioseguridad tipo II
- guantes, mascarilla, goggles
- marcador indeleble
- muestras clínicas (exudados faríngeos, exudados nasofaríngeos o de conjuntiva, lavados o aspirado bronquio alveolar y biopsia)
- crioviales de 2.5 ml
- gradilla
- una charola con hielo o una bolsa refrigerante para mantener las muestras a 4 °C
- agitador tipo vórtex
- centrífuga refrigerada (4 °C)
- vaso con hipoclorito de sodio al 10%
- pinzas de disección
- piseta con alcohol al 70%
- mortero estéril
- puntas para micropipeta de 1.0 µL
- micropipeta de 100 a 1000 µL
- filtros tipo pirinola con membrana de poro de 0.22 µ de diámetro
- Gasas estériles

## Reactivos

- medio de transporte viral (ver preparación anexo III)
- solución amortiguadora para extracción de ácidos nucleicos (AVL de QIAgen o Lysis-Banding Buffer de Roche)

## Procedimientos

### A. *Exudados faríngeo o nasofaríngeo en medio de transporte viral*

- a) Agitar el tubo que contiene la muestra en el vórtex de 5 a 10 segundos (función automática).
- b) Agitar el hisopo vigorosamente y “exprimirlo” en las paredes del tubo.
- c) Retirar el hisopo con pinzas y desecharlo en vaso con hipoclorito de sodio al 10%.
- d) Separar una alícuota (140 o 300  $\mu$ L según sea la técnica de extracción utilizada “QIAGEN o ROCHE”) y agregarla en la solución amortiguadora correspondiente. Mezclar y mantenerla de 2 a 8 °C y pasarla al área de extracción.

En el caso de que el LESP realice la técnica de IFI para otros virus respiratorios:

- e) Centrifugar únicamente 0.5 ml de la muestra a 1000 rpm por 5 minutos a 4 °C

Nota: Transportar los tubos a la centrífuga en una charola con hielo.

- f) El resto de la muestra sin centrifugar se depositará en crioviales perfectamente etiquetados y almacenar a -70 °C si se realiza el envío de muestras al InDRE realizarlo con hielo seco o con suficientes refrigerantes para mantener la muestra en congelación.
- g) Lavar el sedimento con 3.0 ml de solución de trabajo de tapón fosfato salino (PBS) y centrifugar a 1000 rpm.
- h) Decantar el sobrenadante para eliminarlo y re-suspender el sedimento en 0.5 ml de PBS.
- i) Refrigerar de 2 a 8 °C si no se va a hacer inmediatamente la prueba IFI máximo hasta por 24 horas.

### B. *Lavados o aspirados en medio de transporte viral*



- a) Agitar el tubo que contiene la muestra en el vórtex de 5 a 10 segundos (función automática)
- b) Separar una alícuota (140 o 300 µL según sea la técnica de extracción utilizada "QIAGEN o ROCHE") y agregarla en la solución amortiguadora correspondiente. Mantenerla de 2 a 8 °C y pasarla al área de extracción.

En el caso de que el LESP realice la técnica de IFI para otros virus respiratorios:

- c) Centrifugar únicamente 0.5 ml de la muestra a 1000 rpm por 5 minutos a 4 °C

Nota: Transportar los tubos a la centrífuga en una charola con hielo.

- d) El resto de la muestra sin centrifugar se depositará en crioviales perfectamente etiquetados y almacenar a -70 °C si se realiza el envío de muestras al InDRE realizarlo con hielo seco o con suficientes refrigerantes para mantener la muestra en congelación.
- e) Lavar el sedimento en 3.0 ml de PBS y centrifugar a 1000 rpm.
- f) Decantar el sobrenadante para eliminarlo y re-suspender el sedimento en 0.5 ml de PBS.
- g) Refrigerar de 2 a 8 °C si no se va a hacer inmediatamente la prueba IFI, máximo hasta por 24 horas.

