

Información de la OMS para diagnóstico de laboratorio del virus pandémico (H1N1) 2009 en humanos - revisado

Es altamente recomendable enviar de forma inmediata todas las muestras de influenza A no subtipificable a uno de los cinco Centros Colaboradores de la OMS para Referencia & Investigación sobre Influenza para su diagnóstico y posterior caracterización.

23 de noviembre de 2009

Este documento brinda información sobre los medios de diagnóstico disponibles a la fecha anteriormente indicada para los virus tipo A/California/4/2009 de la influenza humana (H1N1). La información sobre diagnóstico será actualizada a medida que se disponga de ella.

El presente documento es una actualización del documento publicado en el sitio web de la OMS con fecha 18 de agosto de 2009.

Los Protocolos actualizados son los siguientes:

- 1. Protocolo N° 5 (Centro Colaborador de la OMS para influenza en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Japón (CC OMS, NIID) para RT-PCR en tiempo real específico para el gen HA del virus pandémico H1N1 2009: utilización de una nueva sonda (NIID-swH1 Probe2).**
- 2. Protocolo de Grupo N° 2 (Dpto. de Virología, Erasmus MC Rotterdam, Holanda).**

Muestras

De acuerdo con lo recomendado por las investigaciones sobre influenza estacional, las muestras del tracto respiratorio superior son las más apropiadas. Se deben tomar muestras de las fosas nasales profundas (hisopado nasal), nasofaringe (hisopado nasofaríngeo), aspirado nasofaríngeo, de garganta o aspirado bronquial. No se conoce aún qué muestra clínica brinda el mejor diagnóstico. Se deben tener las precauciones correspondientes cuando se toman las muestras ya que la persona que realiza esta tarea puede quedar expuesta a las secreciones respiratorias de los pacientes.

Hasta el momento no hay información sobre el valor diagnóstico de las muestras no respiratorias, por ejemplo, muestras de heces.

Se deben usar muestras de suero agudo y convaleciente para la detección de títulos de anticuerpos en incremento.

Pruebas de laboratorio

Diagnóstico molecular

El método de diagnóstico molecular es actualmente el método de elección para el virus pandémico (H1N1) 2009.

El uso de diferentes ensayos con genes objetivo es más adecuado para la correcta identificación de este virus. Son importantes los siguientes genes objetivo: el gen matriz de la influenza tipo A; el gen de hemaglutinina específico para el virus pandémico (H1N1) 2009 y el gen de hemaglutinina específico para la influenza estacional A H1/H3.

Actualmente se dispone de los siguientes Protocolos:

- PCR convencional y en tiempo real específica para influenza tipo A (ver Anexos 1 y 2);
- PCR convencional y en tiempo real específica para el virus pandémico (H1N1) 2009 (ver Anexos 1 y 2).
- Protocolo RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) de los CDC para la detección y caracterización del (H1N1) 2009 pandémico.¹
- RT-PCR en tiempo real para influenza estacional A (H1N1 y H3N2) e influenza aviar A (H5, H7 y H9) (ver Anexo 2).

Los análisis de secuencia del producto de PCR del gen matriz de la influenza tipo A usando los cebadores de los Protocolos de la OMS (ver Anexo 1) diferenciarán entre los genes M de los virus pandémico y estacional H1N1; no obstante, deben realizarse análisis adicionales para confirmar el origen del virus.

Aislamiento y tipificación del virus mediante inhibición de la hemaglutinación o inmunofluorescencia

Se pueden utilizar los Protocolos actuales para el aislamiento de los virus de influenza estacional utilizando células MDCK (por sus siglas en inglés) e inoculación en huevos, aunque su sensibilidad debe aún determinarse (ver sección de Bioseguridad más adelante).

¹ <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimptpcr/en/index.html>

Los eritrocitos de pavos, pollos, conejillos de indias y humanos se aglutinarán con el virus pandémico (H1N1) 2009.

Los anticuerpos policlonales específicos para el subtipo H1 de los virus de influenza estacional del kit de reactivos para influenza de la OMS **no** reaccionarán en la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HAI por sus siglas en inglés) con el virus pandémico (H1N1) 2009 actual.

Los resultados obtenidos utilizando los anticuerpos monoclonales H1 del kit de la OMS (HAI) no deben tomarse como concluyentes y se recomienda realizar verificaciones adicionales.

Pruebas rápidas o inmunofluorescencia

En la actualidad se está evaluando la sensibilidad y la especificidad de las pruebas rápidas en el lugar de atención o de inmunofluorescencia diseñadas para la detección directa de los virus de influenza A. De las pruebas para detección de antígenos realizadas en el punto de atención evaluadas hasta este momento, la sensibilidad analítica para el nuevo virus H1N1 es comparable con su sensibilidad para detectar la influenza estacional. Se debe observar que estas pruebas tienen una sensibilidad considerablemente menor que RT-PCR tanto para el nuevo virus H1N1 como para los virus H1N1 estacional o H3N2. Debe destacarse que estas pruebas no diferenciarán el virus de influenza estacional del virus pandémico (H1N1) 2009.

Serología

Se cree que las pruebas de HAI y de microneutralización utilizando el virus pandémico (H1N1) 2009 podrán detectar las respuestas de anticuerpos después de la infección.

Patología

Dado que el virus pandémico (H1N1) 2009 es un virus nuevo para los humanos, no se sabe demasiado sobre los cambios patológicos asociados con la infección en casos severos en esta etapa. Es importante tomar muestras de tejidos en la autopsia de casos fatales para realizar estudios patológicos. Los CDC brindan pautas para la toma, la conservación y el envío de muestras en el siguiente link: <http://espanol.cdc.gov/enes/h1n1flu/tissuesubmission.htm>.

El Anexo 4 brinda información adicional para la realización de autopsias en contextos de recursos limitados.

Interpretación de los resultados de laboratorio

- PCR — Una muestra se considera positiva si los resultados de las pruebas usando dos objetivos diferentes de PCR (por ejemplo, cebadores específicos para el gen M universal y el gen porcino de hemaglutinina H1) son positivos pero la PCR para H1 + H3 humanos es negativa. Si la RT-PCR para objetivos múltiples de hemaglutinina (HA) (es decir, H1, H3, y H1 pandémico) arroja resultados positivos en la misma muestra, se debe descartar primero la posibilidad de contaminación de PCR repitiendo el procedimiento de PCR usando ARN nuevo extraído de la muestra original o ARN extraído de otra muestra. Si se obtienen resultados positivos repetidos para objetivos HA múltiples, esto aumenta la posibilidad de coinfección, lo que se debe confirmar por secuenciación o cultivo viral. El Anexo 3 muestra un diagrama de flujo para utilizar en la interpretación de los resultados de PCR.
- Ensayos de PCR en tiempo real de los CDC — Se deben interpretar los resultados como se describe en el manual de ensayos de H1N1 en tiempo real de los CDC.¹
- Un resultado de PCR negativo no elimina la posibilidad de que una persona esté infectada con el virus pandémico (H1N1) 2009. Los resultados deben ser interpretados en conjunto con la información clínica y epidemiológica disponible. Las muestras de pacientes con resultados de PCR negativos pero con un elevado grado de sospecha de infección con (H1N1) 2009 pandémico deben investigarse y evaluarse más a fondo mediante otros métodos como cultivo viral o serología, para descartar infección por (H1N1) 2009 pandémico (ver cuadro de flujo en el Anexo 3).
- Serología — Un aumento de cuatro veces o más en los títulos de los anticuerpos específicos del virus pandémico (H1N1) 2009 indica infección reciente con el virus.
- Secuenciación — Los análisis secuenciales del producto de PCR del gen matriz de la influenza tipo A usando los cebadores de los Protocolos de la OMS (ver Anexo 1) diferenciarán entre los genes M de los virus pandémicos y estacionales H1N1, sin embargo, deben realizarse más análisis para confirmar el origen del virus.
- Aislamiento del virus — La identificación y la tipificación de un virus de influenza cultivado puede llevarse a cabo por PCR, por la prueba del anticuerpo fluorescente indirecto (IFA por sus siglas en inglés) usando anticuerpos monoclonales específicos de NP, o por análisis antigénico y HA (subtipificación) por HAI usando antisueros de referencia seleccionados.

Derivación para confirmación y posterior caracterización

Se recomienda a los laboratorios sin capacidad diagnóstica de virus de influenza A, enviar muestras representativas de casos sospechosos de virus pandémico (H1N1) 2009, de acuerdo con las pautas de definición de casos de la OMS,² a uno de los Centros Colaboradores de la OMS para Referencia e Investigación de la Influenza (WHOCC).

Las muestras cuyos resultados de laboratorio indiquen influenza A no subtipificable (es decir, negativas para influenza A (H1) y A (H3)) y no confirmadas de acuerdo con los criterios de la OMS deben enviarse a un WHOCC para confirmación.

Los laboratorios sin capacidad de aislamiento de virus o sin los niveles de contención y bioseguridad requeridos deben enviar las muestras a un WHOCC.

Se deben seguir las reglamentaciones estándar y relevantes de IATA para la conservación, el envasado y el envío de muestras de influenza.³

Bioseguridad

El trabajo de diagnóstico en laboratorio de las muestras clínicas de pacientes considerados casos sospechosos de infección con el virus pandémico (H1N1) 2009 debe llevarse a cabo en condiciones de contención BSL2 usando el equipo de protección personal (EPP) adecuado. Toda manipulación de las muestras clínicas deben realizarse dentro de una cabina de bioseguridad certificada (BSC). Ver el *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la OMS*, 3ra edición.⁴

En la actualidad, el aislamiento viral requiere mayores medidas de contención y de bioseguridad. Para obtener la orientación recomendada, remítase al documento *Manejo de Riesgos Biológicos en el Laboratorio de la OMS para laboratorios que manipulan especímenes con sospecha o confirmación de contener influenza A (H1N1) causante de la actual epidemia internacional*.⁵

Prueba de algoritmos

El enfoque general para la detección del virus de influenza mediante RT-PCR debe considerarse dentro del contexto de la situación nacional; por ejemplo, cuántas muestras se pueden procesar (rendimiento), qué secuencia genética tener como objetivo para RT-PCR, y

² http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/interim_guidance/en/index.html

³ http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/storage_transport/en/index.htm

⁴ http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/

⁵ <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/LaboratoryHumanspecimensinfluenza/es/index.html>

si se deben utilizar pruebas concurrentes o secuenciales para RT-PCR de los genes M, NP y HA.

Buenas prácticas de laboratorio

Deben existir protocolos estándar para todos los procedimientos, que deben revisarse regularmente. Es fundamental garantizar que se utilizan los reactivos recomendados y que se los manipula en forma adecuada, ya que las reacciones son complejas y los problemas con un reactivo único pueden tener un efecto significativo sobre los resultados.

Validación

Siempre se deben validar todos los protocolos en cada laboratorio para garantizar la especificidad y la sensibilidad adecuadas usando los mismos controles que se emplean en cada ciclo.

Aseguramiento de la calidad

Deben existir protocolos de aseguramiento de la calidad estándar y buenas prácticas de laboratorio. Es altamente recomendable la participación en los ejercicios de evaluación de los Centros Nacionales de Influenza (NIC) (programa de evaluación externa de la calidad) para confirmar que los laboratorios están alcanzando un nivel adecuado de especificidad y sensibilidad en sus pruebas.

Capacitación del personal

Estar familiarizado con los protocolos y tener experiencia en la correcta interpretación de los resultados son piedras angulares para la ejecución exitosa de las pruebas diagnósticas.

Instalaciones y áreas de manipulación

Deben existir instalaciones para la manipulación de pruebas y reactivos (incluyendo cadenas de frío) con una separación apropiada para los diferentes pasos de RT-PCR con el fin de prevenir la contaminación cruzada. Las instalaciones y el equipamiento deben cumplir con el nivel de bioseguridad adecuado. Se debe realizar RT-PCR en un lugar separado del utilizado para las técnicas de aislamiento viral.

Equipamiento

Se debe utilizar y mantener el equipamiento de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Anexo 1:

Análisis de RT-PCR convencional para el gen matriz de los virus de influenza tipo A

Protocolo convencional de RT-PCR Protocolo⁶

Los siguientes Protocolos son para RT-PCR convencional y electroforesis en gel de productos de PCR para detectar los virus de influenza tipo A (todos los subtipos) en muestras humanas. Se ha demostrado que estos Protocolos son ampliamente efectivos para la identificación de los virus de influenza tipo A cuando se los utiliza con los reactivos y cebadores indicados. Se recomienda a los laboratorios que tengan inquietudes sobre la identificación de los virus que circulan en la actualidad contactar a uno de los laboratorios de referencia de la OMS⁷ para el diagnóstico de infección por influenza, o a uno de los WHOCC⁸ para recibir ayuda en la identificación de los cebadores óptimos que se deben utilizar.

