

Protocolo del CDC para el RT-PCR en tiempo real para el nuevo subtipo del virus de influenza A(H1N1)¹

**28 de abril de 2009
Revisión 1 (30 de abril e 2009)**

El Centro Colaborador para la Influenza de la OMS en el CDC Atlanta, Estados Unidos de América ha disponibilizado el protocolo adjunto, para el RT-PCR en tiempo real para el nuevo subtipo del virus de influenza A(H1N1)

¹ Traducción de WHO: CDC protocol of realtime RT-PCR for swine influenza A(H1N1). 28 April 2009, revision 1 30 April 2009.

Protocolo del CDC para el RT-PCR en tiempo real para la detección y caracterización del nuevo subtipo del virus de influenza A(H1N1)

ESTOS MATERIALES Y PROTOCOLOS SON PROPIEDAD DE LOS CENTROS PARA EL CONTROL Y LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES DE LOS ESTADOS UNIDOS Y HAN SIDO DISPONIBILIZADOS BAJO UNA AUTORIZACIÓN ESPECIAL DE EMERGENCIA DE LOS ESTADOS UNIDOS COMO UN SERVICIO PARA LA COMUNIDAD DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA. ESTOS PROTOCOLOS NO DEBEN SER UTILIZADOS PARA DESARROLLO COMERCIAL O PARA PRUEBAS CON FINES DE LUCRO

Comentarios generales

Supuestos: Este procedimiento asume una familiaridad con pruebas de RT-PCR

Principio de la prueba: el protocolo del CDC para el RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) para la detección y la caracterización de la influenza porcina incluye un panel de cebadores (*primers*) oligonucleótidos y de sondas (*probes*) de hidrólisis con marcación dual (Taqman[®]) que serán utilizadas en las pruebas de RT-PCR en tiempo real para la detección cualitativa *in Vitro* y la caracterización de los virus de influenza porcina en muestras respiratorias y cultivo de virus. El primer y set de *probes* InfA está diseñado para la detección universal de virus de influenza A. El primer y juego de *probes* swH1 está diseñado específicamente para detectar el nuevo subtipo del virus de influenza A(H1N1). Esta prueba se utiliza para analizar muestras respiratorias positivas para influenza A (no subtipificables) tomadas de pacientes sospechosos de influenza porcina A.

Limitaciones de uso del protocolo: Estos protocolos fueron optimizados utilizando *probes* cuantitativas de un paso para RT-PCR (Invitrogen Superscript[™] III Platinum[®] One Step Quantitative Kit) los cuales se ha comprobado que producen resultados comparables en sistemas termocicladores con formato de 96 pocillos, tales como el sistema de RT-PCR de tiempo real de Applied Biosystems[™] (7000, 7300, 7500, etc), sistemas de detección de RT-PCR en tiempo real BioRad (iQ[™] o Iq5[™]) o instrumentos QPCR de Stratagene (MX4000[®], MX3000[®] o MX3005[®]).

Información de seguridad: el procesamiento de las muestras debe llevarse a cabo según las regulaciones nacionales de seguridad biológica pertinentes.

Muestras aceptables: muestras respiratorias que incluyen: lavado broncoalveolar, aspirado traqueal, esputo, aspirados o lavados nasofaríngeos u orofaríngeos, e hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos. Las muestras recolectadas con hisopos deben ser recolectadas solamente en hisopos con una punta sintética, (tales como poliéster o dacrón®) y la base de aluminio o plástico. Los hisopos con puntas de algodón y base de madera (palillo) no son recomendados. Las muestras recolectadas con hisopos hechos de alginato de calcio no son admisibles.

Criterio de rechazo:

- Muestras que no se hayan mantenido a 2-4⁰C (≤4 días) o congeladas a -70oC o menos.
- Muestras que no se hayan listado arriba, no apropiadas.

Extracción de ácido nucleico: El desempeño de la sonda basada en amplificación de RT-PCR depende de la cantidad y calidad de la muestra RNA. Los procedimientos de extracción de RNA deben ser calificados y comprobados por recuperación y pureza antes de examinar las muestras. Se ha comprobado que los procedimientos de extracción disponibles comercialmente, incluyendo QIAamp® Viral RNA Mini Kit, or RNeasy® Mini Kit (Qiagen), Kit de aislamiento de RNA Roche MagNA Pure Compact, Kit de aislamiento MagNA Pure LC RNA Isolation Kit II, y Roche MagNA Pure Total Nucleic Acid Kit generan RNA altamente purificado cuando se siguen las recomendaciones de los fabricantes para la extracción de muestras.