### C. *Biopsias en medio de transporte viral*

- a) Colocar el fragmento de pulmón (aproximadamente 2.0 cm<sup>3</sup>) en un mortero estéril y macerar con medio de transporte viral en frío.
- b) Tomar 1.0 ml del sobrenadante-macerado en un tubo estéril y completar con 1.5 ml de medio de transporte viral estéril.
- c) El resto del tejido depositarlo en contenedor de Residuos Patológicos
- d) Separar una alícuota (140 a 300 µL según sea la técnica de extracción utilizada "QIAGEN o ROCHE") y agregarla en la solución amortiguadora correspondiente. Mantenerla de 2 a 8 °C y pasarla al área de extracción.
- j) Separar el sobrenadante y depositarlo en crioviales perfectamente etiquetados y almacenar a -70 °C si se realiza el envío de muestras al InDRE realizarlo con hielo seco o con suficientes refrigerantes para mantener la muestra en congelación.

- e) En el caso de biopsias no se recomienda la técnica de IFI para el diagnóstico de otros virus respiratorios.

***D. Exudado faríngeo o nasofaríngeo: muestras en solución salina***

- a) Agitar el tubo que contiene la muestra en el vórtex de 5 a 10 segundos (función automática)
- b) Agitar el hisopo vigorosamente y “exprimirlo” en las paredes del tubo.
- c) Retirar el hisopo con pinzas y desecharlo en vaso con hipoclorito de sodio al 10%.
- d) En el caso de que la muestra contenga más de 2.0 ml de solución salina, centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, desechar el volumen excedente de solución salina hasta que queden 2.0 ml.

Nota: Transportar los tubos a la centrifuga en una charola con hielo

- e) Agregar 1.0 ml de caldo soya tripticaseína o medio de transporte viral a cada muestra.
- f) Mezclar agitando el tubo.
- g) Separar 200 µL de la muestra tratada y agregar 300 µL de solución amortiguadora de lisis para extracción (MAGNAPURE ROCHE) o separar 140 µL de la muestra tratada y agregar 560 µL de la solución amortiguadora de lisis para extracción (QIAGEN, extracción manual).
- h) El resto de la muestra se congela a -20 °C como muestra histórica.

Nota: En el caso de que el resultado sea positivo por RT-PCR tiempo real, la alícuota de la muestra de 1.5-2.0 ml se almacenará a 4 °C y se enviará al InDRE inmediatamente, esto con el objetivo de evitar procesos de congelación y descongelación e incrementar el porcentaje de aislamiento. Si los laboratorios tienen la posibilidad de hacer el envío con hielo seco, mantener las muestras en congelación y enviar lo más pronto posible y evitar en lo posible ciclos de congelación y descongelación.

### Anexo III: Preparación de reactivos

Medio de transporte viral	
Para preparar 100 ml:	
Albúmina bovina al 5%	10 ml
Gentamicina (4 µg/ml)	2.5 ml
Penicilina/estreptomicina (50,000 U/50,000 µg)	1.0 ml
NaHCO <sub>3</sub> al 7.5%	0.25 ml
Fungizona (µg/ml)	0.4–0.7 ml
Solución balanceada de Hank's	85.5 ml
Ajustar el pH de 7.0 a 7.2 y esterilizar por filtración	
Envasar 2.5 ml en tubos estériles	

Solución salina balanceada de Hank's:	
Componentes	g/L
NaCl	8.0
KCl	0.4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.185
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.046
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06
Glucosa	1.0
NaHCO <sub>3</sub>	0.35
Rojo de fenol	0.02

---

Albúmina bovina al 5%, 5 g de albúmina bovina fracción V en 100 ml de agua

---

Esterilizar por filtración

---

### Preparación de reactivos para inmunofluorescencia indirecta:

PBS para IFA (al 1% de Tween 20):

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Tween 20	10 ml

Pesar las cantidades indicadas, disolver con agua bidestilada y aforar a 1.0 L. Ajustar el pH de la solución a 7.2. Esterilizar en autoclave a 15 libras durante 15 minutos.

