

O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS	Página 1 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA
DETECCION DE VIRUS RESPIRATORIOS.**

**O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"**

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS	Página 2 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0

1. OBJETIVO:

1.1 Detectar e identificar oportunamente 19 tipos y subtipos más frecuentes de virus humanos que causan infecciones respiratorias a partir de muestras de exudados nasofaríngeos, exudados faríngeos y lavados bronquiales y/o lavados nasofaríngeos de pacientes con sospecha de infección viral, como auxiliar al médico en el diagnóstico y tratamiento.

2. DEFINICIONES

2.1 **Área de extracción:** área separada y delimitada donde se realizara la extracción del ADN/ARN. Se debe usar campana de flujo laminar.

2.2 **Área pre-PCR:** área separada y delimitada para la preparación de los tubos de amplificación. En esta área se añade a los tubos de amplificación la mezcla de enzimas. Se recomienda el uso de campana.

2.3 **Área de amplificación:** área separada y delimitada para agregar el material extraído. En este lugar se añade el ADN/ARN extraído a los tubos de amplificación a los que previamente se les ha incorporado la mezcla de enzimas. Se debe usar campana de flujo laminar.

2.4 **Área post-PCR o de detección:** área separada y delimitada donde se lleva a cabo la amplificación y la visualización del producto amplificado.

2.5 **Extracción:** proceso en el cual se rompen las células para acceder a los ácidos nucleicos contenidos en ella, se evita la unión con grasas y proteínas y se aísla de otros materiales contenidos en las muestras.

2.6 **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa, proceso por etapas en el cual se realiza la extracción, amplificación e hibridación de ácidos nucleicos para la identificación de los virus

2.7 **Amplificación:** es un método en el cual se aumenta el número de copias de la molécula diana hasta niveles en los cuales puedan ser detectados para la identificación molecular.

2.8 **Visualización:** procedimiento por medio del cual se realiza el marcaje y precipitación de los productos hibridados en el chip para la lectura por medio del software para identificación de virus respiratorios

2.9 **Hibridación:** apareamiento de la cadena recientemente amplificada con las bases nitrogenadas correspondientes unidas en forma de cadena al chip del fondo del pocillo.

2.10 **Lavado nasofaríngeo:** proceso mediante el cual se instilan de 3 a 7 ml.de solución salina estéril en la fosa nasal, manteniendo la cabeza del paciente hacia atrás, y se recoge la solución en un contenedor estéril colocado bajo las fosas nasales, inclinando la cabeza hacia adelante. Conservar la muestra a 4°C si se va a procesar en el día, o a -80°C si se va a procesar después.

2.11 **Exudado faríngeo:** proceso mediante el cual se utiliza un depresor de lengua para evitar la contaminación con la saliva, se toma la muestra de la zona posterior de la faringe en las zonas con edema y eritema o donde existan lesiones visibles, girando la torunda y procurando desprender células epiteliales de la lesión. Si aparecen exudados o restos mucosos adheridos a las lesiones se deben retirar con otro hisopo antes de proceder a la toma de la muestra. Introducir la torunda en su tubo con el medio de conservación. Mantener a 4°C si se va a procesar en el día, o a -80°C si se va a procesar después.

**O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"**

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS	Página 3 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0