Cláusula de descargo de responsabilidad: los nombres de los vendedores o fabricantes se proporcionan como ejemplos de fuentes de productos adecuados. Esta inclusión no implica un aval por parte del CDC.

Materiales

Reactivos

1. Kit de sonda de hidrólisis one-step quantitative RT-PCR (ej. Taqman®)
 - a. Invitrogen Superscript™ III Platinum® One Step Quantitative Kit (no. de catálogo 11732-020 u 11745-100)
2. Agua destilada estéril de grado molecular (libre de RNasa y DNasa)
3. Cebadores (*primers*) *forward* y *reverse* (40µM)
4. Sondas (*probes*) con marcación dual (10µM) (*dual-labeled probes*)

5. Controles positivos

Materiales

1. Lapicero señalador (Marcador) de laboratorio
2. Gradillas (*racks*) refrigerantes para tubos de minicentrífuga de 1.5 y tubos de reacciones de PCR 0.2ml de 96 pocillos.
3. Tira de tubos (tube strips) o placas de reacción de PCR de 0.2ml
4. Tapas de tiras ópticas (optical strip caps)
5. Tubos para minicentrífuga estériles, libres de nucleasa, de 1.5 ml
6. Guantes desechables sin talco.

Equipo

1. Minicentrífuga
2. Vortex
3. Sistema de detección PCR a tiempo real con un bloque termociclador para 96 reacciones (96 well format thermocycler reaction block).

Procedimiento

Preparación

1. Evitar la contaminación de las muestras.
A causa de la sensibilidad de las pruebas de nucleasa fluorogénicas 5', se deben tomar precauciones especiales para evitar amplificaciones de falsos positivos. Se recomienda seguir los siguientes pasos como precaución:
 - a. Mantener áreas separadas para la preparación de las pruebas y el manejo de los ácidos nucleicos.
 - b. Mantener separados los equipos (como pipetas y minicentrífugas), y los materiales (como tubos para minicentrífuga y puntas de pipeta) para la preparación de las pruebas y el manejo de los ácidos nucleicos extraídos.
 - c. Utilizar una bata de laboratorio limpia y guantes desechables sin talco (que no hayan sido utilizados antes) cuando prepare las pruebas.
 - d. Cámbiese los guantes entre muestras, y cada vez que usted sospeche que puedan haberse contaminado.
 - e. Mantenga los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos cuanto le sea posible.
2. Preparación del equipo:
Las superficies de trabajo, pipetas y centrífugas deben estar limpias y

descontaminarse con productos de limpieza tales como el cloro de 5%, “DNAzapTM” o “RNase AWAY[®]” para minimizar el riesgo de contaminación por ácido nucleico.

3. Preparación de reactivos

NOTA: Mantenga todos los reactivos en una gradilla fría durante la preparación de las pruebas.

a. *Primers y probes*

- i. Descongele las alícuotas congeladas de los *primers* y los *probes* (las alícuotas congeladas de los *probes* pueden mantenerse almacenadas en la oscuridad por tres meses 2-8°C. No recongele los *probes*).
- ii. Vortex a todos los *primers* y los *probes*.
- iii. Centrifugue brevemente todos los *primers* y los *probes* y luego colóquelos en una gradilla fría.

b. Reactivos de RT-PCR en tiempo real

- i. Coloque el Master Mix y la enzima en una gradilla fría.
- ii. Descongele el vial 2X Reaction Mix
- iii. Mezcle el 2X Reaction Mix por inversión.

- Centrifugue brevemente el 2X Reaction Mix y la enzima y luego colóquelo en la gradilla fría.

Pruebas para cada corrida de RT-PCR

1. Cada RNA extraído será analizado con sets separados de *primers* y *probes*: INFA, porcina universal (swFluA), porcina H1 (swH1) y RNaseP (RP). El set de *primers* y *probes* RNA se focaliza en el gen RNase P y por lo tanto se desempeña como un control positivo interno para el ácido nucleico humano.
2. Deben ser incluidos en cada corrida los controles negativos (NTC), y los controles positivos (PTC) de todos los *primers* y *probes*.
3. El Control de Especímenes Humano (HSC) proporciona un control secundario negativo que comprueba el procedimiento de extracción nucleica y la integridad de los reactivos.