PBS solución de trabajo pH 7.2

### Preparación de solución A:

- En un matraz volumétrico de 200 ml colocar 170 ml de H<sub>2</sub>O destilada.
- Añadir 5.48 g el fosfato de sodio dibásico anhidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y disolver.
- Añadir 1.575 g. de fosfato de sodio monobásico monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) a la mezcla anterior y disolver.
- Llevar al volumen (aforar) de 200 ml.

### Solución de trabajo:


- En un matraz volumétrico de 1.0 L colocar 800 ml. de H<sub>2</sub>O destilada.
- Agregar 40 ml. de la solución A y mezclar.
- Pesar 8.5 g. de NaCl y agregarlos al matraz
- Llevar al volumen de 1.0 L con H<sub>2</sub>O destilada.

- e) Ajustar el pH a 7.2.
- f) Esterilizar en autoclave y guardar en refrigeración la solución.


Yoduro de propidio es un agente irritante y mutagénico, trabajar con precaución.

- Solución stock: 1 µg/ml
- Solución de trabajo: Tomar 1.5 ml de la solución stock y se lleva a 30 ml con PBS.
- Mantener la solución en la oscuridad.

Anexo IV: Formato de envío de muestras positivas y aislamientos al InDRE (referencia)

 SECRETARÍA DE SALUD	INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"								
	LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS								
Formato de envío de muestras positivas y aislamientos al InDRE (Referencia)									
Nombre y cargo del Remitente:									
Dirección del Remitente:									
Número de Teléfono:			Fax:			E-mail:			
No. de Folio de Plataforma									
Nombre									
Fecha de inicio de síntomas (día/mes/año)									
Fecha de toma de muestra (día/mes/año)									
Edad									
Sexo									
Estado									
Localidad									
Status del paciente (grave, inmunosuprimido, hospitalizado, defunción)									
Resultado (Inf A H1N1 pdm, Inf H1,H3, inf B, )									
Tipo/subtipo									
Técnica utilizada									
CT Inf A									
CT pdm Inf A									
CT pdm H1									
CT Inf H1									
CT Inf H3									
CT Inf B									
CT RP									
Notas y comentarios:									

Anexo V: Formato de envío de muestras negativas al InDRE (control de calidad)

 SECRETARÍA DE SALUD	INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"  <b>LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS</b>								
	<b>FORMATO DE ENVÍO DE MUESTRAS NEGATIVAS AL InDRE (CONTROL DE CALIDAD)</b>								
<b>Nombre y cargo del Remitente:</b> <b>Dirección del Remitente:</b> <b>Número de Teléfono:</b> <b>Fax:</b> <b>E-mail:</b>									
No. de Folio de Plataforma									
Nombre									
Fecha de inicio de síntomas (día/mes/año)									
Fecha de toma de muestra (día/mes/año)									
Edad									
Sexo									
Estado									
Localidad									
Status del paciente (grave, inmunosuprimido, hospitalizado, defunción)									
Resultado									
Tipo/subtipo									
Técnica utilizada									
No. de CT para RP									
<b>Notas y comentarios:</b>   									
* Enviar el número total de muestras negativas por semana									

Anexo VI: Informe semanal. Muestras recibidas para diagnóstico de influenza (USMI)

MUESTRAS RECIBIDAS PARA DIAGNÓSTICO DE INFLUENZA (USMI)  
RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE INFLUENZA

LABORATORIO:

Fecha:

FECHA	SEMANA EPIIDEMIOLÓGICA	MUESTRAS RECIBIDAS (LEP)				MUESTRAS PROCESADAS (LEP)				MUESTRAS NEGATIVAS ENVIADAS A NDRE				MUESTRAS POSITIVAS ENVIADAS A NDRE											
		A/H1N1 pdm	A/N/S	HL	H3	ELIMINADO DETERMINADO	LINEA VICTORIA	LINEA YAMAGATA	NA	NEG	AUTOMORBUS	PARA INFLUENZA	VSR	A/H1N1 pdm	A/N/S	HL	H3	ELIMINADO DETERMINADO	LINEA VICTORIA	LINEA YAMAGATA	NA	AUTOMORBUS	PARA INFLUENZA	VSR	
Dom 05-04-07/15	1																								
Dom 05-11-07/15	2																								
Dom 12-11-07/15	3																								
Dom 19-25-07/15	4																								
Dom 26-02-07/15	5																								
Dom 05-03-07/15	6																								
Dom 12-12-07/15	7																								
Dom 19-22-07/15	8																								
Dom 26-01-07/15	9																								
Dom 02-08-07/15	10																								
Dom 09-15-07/15	11																								
Dom 16-22-07/15	12																								
Dom 23-29-07/15	13																								
Dom 30-05-04/15	14																								
Dom 06-12-04/15	15																								
Dom 13-26-09/15	16																								
Dom 20-26-09/15	17																								
Dom 27-03-09/15	18																								
Dom 04-10-09/15	19																								
Dom 11-17-09/15	20																								
Dom 18-24-09/15	21																								
Dom 25-31-09/15	22																								
Dom 01-07-09/15	23																								
Dom 08-14-09/15	24																								
Dom 15-21-09/15	25																								
Dom 22-28-09/15	26																								
Dom 29-05-07/15	27																								
Dom 05-12-07/15	28																								
Dom 12-19-07/15	29																								
Dom 19-26-07/15	30																								
Dom 26-02-08/15	31																								
Dom 03-09-08/15	32																								
Dom 10-16-08/15	33																								
Dom 17-23-08/15	34																								
Dom 24-30-08/15	35																								
Dom 31-06-09/15	36																								
Dom 07-14-09/15	37																								
Dom 14-20-09/15	38																								
Dom 21-27-09/15	39																								
Dom 28-04-07/15	40																								
Dom 05-12-07/15	41																								
Dom 12-18-07/15	42																								
Dom 19-25-07/15	43																								
Dom 26-01-17/15	44																								
Dom 02-08-17/15	45																								
Dom 09-15-17/15	46																								
Dom 16-22-17/15	47																								
Dom 23-29-17/15	48																								
Dom 30-06-17/15	49																								
Dom 07-13-17/15	50																								
Dom 14-20-17/15	51																								

SEMANA EPIID.	ID. PLATAFORMA	MUESTRAS INFLUENZA B NO ENVIADAS A NDRE			
		CI B	CI Linaje Yamagata	CI Linaje Victoria	CI BP

SEMANA EPIID.	ID. PLATAFORMA	MUESTRAS A H3 NO ENVIADAS A NDRE			
		CI H3	CI Influenza A	CI BP	

SEMANA EPIID.	ID. PLATAFORMA	MUESTRAS A H1N1 pdm9 NO ENVIADAS A NDRE			
		CI H1 SW	CI H1 SW	CI BP	

SEMANA EPIID.	ID. PLATAFORMA	MUESTRAS A NO SUBMITIDAS NO ENVIADAS A NDRE			
		CI Influenza A	CI BP		

Instrucciones de llenado:

La información se basará en FECHA DE RECEPCIÓN DEL LABORATORIO  
Se considerará un solo resultado por muestra recibida (ya sea positivo o negativo)  
Reportar el CI de las muestras de influenza A no subtipificadas, H1, H3, H1N1pdn9 e influenza B que no se van a enviar a NDRE en los  
Será responsabilidad de cada laboratorio de la Red de Influenza ir actualizando esta información semana a semana.  
Este informe se deberá enviar todos los jueves a las 10:00 al correo del laboratorio [laboratoriosnecesarios@ypafos.com.mx](mailto:laboratoriosnecesarios@ypafos.com.mx)



# Anexo VII: Informe semanal. Muestras recibidas para diagnóstico de influenza (NO USMI)

MUESTRAS RECIBIDAS PARA DIAGNÓSTICO DE INFLUENZA (NO USMI)  
RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE INFLUENZA

