

Información de la OMS para diagnóstico de laboratorio del nuevo virus de la Influenza A (H1N1) en seres humanos

Se enfatiza la recomendación que todas las muestras de influenza tipo A no subtificables sean enviadas de inmediato para el diagnóstico y la caracterización adicional a uno de los cinco Centros Colaboradores de la OMS para la gripe.

21 de mayo del 2009

Este documento presenta información sobre los medios de diagnóstico disponibles a la fecha indicada para el virus de la influenza tipo A humana (H1N1) A/California/4/2009 y virus similares. La información sobre el diagnóstico se actualizará cuándo ésta se encuentre disponible.

Muestras

Las muestras más apropiadas según lo recomendado por las investigaciones de la influenza estacional son aquellas del tracto respiratorio superior. Las muestras deben tomarse de los orificios nasales profundos (hisopo nasal), nasofaringe (hisopo nasofaríngeo), aspirado nasofaríngeo, garganta o aspirado bronquial. Todavía no se sabe qué muestra clínica proporciona el mejor rendimiento en el diagnóstico. La(s) persona(s) que tome(n) la muestra debe(n) cumplir con las precauciones apropiadas de toma de muestras ya que puede(n) exponerse a secreciones respiratorias de los pacientes. Hasta ahora, no existe ninguna información sobre el valor de diagnóstico de las muestras no respiratorias, por ejemplo, muestras de heces. Muestras de suero agudo y convaleciente deben usarse para la detección de los títulos ascendentes de anticuerpo.

Pruebas de laboratorio

Diagnostico molecular

Los medios de diagnostico molecular son actualmente el método preferido para la influenza A (H1N1) linaje porcino (swl) virus (A/California/4/2009 y virus similares).

El uso de ensayos con diferentes genes blancos es más apropiado para la identificación de este virus. Los siguientes genes blancos son importantes: gen matriz de la Influenza de tipo A; el gen de la hemaglutinina específico del virus de la Influenza A(H1N1) swl y el gen de la hemaglutinina específico de la Influenza estacional A H1/H3 y otros subtipos.

Los siguientes protocolos están actualmente disponibles:

PCR convencional específico para influenza tipo A y RT-PCR en tiempo real (véase anexos 1 y 2);

RT-PCR en tiempo real de los CDC (rRT-PCR) para la detección y caracterización de la influenza tipo A (H1N1) (versión 2009)¹

El análisis secuencial del producto del PCR del gen matriz de la influenza tipo A usando los cebadores de los protocolos de la OMS (véase anexo 1) diferenciará entre genes M de linaje porcino y virus H1N1 estacionales. Sin embargo, un análisis adicional debe ser realizado para confirmar el origen del virus.

En este momento, las pruebas de RT-PCR convencional están siendo evaluadas. Una actualización se publicará cuando este disponible.

Aislamiento y tipificación del virus mediante la inhibición de hemaglutinina o la inmunofluorescencia:

Se pueden utilizar los protocolos vigentes para el aislamiento de virus de la influenza estacional usando células de MDCK e inoculación de virus en huevos embrionados, aunque su sensibilidad está aún pendiente de determinarse (véase sección de bioseguridad abajo).

Los eritrocitos de pavos, pollos, conejillos de indias y humanos se aglutinarán con el virus de la influenza A (H1N1) swl. Los anticuerpos policlonales específicos para el subtipo H1 de los virus de la influenza estacional del kit de la OMS no reaccionarán con la prueba de inhibición de hemaglutinación (HAI) del virus actual de la influenza A (H1N1). Los resultados obtenidos utilizando los anticuerpos monoclonales H1 del kit de la OMS no debe tomarse como comprobación concluyente y se recomienda realizar una verificación adicional.