Materiales requeridos

- Mini Kit QIAamp® Viral ARN (QIAGEN®, Cat. Nº 52904. Se pueden utilizar otros kits de extracción después de la evaluación adecuada)
- Kit One Step RT-PCR (QIAGEN®, Cat. Nº 210212)
- Inhibidor de RNasa 20U/μl (Applied Biosystems, Cat. Nº N8080119)
- Agua sin RNasa
- Etanol (96–100%)
- Microcentrífuga (ajustable hasta 13 000 rpm)
- Pipetas ajustables (10, 20, 200, y 100 μl)
- Puntas para pipeta estériles, sin RNasa con barrera de aerosol
- Vortex
- Tubos para microcentrífuga (0.2, 1.5 ml)
- Termociclador (equipo de PCR)
- Conjuntos de cebadores
- Control positivo (puede pedirse a un WHOCC)

⁶ WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza. National Institute of Infectious Diseases. Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama-shi, Tokio 208-001, Japón. Email: todayiri@nih.go.jp <http://idsc.nih.go.jp/>

⁷ http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/

⁸ <http://www.who.int/csr/disease/influenza/collabcentres/en/>

Secuencia de cebadores

| Tipo/subtipo | Fragmento de genes | Cebador | Secuencia |
|------------------|--------------------|-----------|-----------------------------|
| Influenza tipo A | Matriz (M) | M30F2/08 | ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG |
| | Matriz (M) | M264R3/08 | TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG |

El tamaño esperado del producto es 244 bp.

Procedimiento

1. Extraer el ARN viral de la muestra clínica con el Mini Kit QIAamp Viral ARN o kit de extracción equivalente, de acuerdo con las indicaciones del fabricante.
2. Realizar RT-PCR de un paso
 - Retirar los reactivos almacenados y descongelarlos a temperatura ambiente. Una vez descongelados, mantenerlos en hielo.
 - Preparación de la mezcla maestra (**trabajar sobre hielo**)
 - Agregar lo siguiente a los tubos de la microcentrífuga y mezclar suavemente agitando la mezcla maestra hacia arriba y hacia abajo diez veces. (Nota: para evitar diferencias localizadas en la concentración de sales es importante mezclar muy bien las soluciones antes del uso.)

Reacción sin solución Q

| Reactivo | Volumen (µl) |
|--|--------------|
| Agua (grado molecular) | 9,5 |
| Amortiguador 5X QIAGEN® RT-PCR | 5,0 |
| Mezcla dNTP (conteniendo 10mM de cada dNTP) | 1,0 |
| Cebador directo (10 µmol/l) | 1,5 |
| Cebador inverso (10 µmol/l) | 1,5 |
| Mezcla enzimática QIAGEN® OneStep RT-PCR (5 U/ µl) | 1,0 |
| Inhibidor de RNasa (20U/µl) | 0,5 |
| Volumen total | 20,0 |

- Distribuir 20 µl de la mezcla maestra en cada tubo de reacción de PCR.
- Agregar 5µl de ARN de la muestra a la mezcla maestra. Para las reacciones de control, usar 5µl de agua destilada para control negativo y 5µl de los ARN virales adecuados para control positivo.
- Programar el termociclador de acuerdo con las condiciones de termociclado.
- Iniciar el programa de RT-PCR mientras los tubos de PCR se encuentren aún sobre hielo. Esperar hasta que el termociclador alcance los 50 °C. Luego colocar los tubos de PCR en el termociclador.

Condiciones de termociclado

| Tipo de Ciclo | Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nº de ciclos |
|---------------------------|------------------|-------------------------|--------------|
| Transcripción inversa | 50 | 30:00 | |
| Activación de PCR inicial | 95 | 15:00 | |
| Ciclado en tres pasos: | | | |
| Desnaturalización | 94 | 0:30 | 45 |
| Fijado | 50 | 0:30 | |
| Extensión | 72 | 1:00 | |
| Extensión Final | 72 | 10:00 | |

3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR

Preparar el gel de agarosa, cargar los productos de PCR y el marcador de peso molecular, luego hacer correr de acuerdo con los Protocolos estándar. Visualizar la presencia del marcador con luz UV. A continuación se muestra un ejemplo de los materiales requeridos y del procedimiento.

Materiales requeridos

- Bandeja para fundición de gel de agarosa y cámara de electroforesis
- Suministro eléctrico y electrodos
- Caja de luz UV ($\lambda = 302 \text{ nm}$)
- Cámara y película Polaroid® o utilizar cualquier sistema digital para documentación de geles
- Pipetas ajustables
- Gel de agarosa al 2% en 1x TAE
- Amortiguador 1x TAE
- Bromuro de etidio (10 mg/ml)
- 6x solución amortiguadora en gel (GLB)
- Marcador de peso molecular

Procedimiento

A) Fundición del gel de agarosa:

- i. Colocar una bandeja para fundición de gel en una base para fundición de gel. Insertar un peine y nivelar la base.
- ii. Preparar agarosa al 2% pesando 4 g de polvo de agarosa y disolverlo en 200 ml 1× amortiguador TAE. Disolver el agar calentándolo en horno de microondas.
- iii. Enfriar la agarosa derretida a aproximadamente 60° C, luego añadir 10 µl de bromuro de etidio.
- iv. Verter la agarosa derretida en la bandeja para fundición de gel.
- v. Dejar que el gel se solidifique a temperatura ambiente.
- vi. Retirar el peine del marco.
- vii. Colocar la bandeja en la cámara de electroforesis con las fosas del lado de los cátodos.
- viii. Llenar la cámara amortiguadora con 1× TAE hasta un nivel que pueda cubrir la parte superior del gel.

B) Carga de las muestras:

- i. Agregar 5 µl de la solución amortiguadora con gel a cada tubo de PCR.
- ii. Cargar el marcador de peso molecular en la primera fosa del gel de agarosa.
- iii. Pipetear 15 µl del producto de PCR/GLB al gel.
- ii. Cerrar la tapa de la cámara y conectar los electrodos. Hacer correr el gel a 100V por 30–35 minutos.
- iii. Visualizar la presencia de las bandas de marcadores y producto de PCR con luz ultravioleta.
- iv. Documentar la imagen del gel tomando fotografías.

Interpretación de los resultados

El tamaño de los productos de PCR obtenidos se debe comparar con el tamaño esperado del producto. Si se corre la prueba sin control positivo, los productos se deben confirmar mediante secuenciación y comparación con las secuencias disponibles.

Protocolo N° 1⁹

RT-PCR convencional de un paso para el gen HA del virus pandémico (H1N1) 2009

A continuación se enumeran los Protocolos y los cebadores de la RT-PCR convencional para detectar los virus pandémicos (H1N1) 2009 en muestras humanas. Es recomendable que los laboratorios que tengan inquietudes para identificar los virus que circulan en la actualidad se contacten con uno de los miembros del Comité de Expertos de la OMS sobre influenza por PCR, o con uno de los WHOCC, para solicitar ayuda con la identificación de los cebadores óptimos que deban utilizarse.

Estos ensayos fueron validados en las siguientes plataformas de trabajo:

Sistema GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems)

Termociclador Veriti de 96 pocillos (Applied Biosystems)

Materiales requeridos

- Mini Kit QIAamp Viral ARN (QIAGEN®, Cat. N° 52904)
- Kit QIAGEN OneStep RT-PCR (QIAGEN®, Cat. N° 210212)
- Inhibidor de RNasa 20U/μl (Applied Biosystems, Cat. N° N808-0119)
- Etanol (96–100%)
- Microcentrífuga (ajustable, hasta 13 000 rpm)
- Pipetas ajustables (10, 20, 100, 200 μl)
- Puntas para pipetas estériles sin RNasa con barrera de aerosol
- Vortex
- Tubos para microcentrífuga (0,2, 1,5 ml)
- Termociclador (Sistema GeneAmp PCR 9700, Applied Biosystems o termociclador Veriti de 96 pocillos, Applied Biosystems)
- Control positivo (Virus A de la influenza porcina A/SW/HK/PHK1578/03 o A/California/04/2009) (Disponible a pedido de la Universidad de Hong Kong)
- Conjunto de cebadores

⁹ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Hong Kong, University Pathology Building Queen Mary Hospital, Hong Kong Special Administrative Region of China.

Cebadores y sondas

| Tipo/subtipo | Fragmento del gen | Cebador | Secuencia |
|---|-------------------|---------|------------------------|
| Influenza A H1N1 (virus pandémico 2009) | HA | HKU-SWF | GAGCTCAGTGTGCATCATTGAA |
| | HA | HKU-SWR | TGCTGAGCTTTGGGTATGAA |

Tamaño esperado: 173 bp

Procedimiento

1. Extraer el ARN viral de la muestra clínica con el mini kit QIAamp viral o kit de extracción equivalente de acuerdo con las indicaciones del fabricante.
2. Preparar la mezcla maestra para RT-PCR según se indica a continuación:

| Reactivo | Volumen (µl) | Concentración final |
|-----------------------------|--------------|---------------------|
| Agua | 7,4 | |
| Amortiguador 5X PCR (kit) | 4,0 | 1X |
| dNTPs (kit) | 0,8 | 400 µM de cada dNTP |
| Cebador 5 µM: HKU-SWF | 2,4 | 0,6µM |
| Cebador 5 µM: HKU-SWR | 2,4 | 0,6µM |
| Inhibidor de RNasa (20U/µl) | 0,2 | 4 U |
| Mezcla enzimática (kit) | 0,8 | - |
| Total | 18,0 | |

3. Colocar 18 µl de la mezcla maestra en cada tubo de ensayo
4. Agregar 2 µl de ARN a la anterior mezcla para reacción.
5. Establecer las siguientes condiciones de RT-PCR:

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nº de ciclo |
|--------------------------|------------------|-------------------------|-------------|
| Transcripción inversa | 50 | 30:00 | 1 |
| | 95 | 15:00 | |
| Desnaturalización Fijado | 94 | 0:30 | } 40 |
| | 57 | 0:30 | |

| | | | |
|---------------------------|-----------|-------------|----------|
| Extensión | 72 | 0:20 | |
| Extensión post-PCR | 72 | 7:00 | 1 |
| Post-corrída | 4 | ∞ | |

6. Preparar gel de agarosa al 2 %, cargar los productos de PCR y los marcadores de peso molecular, y hacer correr de acuerdo con los Protocolos estándar. Visualizar la presencia de bandas de marcadores y productos de PCR con luz UV.

Interpretación de los resultados

El tamaño esperado de los productos de PCR para la influenza H1 es 173bp. Este ensayo puede específicamente detectar muestras con el virus pandémico H1N1, pero no aquellas con el virus humano estacional H1N1. Las muestras de ARN de siete humanos con H1N1 estacional, de dos humanos con H3N2 estacional, de un humano con H5N1, de siete virus de influenza aviar (HA subtipos 4, 5, 7, 8, 9 y 10) y de >150 muestras de aspirados nasofaríngeos de pacientes con otras enfermedades respiratorias fueron, en el estudio, negativas en su totalidad. Se debe observar que estos ensayos pueden detectar el virus pandémico H1N1 y algunas otras secuencias virales de H1 porcino. Uno de los controles positivos recomendados en este ensayo es un virus porcino H1 aislado en Hong Kong. El mismo está diseñado para minimizar el envío y la manipulación de los virus H1N1 similares al A/California/04/2009 a los laboratorios sin la infraestructura de bioseguridad recomendada. Si se ejecuta la prueba sin controles, los productos se deben confirmar mediante secuenciación y confirmando con las secuencias en bases de datos depositadas. La falta de los productos de PCR correctos (es decir, un resultado negativo) no descarta la presencia del virus de influenza. Los resultados se deben interpretar junto con la información clínica y epidemiológica disponible.

Protocolo N° 2¹⁰

RT-PCR convencional de un paso para el gen HA del virus pandémico (H1N1) 2009

A continuación se proporcionan los protocolos y los cebadores de la RT-PCR convencional para detectar los virus pandémicos (H1N1) 2009 en muestras humanas. Se recomienda a los laboratorios con inquietudes para identificar los virus actualmente circulantes contactarse con uno de los miembros del Comité de Expertos de la OMS sobre influenza por PCR o con uno de los WHOCC para solicitar ayuda para la identificación de los cebadores óptimos que deban utilizarse.