- 2.12 **Exudado nasofaríngeo:** proceso mediante el cual se inserta un hisopo de rayón o dacrón a través de la nariz en la nasofaringe y se gira suavemente unas cuantas veces. Volver a introducir la torunda en su tubo con el medio de conservación. Mantener a 4°C si se va a procesar en el día, o a -80°C si se va a procesar después.
- 2.13 **Mezcla de enzimas:** producto en el cual se encuentra en fase líquida una mezcla de retro transcriptasa y DNA polimerasa necesarias para la amplificación de los productos genómicos de los virus.
- 2.14 **Micro arreglo:** sistema en forma de chip localizado en el fondo de los pocillos, contiene sondas específicas para los productos de la amplificación, lugar donde se hibridaran en zonas determinadas para cada virus, se marcarán con biotina y se leen en el sistema automatizado para micro arreglos.
- 2.15 **Virus:** agente patógeno infeccioso consistente en una partícula cuyo contenido genético es capaz de producir sus propios constituyentes iniciales para la infección de una célula.
- 2.16 **Resultado positivo:** lectura por el sistema automatizado para micro arreglos del chip en el pocillo en el cual se realizó una amplificación e hibridación de productos virales.
- 2.17 **Resultado negativo:** lectura por el sistema automatizado para micro arreglos del chip en el pocillo en el cual no existió amplificaciones hibridación en las sondas por no existir virus en la muestra.
- 2.18 **Resultado no concluyente:** lectura por el sistema automatizado para micro arreglos del chip en el pocillo en el cual los controles internos de amplificación e hibridación fallaron por presencia de inhibidores en la muestra, muestra no adecuada, falla en la amplificación o mala conservación de la muestra, debe reprocesarse o tomar una nueva muestra.
- 2.19 **Medio de transporte para virus:** medio nutriente líquido para la conservación de virus a partir de muestras biológicas, está compuesto por Albúmina al 5%, Gentamicina (4 mg/ml), Penicilina / estreptomycin (50,000 U/50,000 I-Ig), Fungizona (1 mg/ml), NaHC03 al 7.5 %, Solución balanceada de Hank's (NaCl 8.0 , KCl 0.4 , MgSO47H2O 0.2, CaCl2H2O 0.185, Na2HP04 0.046 , KH2P04 0.06 , Glucosa 1.0, NaHC03 0.35 y Rojo de fenol 0.02, todo en gramos por litro de solución con un pH de 7.0-7.2).
- 2.20 **Rechazo de muestra:** las muestras que no cumplen con los requerimientos de toma (hisopo inadecuado), transporte (medio viral) y almacenamiento (temperatura) para su procesamiento, se rechazarán y se tirarán de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.
- 2.21 **Aceptación de muestra:** toda muestra tomada, transportada y almacenada de manera adecuada.

4. RESPONSABILIDADES:

- 4.1 Del jefe, encargado, responsable y personal del área de microbiología revisar las muestras biológicas y determinar su aceptación o rechazo.
- 4.2 Del jefe, encargado, responsable y personal del área de microbiología revisar las solicitudes y resúmenes clínicos necesarios para el procesamiento de las muestras biológicas.
- 4.3 Del solicitante, entregar la muestra transportada y, en su caso, almacenada en las condiciones adecuadas con nombre completo y los datos para identificación de la muestra adecuados.

**O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"**

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS	Página 4 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0

- 4.4 Del jefe, encargado, responsable y personal del área de microbiología almacenar en ultra congelación las muestras que no serán procesadas en el mismo día o, a tener a 4 grados centígrados si se procesara en las 24 horas a la toma de la muestra.
- 4.5 Del jefe, encargado, responsable del procedimiento de micro arreglos, actualizar la bitácora, entregar resultados y solicitar la firma de la persona que recolecta el resultado.
- 4.6 Del responsable y encargado del procedimiento de micro arreglos, mantener los reactivos a la temperatura adecuada, mantener las áreas de extracción, amplificación y detección limpias, ordenadas y en buen estado.