LABORATORIO:		Fecha:										Fecha:															
		FECHA	SOMAR EPIC INICIÓ CA	MUESTRAS RECIBIDAS (LSP)	MUESTRAS RECIBIDAS NÚM. JÓV. E	A/N/S	H1	H3	B LINEAR NO DETERMINADO	LINEAR VICTORIA	LINEAR YAMAGATA	NA	NEG	ADENOVIRUS	PARVA INFLUENZA	VR	MUESTRAS NEGATIVAS PARA INFLU ZIN	A/N/S	H1	H3	B LINEAR NO DETERMINADO	LINEAR VICTORIA	LINEAR YAMAGATA	NA	ADENOVIRUS	PARVA INFLUENZA	VR
		del 29/04/17/15	1																								
		del 05/10/17/15	2																								
		del 12/08/17/15	3																								
		del 19/07/17/15	4																								
		del 26/02/17/15	5																								
		del 02/08/17/15	6																								
		del 09/10/17/15	7																								
		del 16/02/17/15	8																								
		del 23/02/17/15	9																								
		del 01/08/17/15	10																								
		del 08/10/17/15	11																								
		del 15/02/17/15	12																								
		del 22/02/17/15	13																								
		del 01/07/17/15	14																								
		del 08/05/17/15	15																								
		del 15/04/17/15	16																								
		del 22/08/17/15	17																								
		del 29/04/17/15	18																								
		del 06/10/17/15	19																								
		del 13/05/17/15	20																								
		del 20/07/17/15	21																								
		del 27/03/17/15	22																								
		del 03/07/17/15	23																								
		del 10/04/17/15	24																								
		del 17/02/17/15	25																								
		del 24/08/17/15	26																								
		del 31/05/17/15	27																								
		del 07/02/17/15	28																								
		del 14/07/17/15	29																								
		del 21/06/17/15	30																								
		del 28/02/17/15	31																								
		del 05/09/17/15	32																								
		del 12/04/17/15	33																								
		del 19/03/17/15	34																								
		del 26/08/17/15	35																								
		del 02/09/17/15	36																								
		del 09/07/17/15	37																								
		del 16/08/17/15	38																								
		del 23/07/17/15	39																								
		del 30/04/17/15	40																								
		del 07/10/17/15	41																								
		del 14/03/17/15	42																								
		del 21/02/17/15	43																								
		del 28/02/17/15	44																								
		del 05/07/17/15	45																								
		del 12/03/17/15	46																								
		del 19/02/17/15	47																								
		del 26/01/17/15	48																								
		del 02/06/17/15	49																								
		del 09/10/17/15	50																								
		del 16/03/17/15	51																								

**Instrucciones de llenado:**  
La información se basará en FECHA DE RECEPCIÓN DEL LABORATORIO  
Se considerará un solo resultado por muestra recibida (ya sea positivo o negativo)  
Se es responsable de cada Laboratorio de la Red de Influenza ir actualizando esta información semana a semana.  
Este informe se deberá enviar todos los jueves a las 10:00 al correo del laboratorio [laboratorioinfluenza@yahoo.com.mx](mailto:laboratorioinfluenza@yahoo.com.mx)

## Anexo VII: Captura de resultados en la Plataforma SISVEFLU

La captura de los datos en la plataforma del SISVEFLU se realizará de la siguiente manera:

- Para colocar resultados en la plataforma SINAVE es necesario tener acceso a internet e introducir la siguiente dirección <http://influenza.rhove.gob.mx/influenza/> para posteriormente acceder con el nombre de Usuario y la Clave (Biología Molecular).

Para cualquier duda, comentario o incidente en la operación del sistema favor de registrarlo al teléfono: (0155) 5337-7702 o a los correos electrónicos: [monitoreoservicio@dggepi.salud.gob.mx](mailto:monitoreoservicio@dggepi.salud.gob.mx) o [plataforma@dggepi.salud.gob.mx](mailto:plataforma@dggepi.salud.gob.mx). En su horario de atención de Lunes a Viernes de 09:00 a 18:00hrs.