Materiales requeridos

- Mini kit QIAamp Viral ARN (QIAGEN®, Cat. N° 52904)
- Kit QIAGEN OneStep RT-PCR (QIAGEN®, Cat. N° 210212)
- Inhibidor de RNasa 20U/μl (Applied Biosystems, Cat. N° N808-0119)
- Etanol (96–100%)
- Microcentrífuga (ajustable, hasta 13 000 rpm)
- Pipetas ajustables (10, 20, 100, 200 μl)
- Puntas para pipetas estériles sin RNasa con barrera de aerosol
- Vortex
- Tubos para Microcentrífuga (0.2, 1.5 ml)
- Termociclador (Sistema GeneAmp PCR 9700, Applied Biosystems o Veriti de 96 pocillos, Applied Biosystems)
- Control positivo (Virus A de la influenza porcina A/SW/HK/PHK1578/03 o A/California/04/2009; disponible a pedido)
- Conjunto de cebadores

Cebadores y sondas

| Tipo/subtipo | Fragmento del gen | Cebador | Secuencia |
|---|-------------------|------------|---------------------------------|
| Virus pandémico H1N1 2009 de la Influenza A | HA | H1-sw-434f | CGA ACA AAG GTG TAA CGG CAG CAT |
| | HA | H1-sw-905r | GCA CCC TTG GGT GTT TGA CAA GTT |

¹⁰ Protocolo proporcionado por: Virology Division, Centre for Health Protection, Hong Kong SAR, China., (National Influenza Centre, WHO H5 Reference Laboratory).

http://www.chp.gov.hk/files/pdf/CHP_Protocolos_for_the_Detection_of_Human_Swine_Influenza.pdf

Procedimiento

1. Extraer el ARN viral de la muestra clínica con el mini kit QIAamp viral o kit de extracción equivalente de acuerdo con las indicaciones del fabricante.
2. Preparar la mezcla maestra para RT-PCR como se indica a continuación:

| Reactivo | Volumen (µl) | Concentración final |
|--------------------------------|--------------|---------------------|
| Amortiguador 5X PCR (kit) | 10,0 | 1X |
| dNTPs (kit) | 2,0 | 400 µM de cada NTP |
| 5X Q-sol (kit) | 10,0 | 1 X |
| Cebador 5 µM: H1-sw-434f | 6,0 | 0,5µM |
| Cebador 5 µM: H1-sw-905r | 6,0 | 0,5µM |
| Mezcla enzimática (kit) | 2,0 | - |
| Inhibidor de RNasa (20U/µl) | 0,5 | 10 U |
| Agua | 8,5 | |
| Total | 45,0 | |
| Plantilla de ARN | 5,0 | |

3. Establecer las siguientes condiciones de RT-PCR:

| Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nro. de ciclos |
|------------------|-------------------------|----------------|
| 50 | 30:00 | |
| 95 | 15:00 | 1 |
| 94 | 0:30 | } 45 |
| 55 | 0:30 | |
| 72 | 0:30 | |
| 72 | 7:00 | 1 |
| 10 | ∞ | |

4. Realizar electroforesis en gel como se describió con anterioridad. El tamaño del producto de PCR es 472 bp para el virus pandémico (H1N1) 2009.

Protocolo N° 3:¹¹

RT-PCR convencional de un paso para detectar el gen HA del virus pandémico (H1N1) 2009

A continuación se proporcionan los protocolos y los cebadores de la RT-PCR convencional para detectar los virus pandémicos (H1N1) 2009 en muestras humanas. Se recomienda que los laboratorios con inquietudes para identificar los virus actualmente circulantes se contacten con uno de los miembros del Comité de Expertos de la OMS sobre influenza por PCR o con uno de los WHOCC para solicitar ayuda en la identificación de los cebadores óptimos a utilizar.

Cebadores y sondas

| Tipo/subtipo | Fragmento del gen | Cebador | Secuencia |
|---|-------------------|-------------------|--------------------------|
| Virus pandémico H1N1 2009 de la influenza A | HA | NIID-swH1 Conv-F1 | TGCATTTGGGTAAATGTAACATTG |
| | HA | NIID-swH1 Conv-R1 | AATGTAGGATTTCTGAKCTTTGG |

Tamaño esperado del producto: 349bp

Procedimiento

Seguir el mismo procedimiento y pasos descritos anteriormente para la detección del protocolo RT-PCR del gen M universal desarrollado por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (NIID) y mencionado previamente.

Interpretación

El tamaño de los productos de PCR obtenidos debe compararse con el tamaño del producto esperado. Si se realiza la prueba sin control positivo, se deben confirmar los productos mediante secuenciación y comparación con las secuencias disponibles.

¹¹ Protocolo suministrado por el WHO Collaborating Center for Reference and Research on Influenza y el WHO H5 Reference Laboratory del National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokio, Japón. Email: todayiri@nih.go.jp, <http://idsc.nih.go.jp/>.

Protocolo de Grupo N° 1¹²

Ensayos de RT-PCR convencionales para la detección de los virus de la influenza A (H1N1, H3N2), influenza B e influenza aviar A (H5N1)

Este Protocolo describe los procedimientos de RT-PCR convencionales para detectar:

1. Los virus de la influenza A (H1N1) estacional (genes H1 y N1)
2. Los virus de la influenza A (H3N2) estacional (genes H3 y N2)
3. Los virus de la influenza B estacional (genes HA y NA)
4. La influenza aviar A (H5N1) (genes H5 y N1).

Los genes HA y NA están amplificados como mitades superpuestas con los conjuntos de cebadores indicados a continuación. Los productos de PCR generados se pueden usar para diagnóstico de influenza y para estudios de secuenciación.

Materiales requeridos

- Mini kit QIAamp Viral ARN (QIAGEN®, Cat. N° 52904)
- Kit QIAGEN OneStep RT-PCR (QIAGEN®, Cat. N° 210212)
- Inhibidor de RNasa 20U/μl, (Applied Biosystems, Cat. N° N808-0119)
- Etanol (96–100%)
- Microcentrífuga (ajustable, hasta 13 000 rpm)
- Pipetas ajustables (10, 20, 100, 200 μl)
- RNAsin (Promega #N2515)
- SS III RT (Invitrogen #18080-085)
- Polimerasa Pfx (Invitrogen #11708-039)
- Puntas para pipetas estériles sin RNasa con barrera de aerosol
- Vortex
- Tubos para microcentrífuga (0.2, 1.5 ml)
- Termociclador: BIORAD DNA Engine (BIORAD)
- Conjunto de cebadores

Procedimiento

Seguir las indicaciones del fabricante y eluir el ARN en 50 μl de la solución amortiguadora suministrada.

Usar 5 μl de ARN en 50 μl de reacción de RT-PCR de un paso para extractos de muestras

¹² WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza. National Institute for Medical Research The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, England. Email: whocc@nimr.mrc.ac.uk. <http://www.nimr.mrc.ac.uk/wic/>

clínicas o 2 µl en una reacción de 50 µl para extractos de virus desarrollados.
 Para RT-PCR, todas las reacciones se hacen correr en un BIORAD DNA Engine usando tubos de paredes delgadas con control de temperatura calculado (de bloque).

Cebadores y sondas

Conjuntos de cebadores usados para RT-PCR de un paso para vigilancia de la influenza estacional y H5N1 (Londres WHOCC; abril de 2009).

| Tipo/subtipo | Fragmento del gen | Cebador | Secuencia |
|--------------------------|-------------------|---------------------|---|
| Influenza A H1N1 | HA-5'(H1) | H1A1F1 H1HAR1087 | CAACCAAATGAAAGCAAACACTAC AAACCGCAATGGCTCCAAA |
| | HA-3'(H1) | H1HAF552 H1A2R1 | TACCCAAACCTGAGCAAGTCCTAT GCATATTCTGCACTGCAAAGACCC |
| | NA-5'(N1) | H1N1F6 N1R1124 | AGCAGGAGATTTAAATGAATCCAA TCTAAGTCTGTTACTTTTAGTCTT |
| | NA-3'(N1) | N1F741 H1N1R1 | ATAATGACCGATGGCCCGAGTAAT GTAGAAACAAGGAGTTTTTTCAAC |
| Influenza A H3N2 | HA-5'(H3) | H3A1F6 H3HAR1075 | AAGCAGGGGATAATTCTATTAACC AACCGTACCAACCRCCACCATTCC |
| | HA-3'(H3) | H3HAF567 H3A2R1 | CTGAACGTGACTATGCCAAACAAT AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTAAT |
| | NA-5'(N2) | H3N2F1 H3N2R1104 | AGCAAAAGCAGGAGTGAAAATGAA ATCCACACGTCATTTCCATCGTCA |
| | NA-3'(N2) | H3N2F387 H3N2R1 | CATGCGATCCTGACAAGTGTTATC TTCTAAAATTGCGAAAGCTTATAT |
| Matriz de Influenza A | Full gene | MF1 MR1027 | AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGA AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTACTC |
| Influenza B | HA-5' | BHA1F1 BHAR1166 | AATATCCACAAAATGAAGGCAATA ATCATTCTTCCCATCCTCCTTCT |
| | HA-3' | BHAF458 BHA2R1 | AGAAAAGGCACCAGGAGGACCCTA GTAATGGTAACAAGCAAACAAGCA |
| | NA-5' | BNAF1 BNAR2 | AGCAGAAGCAGAGCATATTCTTAG GATGGACAAATCCTCCCTTG ATGC |
| | NA-3' | BNAF2 BNAR1 | GC ACTCCTAATTAGCCCTC ATAGA CAGAAACAATTAAGTCCAGTAAGG |
| Influenza A H5N1 | HA-5'(H5) | H5A1F1 H5R1265 | AGCAAAAGCAGGGGTATAATC ACGGCCTCAAACCTGAGTGTTTCATT |
| | HA-3'(H5) | H5F417 H5A2R1 | TTGAGAAAATWCAGATCATCCC AAGG GTGTTTTTAACTAACAATCT |

| | | | |
|--|-----------|-----------------------|--|
| | NA-5'(N1) | H5N1F4 H5N1R1112 | AGCAAAAGCAGGAGATTAATGAAT TTCTCCCGATCCAAACACCATTGC |
| | NA-3'(N1) | H5N1F461 H5N1R1457 | GACTGTCAAAGACAGAAGCCCTCA GTAGAAACAAGGAGTTTTTTGAA |

Los genes HA y NA están amplificados como mitades superpuestas con los conjuntos de cebadores indicados. Los productos generados pueden usarse para diagnóstico de la influenza y estudios de secuenciación

Procedimiento

Protocolo de RT-PCR de un paso

1. Kit QIAGEN® OneStep RT-PCR (Cat. Nº 210212) es suficiente para las reacciones de 100 x 50µl siguiendo las indicaciones del fabricante.
2. Protocolo Invitrogen de un paso basado en el reactivo, usado en el Instituto Nacional de Investigación Médica (NIMR, Londres).

| Reactivo | Volumen (µl) | | Concentración final |
|---------------------------------------|--------------|-------------|---------------------------------|
| | Clínico | Virus | |
| Agua | 30,6 | 33,6 | (QIAGEN®, Cat. Nº 129114) |
| 10x Buffer* | 7,5 | 7,5 | |
| 50mM MgSO ₄ * | 1,0 | 1,0 | |
| 100mM dNTPs | 0,9 | 0,9 | 25mM de cada uno (G, A, T, C) |
| 10 µmol/l Forward primer [§] | 1,5 | 1,5 | 0.3 µmol/l concentración final |
| 10 µmol/l Reverse primer [§] | 1,5 | 1,5 | 0.3 µmol/l concentración final |
| RNAsin | 0,5 | 0,5 | (Promega, Cat. Nº N2515) |
| SS III RT | 1,0 | 1,0 | (Invitrogen, Cat. Nº 18080-085) |
| Pfx Polimerasa* | 0,5 | 0,5 | (Invitrogen, Cat. Nº 11708-039) |
| ARN | 5,0 | 2,0 | |
| Total | 50,0 | 50,0 | |

* Suministrado con la polimerasa Pfx.

Programa termociclador BIORAD DNA

| Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nro. de ciclos |
|------------------|----------------------------|----------------|
| 50 | 30:00 | |
| 94 | 10:00 | |
| 94 | 0:05 | } 40 |
| 55 | 0:05 | |
| 68 | 0:30 | |
| 68 | 10:00 | |
| 4 | Retener | |

RT-PCR de dos pasos

Para las muestras clínicas poco específicas (por ejemplo, con valores bajos de Ct [30 o superior] en qRT-PCR) se utiliza un protocolo 'optimizado' de dos pasos.

a) Paso de RT

| Tipo | Fragmento del gen | Cebador | Secuencia |
|-------------|-------------------|---------|--------------|
| Influenza A | todos los genes | uni12W | AGCRAAAGCAGG |
| Influenza B | todos los genes | Buni11W | AGCAGAAGCGS |

Para una reacción de 40 µ:

| Reactivo | volumen (µl) | Concentración final |
|-----------------------------|-----------------|---------------------------------|
| Agua | 12,1 | (QIAGEN®, Cat. Nº 129114) |
| Solución amortiguadora 5x * | 8,0 | |
| 0.1M DTT * | 2,0 | |
| RNAsin | 2,0 | (Promega, Cat. Nº N2515) |
| 100mm dNTPs | 0,9 | 25mm de cada(G, A, T, C) |
| 30 µmol/l Uni12W o Buni 11W | 3,0 | |
| SS III RT | 2,0 | (Invitrogen, Cat. Nº 18080-085) |

| | | |
|------------------|-------------|--|
| ARN de plantilla | 10,0 | |
| Total | 40,0 | |

* Proporcionado con el SS III RT.