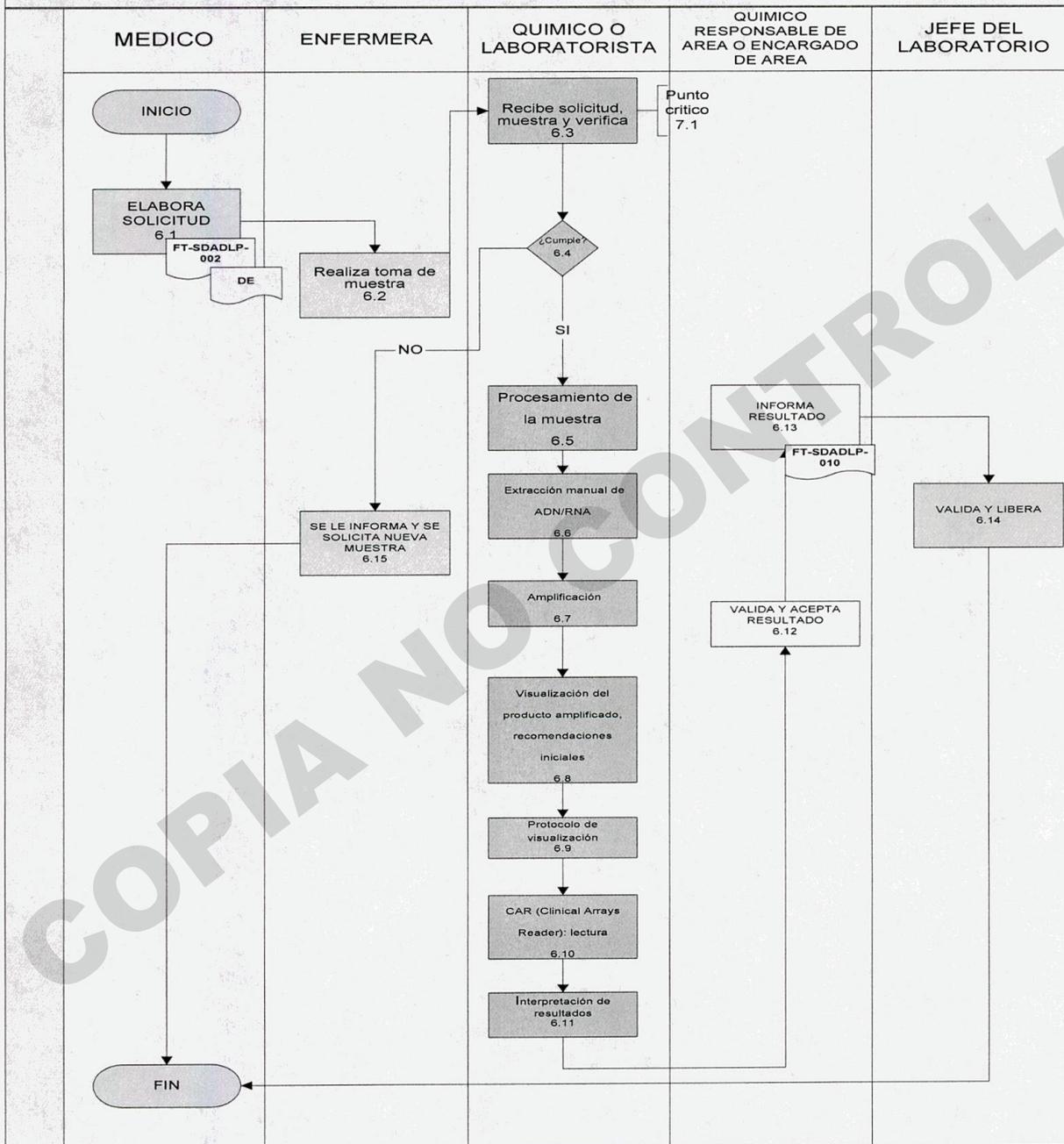
5. DIAGRAMA DE FLUJO:

COPIA NO CONTROLADA

**O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"**

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS	Página 5 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0

PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIO



**O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"**

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS	Página 6 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0

6. DESARROLLO:

6.1 ELABORA SOLICITUD

6.1.1 El médico adscrito responsable del paciente solicita el examen ordinario y deberá llenar la solicitud de ordinarios (FT-SDADLP-002) y deberá de contener nombre completo del paciente, registro de la institución, fecha, edad, servicio, cama, diagnostico, registro de laboratorio interno, fecha de nacimiento, así como nombre del médico que lo solicita y valora como tal la urgencia para la elaboración de los exámenes con su firma, cedula profesional y sello, para su registro en el sistema electrónico que contiene los mismos datos de acuerdo a la NOM-004-SSA3-2012 y NOM-007-SSA3-2011 y las metas internacionales al mismo tiempo anexa historial o resumen clínico que justifique las pruebas solicitadas.

6.2 REALIZA TOMA DE MUESTRA.

6.2.1 El personal de Enfermería será el responsable de rotular, realizar la toma de la muestra correctamente y acudir al área ordinarios del laboratorio y registrarla en la bitácora FT-SDADLP- 021 de ordinarios.

6.3 RECIBE SOLICITUD, MUESTRA Y VERIFICA.

6.3.1 El químico o laboratorista del área de microbiología, recibe solicitud de exámenes con los datos necesarios en el formato y correctamente rotulados los tubos (FT -SDADLP- 002) formato de ordinarios blanca.