Preparación de la reacción

Las mezclas de la prueba de reacción se realizan como un coctel y se dispensan en el plato de reacción de 96 pocillos. Luego, se agregan agua y ácido nucleico extraído, o las plantillas de controles positivos a los controles y reacciones de prueba que corresponda.

1. Rotule un tubo de minicentrífuga de 1.5ml por cada set de *primers* o *probes*.
2. Determine el número de reacciones (N) para preparar por cada prueba. Es necesario que prepare en exceso el cóctel de reacción, considerando la posibilidad de errores en las reacciones de NTC, PTC, HSC y de pipetaje.
 - 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 $N=n+2$
3. Master Mix: calcule el número de cada reactivo que será añadido a cada set maestro de reacción de *primers* o *probes*. Los cálculos siguen a continuación:

Reactivo	Volumen de reactivo añadido por reacción
Agua libre de nucleasa	Nx5.5µl
Cebador forward	Nx5.5µl
Cebador reverse	Nx5.5µl
Sonda	Nx5.5µl
Superscript™ III Platinum® Taq Kit	Nx5.5µl
2X PCR Master Mix	Nx5.5µl
Volumen Total	Nx20µl

4. Luego de añadir el agua, mezcle las mezclas de reacción pipeteándolas hacia arriba y hacia abajo. No realice vortex.
5. Centrifugue por 5 segundos para recolectar los contenidos en el fondo del tubo, y luego coloque el tubo en la gradilla fría.
6. Prepare las tiras de tubos (strip tubes) o los platos en una gradilla refrigerante de 96 pocillos.
7. Dispense 20µl de cada mezcla máster en cada pocillo yendo a través de la fila tal y como sigue a continuación.

Ejemplo de la preparación de la prueba

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	InfA											
B	sw InfA											
C	swH1											
D	RP											
E	InfA											
F	sw InfA											
G	swH1											
H	RP											

Ejemplo de preparación de la muestra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	M1	M3	M5	M7	M9	M11	M13	M15	M17	M19	PTC
B	NTC	M1	M3	M5	M7	M9	M11	M13	M15	M17	M19	PTC
C	NTC	M1	M3	M5	M7	M9	M11	M13	M15	M17	M19	PTC
D	NTC	M1	M3	M5	M7	M9	M11	M13	M15	M17	M19	PTC
E		M2	M4	M6	M8	M10	M12	M14	M16	M18	HSC	
F		M2	M4	M6	M8	M10	M12	M14	M16	M18	HSC	
G		M2	M4	M6	M8	M10	M12	M14	M16	M18	HSC	
H		M2	M4	M6	M8	M10	M12	M14	M16	M18	HSC	

Nota: las plantillas de controles negativos (NTC) deben agregarse primero (columna 1) antes de que cualquier muestra se añada, para probar si hay contaminación en la mezcla máster. HSC debe agregarse luego de que las muestras han sido añadidas (columna 11) para determinar si hay contaminación cruzada durante la preparación de la muestra durante la preparación o adición de la muestra. Las plantillas de controles positivos (PTC) deben añadirse al final luego de que todas las muestras y los NTCs han sido sellados.

8. Antes de mover el plato al área de manejo de ácidos nucleicos, prepare las reacciones NTC para la columna 1 en el área de preparación de las pruebas. Tal y como se enseña arriba, las muestras pueden añadirse por columnas.
9. Pipetee, 5µl de agua libre de nucleasa en los pocillos NTC. Tape los pocillos NTC
10. Cubra el plato de reacción y páselo hacia el área de manejo de ácido nucleico.
11. Vortex los tubos conteniendo las muestras por 5 segundos. Centrifuge los tubos por 5 segundos.
12. Instale las muestras de ácido nucléico extraído en la gradilla fría.