Método

Mezclar el cebador y la plantilla en un tubo de paredes delgadas e incubar a 65°C/5 min. Retirar de la fuente de calor (DNAEngine) y dejar enfriar a temperatura ambiente. Centrifugar brevemente antes de agregar 27µl de mezcla para reacción, luego mezclar y centrifugar brevemente antes del termociclado usando el programa:

| Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) |
|-------------------------|------------------------------------|
| 25 | 5:00 |
| 50 | 60:00 |
| 70 | 15:00 |

b) Paso de PCR

Para una reacción de 50 µl:

| Reactivo | Volumen (µl) | Concentración final |
|--|---------------------|-------------------------------|
| Agua | 35,1 | |
| Solución amortiguadora de 10x* | 7,5 | |
| MgSO ₄ * | 1,0 | |
| 100mm dNTPs | 0,9 | 25mm de cada(G, A, T, C) |
| 10 µmol/l Cebador directo [§] | 1,5 | |
| 10 µmol/l Cebador inverso [§] | 1,5 | |
| Pfx | 0,5 | Invitrogen, Cat. N° 11708-039 |
| Producto de RT | 2,0 | |
| Total | 50,0 | |

* Suministrado con la polimerasa Pfx.

Método

Mezclar los cebadores y la plantilla en un tubo de paredes delgadas, luego agregar 45µl de mezcla para reacción. Mezclar y centrifugar brevemente antes del programa del termociclador:

| Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nro. de ciclos |
|------------------|----------------------------|----------------|
| 94 | 10:00 | |
| 55 | 5:00 | |
| 68 | 2:00 | |
| 94 | 0:05 | } 39 |
| 55 | 0:05 | |
| 68 | 2:00 | |
| 94 | 0:05 | |
| 55 | 0:05 | |
| 68 | 10:00 | |
| 4 | Retener | |

Análisis del producto

Hacer correr 5µl de cada muestra en un gel de agarosa al 0,8% (w/v) compuesto de solución amortiguadora 1x TBE conteniendo tinte GelRed (Biotium, Cat. N° 41003-1) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Las reacciones deben producir bandas únicas y no requieren purificación del gel.

Depurado del producto

Es necesario retirar los reactivos de los componentes de RT-PCR antes de la secuenciación de genes. La mejor forma de hacerlo es usando un proceso de captura/elución de ADN de columna y el sistema usado en el NIMR es de GE Healthcare (ilustra GFX PCR DNA y kit de purificación de bandas de gel #28-9034-70). Se deben seguir las indicaciones del fabricante, pero se utilizan lavados 2 x 500 µl y, con fines de secuenciación, los productos por lo general son eluidos con 50µl de agua (QIAGEN®, Cat. N° 129114) o con el amortiguador para elusión 'rosa' suministrado con el kit GE Healthcare.

Cuantificación del producto

El producto del ADN se mide utilizando un GeneQuant pro (Cat. N° 80-2114-98) y el equivalente a 100-200 ng de ADN por cada reacción de secuenciación.

Secuenciación de genes

Se realiza utilizando kits ABI BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Cat. N° 4336774) y secuenciadores capilares (MegaBACE 1000 o ABI 3700).

Anexo 2:

Análisis de RT-PCR en tiempo real para el gen matriz (Virus de influenza tipo A)

La RT-PCR en tiempo real presenta desafíos distintos que la RT-PCR convencional. Además de las consideraciones de la RT-PCR descritas en el Anexo 1, las consideraciones específicas para la RT-PCR en tiempo real incluyen:

- Garantizar que se usen y manipulen correctamente los equipos, el software, y los reactivos para fluorescencia adecuados.
- Garantizar la adecuada capacitación del personal para la interpretación de los resultados (es crucial la experiencia para reconocer los positivos verdaderos, la interpretación de los controles/el valor Ct y la fluorescencia aberrante).
- La validación en el laboratorio y la optimización de las reacciones son esenciales para las determinaciones cuantitativas.
- Hay poca probabilidad de contaminación cuando se eliminan las reacciones luego de las pruebas. Sin embargo, muchos laboratorios realizan otros análisis posteriores a la reacción (por ejemplo, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción usando geles, secuenciación, etc.) los cuales pueden reintroducir la contaminación.

Protocolo 1 de RT-PCR en tiempo real¹³

Extraer el ARN viral de la muestra clínica según se describe en el Anexo 1: Análisis de RT-PCR Convencional.

Materiales requeridos

Transcripción inversa

- Amortiguador 10x PCR I con 15 mmol/l MgCl₂ (Applied Biosystems)
- Hexámero aleatorio 50 μmol/l (Applied Biosystems, Cat. N° 8080127)
- Transcriptasa Inversa de Mula 50 U/μl (Applied Biosystems, Cat. N° 8080018)
- Inhibidor de RNasa 20 U/μl (Applied Biosystems, Cat. N° 8080119)
- Kit LightCycler® – FastStart™ DNA Master HybProbe (Roche Applied Sciences, Cat. N° 03 003 248 001)

PCR en Tiempo Real

Cebadores y mezcla de sondas: Agregar igual volumen de los siguientes componentes para preparar los cebadores y la mezcla de sondas para la influenza tipo A, gen M.

Cebadores y sondas

| Tipo/subtipo | Fragmento del gen | Cebador | Secuencia |
|------------------|-------------------|----------|---|
| Influenza tipo A | Matriz (M) | FLUAM-1F | AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA (10 μmol/l) |
| Influenza tipo A | Matriz (M) | FLUAM-2F | CATTGGGATCTTGCACTTGATATT (10 μmol/l) |
| Influenza tipo A | Matriz (M) | FLUAM-1R | CAA AGCGTCTACGCTGCAGTCC (10 μmol/l) |
| Influenza tipo A | Matriz (M) | FLUAM-2R | AAACCGTATTTAAGGCGACGATAA (10 μmol/l) |
| Influenza tipo A | Matriz (M) | FLUA-1P | 5'-(FAM)-TTTGTGTTACGCTCACCGT-(TAMRA)-3' (5 μmol/l) |
| Influenza tipo A | Matriz (M) | FLUA-2P | 5'-(FAM)-TGGATTCTTGATCGTCTTTTCTTCAAATGCA-(TAMRA)-3 (5 μmol/l) |

El cebador activo y la mezcla de sondas se preparan mezclando los 6 reactivos antes mencionados en volúmenes iguales.

Procedimiento

1. Realizar el paso de RT usando los reactivos que se muestran en la siguiente tabla y las indicaciones i-iii debajo de la misma.

¹³ [National Influenza Centre, Centre for Health Protection, 382 Nam Cheong Street, Shek Kip Mei, Kowloon, Hong Kong Special Administrative Region of China. http://www.chp.gov.hk](http://www.chp.gov.hk)

| Reactivo | Volumen (µl) por reacción |
|--|---------------------------|
| Amortiguador 10x PCR I con 15 mmol/l MgCl ₂ | 2,0 |
| Extra 25 mmol/l MgCl ₂ | 2,8 |
| dNTPs (2.5 mmol/l) | 8,0 |
| ARN extraído | 4,2 |
| Hexámero aleatorio 50 µmol/l | 1,0 |
| Inhibidor de RNAasa 20U/µl | 1,0 |
| Transcriptasa inversa 50 U/µl | 1,0 |

- i. Agitar en Vortex y centrifugar el tubo con la mezcla brevemente (~3 seg).
- ii. Mantener el tubo a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego incubarlo a 42 °C durante por lo menos 15 minutos.
- iii. Incubar el tubo a 95 °C durante 5 minutos y luego enfriarlo en hielo.

2. Realizar RT-PCR

- i. Preparar la mezcla para reacción Hot Start pipeteando suavemente 60 µl de LightCycler-FastStart Reaction Mix Hyb Probe (frasco ampolla 1b) en el LightCycler-FastStart Enzyme (frasco ampolla 1a).
- ii. Para cada muestra de la prueba, controles positivos y negativos, preparar la mezcla de reactivos con los cebadores y la mezcla de sondas como se describe en la siguiente tabla:

Mezcla Maestra:

| Reactivo | Volumen (µl) |
|----------------------------------|--------------|
| H ₂ O grado PCR | 7,6 |
| MgCl ₂ (25 mmol/l) | 2,4 |
| Cebadores y mezcla de sondas | 3,0 |
| Mezcla para reacción "Hot Start" | 2,0 |
| Volumen total | 15,0 |

Cada reacción:

| Reactivo | Volumen (µl) |
|---|--------------|
| Mezcla Maestra | 15,0 |
| cDNA (del producto de RT; paso 1. Arriba) | 5,0 |

Condiciones del ciclado de la temperatura de RT-PCR:

| Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nº de ciclos |
|-----------------------------|------------------------------------|---------------------|
| 95 | 10:00 | 1 |
| 95 | 0:10 | } 50 |
| 56 | 0:15 | |
| 72 | 0:10 | |
| 40 | 0:30 | 1 |

Protocolo 2 de RT-PCR en tiempo real¹⁴

Extraer el ARN viral de la muestra clínica como se describe en el Anexo 1: Análisis de RT-PCR Convencional

Materiales requeridos

- Kit QIAGEN® QuantiTect®, Sonda RT-PCR (Cat. N° 204443)
- QIAGEN® 2 x QuantiTect®, Mezcla Maestra Sonda RT-PCR
- Mezcla RT QIAGEN® QuantiTect®,
- Agua sin RNasa
- Inhibidor de RNasa (Applied Biosystems, Cat. N° N808-0119)
- Cebadores
- Sonda TaqMan® MGB

Equipo

Sistema de detección de PCR en tiempo real Chromo-4 (BioRad) LightCycler 2 (Roche) o LightCycler 480 (Roche)

PCR en Tiempo Real

La PCR en Tiempo Real se realiza con RT-PCR de Un Paso utilizando la sonda TaqMan®.

Cebadores y sondas

| Tipo/subtipo | Fragmento del gen | Cebador | Secuencia |
|------------------|-------------------|---------------------|---|
| Influenza tipo A | Matriz (M) | MP-39-67For | CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC (10 µmol/l) |
| Influenza tipo A | Matriz (M) | MP-183-153Rev | TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCC A (10 µmol/l) |
| Influenza tipo A | Matriz (M) | MP-96- 75ProbeAs | 5' (FAM)-ATYTCCGCTTTGAGGGGGCCTG- (MGB)-3' (5 pmol/ µl) |

¹⁴ Protocolo suministrado por National Institute of Infectious Diseases (NIID), Center for Influenza Virus Research, Tokio, Japón (WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza).

Mezcla para reacción

| Reactivo | Volumen (µl) |
|--|--------------|
| Agua sin RNasa | 3,75 |
| Mezcla Maestra Probe RT-PCR 2x QuantiTect® | 12,5 |
| Cebador directo (10 µmol/l) | 1,5 |
| Cebador inverso (10 µmol/l) | 1,5 |
| Sonda TaqMan MGB (5 pmol/µl) | 0,5 |
| Mezcla QuantiTect®RT | 0,25 |
| Total | 20,0 |

Procedimiento

1. Distribuir 20 µl de la mezcla de reacción dentro de cada placa de reacción para RT-PCR.
2. Agregar 5 µl del ARN de la muestra a cada mezcla de reacción. Para reacciones de control, utilizar 5 µl de agua destilada para control negativo y 5 µl de los ARN virales adecuados para control positivo.
3. Programar los termocicladores como lo muestra la siguiente tabla.
4. Iniciar el programa de RT-PCR en tiempo real mientras las placas de reacción para RT-PCR están aún sobre el hielo.
5. Esperar hasta que el termociclador haya llegado a 50 °C, luego colocar las placas de reacción para RT-PCR en el termociclador.

Condiciones del ciclado de la temperatura de RT-PCR:

Sistema de detección de PCR en Tiempo Real Chromo-4 (BioRad).

| Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nº de ciclos |
|------------------|------------------------------|--------------|
| 50 | 30:00 | 1 |
| 95 | 15:00 | 1 |
| 94 | 0:15 | } 45 |
| 56 | 1:00 (recopilación de datos) | |

Condiciones del ciclado de la temperatura de RT-PCR: LightCycler 2 (Roche) y LightCycler 480 (Roche).

| Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nº de ciclos |
|------------------|---|--------------|
| 50 | 30:00 | 1 |
| 95 | 15:00 | 1 |
| 94 | 0:15 (índice de rampa 1,5 °C/seg) | } 45 |
| 56 | 1:15 (índice de rampa 1,5 °C/seg) Recopilación de datos | |

RT-PCR en tiempo real de un paso para detección del gen H1 del virus pandémico (H1N1) 2009

Protocolo 1 de RT-PCR en Tiempo Real¹⁵

Este protocolo es para RT-PCR en tiempo real para la detección de los virus pandémicos (H1N1) 2009 (gen HA) en muestras humanas. Se recomienda a los laboratorios con dificultades para identificar los virus que circulan en la actualidad contactarse con uno de los miembros del Comité de Expertos en influenza por PCR de la OMS o con uno de los WHOCC para solicitar ayuda en la identificación de los cebadores óptimos a utilizar.