Pruebas de inmunofluorescencia rápida:

La sensibilidad y especificidad de las pruebas de inmunofluorescencia rápida en el lugar de atención, diseñadas para la detección directa de los virus de la influenza tipo A son actualmente desconocidas. Una actualización se publicará cuándo exista evidencia disponible. Debe recalarse que estas pruebas no diferenciarán la influenza estacional de la del virus de influenza de tipo A (H1N1) swl .

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

Serología

Se espera que las pruebas de HAI y las reacciones de micro-neutralización empleando el virus de la influenza A (H1N1)swl puedan detectar respuestas de anticuerpos después de la infección.

Interpretación de los resultados de laboratorio

- **PCR:** Una muestra se considera positiva si los resultados de las pruebas usando dos diferentes blancos de PCR (por ejemplo, iniciadores específicos para gen M y gen porcino de hemaglutinina H1) son positivos pero el PCR para virus humano H1 + H3 es negativo. Si el PCR en tiempo real (RT-PCR) para hemaglutinina múltiple (HA) (es decir, H1, H3 y H1 de linaje porcino) da resultados positivos en la misma muestra, la posibilidad de contaminación de PCR debe ser primeramente excluida al repetir el procedimiento de PCR usando ARN nuevo extraído de la muestra original o ARN extraído de otra muestra. Si se repiten los resultados positivos para los blancos múltiples de HA, existe entonces la posibilidad de coinfección, que debe confirmarse mediante secuenciación o cultivo viral. El Anexo 3 muestra un diagrama de flujo para facilitar la interpretación de los resultados de PCR.
- **RT-PCR en tiempo real de los CDC:** Los resultados deben interpretarse según lo descrito en el manual de pruebas de H1N1 en tiempo real de los CDC.¹
- **Un resultado de PCR negativo no permite descartar que la persona pueda estar infectada por el virus de la influenza A (H1N1):** Los resultados deben interpretarse conjuntamente con la información clínica y epidemiológica disponible. Las muestras de los pacientes cuyos resultados de PCR son negativos pero para quienes hay una alta sospecha de infección con H1N1 deben investigarse más a fondo y ser analizadas por otros métodos como el cultivo o serología viral, para descartar infección por influenza A (H1N1) swl (véase diagrama de flujo en Anexo 3).
- **Serología:** Un incremento cuádruple en los anticuerpos neutralizantes específicos del virus de la influenza A (H1N1) indica infección reciente con el virus.
- **Secuenciación:** en esta etapa, la secuenciación de al menos uno de los blancos es esencial para la confirmación por PCR convencional.
- **Aislamiento del virus:** La identificación y tipificación del cultivo de virus de influenza puede llevarse a cabo por PCR, por la técnica del anticuerpo fluorescente indirecto (IFA), la prueba usando anticuerpos monoclonales

específicos de NP, o el análisis de HA y el análisis antigénico (subtipificación) por HAI usando antisueros de referencia seleccionados.

Referencia para la confirmación y caracterización adicionales:

A los laboratorios que no cuenten con capacidad de diagnóstico del virus de la influenza A se les recomienda enviar las muestras representativas de los casos sospechosos de influenza A (H1N1), de acuerdo a la definición de caso de la OMS², a uno de los Centros Colaboradores de la OMS para influenza (WHOCCs).

Las muestras con resultados de laboratorio positivas para influenza A pero no subtipificables (es decir, negativas para influenza A(H1) y A(H3)); se consideran como no confirmadas de acuerdo a los criterios de la OMS) deben remitirse a uno de los WHOCCs para la confirmación.

Los laboratorios que no cuenten con capacidad de aislamiento del virus (o que no tengan el nivel necesario de medidas de bioseguridad) deben remitir las muestras a cualquiera de los WHOCCs.

En adición a los reglamentos pertinentes de IATA, se deben seguir las normas ordinarias de almacenamiento, envasado y envío de muestras de influenza.