6.3.2 Se recibe la muestra a procesar por parte de cualquier miembro del personal' del área de microbiología.

6.3.3 Se revisa que la muestra se haya tomado con el hisopo adecuado, que se haya transportado o almacenado a la temperatura adecuada y en el medio adecuado.

6.3.4 Se revisa la solicitud, muestra y resumen clínico, estos deben coincidir en el nombre del paciente, el diagnóstico, fecha, cama, servicio, la firma y sello del solicitante.

6.3.5 Si va a procesarse la muestra dentro de las primeras 24 horas desde la toma, se almacena a 4 grados centígrados, si va a procesarse después de las 24 horas desde la toma, se almacenará a -80 grados centígrados.

6.4 ¿CUMPLE?

6.4.1 Si cumple pasa al 6.5

6.4.2 No cumple pasa al 6.15

6.5 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

6.5.1 Deberá realizarse en las áreas correspondientes, físicamente separadas para evitar la contaminación de las muestras con el producto amplificado. Cada una de las áreas debe tener su propio material de trabajo identificado (pipetas, puntas, tubos, gradillas, guantes, etc.) y nunca debe salir de cada una de ellas. El área de extracción se utiliza para las muestras primarias, se preparan los tubos para la amplificación y en esta área se les agregan las enzimas. Debe utilizarse campana de flujo laminar. El área de amplificación es donde se encontrará el termociclador para el procedimiento de PCR. Área de visualización, donde se encontrará el equipo automatizado para la lectura del material amplificado, hibridados, marcado y precipitado.

**O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"**

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS	Página 7 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0

6.5.2 Utilizar guantes en todo momento. Es recomendable cambiarse de guantes con cierta frecuencia y obligatoriamente cada vez que se empieza a trabajar en las áreas antes descritas. Siempre hay que utilizar guantes nuevos cuando se preparen los tubos de amplificación y cuando se añada el ADN/ARN a esos tubos.

6.5.3 Limpiar las zonas de trabajo (campanas, gradillas, pipetas) en profundidad con cloro diluido al 10% cada vez que se procese una tanda de muestras, y obligatoriamente después de una contaminación. En el caso de termociclador y termomixers, se recomienda limpiarlos antes y después de su uso, en estas mismas condiciones.

6.5.4 Emplear siempre puntas con filtro y pipetas de desplazamiento positivo para evitar contaminaciones debidas a la micro pipeta. Se debe trabajar con un juego de pipetas para cada área. Siempre Emplear material de laboratorio desechable y auto-clavado.

6.5.5 Nunca mezclar reactivos de dos tubos diferentes, aunque sean del mismo lote. Cerrar los tubos de reactivos inmediatamente después de su uso para evitar contaminaciones. Desechar la punta de la micro pipeta tras cada pipeteo. Separar los tubos unos de otros en todo momento durante la manipulación, con especial precaución durante la extracción.

6.5.6 Evitar que la punta de la pipeta o del sistema de vacío toque el fondo del pocillo, ya que podría dañarse el microarray situado en el fondo. Añadir cada solución sobre la pared del pocillo nunca directamente sobre el fondo. NO añadir la solución SH hasta que se vayan a añadir los productos desnaturalizados de PCR. Tras la incubación con la solución de conjugación, es muy importante lavar bien el microarray para evitar que queden restos de éste y que reaccionen con la solución Reveladora produciendo un precipitado inespecífico que pueda interferir con el resultado.

6.5.7 Evitar la formación de burbujas sobre la superficie del microarray al añadir cualquiera de las distintas soluciones. Mantener limpia la base del pocillo para evitar posibles interferencias en la lectura de resultados. Al visualizar la imagen en el lector, comprobar que, aparezcan los marcadores de posición y de que no haya burbujas o manchas que interfieran en la lectura. En caso contrario, limpiar el fondo del pocillo con un papel de celulosa.

6.6 EXTRACCIÓN MANUAL DE ADN/RNA

6.6.1 El rendimiento mínimo para un buen resultado es tener como mínimo unos 5-10 ng/µl de ADN/ARN.

6.6.2 Mantener las muestras en hielo y lo más separadas posible entre sí. Añadir los reactivos en el orden en que se indica. No utilizar solución salina para las torundas. Incluir un control negativo por cada serie de muestras.