Materiales requeridos

- Mini kit QIAamp Viral ARN (QIAGEN® Cat. Nº 52904)
- Sistema 750 RealTime PCR (Applied Biosystems)
- Reactivos TaqMan EZ RT-PCR Core (Applied Biosystems, Part Nº N8080236)
- Placa de Reacción MicoAmp Fast Optical de 96 fosas (Applied Biosystems, Part Nº 4346906)
- Film adhesivo óptico MicroAmp (Applied Biosystems, Part Nº 4311971)
- Etanol (96–100%)
- Microcentrífuga (ajustable, hasta 13 000 rpm)
- Pipetas ajustables (10, 20, 100, 200 µl)
- Puntas para pipetas estériles sin RNasa con barrera de aerosol
- Vortex
- Tubos para microcentrífuga (0,2, 1,5 ml)
- Control positivo (Virus A de la influenza porcina A/SW/HK/PHK1578/03 o A/California/04/2009) (disponible a pedido)
- Cebadores y conjunto de sondas

¹⁵ Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Hong Kong, Universidad Pathology Building Queen Mary Hospital, Hong Kong Región Administrativa Especial de China

Cebadores y sondas

| Tipo/subtipo | Fragmento del gen | Cebador | Secuencia |
|-------------------------------------|-------------------|----------|---|
| Virus pandémico Influenza A H1N1 | HA | HKU-qSWF | GGGTAGCCCCATTGCAT |
| Virus pandémico Influenza A H1N1 | HA | HKU-qSWR | AGAGTGATTCACTCTGGATTTC |
| Virus pandémico Influenza A H1N1 | HA | HKU-qSWP | 5`-[FAM] TGGGTAATGTAACATTGCTGGCTGG [TAMRA]-3` |

Procedimiento

1. Extraer el ARN viral de la muestra clínica con el mini kit QIAamp viral o kit de extracción equivalente de acuerdo con las indicaciones del fabricante.
2. Preparar la mezcla maestra para RT-PCR como se indica a continuación:

| Componente | Concentración activa | Volumen, μ l |
|--------------------------|----------------------|------------------|
| Agua H ₂ O | NA | 6,2 |
| 5X EZBuffer A | 5X | 5,0 |
| Mn(OAc) ₂ | 25 mM | 3,0 |
| dATP | 10 mM | 0,75 |
| dCTP | 10 mM | 0,75 |
| dGTP | 10 mM | 0,75 |
| dUTP | 20 mM | 1,5 |
| Cebador directo | 50 μ M | 0,4 |
| Cebador inverso | 50 μ M | 0,4 |
| Sonda (FAM) | 10 μ M | 1,0 |
| rTth Poly(2.5U/ μ l) | 2.5 U/ μ l | 1,0 |
| UNG(1 U/ μ l) | 1 U/ μ l | 0,25 |
| Plantilla de ARN | | 4,0 |
| TOTAL | | 25,0 |

3. Establecer las siguientes condiciones de RT-PCR:

Tinte de detección: FAM

Tinte extintor: TAMRA

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nº de ciclos |
|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| Transcripción inversa | 50 | 2:00 | 1 |
| | 60 | 40:00 | |
| | 95 | 5:00 | |
| PCR | 95 | 0:15 | 50 |
| | 55 | 1:00 | |

Interpretación de los resultados

Este ensayo puede detectar específicamente muestras con el virus pandémico (H1N1) 2009 y, especialmente, algunas otras secuencias virales de H1 porcino, pero no las que contienen virus H1N1 estacional humano. Las muestras de ARN extraídas de siete humanos con H1N1 estacional, dos humanos con H3N2 estacional, un humano con H5N1, siete con virus de influenza aviar (HA subtipos 4, 5, 7, 8, 9 y 10) y >150 muestras de aspirados nasofaríngeos de pacientes con otras enfermedades respiratorias fueron negativas en su totalidad en este ensayo. Uno de los controles positivos recomendados en este estudio es un virus H1 porcino aislado en Hong Kong. Esto es diseñado para minimizar el envío y la manipulación de los virus H1N1 similares a A/California/04/2009 a los laboratorios que no tienen las instalaciones de bioseguridad recomendadas. Se ha desarrollado el ensayo de RT-PCR en tiempo real específico para el virus pandémico (H1N1) 2009, y no para otros virus porcinos (Poon et al., 2009).¹⁶ Si esta prueba se hace correr sin controles, los productos deben confirmarse mediante secuenciación y comparación con las secuencias en las bases de datos depositadas. La ausencia de los productos de PCR correctos (es decir, un resultado negativo) no descarta la presencia de virus de influenza. Los resultados deben ser interpretados junto con la información clínica y epidemiológica disponible.

Protocolo 2 de RT-PCR en Tiempo Real ¹⁶

Este Protocolo es una RT-PCR en tiempo real para la detección de los virus pandémicos (H1N1) 2009 (gen HA) en muestras humanas. Se recomienda a los laboratorios con dificultades para identificar los virus que circulan en la actualidad contactarse con uno de los miembros del Comité de Expertos en influenza por PCR de la OMS o con uno de los WHOCC para solicitar ayuda en la identificación de los cebadores óptimos a utilizar.

Materiales requeridos

- Mini kit QIAamp Viral ARN (QIAGEN® Cat. Nº 52904)
- Sistema 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)
- Sistema Invitrogen SuperScript® III Platinum® one-step qRT-PCR (Nº 11732-088).

Cebadores y sondas

| Tipo/subtipo | Fragmento del | Cebador | Secuencia |
|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|
| Virus pandémico (H1N1) 2009 | HA | swlH1F swlH1R swlH1P* | GACAAAATAACAAACGAAGCAACTGG GGGAGGCTGGTGTATAGCACC GCATTCGCAA"t"GGAAAGAAATGCTGG |

* La "t" minúscula denota la posición del extintor. Las sondas deben ser marcadas en el extremo 5' con la molécula reportera 6-carboxifluoresceína (FAM) y extinguida internamente en un residuo "t" modificado con BHQ1, con un fosfato terminal en el extremo 3' para prevenir la extensión de la sondas por ADN polimerasa.

Procedimiento

1. Extraer el ARN viral de la muestra clínica con el mini kit QIAamp viral o kit de extracción equivalente según las indicaciones del fabricante.
2. Preparar la mezcla maestra para RT-PCR como se indica a continuación:

| Componente | Concentración activa | Volumen in µl |
|--------------------------------|----------------------|---------------|
| Agua H2O | NA | 5,5 |
| 2x mezcla maestra para PCR *\$ | 5X | 12,5 |
| Cebador directo | 40 µM | 0,5 |
| Cebador inverso | 40 µM | 0,5 |
| Sonda | 10 µM | 0,5 |

¹⁶ WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza. National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, England. Email: whocc@nimr.mrc.ac.uk. <http://www.nimr.mrc.ac.uk/wic/>

| | | |
|----------------------------------|--|-------------|
| Mezcla de RT/ADN polimerasa * | | 0,5 |
| Mezcla maestra total | | 20,0 |
| Plantilla de ARN | | 5,0 |
| Volumen de reacción TOTAL | | 25,0 |

* Suministrado en el kit Invitrogen.

§ El tinte de referencia ROX (suministrado con el kit Invitrogen) **debe** agregarse a la mezcla maestra al nivel recomendado por el fabricante.

3. Ensamblar una mezcla maestra para la cantidad de muestras requeridas (se debe recordar preparar más de lo requerido para compensar las pérdidas de pipeteado).
4. Preparar alícuotas de 20 µl de este preparado y agregar la plantilla de ARN requerida. Centrifugar brevemente las placas/tubos antes de cargar en el termociclador y correr el programa de termociclado.

Programa de amplificación del termociclador:

| Paso | Temperatura (o C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nro. de ciclos |
|--|----------------------|--------------------------------|-------------------|
| Transcripción inversa y activación de Taq | 50 95 | 30:00 02:00 | 1 |
| PCR | 95 55 | 00:15 00:30* | 50 |

* Los datos de fluorescencia (FAM) se recopilan durante el paso de incubación a 55°C.

Protocolo N° 4¹⁷

Este protocolo es una RT-PCR en tiempo real para detectar los virus pandémicos H1N1 (gen HA) en muestras humanas. Se recomienda a los laboratorios con dificultades para identificar los virus que circulan en la actualidad contactarse con uno de los miembros del Comité de Expertos en influenza por PCR de la OMS o con uno de los WHOCC para solicitar ayuda en la identificación de los cebadores óptimos a ser utilizados.

Materiales requeridos

- Mini kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN®, Cat. N° 52904)
- Etanol (96–100%)
- Microcentrífuga (ajustable, hasta 13 000 rpm)
- Pipetas ajustables (10, 20, 100, 200 µl)
- Puntas para pipetas estériles sin RNasa con barrera de aerosol
- Vortex
- Tubos para microcentrífuga (0,2, 1,5 ml)
- Kit LightCycler – Fast Start DNA Master Hybridization Probe (Cat. N° 03003248001 o 12239272001) (Roche):
 - LC-Fast Start Enzyme (frasco ampolla 1a)
 - LC-Fast Start Reaction Mix Hybridization Probes, 10 × conc. (frasco ampolla 1b)
 - MgCl₂ (25 mm) (frasco ampolla 2)
 - H₂O grado PCR (frasco ampolla 3)

Cebadores y sondas

| Tipo/subtipo | Fragmento del gen | Cebador | Secuencia |
|----------------------------------|-------------------|-------------|---|
| Virus pandémico Influenza A H1N1 | HA | H1-sw-988f | AGA CTG GCC ACA GGA TTG AGG AAT (10 µmol/l) |
| Virus pandémico Influenza A H1N1 | HA | H1-sw-1171r | CGT CAA TGG CAT TCT GTG TGC TCT (10 µmol/l) |
| Virus pandémico Influenza A H1N1 | HA | H1-sw-1077p | 5'-(FAM)- AGGGATGGTAGATGGATGGTACGG TT-(TAMRA)-3' (5 µmol/l) |

* Para preparar los cebadores y la mezcla de sondas, agregar volúmenes iguales (en µl) de cada uno de los tres reactivos y mezclar.

¹⁷ Protocolo suministrado por: Virology Division, Centre for Health Protection, Hong Kong SAR, China., (National Influenza Centre, WHO H5 Reference Laboratory).

http://www.chp.gov.hk/files/pdf/CHP_Protocolos_for_the_Detection_of_Human_Swine_Influenza.pdf

Procedimiento

1. Proceder a la extracción del ARN de las muestras clínicas.
2. Sintetizar el cDNA en el ARN extraído utilizando el método que se describe en El protocolo N° 1, PCR en Tiempo Real (Anexo 2) página N° 19.
3. Preparar el LightCycler 2.0 (ver apéndice I).
4. Preparar la mezcla para reacción “Hot Start” pipeteando suavemente 60 µl de LC-Fast Start Reaction Mix Hybridization Probes (frasco ampolla 1b) en el LC-Fast Start Enzyme (frasco ampolla 1a).
5. Para cada muestra de la prueba y para los controles positivos y negativos, preparar la mezcla de reactivos según las siguientes indicaciones:

| Reactivo | Volumen (µl) |
|----------------------------------|--------------|
| Mezcla Maestra: | |
| H ₂ O grado PCR | 7,6 |
| MgCl ₂ (25 mm) | 2,4 |
| Cebadores y mezcla de sondas | 3,0 |
| Mezcla para reacción “Hot Start” | 2,0 |
| Volumen total | 15,0 |
| Cada reacción: | |
| Mezcla Maestra | 15,0 |
| cDNA | 5,0 |

6. Colocar el carrusel dentro de la caja de enfriado y cargar los capilares dentro del carrusel.
7. Pipetear la mezcla maestra y el cDNA en los capilares correspondientes.
8. Cerrar los capilares y trasladar el carrusel al LightCycler Carousel Centrifuge.
9. Centrifugar los capilares en el LightCycler Carousel Centrifuge por 1 segundo a 400-x g (3000 rpm).
10. Colocar el carrusel dentro del LightCycler y oprimir *Run* para comenzar el programa.