13. Tal y como se mostró arriba, las muestras pueden agregarse por columnas. Pipetee 5 µl de la primera muestra en todos los pocillos etiquetados para esa muestra (por ejemplo “muestra M1” tal y como mostrado arriba). Cambie las puntas luego de cada adición.
14. Tape las columnas para las cuales la muestra ha sido agregada. Esto le ayudará a prevenir la contaminación cruzada de muestras y le permitirá llevar un control de por dónde va en el plato.
15. Cámbiese los guantes cada vez que sea necesario para evitar contaminación.
16. Repita los pasos 13. a 15. para las muestras restantes.
17. Agregue 5µl de la muestra extraída en los pocillos de HSC (columna 11). Tape los pocillos de HSC.
18. Finalmente, pipetee 5 µl de plantilla de control positivo RNA en todos los pocillos PTC. Tape los pocillos PTC.
19. Si está utilizando tiras de 8 tubos, etiquete la **pestaña** de cada tira para indicar la posición de la muestra. (NO ETIQUETE LAS TAPAS DE LOS TUBOS DE REACCIÓN). Centrifugue brevemente las tiras de tubos por 10-15 segundos. Vuelva a colocar las tiras de tubos en una gradilla fría.
Si está utilizando platos, centrifugue a 500x g por 30 segundos a 4°C. Vuelva a colocarlo en la gradilla fría.

Condiciones de amplificación de RT-PCR

El volumen de reacción es 25 µl. Programe el termociclador como sigue:

Transcripción inversa (reverse transcription)	50°C por 30 min
Activación de inhibidor Taq	95°C por 2 min
Amplificación de PCR	95°C por 15 seg 55°C por 30 seg*

* Deben recolectarse los datos de fluorescencia (FAM) durante el paso de incubación de 55°C.

Interpretación/análisis

1. las reacciones NTC de los sets de *probes* / *primers* no deben exhibir curvas de crecimiento de fluorescencia que crucen la línea de umbral. En caso de que un falso positivo ocurra en una o más de las reacciones de *primers* o *probes* NTC, es

- posible que haya ocurrido contaminación de la muestra. Descarte esta corrida, y repita la prueba con una adherencia más estricta a las guías de procedimiento.
2. Todas las muestras clínicas deben exhibir curvas de reacción RP que crucen la línea umbral en los primeros 37 ciclos, indicando así la presencia de RNA suficiente de genes humanos RNase P, y por tanto, indicando que la muestra es de calidad aceptable. Sin embargo, es posible que algunas muestras no den resultado positivo debido a una cantidad baja de células en la muestra clínica original. Además, muestras tomadas de especies humanas/aviares o de cultivo celular, típicamente o no exhiben ninguna reacción RP, o una débil reacción RP. La imposibilidad de detectar RNase P en cualquiera de las muestras clínicas puede indicar:
 - a. Extracción inapropiada de ácido nucleico de los materiales clínicos, resultante en pérdida de RNA o de un traspaso de inhibidores de RT-PCR de muestras clínicas
 - b. Ausencia de material celular humano suficiente en la muestra para permitir la detección.
 - c. Preparación y ejecución inapropiadas de la prueba
 - d. Mal funcionamiento de los reactivos o el equipo.
 3. El HSC no debe exhibir curvas de crecimiento que crucen la línea de umbral en los primeros 40 ciclos en la fluorescencia para los sets de *primers/probes* INFA, swFluA o swH1. Si algún primer/probe exhibe una curva de crecimiento que cruza la línea de umbral, intérpretele de la siguiente manera:
 - a. Puede haber ocurrido contaminación de los agentes de extracción RNA. Descarte esta corrida y verifique la integridad de los reactivos de extracción RNA antes de continuar con las pruebas.
 - b. Puede haber ocurrido contaminación cruzada de las muestras durante el procedimiento de extracción de RNA o durante la preparación de la prueba. Descarte la corrida y repita la prueba con adherencia más estricta a las guías de procedimiento.
 4. Las reacciones PCT deben producir un resultado positivo con INFA, swInfA, swH1, y reacciones de RP antes de 40 ciclos. Si la reacción positiva esperada no se produce, descarte la corrida y repita la prueba con una adherencia más estricta a las guías de procedimiento. Determine la causa para el fallo de la reacción PTC, implemente las acciones correctivas, documente los resultados de la investigación y las acciones correctivas. No utilice los reactivos PTC que no generan los resultados esperados.
 5. Cuando todos los controles cumplen con los requerimientos estipulados, una muestra muestra se considera presuntamente positiva para influenza A si las

curvas de crecimiento de la reacción cruzan la línea de umbral en los primeros 40 ciclos. Si la reacción por influenza A es positiva, también puede ser positiva para SW universal y/o SW H1. Un espécimen es considerado presuntamente positivo por influenza porcina A/H1 si AMBAS curvas de crecimiento de la reacción, tanto la de InfA y como la del respectivo subtipo (swInfA o swH1) cruzan la línea de umbral en los primeros 40 ciclos. Si una muestra es positiva para InfA y solo uno de los subtipos reacciona, o si es positivo para InfA solamente, contacte al CDC para su orientación.