6.6.3 Tomar 200 µl de cada muestra y la misma cantidad de solución de dilución que servirá como control negativo. Si se encontraban congeladas, descongelar a temperatura ambiente y vortexear por 30 segundos, después mantener en hielo. Añadir 600 µl de solución de extracción de muestras líquidas (SEML). Esperar a que la solución se descongele y se vuelva transparente antes de usarla. Mezclar invirtiendo los tubos varias veces, y esperar 15 minutos a temperatura ambiente.

6.6.4 Añadir 600 µl de isopropanol (IP), almacenado a -20°C; mezclar invirtiendo los tubos varias veces y centrifugar, preferiblemente a 4°C, a 13000 rpm durante 20 min.

6.6.5 Aspirar el sobrenadante con micro pipeta. Se puede utilizar la micro pipeta de 1000 µl para eliminar el sobrenadante, siempre y cuando se emplee al final una micro pipeta de menor escala, por ejemplo de 20 µl para los restos del fondo del tubo y evitar eliminar el precipitado por equivocación.

**O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"**

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS	Página 8 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0

6.6.6 Añadir 1000 µl de etanol 70%, almacenado a -20°C. Agitar ligeramente para limpiar el precipitado del fondo. Centrifugar preferiblemente a 4°C, a 13000 rpm durante 15 min.

6.6.7 Eliminar el sobrenadante cuidadosamente, dejar secar perfectamente en la campana durante 15 a 20 minutos hasta que no queden residuos de etanol. Antes de re suspender la muestra, comprobar que no quede etanol.

6.6.8 Re-suspender en 20 µl de Solución de dilución (SD).

6.7 AMPLIFICACIÓN

6.7.1 Trabajar en el área pre-PCR de amplificación, siempre en campana, tener especial cuidado a la hora de añadir la mezcla de enzimas ya que contiene un elevado porcentaje de glicerol, si se introduce demasiado la punta de la pipeta, la mezcla se adhiere a las paredes provocando, por un lado, que se añada más mezcla de lo necesaria al tubo de reacción, y por otro lado, se produzca una pérdida de producto, pudiendo darse el caso de no tener suficiente para el resto de tubos de amplificación del kit.

6.7.2 Mantener los tubos de muestras con el material extraído separados y en hielo.

6.7.3 Descongelar y mantener en hielo, por cada muestra que se vaya a analizar, dos tubos de amplificación (uno incoloro y otro verde). Centrifugar unos segundos los tubos de reacción en la micro centrífuga para que quede todo el líquido en el fondo del tubo.

6.7.4 Añadir 2 µl de la mezcla de enzima a ambos tubos de amplificación. Añadir 5 µl del ARN/ADN extraído a cada uno de los tubos de reacción, y re suspender varias veces con la micro pipeta. Dejar los tubos en el hielo.

6.7.5 Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas: un ciclo a 45°C por 45 minutos seguido de 95°C por 15 minutos, 45 ciclos a 95°C por medio minuto, seguido de 1.5 minutos a 50°C, otros 1,5 minutos a 68°C, posteriormente un ciclo a 68°C durante 10 minutos y finalmente a 4°C continuo hasta la recogida de tubos (opcional) Arrancar el programa y colocar los tubos de reacción en el termociclador. La duración de la amplificación es de unas 5 horas.

6.8 VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO, RECOMENDACIONES INICIALES

6.8.1 Mantener el termomixers al menos 1 hora a 59°C antes de colocar las muestras procesadas.

6.8.2 Colocar los tubos de amplificación separados en el termociclador durante la desnaturalización, desnaturalizar por 10 minutos. Nunca sobrepasar los 10 min.

6.8.3 Atemperar la SH (solución de hibridación) a temperatura ambiente. Encender el CAR (Clinical Arrays Reader) al comienzo del proceso e introducir el nombre de las muestras de cada pocillo en el programa antes de la lectura.