Análisis de los datos

1. Una vez terminada la corrida, hacer clic en *Finish*.
2. Hacer clic en *Analysis* en la Barra de Herramientas Global y seleccionar *Absolute Qualification of the Analysis type* para analizar los datos.
3. Seleccionar el canal 530 y el denominador de canales 640 en *Channel Setting*.
4. En la pantalla *Fit Point*, hacer clic en *Noise band curve* para ver el resultado.
5. En *Results*, la columna Cp muestra los puntos de cruzamiento de las curvas.

Apéndice I

Preparación del LightCycler 2.0 para RT-PCR en tiempo real para H1 (porcino)

1. Encender LightCycler 2.0, Carousel Centrifuge, computador e impresora.
2. Escribir nombre de usuario y contraseña para ingresar a Windows XP.
3. Hacer clic en el ícono **LightCycler 4.05 software**.
4. Escribir nombre de usuario y contraseña para ingresar al programa.
5. Abrir el programa **FluA.exp** en la pantalla principal y un Experiment Kit Wizard guiará el procedimiento del experimento completo.
6. Continuar con el **self-test** desde Wizard.
7. Después de terminar la autoevaluación, controle la condición de temperatura-ciclado.

Condición de temperatura-ciclado de PCR

| Temperatura (°C) | Tiempo (minuto: segundo) | Nro. de ciclos |
|------------------|-----------------------------|----------------|
| 95 | 10:00 | 1 |
| 94 | 0:10 | }50 |
| 56 | 0:15 | |
| 72 | 0:10 | |
| 40 | 30 | 1 |

8. Editar la Lista Modelo (Sample List) e ingresar la información adecuada en los campos **Sample Name** y **Type** de **Capillary View** de la pantalla del programa después del Wizard.
9. Hacer clic en el botón **Start Run** de Wizard para que comience el funcionamiento. Durante el mismo, el Wizard permanece en la pantalla.

Protocolo N° 5¹⁸

Este protocolo es una RT-PCR en tiempo real para detectar virus pandémicos H1N1 (gen HA) en muestras humanas. Se recomienda a los laboratorios con dificultades para identificar los virus actualmente circulantes contactarse con uno de los miembros del Comité de Expertos en influenza por PCR de la OMS o con uno de los WHOCC para solicitar ayuda en la identificación de los cebadores óptimos a utilizar

Extraer el ARN viral de la muestra clínica según se describe en el Anexo 1: Análisis Convencional de RT-PCR

Materiales requeridos

- Kit QIAGEN® QuantiTect®, SondaRT-PCR (No. 204443)
 - Mezcla Maestra 2 x QuantiTect®, Sonda RT-PCR
 - QuantiTect®, RT Mix
 - Agua sin RNasa
- Inhibidor de RNasa (Applied Biosystems, Cat. No. N808-0119)
- Cebadores
- Sonda TaqMan® MGB

Equipo

Sistema Chromo-4 Real-time PCR Detection (BioRad) LightCycler 2 (Roche) o LightCycler 480 (Roche)

PCR en tiempo real

PCR en tiempo real se realiza mediante One-step RT-PCR usando sonda TaqMan®

¹⁸ Protocolo suministrado por WHO Collaborating Center for Reference and Research on Influenza y WHO H5 Reference Laboratory en el National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokio, Japón.

Cebadores y sondas

| Tipo/subtipo | Fragmento del gen | Cebador | Secuencia |
|----------------------------------|-------------------|------------------------|---|
| Virus pandémico Influenza A H1N1 | HA | NIID-swH1 TMPPrimer-F1 | AGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGT |
| Virus pandémico Influenza A H1N1 | HA | NIID-swH1 TMPPrimer-R1 | TGTTCCACAATGTARGACCAT |
| Virus pandémico Influenza A H1N1 | HA | NIID-swH1 Sonda2* | 5'-(FAM)-CAGCCAGCAATRTRCATTACC-(MGB)-3' |

* Sonda actualizada; diferente de la versión anterior del 18 de agosto de 2009

Mezcla para reacción

| Reactivo | Volumen (μl) |
|--|--------------|
| Agua sin RNasa | 3,75 |
| Mezcla para Sonda de RT-PCR 2x QuantiTect® QuantiTect®Maestra | 12,5 |
| Cebador directo(10 μmol/l) | 1,5 |
| Cebador inverso(10 μmol/l) | 1,5 |
| Sonda TaqMan MGB (5 pmol/μl) | 0,5 |
| Mezcla QuantiTect®RT | 0,25 |
| Total | 20,0 |

Procedimiento

1. Distribuir 20 μl de la mezcla para reacción dentro de cada placa de reacción de RT-PCR.
2. Agregar 5 μl del ARN de muestra a la mezcla para reacción. Para reacciones de control, utilizar 5 μl de agua destilada para control negativo y 5 μl de los ARN virales adecuados para control positivo.
3. Programar el termociclador como muestra la tabla siguiente.
4. Comenzar el programa RT-PCR en tiempo real mientras las placas para reacción de la RT-PCR aún se encuentren sobre hielo.

5. Esperar hasta que el termociclador haya alcanzado 50 °C, luego colocar las placas de reacción RT-PCR en el termociclador.

Condiciones de ciclado de la temperatura de RT- PCR: Sistema de detección Chromo-4 Real-time PCR (BioRad)

| Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nº de ciclos |
|------------------|-------------------------|--------------|
| 50 | 30:00 | 1 |
| 95 | 15:00 | 1 |
| 94 | 0:15 | } 45 |
| 56 | 1:00 | |

Condiciones de ciclado de la temperatura de RT-PCR: LightCycler 2 (Roche) y LightCycler 480 (Roche)

| Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nº de ciclos |
|------------------|---|--------------|
| 50 | 30:00 | 1 |
| 95 | 15:00 | 1 |
| 94 | 0:15 (índice de rampa 1.2 ° C/seg) | } 45 |
| 56 | 1:15 (índice de rampa 1.2 ° C/seg) Recopilación de datos | |

Ensayos de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus pandémico (H1N1) 2009, los virus de influenza estacional o virus aviáres (solo protocolo de Grupo N° 2) de la influenza A

Protocolo de Grupo N° 1¹⁹

Este Protocolo describe los procedimientos de RT-PCR para detectar:

1. Los virus de influenza tipo A (gen M)
2. El virus pandémico (H1N1) 2009 (gen H1)
3. Los virus de influenza estacional A (H1N1) y A (H3N2) (genes H1h, N1h, H3h, N2h)

Este Protocolo deberá ser utilizado en caso que se sospeche infección humana debido al virus pandémico (H1N1) 2009.

Se recomienda la siguiente estrategia de prueba:

- Extracción de ARN.
- Amplificación en paralelo de los genes M, H1 pandémico y GAPDH (para evaluar la calidad de la muestra y el procedimiento de extracción).
- En un grupo por separado, amplificación de los genes H1h, N1h, H3h y N2h.
- Todos los genes antes mencionados son evaluados en un formato simple y no múltiple.

Materiales requeridos

- QIAamp Viral ARN (QIAGEN mini Kit 50) (Qiagen®, Cat. No. 52904)
- Sistema SuperScript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Cat. No. 11732-020)
- Sistema Superscript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Cat. No. 11732-088)
- BSA no acetilada al 10% (Invitrogen, Cat. No. P2046)
- LightCycler 1.5 o 2.0 (Capilares)
- LightCycler 480
- Sistema 7500 Real-Time PCR, Applied® Biosystems
- Smart Cycler® Cepheid

Extracción de ácido nucleico

Se extrae el ARN de las muestras utilizando el kit QIAamp Viral ARN (QIAGEN® Mini Kit 50 ref 52904). El ARN extraído de 200 µl de la muestra original es eluído en 60 µl del amortiguador de elución.

Todos los cebadores y las sondas que se describen a continuación fueron validados en las

¹⁹Unité de Génétique Moléculaire des Virus Respiratoires. Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux 75724, Paris Cedex 15, France. Email: grippe@pasteur.fr; <http://www.pasteur.fr>

siguientes condiciones usando el equipo antes mencionado y los reactivos mencionados en la sección Materiales Requeridos anterior.

Se pueden requerir ajustes para el uso de otros kits o de otros instrumentos de PCR en tiempo real. Los cebadores y las sondas para detectar los virus de influenza A (gen M), GAPDH y el virus pandémico de la influenza A (H1N1) 2009 (gen H1swl) también se validaron en las siguientes condiciones:

Kit para mezcla de RT-PCR:

- Sistema Invitrogen Superscript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR (Cat. Nº : 11732-088)

Equipos para PCR en tiempo real:

- 7500 Applied® Biosystems
- SmartCycler® Cepheid

Cebadores y sondas

Si la muestra resulta positiva para M y negativa para H1sw, se sugiere usar los conjuntos de cebadores H1N1h y H3N2h.

| Tipo/subtipo | Gene | Nombre | Secuencias | Bases | Tamaño del producto de PCR | Referencia |
|-----------------|------|----------------|--------------------------------------|-------|----------------------------|------------|
| H1N1 Estacional | HA | H1h-678Fw | CACCCCAGAAATAGCCAAAA | 20 | | 1 |
| H1N1 Estacional | HA | H1h-840Rv | TCCTGATCCA A AG CCTCT AC | 20 | 163 bp | 1 |
| H1N1 Estacional | HA | H1h-715probe | 5'-Fam-CAGGAAGGAAGAATCAACTA 3'-BHQ-1 | 20 | | 1 |
| | | | | | | |
| H3N2 Estacional | HA | H3h-177Fw | GAGCTGGTTCAGAGTTCCTC | 20 | | 1 |
| H3N2 Estacional | HA | H3h-388Rv | GTGACCTAAGGGAGGCATAATC | 22 | 211 bp | 1 |
| H3N2 Estacional | HA | H3h-306Probe | 5'-Fam-TTTTGTGAACGCAGCAAAG 3'-BHQ-1 | 20 | | 1 |
| | | | | | | |
| H3N2 Estacional | NA | N2h-1150 Fw | GTCC AMACCTAAYTCCA A | 18 | | 1 |
| H3N2 Estacional | NA | N2h-1344 Rv | GCCACAAAACACAACAATAC | 20 | 194 bp | 1 |
| H3N2 | NA | N2h-1290 probe | 5'-Fam- | 21 | | 1 |

| | | | | | | |
|-------------------------------|-----------|------------------------|---|----|--------|---|
| Estacional | | | CTTCCCCTTATCAACTCCACA-3'- BHQ-1 | | | |
| H1N1 Estacional | NA | NIh-1134 Fw | TGGATGGACAGATACCGACA | 20 | | 1 |
| H1N1 Estacional | NA | NIh-1275 Rv | CTCAACCCAGAAGCAAGGTC | 20 | 142 bp | 1 |
| H1N1 Estacional | NA | N1h-1206 probe | 5'Fam- CAGCGGAAGTTTCGTTCAACAT 3'-BHQ-1 | 22 | | 1 |
| H1N1 Pandémico | HA | GRswhI-349Fw | GAGCTAAG AGAG C AATTGA | 19 | | 1 |
| H1N1 Pandémico | HA | GRswhI-601Rv | GTAGATGGATGGTGAATG | 18 | 253bp | 1 |
| H1N1 Pandémico | HA | GRswhI- 538Probe(-) | Fam 5'- TTGCTGAGCTTTGGGTATGA -3'- BHQ-1 | 20 | | 1 |
| Influenza tipo A | | GRAM/7Fw | CTTCT A ACCGAGGTCGAAACGTA | 23 | | 2 |
| Influenza tipo A | | GRAM/161Rv | GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTT TA | 25 | 202 bp | 2 |
| Influenza tipo A | | GRAM probe/52/+ | 5'-Fam- TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG 3'-BHQ-1 | 21 | | 2 |
| Control interno humanos | GAPD H | GAPDH-6Fw | GAAGGTGAAGGTCGGAGT | 18 | | 3 |
| Control interno humanos | GAPD H | GAPDH-231Rv | GAAGATGGTGATGGGATTTC | 20 | 226 bp | 3 |
| Control interno humanos | GAPD H | GAPDH- 202Probe(-) | 5'-Fam- CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'- BHQ-1 | 20 | | 3 |

1. National Influenza Center (Northern-France), Institut Pasteur, Paris.

2. Wong et al., 2005, J. Clin. Pathol. 58;276-280.

3. National Influenza Center (Southern-France), CHU, Lyon.

Procedimiento

LightCycler 1.5 o 2.0 (Capilares) (ROCHE)

| Reactivo | Volumen (μl) | Concentración final |
|--|--------------|---------------------|
| H ₂ O PPI | 1,06 | |
| Mezcla para reacción 2x | 10,0 | 3,0 mM Mg |
| MgSO ₄ (50mM) | 0,24 | 0,6 mM Mg |
| Cebador directo (10μM) | 1,0 | 0,5 μM |
| Cebador inverso (10μM) | 1,0 | 0,5 μM |
| Sonda (10μM) | 0,4 | 0,2 μM |
| BSA no acetilada (10mg/ml) | 0,5 | 0,25 mg/ml |
| Mezcla Superscript III RT/Platinum Taq | 0,8 | |
| Total | 15,0 | |

LightCycler 480 (formato de 96 pocillos) (ROCHE)

| Reactivo | Volumen (μl) | Concentración final |
|--|--------------|---------------------|
| H ₂ O PPI | 1,56 | |
| Mezcla para reacción 2x | 10,0 | 3,0 mM Mg |
| MgSO ₄ (50mM) | 0,24 | 0,6 mM Mg |
| Cebador directo (10μM) | 1,0 | 0,5 μM |
| Cebador inverso (10μM) | 1,0 | 0,5 μM |
| Sonda (10μM) | 0,4 | 0,2 μM |
| Mezcla Superscript III RT/Platinum Taq | 0,8 | |
| Total | 15,0 | |

15 μl de mezcla para reacción + 5 μl de muestras de ARN.