Bioseguridad

El trabajo de laboratorio con muestras clínicas de pacientes considerados como casos sospechosos de infección por virus de influenza A (H1N1) swl se deben realizar aplicando las normas y procedimientos de nivel de bioseguridad 2 utilizando el equipo de protección personal apropiado (PPE). Toda manipulación de muestras debe hacerse dentro de una cabina de bioseguridad certificada (BSC). Ver Manual de bioseguridad en el laboratorio de la OMS, 3.^a ed.³

Actualmente, el aislamiento viral requiere mayores medidas de bioseguridad. Para las recomendaciones específicas ver: Gestión de los riesgos biológicos en los laboratorios donde se manipulan muestras humanas que contienen o pueden contener el virus de la gripe A (H1N1) que está causando las actuales epidemias internacionales.⁴

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

³ http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/

⁴ http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/swineflu/Laboratorybioriskmanagement_es.pdf

Prueba de los algoritmos

El método general de la detección de virus de la influenza por PCR-RT debe considerarse en el contexto de la situación nacional, por ejemplo, cuántas muestras pueden procesarse (producto), el blanco utilizado para la secuencia del gen por PCR-RT, y si se utiliza la comprobación concurrente o secuencial de M, NP y genes de HA por PCR-RT.

Buenas prácticas de laboratorio

Los protocolos estándar para todos los procedimientos deben existir y ser revisados regularmente. Es fundamental asegurarse que los reactivos recomendados se usen y manejen adecuadamente ya que las reacciones son complejas y problemas incluso sólo con un reactivo pueden tener efectos significativos sobre los resultados obtenidos.

Validación

Todos los protocolos deben ser validados en cada uno de los laboratorios para evaluar que su especificidad y sensibilidad al usar los mismos controles en cada ronda sean adecuadas.

Aseguramiento de la calidad

Los protocolos de aseguramiento de la calidad y buenas prácticas de laboratorio deben existir. La participación en los ejercicios de evaluación de los Centros Nacionales de Influenza (Proyecto de evaluación externa de la calidad) es altamente recomendada para confirmar que los laboratorios están alcanzando un nivel adecuado de sensibilidad y especificidad en sus pruebas.

Capacitación del personal

La familiaridad del personal con los protocolos y experiencia en la interpretación correcta de los resultados son piedras angulares para la ejecución exitosa de las pruebas diagnósticas.

Instalaciones y áreas de manejo

Deben existir instalaciones adecuadas para el manejo de muestras y reactivos (incluyendo cadenas de frío) con una separación apropiada para las diferentes etapas de RT-PCR a fin de prevenir la contaminación cruzada. Las instalaciones y el equipo deben cumplir con el nivel de bioseguridad apropiado. El RT-PCR debe realizarse en un espacio separado del usado para las técnicas de aislamiento de virus.

Equipo

El equipo de equipo debe usarse y mantenerse de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Anexo 1: Análisis de RT-PCR convencional del gen matriz de los virus de Influenza de tipo A

Protocolo Convencional de RT-PCR ⁵

A continuación se presentan los protocolos y cebadores (o primers) de PCR convencional y electroforesis en gel de productos para detectar virus de influenza tipo A en muestras de seres humanos. Estos protocolos han demostrado ser ampliamente efectivos para la identificación del virus de influenza de tipo A cuando se les utiliza con los reactivos y cebadores indicados. Se recomienda que los laboratorios que tengan dudas sobre la identificación de los virus actualmente circulantes contactar a uno de los Laboratorios de Referencia H5 de la OMS⁶ o a uno de WHOCCs para la influenza⁷ a fin de recibir ayuda para la identificación de los cebadores óptimos para su uso

Materiales requeridos

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Cat#52904. Otros kits de extracción pueden ser usados después de haber sido sujetos a una evaluación apropiada).
- OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, , Cat#210212)
- Inhibidor de RNase 20U/μl (Applied Biosystems, Cat# N8080119)
- Agua destilada (libre de RNase)
- Ethanol (96–100%)
- Microcentrífuga (ajustable hasta 13 000 rpm)
- Pipetas ajustables (10, 20, 200, and 100 μl)
- Puntas para pipeta estériles (libres de RNase) con barrera de aerosol
- Vortex
- Tubos para microcentrífuga (0.2, 1.5 ml)
- Termociclador (equipo de PCR)
- Conjunto de cebadores
- Control positivo (este puede solicitarse al WHOCC en los CDC de Atlanta, EEUU)

⁵ Protocol provided by Virology Division, Centre for Health Protection, Hong Kong SAR, China (WHO H5 Reference Laboratory).