- Una vez anotado el usuario y la clave se muestra una pantalla en la cual se despliegan varios iconos, de los cuales se va a seleccionar el de “Lista de muestras pendientes”.



- En la siguiente pantalla aparece un listado de muestras que se encuentran pendientes para reportar su resultado.





INFLUENZA

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

CERRAR SESIÓN

CAMBIAR CONTRASEÑA

REGRESAR AL MENU PRINCIPAL

LABORATORIO:

INDRE

UNIDAD MEDICA

PACIENTE

CURP

TIPO DE MUESTRA

FECHA DE LA TOMA

FOLIO

FOLIO LABORATORIO

(SSAJG. AUX. HOSPITAL GENERAL QUERETARO (GRO.))

AGUILAR CARRANZA ROSA ELIA

AUCR530720MGRGR5

EXUDADO FARINGEO

26/10/2013

223183003209224

3314

(SSAJG. AUX. DR. CARLOS LEÓN DE LA PEÑA (DGO.))

BARRIOS HUIZAR JOSE ALFREDO

BAHA720329HDGRZL

EXUDADO FARINGEO

31/01/2014

103210912236469

314

(SSAJH G. HOSPITAL GENERAL DE LAGOS DE MORENO (JAL.))

CLAUDIO LOPEZ YOSAFAT ALEJANDRO

CALY120525HCLPS

EXUDADO FARINGEO

17/10/2013

143181088208287

45985

(SSAJH G. HOSPITAL GENERAL DE LAGOS DE MORENO (JAL.))

ESCOBAR LOPEZ LAURA VERONICA

EOLL121213MJCSPR

EXUDADO FARINGEO

17/10/2013

143181087208286

45983

(SSAJH G. H.G. DR. PEDRO DANIEL MARTINEZ (MICH.))

GALEANA BARRAGAN JESUS

GABJ800414HGRLRS

EXUDADO FARINGEO

23/09/2013

103170994205028

305

(SSAJH G. H.G. DR. PEDRO DANIEL MARTINEZ (MICH.))

GALEANA BARRAGAN JESUS

GABJ800414HGRLRS

EXUDADO FARINGEO

23/09/2013

103170994205028

305

(SSAJH G. HOSPITAL CIVIL NUEVO (JAL.))

MEDINA DIAZ ISRAEL ALEXANDER

MEDI120403HJCDZS

EXUDADO FARINGEO

17/10/2013

143181945208324

45273

(SSAJG. AUX. HOSPITAL GENERAL QUERETARO (GRO.))

MEJIA SALINAS CATARINO

MESC330227HQTJLT

EXUDADO FARINGEO

25/10/2013

223182855209075

3315

(SSAJH G. HOSPITAL CIVIL NUEVO (JAL.))

MONTAÑO MARQUEZ YESENIA GUADALUPE

MDMY120919MJCHRS

EXUDADO FARINGEO

23/10/2013

143182510208775

3293

(SSAJH G. HOSPITAL REGIONAL DE PUERTO VALLARTA (JAL.))

RAMIREZ RODRIGUEZ CRISTINA

RARC651009MNTMDR

EXUDADO NASOFARINGEO

21/10/2013

143182067208419

46459

- Se selecciona el nombre del paciente al que se le va a colocar resultado. Aparecerá una pantalla con los datos generales del paciente, así como los datos del procedimiento.