Sistema 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) o equipos SmartCycler (Cepheid) Real-Time PCR

| Reactivo | Reactivo | Reactivo |
|--|-------------|-----------|
| H ₂ O PPI | 1,5 | |
| Mezcla para reacción 2x | 12,5 | 3,0 mM Mg |
| MgSO ₄ (50mm) | 2,0 | 0,8 µM |
| Cebador directo (10µM) | 2,0 | 0,8 µM |
| Cebador inverso (10µM) | 1,0 | 0,2 µM |
| Sonda (10µM) | 0,5 | |
| Mezcla Superscript III RT/Platinum Taq | 0,5 | |
| Total | 20,0 | |

20 µl de mezcla para reacción + 5 µl de muestras de ARN

Controles

Cada ensayo de RT-PCR en tiempo real incluye muestras adicionales desconocidas:

- Dos muestras negativas enmarcando muestras desconocidas durante la extracción de ARN (controles de extracción negativos);
- Controles positivos (por duplicado); cuando se usan transcripciones sintetizadas *in vitro* como controles, incluir cinco controles positivos para cuantificación (por duplicado) incluyendo copias 10⁴, 10³ y 10² de transcripciones de ARN sintetizadas *in vitro*; y
- Un control negativo de amplificación.

Sistema LightCycler

| Ciclos de amplificación | Temperatura (°C) | Tiempo(minuto:segundo) | Nro. de ciclos |
|-------------------------|------------------|------------------------|----------------|
| Transcripción inversa | 45 | 15:00 | 1 |
| Desnaturalización | 95 | 3:00 | 1 |
| Amplificación | 95 | 0:10 | } 50 |
| | 55 | 0:10 | |
| | 72 | 0:20 | |
| Enfriado | 40 | 0:30 | 1 |

Sistema 7500 Applied r Smartcycler

| Ciclos de amplificación: | Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nro. de ciclos |
|--------------------------|------------------|-------------------------|----------------|
| Transcripción inversa | 50 | 2:00 | 1 |
| Desnaturalización | 95 | 15:00 | |
| Amplificación | 95 | 0:15 | 50 |
| | 60 | 0:40 | |

Sensibilidad

Para RT-PCR en tiempo real de M

La sensibilidad es de alrededor a 100 copias de genoma de ARN equivalente por reacción (nivel de confianza del 95%).

Esta cantidad de secuencias objetivo es siempre detectada; sin embargo, la probabilidad de detectar cantidades menores del virus decrece proporcionalmente. En nuestros entornos se podrían detectar muestras que contengan 10 copias.

Para la RT-PCR en tiempo real del H1 pandémico

La sensibilidad es comparable a la de RT-PCR en tiempo real de M y a la sensibilidad del kit de los CDC ($C_p < 36$ para todas las muestras positivas evaluadas hasta la fecha).

Para la RT-PCR en tiempo real de H3h y N2h

La sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real de H3h es equivalente a la de la PCR en tiempo real de M ($C_p \text{ H3h} \approx C_p \text{ M}$) pero la sensibilidad de la RT-PCR de N2h es menor ($C_p \text{ N2h} \approx C_p \text{ M} + 5 C_p$)

Para la RT-PCR en tiempo real de H1h y N1h

La sensibilidad de la RT-PCR de N1h es equivalente a la de la PCR en tiempo real de M ($C_p \text{ N1h} \approx C_p \text{ M}$) pero la sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real de H1h es menor ($C_p \text{ H1h} \approx C_p \text{ M} + 4 C_p$).

Especificidad

Para la RT-PCR en tiempo real del H1 pandémico

Hasta el momento, pruebas limitadas no demostraron detectar los virus de influenza estacional (influenza A(H1N1), A(H3N2), B) ni muestras reconocidas como positivas para otros virus respiratorios (influenza C, RSV A, B, hBoV, hPIV1,3, hMPV, HRV, enterovirus, adenovirus, CMV, HSV, VZV).

En el caso de los virus de influenza porcina, la detección fue positiva para A/sw/England/117316/86 (linaje porcino clásico) y negativa para A/sw/England/502321/94 (H3N2).

Para los virus pandémicos (H1N1) 2009, la detección fue positiva para A/California/4/2009, así como también para más de 10 muestras positivas para el nuevo virus pandémico A(H1N1).

NOTA: La RT-PCR en tiempo real para H1 pandémico no detecta el control positivo del kit de los CDC.

Control positivo para RT-PCR en tiempo real de M y GAPDH

El control positivo para RT-PCR en tiempo real de M es un ARN transcripto *in vitro* de la cepa A/Paris 650/06(H1N1). El transcripto contiene el Marco Abierto de Lectura del gen M (de ATG a nt 982) como estándar negativo. Cada microtubo contiene 10^{11} copias de las secuencias objetivo diluidas en tRNA de levadura y liofilizadas.

El control positivo de RT –PCR en tiempo real de GAPDH es un ARN transcripto *in vitro*. El transcripto contiene el Marco Abierto de Lectura del gen M (desde nt 6 (ATG = 1) a nt 231) como cadena negativa. Cada microtubo contiene 10^{11} copias de las secuencias objetivo diluidas en tRNA de levadura y liofilizadas.

Reconstitución del ARN transcripto

- Agregar 100 µl de agua destilada para obtener una solución a una concentración de 10^9 copias/µl. Almacenar a -80°C .
- Diluir en H_2O para preparar un banco maestro a 2×10^6 copias/µl. Almacenar a -80°C .
- A partir de ahí, preparar un banco activo del reactivo a 2×10^4 copias/µl con el fin de evitar los ciclos de congelamiento/descongelamiento. Los tubos activos pueden ser almacenados a -20°C por menos de una semana.
- Los controles positivos están disponibles a pedido en grippe@pasteur.fr.

Interpretación de los resultados

Las reacciones de GAPDH deben arrojar un $\text{Cp} < 35$; si se obtienen resultados mayores y por otro lado negativos, esto puede deberse a:

- Calidad deficiente de la muestra con cantidad insuficiente de células; obtener una nueva muestra para el mismo paciente.
- Presencia de inhibidores; repetir el procedimiento con diluciones del ARN extraído (por ejemplo, 1:10, 1:100) y/o volver a extraer el ARN.

Reacciones positivas para M y H2 pandémico y reacciones positivas para H1h, N1h, H3h, N2h: caso confirmado de virus pandémico (H1N1) 2009.

Reacción positiva para M y negativa para H1 pandémico y para H1h, N1h, H3h, N2h (generalmente observado para carga baja del virus en la muestra), repetir las reacciones y/o volver a extraer el ARN.

Una reacción positiva para M y para N1h o H3h pero negativa para H1 pandémico y para

H1h y N2h (generalmente observado para carga baja del virus en la muestra) puede indicar una infección con el virus estacional; en este caso, repetir las reacciones y/o repetir la extracción de ARN para determinar los subtipos.

Reacción positiva para M y el virus H1 pandémico y reacción positiva para N1h o H3h puede reflejar una contaminación cruzada o una posible coinfección tanto con el virus pandémico (H1N1) 2009 como con el virus estacional; repetir la extracción de ARN y repetir las reacciones teniendo todas las precauciones necesarias para evitar la contaminación cruzada.

Protocolo de Grupo Nº 2²⁰

Este Protocolo describe los procedimientos para RT-PCR en tiempo real para detectar:

1. Los virus de influenza tipo A (gen M)
2. El virus pandémico de la influenza A (H1N1) 2009 (gen N1)
3. El virus pandémico de la influenza A (H1N1) 2009 (gen HA)
4. Los virus de influenza estacional A (H1N1) y A (H3N2) (genes H1h, H3h)
5. Los virus de influenza aviar A (H5), los virus altamente patogénicos H5N1
6. Los virus de influenza aviar A (H7)
7. Los virus de influenza tipo B

Materiales requeridos

1. Equipo ABI7500
2. Kit de reactivos TaqMan EZ RT-PCR Core (Applied Biosystems, Cat. No. N8080236)
3. La amplificación y la detección se realizan en un equipo ABI7500 con el kit de reactivos TaqMan EZ RT-PCR Core (Applied Biosystems), usando 20 µl de ARN en un volumen final de 50 µl

Validación de la prueba

Todas las pruebas fueron optimizadas y validadas para funcionar en la plataforma anteriormente descrita. No fueron optimizadas para otras plataformas u otros reactivos. Por ejemplo, algunas de estas pruebas no funcionan bien con otros reactivos (por ejemplo, Ampli-Taq Gold).

La prueba para el virus de influenza B, la prueba para el gen M del virus de la influenza A, la prueba para el virus humano de la influenza A/H1, y la prueba para el virus humano de la influenza A/H3 se han utilizado con éxito por varios años en un laboratorio para diagnóstico virológico con muestras humanas. La prueba para el gen M del virus de influenza A, las pruebas para el virus de influenza A/H5 y la prueba para influenza A/H7 se han usado con éxito por varios años en un laboratorio para diagnóstico virológico con muestras humanas y animales.

La prueba para la influenza A/H1 estacional no detecta las secuencias H1 del virus pandémico H1N1 2009, sólo las secuencias H1 del virus de influenza estacional A (H1N1). Las pruebas del virus pandémico H1N1 2009 NA y HA no detectan las secuencias NA o HA de la influenza estacional A (H1N1), sólo N1 y H1 de las secuencias del virus pandémico H1N1 2009. Esto ha sido validado usando grupos de diversos virus H1N1 humanos recientes y el virus porcino y el virus pandémico H1N1. Además, las pruebas demostraron ser efectivas para detectar casos esporádicos de los virus pandémicos H1N1 2009 en los Países Bajos.

²⁰ Dept Virology, Erasmus MC Rotterdam, Netherlands. (www.virology.nl)

Mezcla para reacción (EZ RT-PCR)

| Reactivo | Volumen (µl) |
|--|--------------|
| Agua DEPC | 4,5 µl |
| Amortiguador 5x Taqman EZ | 10,0 µl |
| Acetato de manganeso (25 mm) | 6,0 µl |
| dNTP's | 6,0 µl |
| Cebador/Mezcla de sondas (1 µl/reacción) | 1,0 µl |
| Polimerasa rTth DNA (2,5U/µl) | 2,0 µl |
| Amperasa UNG (1U/µl) | 0,5 µl |
| Volumen de la mezcla total | 30,0 |
| | |
| ARN de entrada | 20,0 µl |
| Volumen total | 50,0 |

Condiciones de termociclado

| Temperatura (°C) | Tiempo (minuto:segundo) | Nro. de ciclos |
|------------------|-------------------------|----------------|
| 50 | 02:00 | 1 |
| 60 | 30:00 | 1 |
| 95 | 05:00 | 1 |
| 94 | 00:20 | 40[a] |
| 62 | 01:00 | |

[a] Para la prueba específica del gen NA y HA del virus pandémico (H1N1) 2009 se utilizan 45 ciclos.