⁶ http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/

⁷ <http://www.who.int/csr/disease/influenza/collabcentres/en/>

Cebadores

Gen: M

Virus Influenza A

Secuencias de cebadores

M30F2/08: 5'- ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG -3'

M264R3/08: 5'- TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG -3'

Tamaño esperado del producto 244bp (referencia: NIID⁸)

Procedimiento

1. Extraer ARN viral de la muestra clínica con el Mini Kit QIAamp Viral RNA o kit de extracción equivalente, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
2. Realice el RT-PCR de una etapa.
 - Sacar los reactivos de su almacén, déjelos descongelar a temperatura ambiente. Una vez descongelados, manténgalos en hielo.
 - Preparar la mezcla maestra (operada en hielo)
 - Agregar lo siguiente a un tubo para centrifuga y mezclarlo bien agitándolo para arriba y para abajo 10 veces, (Nota: A fin de evitar diferencias localizadas en la concentración de sales, es muy importante mezclar las soluciones antes de su uso).

Reacción sin solución Q

Agua destilada(sin RNasa) 9.5 µl

Amortiguador 5x QIAGEN RT-PCR 5.0 µl

Mezcla de dNTP 1.0 µl

Cebador sentido (+) (10 µM) 1.5 µl

Cebador antisentido (-) (10 µM) 1.5 µl

Mezcla enzimática 1.0 µl

Inhibidor de la RNasa (20U/µl) 0.5 µl

Volumen total 20.0 µl/prueba

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

⁸ Primers designed by Laboratory at National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo, Japan (WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza)

Condiciones de ciclado de la temperatura para PCR

Transcripción inversa 30 min, 50 °C

Activación de la PCR inicial 15 min, 95 °C

Ciclado en tres etapas

Desnaturalización 30 seg, 94 °C

Templado 30 seg, 50 °C

Extensión 1 min ,72 °C

Número de ciclos 45

Extensión final 10 min, 72 °C

Mantener 4 °C

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

Preparar el gel de agarosa, cargar los productos de PCR y el marcador de peso molecular, ejecutar de acuerdo con los protocolos estándar. Visualizar la presencia del marcador con luz ultravioleta.

Materiales requeridos

- Bandeja para gel de agarosa y cámara de electroforesis
- Suministro eléctrico y electrodos
- Caja de luz UV (302nm)
- Cámara y película Polaroid o computadora conectada a la cámara
- Pipetas ajustables
- Gel de agarosa al 2% en 1× TAE
- Amortiguador 1× TAE
- Bromuro de etidio (10 mg/ml)
- 6 x Solución amortiguadora con carga de gel (GLB)

Procedimiento

A) Fundir un gel de agarosa:

- I. Colocar una bandeja para fundición del gel dentro de una base para fundición de gel. Inserte un peine y nivele la base.
- II. Preparar agarosa al 2% pesando 4 g de polvo de agarosa y disuélvala en 200ml 1× amortiguador TAE. Disuelva el agar calentándolo en horno de microondas.
- III. Enfriar el agar derretido hasta aproximadamente 60 °C, y luego agregue 10 µl de bromuro de etidio.
- IV. Verter la agarosa derretida en una 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 dentro de la cámara de electroforesis con las fosas del lado de los cátodos.
- VIII. Llenar la cámara amortiguadora con 1× TAE a un nivel que pueda cubrir la parte superior del gel.