6.8.4 Preparar las soluciones de lavado antes de cada ensayo.

6.8.5 Introducir la tira en el termomixer INMEDIATAMENTE después de añadir la solución de hibridación (SH).

6.9 PROTOCOLO DE VISUALIZACIÓN

6.9.1 Utilizar el termociclador para desnaturalizar los productos de PCR. Para este paso, colocar los tubos amplificados en el termociclador e incubar a 95° C durante 8 minutos. Programar en el termociclador 15 minutos para que una

**O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"**

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS	Página 9 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0

vez transcurridos los 10 minutos los amplificadores sigan a 95° C. Sacar los tubos de la incubación a 95° C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo.

- 6.9.2 Preparar la Solución TL diluida: Por cada tira CS (8 pocillos en total), preparar 10 ml. de solución de lavado diluida, añadiendo 1 ml. de Solución TL a 9 ml. de agua destilada.
- 6.9.3 Pre lavar los pocillos antes de empezar el ensayo añadiendo 200 µl de Solución TL diluida a cada pocillo del CS, re suspender de 10 a 15 veces con la pipeta multicanal, teniendo en cuenta que no se debe tocar la superficie del array. Se recomienda realizar este lavado mientras se desnaturalizan los amplificadores y mantener la solución de lavado en la tira hasta la adición de los mismos. Decantar con pipeta.
- 6.9.4 Hibridación: antes de usar la Solución SH, ésta debe estar a temperatura ambiente. Una vez desnaturalizados los productos de PCR, añadir 100 µl de solución SH (evitar que se forme espuma) a cada pocillo y añadir al mismo pocillo 3 µl del amplificado del tubo incoloro y otros 3 µl del verde. Re suspender varias veces para que se mezcle con la solución de hibridación, con cuidado de no tocar el array.
- 6.9.5 Incubar la tira cubierta con la tapa de plástico transparente en el termomixer de placa tapado durante 1 hora a 59° C, agitando a 550 rpm. Tras esta incubación, sacar la placa y desechar la Solución SH con pipeta o bomba de vacío.
- 6.9.6 Dejar programado el termomixer a 30° C y en movimiento para su utilización posterior. Realizar un doble lavado de los pocillos, usar puntas diferentes para cada pocillo en ambos lavados. Añadir 200 µl de Solución TL diluida a cada pocillo, re suspender de 10 a 15 veces, desechar la Solución TL, repetir la operación 2 veces.
- 6.9.7 Centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla, preparar la solución CJ diluida. Por cada pocillo, se añade 1 ml. de solución DC y 7.5 µl de Solución CJ. Desechar la Solución TL diluida y añadir a cada pocillo 100 µl de Solución CJ diluida. Incubar durante 15 minutos exactos en el termomixer de placa a 30° C, agitando a 550 rpm, luego sacar la placa y desechar la solución rápidamente.
- 6.9.8 Triple Lavado: añadir inmediatamente 200 µl de Solución TL diluida a cada pocillo, re suspender de 10 a 15 veces con la pipeta y desechar la solución.
- 6.9.9 Revelado con Solución RE: quitar la solución TL diluida, añadir 100 µl de solución RE a cada pocillo e incubar 10 minutos a 25 ° C en el termomixer de placa sin agitación, Desechar la Solución RE completamente con pipeta. El array debe quedar seco.

6.10 CAR (CLINICAL ARRAYS READER): LECTURA

- 6.10.1 El procesamiento de los datos obtenidos a partir de cada uno de los análisis, se realiza de forma automática. El equipo de lectura y análisis presentará un informe en el que se indican los resultados. En la pantalla del equipo aparecerá una tabla con tres columnas, en la columna de la izquierda aparecerán las especies de virus y los subtipos que se caracterizan en el microarray. En la columna del centro aparece el resultado de positivo o negativo para cada especie de virus, y en la de la derecha aparecerá la conformidad del control de ADN/ARN de la extracción y de la amplificación.

6.11 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- 6.11.1 Si la extracción RNA/DNA se realiza de forma incorrecta la técnica dará lugar a un falso negativo, por lo que se recomienda especial cuidado a la hora de realizar este proceso. El tubo de RT-PCR se ha diseñado para favorecer la

**O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"**

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS	Página 10 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0

amplificación de los virus frente a la del control de amplificación. De manera que, en ciertas condiciones (ej. cuando hay un elevado número copias de un virus o cuando la muestra presenta co-infecciones con varios virus a la vez), puede suceder que no se amplifique el control y aparezca una lectura de: CONFORME, aun así es un resultado POSITIVO.