  		<b>INFLUENZA</b> Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica								
<a href="#">CERRAR SESIÓN</a>		<a href="#">CAMBIAR CONTRASEÑA</a>		<a href="#">REGRESAR AL MENU PRINCIPAL</a>						
<b>DATOS GENERALES DEL PACIENTE</b>										
Nombre completo:	ROSA ELIA AGUILAR CARRANZA		Sexo:	MUJER						
Entidad de residencia:	QUERETARO, QUERETARO		Fecha de Nacimiento:	20/07/1953						
Inicio de síntomas:	22/10/2013		Fecha de la muestra:	26/10/2013						
			Fecha de Registro del Caso:	20/10/2013						
SINTOMAS: FIEBRE, TOS, ODINOFAGIA, DISNEA, IRRITABILIDAD, DOLOR TORACICO, ESCALOFRIOS, CEFALEA, MIALGIAS, ARTRALGIAS, ATAQUE AL ESTADO GENERAL, RINORRREA, DOLOR ABDOMINAL, CONJUNTIVITIS, CO-MORBILIDAD ENF. CARDIOVASCULAR.										
<b>DATOS DEL PROCEDIMIENTO</b>					<a href="#">Regresar</a>					
Tipo de la Muestra: EXUDADO FARINGEO			No. de Folio de la Muestra: 223183003209224							
SE ACEPTA LA MUESTRA: <input checked="" type="checkbox"/>										
Estudio: DIAGNOSTICO			FOLIO DEL LABORATORIO: 3314							
<b>PROCEDIMIENTO 1</b>										
TÉCNICA*: <input type="text"/>	RESULTADO: <input type="text"/>		FECHA DE TERMINO DEL PROCESO: <input type="text"/> dd/mm/aaaa							
<a href="#">GUARDAR INFORMACION</a>										
Para cualquier duda, comentario o incidencia en la operación del sistema favor de reportarlo al teléfono: (0155) 5337 4702 o a los correos electrónicos: mesadeservicio@dgepi.salud.gob.mx o plataforma@dgepi.salud.gob.mx. En un horario de atención de Lunes a Viernes de 09:00 a 18:00hrs.										

- En la parte inferior de la pantalla aparece el recuadro “Procedimiento 1” en el cual, se observan inicialmente 3 recuadros en los que se colocará la “Técnica”, el “Resultado” y la “Fecha de término del proceso”.
- Una vez seleccionada la “Técnica”, la cual se elige mediante un menú desplegable, se procede a escoger el “Resultado” del catálogo de posibles agentes etiológicos; inmediatamente aparece otro recuadro contiguo al de resultados, en donde se debe colocar el número de Cq del marcador que define el resultado de la muestra. Así mismo, se ingresa la fecha en el recuadro de “Fecha de término de proceso”. Nota:(si la muestra es negativa se coloca el Cq del RP).

**SALUD** **DPE** **INFLUENZA**

**CERRAR SESIÓN** **CAMBIA CONTRASEÑA** **REGRESAR AL MENÚ PRINCIPAL**

**DATOS GENERALES DEL PACIENTE**

Nombre completo: JOSÉ ALFREDO BARRIOS NUZAR Sexo: HOMBRE Fecha de nacimiento: 29/03/1972  
 Ciudad de residencia: DURANGO, DURANGO CURP: BAAAT720329H00023  
 Inicio de síntomas: 28/01/2014 Fecha de la muestra: 28/01/2014 Fecha de Registro del Caso: 24/01/2014

**DATOS DEL PROCEDIMIENTO**

Tipo de la Muestra: EXUDADO FARINGEO No. de Folio de la Muestra: 883210312230408

SE ACEPTA LA MUESTRA: ☒

Estudio: DIAGNOSTICO POLICLINICO LABORATORIO: EPE

**PROCEDIMIENTO**

TÉCNICA:  RESULTADO:  FECHA DE TÉRMINO DEL PROCESO:

**GUARDAR INFORMACIÓN**

Para cualquier duda, comentario o incidencia en la operación del sistema favor de reportarlo al teléfono: (0442) 5337-1752 o a los correos electrónicos: [soporteinformacion@dgpa.salud.gob.mx](mailto:soporteinformacion@dgpa.salud.gob.mx) o [graficoinform@dgpa.salud.gob.mx](mailto:graficoinform@dgpa.salud.gob.mx). En un horario de atención de Lunes a Viernes de 08:00 a 15:00 hrs.