B) Carga de las muestras:

- I. Agregar 5 µl de GLB de PCR.
- II. Cargar el marcador de peso molecular en la fosa del gel de agarosa.
- III. Pipetear 15 µl del producto de PCR /GLB en el gel.
- IV. Cerrar la tapa de la cámara y conecte los electrodos. Correr el gel a 100V durante 30–35 min.
- V. Visualizar la presencia de bandas de marcadores y productos de PCR con luz UV.
- VI. Documentar la imagen del gel con una fotografía.

Interpretación de los resultados

El tamaño de los productos de PCR obtenidos debe compararse con el tamaño esperado de los productos. Si la prueba se ejecuta sin un control positivo, los productos deben ser confirmados mediante secuenciación y comparación con las secuencias disponibles.

Anexo 2: Análisis de RT-PCR en tiempo real de la matriz de los virus de Influenza de tipo A

La RT PCR en tiempo real presenta diferentes desafíos en comparación con la RT-PCR convencional. Además de las consideraciones sobre RT-PCR descritas en el Anexo 1 , las consideraciones específicas para 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 capacitación adecuada del personal para la interpretación de los resultados (es esencial la experiencia para reconocer los verdaderos positivos, interpretación de los controles/valor Ct y fluorescencia aberrante, etc.).
- Para hacer determinaciones cuantitativas, es esencial la validación en el laboratorio y la optimización de las reacciones.
- Hay poca probabilidad de contaminación cuando se descartan las reacciones después de realizar las pruebas. Sin embargo, muchos laboratorios hacen análisis post reacción adicionales (por ej., polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción usando geles, secuenciación) que pueden reintroducir la contaminación.

Protocolo de RT-PCR en tiempo real⁹

Extraer el ARN viral del espécimen clínico según se describe en el Anexo 1: Análisis de RT-PCR convencional

Materiales requeridos

Transcripción Inversa

Amortiguador I 10X PCR con 15 mM MgCl (Applied Biosystems)

Hexámero aleatorio 50 µM (Applied Biosystems)

Transcriptasa Inversa de MuLV 50 U/µl (Applied Biosystems)

Inhibidor de la RNasa 20 U/µl (Applied Biosystems)

PCR en tiempo real

Kit LightCycler[®] – FastStart[™] DNA Master HybProbes (Roche)

Cebadores y mezcla de sondas: Agregar igual volumen de los siguientes componentes para preparar los cebadores y la mezcla de sondas para H5 y gen M

Cebadores y sondas

Virus de influenza tipo A

Secuencia de cebadores

FLUAM-1F: 5'-AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA-3' (10 µmol/l)

FLUAM-2F: 5'-CATTGGGATCTTGCACTTGATATT-3' (10 µmol/l)

FLUAM-1R: 5'-CAA AGCGTCTACGCTGCAGTCC-3' (10 µmol/l)

FLUAM-2R: 5'-AAACCGTATTTAAGGCGACGATAA-3' (10 µmol/l)

FLUA-1P: 5'-(FAM)-TTTGTGTTACGCTCACCGT-(TAMRA)-3' (5 µmol/l)

FLUA-2P: 5'-(FAM)-TGGATTCTTGATCGTCTTTTCTTCAAATGCA-(TAMRA)-3' (5 µmol/l)

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

⁹ Protocol provided by Virology Division, Centre for Health Protection, Hong Kong SAR, China, WHO H5 Reference Laboratory

Procedimiento

1. Realizar RT utilizando los reactivos que se muestran en la siguiente tabla y las instrucciones 1-3 al calce de la tabla.