6. Cuando todos los controles cumplen con los requerimientos estipulados, una muestra es considerada negativa para el virus de la influenza si ninguna de las curvas de crecimiento de InfA cruza el umbral en los primeros 40 ciclos.

Limitaciones:

1. Los analistas deben estar entrenados y familiarizados con los procedimientos de muestreo y la interpretación de los resultados previo a la realización de la prueba.
2. Un resultado falso negativo puede ocurrir si existe una cantidad inadecuada de organismos presentes en la muestra debido a una recolección, manejo o transporte inapropiados.
3. Un resultado falso negativo puede ocurrir si hay un exceso de plantilla de DNA/RNA en la reacción. Si la inhibición de la reacción de control RP se observa para una muestra particular, el RNA extraído puede ser examinado a dos o más diluciones (por ejemplo 1:10 y 1:100) para comprobar los resultados.

Comentarios: sugerencias y preguntas respecto a este procedimiento pueden ser enviados a slindtrom@cdc.gov

Sets de Primer y Probe

Nota: los sets de primer/probe pueden sufrir modificaciones periódicas conforme la información sobre los virus circulantes vaya dándose a conocer.

Primers and Probes	Sequence (5'>3')	Working Concentration
InfA Forward	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C	40 µM
InfA Reverse	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA	40 µM
InfA Probe ¹	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG	10 µM
SW InfA Forward	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG	40 µM
SW InfA Reverse	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC	40 µM
SW InfA Probe ²	CYA CTG CAA GCC CA" T" ACA CAC AAG CAG GCA	10 µM
SW H1 Forward	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA	40 µM
SW H1 Reverse	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC	40 µM
SW H1 Probe ²	CA GAA TAT ACA " T" CC RGT CAC AAT TGG ARA A	10 µM
RnaseP Forward	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	40 µM
RnaseP Reverse	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	40 µM
RnaseP Probe ¹	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG	10 µM

Los *probes* TaqMan® están marcados en el extremo 5' con la molécula reporter 6-carboxyfluoresceína (FAM), y con el quencher, Blackhole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) al 3'-end.

Los *probes* TaqMan® están etiquetados al 5'-end con la molécula reportera 6-carboxyfluoresceína (FAM) y quenched internamente a un residuo "T" modificado con BHQ1, con un 3'-end modificado para prevenir la extensión del probe por polimerasa Taq.

Instrucciones para ordenar la prueba del CDC de Influenza A(H1N1) para RT-PCR en tiempo real

Favor notar:

Hemos recibido una gran cantidad de solicitudes de estos kits. **Aunque usted haya recibido otra información, por favor siga los pasos a continuación si usted desea obtener un kit de RT-PCR en tiempo real para el nuevo subtipo del virus de influenza A(H1N1)**

Pasos para obtener un kit de *primers/probes* de rRT-PCR para el nuevo subtipo del virus de influenza A(H1N1):

** envíe el siguiente e-mail a fluorder@cdc.gov** (escríbalo en inglés)

1. I would like to request a rRT-PCR *primers/probes* kit for Swine A/H1 flu
2. Contact name (Nombre del contacto):
3. Contact phone (número telefónico de contacto)
4. Contact e-mail (correo electrónico del contacto)
5. Institution name (nombre de la institución)
6. Institution physical shipping address (No.P.O. Box) (dirección física de la institución –no se admitirán casilleros postales--)
7. Preferred Shopping carrier (transportista preferido para el envío del material)

Favor no envíe preguntas a fluorder@cdc.gov; la dirección es solamente para ordenar un kit. Si tiene preguntas, favor contactar al Centro de Coordinación Internacional (eocinternational@cdc.gov)

Una vez que el kit de rRT-PCR es enviado, usted recibirá un número rastreo de envío (Shopping/waybill Trucking number)