Cebadores y sondas

| Tipo/subtipo | Cebador/Sonda ²² | Fragmento del gen | Secuencia Oligonucleótida | Cantidad/reacción (pmol) |
|--------------|-----------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------|
| Flu B | Cebador 1 | M | GAGACACAATTGCCTACCTGCTT | 10 |
| Flu B | Cebador 2 | M | TTCTTTCCCACCGAACCAAC | 40 |
| Flu B | Sonda | M | AGAAGATGGAGAAGGCAAAGCAGAACTAGC | 5 |
| | | | | |
| Flu tipo A | Cebador 1 | M | AAGACCAATCCTGTACCTCTGA | 40 |
| Flu tipo A | Cebador 2 | M | CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC | 30 |
| Flu tipo A | Sonda | M | TTTGTGTTACGCTCACCGTGCC | 5 |
| | | | | |

| | | | | |
|--------------------------|-----------|----|---------------------------------|-----|
| Flu A (H1N1) estacional | Cebador 1 | HA | GAATAGCCCCACTACAATTGGGTAA | 10 |
| Flu A (H1N1) estacional | Cebador 2 | HA | GTAATTCGCATTCTGGGTTTCCT | 10 |
| Flu A (H1N1) estacional | Sonda | HA | AAGATCCATCCGGCAACGCTGCA | 10 |
| | | | | |
| Flu A (H3) estacional | Cebador 1 | HA | GATGTGTACAGAGATGAAGCATTAAACA | 40 |
| Flu A (H3) estacional | Cebador 2 | HA | TAGGATCCAATCTTTGTATCCTGACTT | 15 |
| Flu A (H3) estacional | Sonda 1 | HA | AGCTCAACACCTTTGATCTGGAACCGG | 10 |
| Flu A (H3) estacional | Sonda 2 | HA | AGCTCAACGCCTTTGATCTGGAACCGG | 10 |
| | | | | |
| Flu A (H5N1) HPAI, Set 1 | Cebador 1 | HA | GAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGA | 30 |
| Flu A (H5N1) HPAI, Set 1 | Cebador 2 | HA | AAGATAGACCAGCTACCATGATTGC | 2.5 |
| Flu A (H5N1) HPAI, Set 1 | Sonda | HA | TTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTAGCACT | 10 |
| | | | | |
| Flu A (H5N1) HPAI, Set 2 | Cebador 1 | HA | GGAACTTACCAAATACTGTCAATTTATTCA | 40 |
| Flu A (H5N1) HPAI, Set 2 | Cebador 2 | HA | CCATAAAGATAGACCAGCTACCATGA | 2.5 |
| Flu A (H5N1) HPAI, Set 2 | Sonda | HA | TTGCCAGTGCTAGGGAACCTCGCCAC | 10 |
| | | | | |
| Flu A (H7) AI virus | Cebador 1 | HA | GGCAACAGGAATGAAGAATGTTC | 40 |
| Flu A (H7) AI virus | Cebador 2 | HA | AATCAGACCTTCCCATCCATTTTC | 15 |
| Flu A (H7) AI virus | Sonda | HA | AGAGGCCTATTTGGTGCTATAGCGGGTTTCA | 10 |
| | | | | |
| Virus pandémico 2009 * | Cebador 1 | HA | GGAAAGAAATGCTGGATCTGGTA | 30 |
| Virus pandémico 2009 * | Cebador 2 | HA | ATGGGAGGCTGGTGTATATAGC | 30 |
| Virus | Sonda | HA | TGCAATACAACCTTGTGACACACCCAAGGG | 10 |

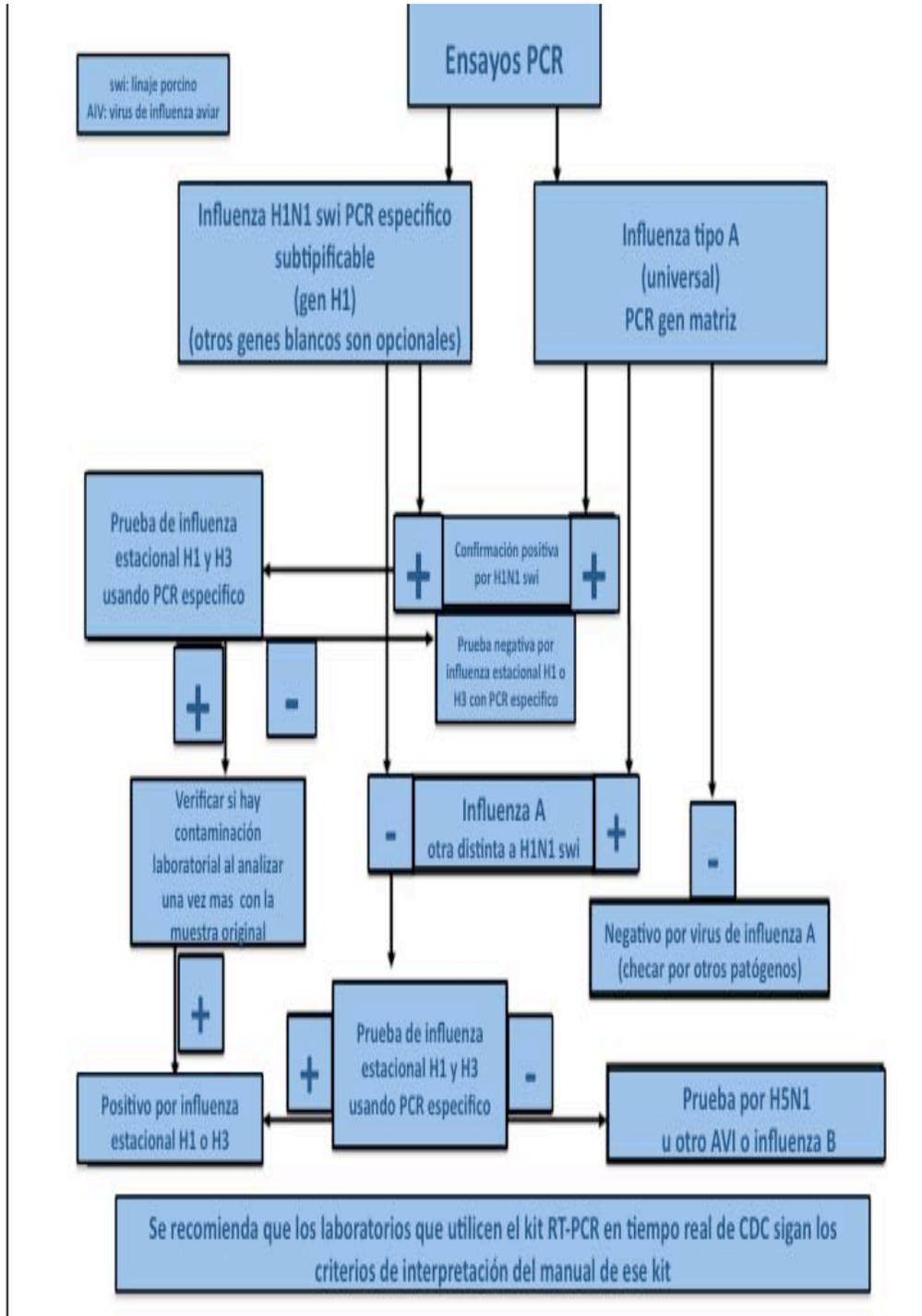
| | | | | |
|----------------------|-----------|----|---------------------------|----|
| pandémico 2009 * | | | | |
| Virus pandémico 2009 | Cebador 1 | NA | ACATGTGTGTGCAGGGATAACTG | 30 |
| Virus pandémico 2009 | Cebador 2 | NA | TCCGAAAATCCCCTGCATAT | 30 |
| Pandémico 2009 virus | Sonda | NA | ATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCA | 10 |

* Nuevo Protocolo que no existía en la versión del 18 de agosto de 2009 de este documento.

Interpretación de los resultados de la prueba

Gen M gene pos, H1 estacional pos, pandémico 2009 H1 y N1 neg: gen M de influenza estacional humana pos, estacional H1 neg, pandémico 2009 H1 o N1 pos: virus pandémico (H1N1) 2009.

Anexo 3:
Algoritmo de prueba de PCR e interpretación de los resultados



Anexo 4:

Toma de tejidos de autopsia en medios de recursos limitados

Este documento debe leerse como un suplemento a las pautas de autopsia existentes recomendadas por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EE.UU. (CDC) para procedimientos de presentación (ver: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/tissuesubmission.htm>) y requisitos de seguridad (ver: http://www.cdc.gov/h1n1flu/post_mortem.htm.)

La información siguiente complementa específicamente la información de los CDC anteriormente mencionada cuando no se dispone fácilmente de métodos rápidos de congelamiento y almacenamiento tales como hielo seco, y también si sólo se ha otorgado el consentimiento para un examen parcial o paramortem.

Si se ha otorgado consentimiento para una autopsia/examen postmortem completo, idealmente se deben dividir los tejidos relevantes y colocarlos en contenedores adecuados para cada uno de los siguientes: (1) tejido congelado, (2) fijado en alcohol al 70% (esto permite una mejor conservación del ARN que la formalina), (3) colocación en tubo RNAlater Tissue Protect (Qiagen®, Cat. No. 76163) para conservación del ARN (ver abajo), (4) medio para transporte del virus para aislamiento del virus y (5) formalina amortiguada neutra al 10%.

Para almacenamiento y transporte prolongados, los Tubos RNAlater (Ambion) Tissue Protect Tubes brindan volúmenes premedidos del Reactivo para Estabilización ARN RNAlater en tubos resellables para conveniente manipulación y almacenamiento de las muestras. El reactivo **no** es un fijador sino que conserva el ARN durante un máximo de un día a 37°C, siete días a 18–25°C, o cuatro semanas a 2–8°C, permitiendo procesamiento, transporte, almacenamiento y envío de las muestras sin nitrógeno líquido ni hielo seco. Como alternativa, las muestras pueden colocarse a –20°C o –80°C para almacenamiento de archivo. Sin embargo, el análisis morfológico será muy difícil de interpretar en tejidos mantenidos en este reactivo.

Muestras de los siguientes tejidos:

- Pulmones: todos los lóbulos, incluyendo las áreas afectadas
- Tráquea proximal y distal
- Hígado
- Cerebro
- Riñones
- Nasofaringe (lo mejor es hacerlo desde un enfoque supratentorial con remoción en bloque).

En caso de que no se obtenga consentimiento para una autopsia completa, el médico

interviniente debe considerar un enfoque de biopsia paramortem por aguja. En Hong Kong, durante el brote de SRAS de 2003, se realizó este procedimiento en 24 de los 39 casos post-mortem. Estas biopsias pueden obtenerse percutáneamente y salvo por pequeñas heridas de punción, no se desfigura el cuerpo y el riesgo de infección al personal de autopsia es bajo.



Aguja para biopsia tipo Trucut que puede utilizarse para tomar muestras de órganos por aguja.

PULMÓN

El área del pulmón elegida para Trucut idealmente debe corresponderse con los signos radiológicos de neumonía. Para control negativo, también se aconseja una biopsia de un área radiológicamente normal.

Se deben tomar muestras de como mínimo cuatro núcleos de tejido, cinco si se dispone de nitrógeno líquido. Debe mencionarse que las muestras que involucran fijación se deben realizar en último lugar para evitar una posible contaminación de los frascos de las muestras.

Biopsia 1 (en fresco): La mitad se coloca en medio para transporte viral, la otra mitad se coloca en medios embebidos en OCT y congelados en nitrógeno líquido, si hay disponible.

Biopsia 2 (en fresco): *Colocada en Tubo RNAlater Tissue Protect (Qiagen®, Cat. No. 76163), si hay disponible.

Biopsia 3 – 70% en etanol: El etanol es un fijador superior a la formalina para extracción de ARN pero es inferior para morfología. Este fijador se puede usar si el tejido tiene que ser transportado a distancia y si no se dispone de nitrógeno líquido. (Si se usa la misma aguja Trucut para todas las biopsias, la fijación en etanol debe hacerse primero ya que incluso una pequeña cantidad de formalina en etanol perjudicará la extracción de ARN).

Biopsia 4 y 5 – formalina amortiguada neutra al 10%: Esto permitirá una buena morfología para determinar la extensión del daño pulmonar, la infección bacteriana secundaria, etc. También será posible realizar inmunohistoquímica de anticuerpos virales y estudios de co-localización para determinar las células infectadas con el agente infeccioso. El tejido fijado con formalina puede usarse para extracción de ARN pero es menos óptimo como fijativo que el alcohol en este caso. Una de las muestras de biopsia debe procesarse para ser embebida en parafina; la otra permanecerá en formalina para futura extracción de ARN/ADN o examen en microscopio electrónico. Debe reconocerse que el ARN proveniente del tejido extraído fijado con formalina se degradará y no se debe intentar amplificar fragmentos mayores a 60-120 bp. Si se prepara en fresco, se dispone de amortiguador de glutaraldehído en cacodilato al 2,5% (0,1 M cacodilato de sodio-amortiguador HCl pH 7.4); una muestra de 1-2 mm del núcleo puede colocarse directamente en este fijador para examen en microscopio electrónico.

OTROS ÓRGANOS

Sería importante tomar muestras de otros órganos, especialmente el bazo, la médula y el hígado (por lo menos para la histología estándar), y para detectar la presencia de virus (mediante cultivo, RT-PCR y antígeno viral mediante inmunohistología), y para buscar hemofagocitosis u otros cambios en estos órganos. Para evitar una posible contaminación posterior de la PCR se debe utilizar una jeringa nueva para cada órgano. Esto es también importante para determinar el grado de diseminación de la enfermedad.