Reactivo	Volumen (μl) por reacción
Amortiguador 10x PCR I con 15 mmol/l MgCl ₂	2
Extra 25 mmol/l MgCl ₂	2.8
2.5 mmol/l d NTPs	8
Hemámero aleatorio 50μM	1
Inhibidor de la ARNasa 20U/μl	1
Transcriptasa Inversa 50 U/μl	1
ARN extraído	4.2

- I. Agitar en Vortex y centrifugar el tubo con la mezcla brevemente (aprox. 3 seg.)
- II. Mantener el tubo a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego incubar a 42 °C por lo menos durante 15 minutos
- III. Incubar el tubo a 95 °C durante 5 minutos y luego enfriar en hielo.

2. Realizar PCR en tiempo real

- I. Preparar la mezcla de reacción “Hot Start” pipeteando suavemente 60 μl de Sondas de Hibridación para Mezcla de Reacción LC-FastStart™ (frasco ampolla 1b) en el LC-Enzima FastStart™ (frasco ampolla 1a).
- II. Para cada muestra de prueba y controles positivos y negativos, preparar la mezcla del reactivo con cebadores y mezcla de sondas de acuerdo con lo siguiente

Mezcla maestra:

Reactivo	Volumen (μl)
H ₂ O grado PCR	7.6
MgCl ₂ (25 mmol/l)	2.4
Cebadores y mezcla para sondas	3
Mezcla para reacción “Hot Start”	2
Volumen total	15

Cada reacción:

Mezcla maestra 15
ADNc: 5

Condiciones de ciclado de la temperatura de 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 de RT-PCR en tiempo real¹⁰

Extraer el ARN viral del espécimen clínico como se describe en Análisis de RT-PCR convencional

Materiales requeridos

- QIAGEN[®] QuantiTect[®], Equipo de Sonda para RT-PCR (#204443):
 - 2 x QuantiTect[®], Mezcla Maestra de Sonda de RT-PCR
 - QuantiTect[®], Mezcla RT
 - Agua sin RNasa
- Inhibidor de la ARNasa
- Cebadores
- Sonda TaqMan[®] MGB
- Equipo: Sistema de Detección de PCR en tiempo real Chromo-4[™] (BioRad);
LingtCycler 2 (Roche) o LingtCycler 480 (Roche)

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realiza mediante RT-PCR de un solo paso usando una sonda TaqMan[®]

Cebadores y sondas:

Gen: Tipo A (M)

Secuencias de cebadores

MP-39-67For 5'-CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC-3' (10 µmol/l)
MP-183-153Rev 5'-TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA-3' (10 µmol/l)

¹⁰ Protocol provided by National Institute of Infectious Diseases (NIID), Center for Influenza Virus Research, Tokyo, Japan (WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza).

Secuencia de sondas

MP-96-75ProbeAs 5' (FAM)-ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG-(MGB)-3' (5 pmol/μl)

Mezcla de Reacción

Reactivo	Volumen (μl)
Mezcla Maestra para Sonda de RT-PCR 2x QuantiTect [®]	12.5
Cebador Directo (10μM)	1.5
Cebador Inverso (10μM)	1.5
Sonda TaqMan [®] MGB (5pmol/μl)	0.5
Mezcla QuantiTect [®]	0.25
Agua sin RNasa	3.75
Total	20

Procedimiento

- 1) Distribuir 20 μl de la mezcla de reacción en cada placa de reacción para RT-PCR.
- 2) Agregar 5 μl ARN de muestra a la mezcla de reacción. Para reacciones de control, usar 5 μl de agua destilada para control negativo, y 5 μl de ARN virales positivos adecuados para control positivo.
- 3) Programar el termociclador de acuerdo con el programa que se describe a continuación.
- 4) Iniciar el programa de RT-PCR en tiempo real mientras que las placas de reacción para RT-PCR **todavía están en hielo**.
- 5) **Esperar hasta que el termociclador haya alcanzado 50 C.** Luego, colocar las placas de reacción para RT-PCR en el termociclador.

Condiciones de ciclado de temperatura de RT-PCR: Sistema de detección de PCR Chromo-4-Real-time (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 temperatura de RT-PCR: LingtCycler 2 (Roche) o LingtCycler 480 (Roche)

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

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