- Al finalizar con el registro del resultado, se procede a “**Guardar la información**” para concluir la captura de los datos en el nombre del paciente seleccionado.<sup>1</sup>

- Por último, al presionar el botón de “**Guardar información**”, se visualizará en la pantalla el resultado que se ha colocado anteriormente, el cual se puede cancelar con la tecla ESC, acción que procederá a desplegar un submenú en el que se deberá seleccionar el resultado definitivo y se procederá finalmente a “**Guardar**”.

<sup>1</sup> Nota: Ésta opción, se encuentra disponible únicamente para reportar resultados de diagnóstico bajo la técnica de RT-PCR en Tiempo Real (qRT-PCR); para reportar resultados de Panel Viral Respiratorio por BIO-PLEX (técnica que para trabajarse, debe esperar a que se emita un resultado Negativo por qRT-PCR), se ingresa como procedimiento dos, sin embargo, debe hacerse la búsqueda por nombre del paciente ingresando a la página principal y seleccionando el ícono de “Búsqueda de Paciente”; se mostrará el nombre del paciente con todos sus datos y sintomatología, así como el resultado del procedimiento 1; el procedimiento 2 aparecerá en blanco, en donde se colocará el resultado de la técnica (Panel Viral Respiratorio), donde se despliega un menú de posibles agentes virales productores de infecciones respiratorias, seleccionándose el obtenido en el análisis.

CERRAR SESIÓN		CAMBIAR CONTRASEÑA		REGRESAR AL MENU PRINCIPAL	
<b>DATOS GENERALES DEL PACIENTE</b>					
Nombre completo:		YOSAFAT ALEJANDRO CLAUDIO LOPEZ		Sexo: HOMBRE	
Entidad de residencia:		JALISCO, LAGO DE MORENO		Fecha de nacimiento: 25/05/2012	
Inicio de síntomas: 16/10/2013		Fecha de la muestra: 17/10/2013		CURP: CALY120626HJC LPS	
SINTOMAS: FIEBRE, TOS, DISNEA, IRRITABILIDAD, ATAQUE AL ESTADO GENERAL, RINORREA, INICIO SUBITO DE LOS SINTOMAS, CO-MORBILIDAD:					
<b>INFORMACIÓN DE LAS MUESTRAS DEL EVENTO</b>					
FOLIO DE LA MUESTRA: 14310188620520		17/10/2013		TIPO DE MUESTRA: EXUDADO FARINGEO	
Muestra sin resultados		A H1			
		A H3			
		B			
		NEGATIVO			
		NO ADECUADO			
		ADENOVIRUS			
		PARAINFLUENZA 1			
		PARAINFLUENZA 2			
		PARAINFLUENZA 3			
		VSR			
		NEGATIVO			
		NO SUBTIPIFICADO			
		H5			
		H7N9 A			
		RECHAZADA			
		H1			
		A H3			
		VSR A			
		VSR B			
		CORONA 229E			
		CORONA OC43			
		CORONA SARS			
		CORONA NL63			
		CORONA HKU1			
		NO AMPLIFICADO			
		ENTEROVIRUS/HUMAN			
		REINFLUENZA			
		SIN AISLAMIENTO			
A CONTINUACIÓN DEBE PROPORCIONAR CASO:		ESTE RESULTADO SERÁ EL QUE SE REPORTARÁ PARA EL			
RESULTADO:		<input type="button" value="GUARDAR"/>			
Para cualquier duda al teléfono: (0155) 5337-1702 o a fax 5337-1703		En la operación del sistema favor de reportarlo a: servicio@dgepi.salud.gob.mx o plataforma@dgepi.salud.gob.mx de Lunes a Viernes de 09:00 a 18:00hrs.			



1939 · 2019

**AÑOS**

*Siendo Referencia Nacional en Salud Pública*

**INDRE**

**SALUD**

SECRETARÍA DE SALUD



Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud  
Dirección General de Epidemiología

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos  
"Dr. Manuel Martínez Báez"