6.11.2 Si se realizó la amplificación del control, la hibridación e identificación todos los controles internos aparecen como CONFORME y el resultado es POSITIVO.

6.11.3 Ante la falla de uno de los controles, el resultado es INVÁLIDO y el control se lee como NO CONFORME, puede reanalizarse

6.11.4 Si los controles son CONFORMES y el procesamiento fue adecuado pero no hay identificación viral, el resultado se considera NEGATIVO y VÁLIDO.

6.12 VALIDA Y ACEPTA RESULTADO

6.12.1 El químico responsable de área o encargado de área valida y acepta el resultado de acuerdo a la patología o diagnóstico probable que el médico proporcione.

6.13 INFORMA RESULTADO

6.13.1 El químico responsable de área o encargado reporta los resultados en el formato FTSDADLP-010 ya validado y aceptado el resultado se entrega al jefe del laboratorio para ser liberados.

6.14 VALIDA Y LIBERA

6.14.1 El jefe del laboratorio valida los resultados que le informa el químico responsable de área o encargado de área y lo libera para informar al médico.

6.15 SE LE INFORMA Y SE SOLICITA NUEVA MUESTRA

6.15.1 Se le informa a la enfermera de la muestra inadecuada o como mal transportada y se le solicita nueva muestra para procesar el examen solicitado.

7. PUNTOS CRÍTICOS

7.1 **Las muestras biológicas de pacientes con sospecha de infecciones respiratorias virales** deben ser tomadas durante los primeros 10 días de los síntomas, con el hisopo adecuado, transportado en medio viral de Hans a 4 grados centígrados y almacenado a 4 grados si se procesara en las primeras 24 horas desde la toma o a -80 grados centígrados si se procesara después de las 24 horas.

Utilización de muestras no adecuadas. El análisis de cualquier otro tipo de muestra clínica distinta a las indicadas en el manual del kit CLART Pneumovir, así como una toma incorrecta de las muestras, puede conllevar que el resultado del análisis no sea concluyente o no conforme debido a una falta de amplificación por falta de muestra o por reacción inhibida. La conservación inadecuada de las muestras puede influir en el resultado del análisis. Si las muestras se someten a condiciones que den lugar a una degradación del ADN/ARN que contienen, el resultado del análisis será erróneo. La presencia de hemoglobina o etanol tras la extracción de ADN/ARN puede inhibir la reacción de amplificación, puede evitarse purificando y dejando secar el ADN/ARN.

**O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"**

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS	Página 11 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0

Sensibilidad analítica se determina mediante la amplificación de diluciones seriadas de ADN de plásmidos recombinantes para cada uno de los virus detectados en el kit. Cada uno de ellos lleva inserto el producto amplificado (incluyendo la parte complementaria a las sondas específicas de detección). La visualización se realizó en CS dando lugar a los siguientes resultados:

- Metapneumovirus, Coronavirus, influencias, Parainfluenzas 4, Virus sincitial respiratorio A y B y Bocavirus -100 copias del plasmado para una sensibilidad del 100% Enterovirus, Parainfluenzavirus 1,2 y 3 y Rhinovirus – 1000 copias del plasmado para producir una sensibilidad del 100%.
- Especificidad analítica se llevaron a cabo experimentos de especificidad con los 17 plásmidos recombinantes, observándose que no se produce detección inespecífica de otros virus diferentes al que se quiere determinar. Por lo tanto, se considera que la técnica alcanza una especificidad analítica del 100%.

8. ANEXOS

8.1 FT-SDADLP-002 SOLICITUD EXAMENES ORDINARIOS

8.2 FT-SDADLP-010 HOJA DE RESULTADOS

9. REFERENCIAS

9.1 Grupo técnico interinstitucional del comité nacional para la vigilancia epidemiológica.

Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de Influenza. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica. México, 2011

9.2 Genómica SAU, CLART Pneumovir, Caracterización de virus causantes de infecciones respiratorias humanas mediante identificación genómica para diagnóstico in vitro. Madrid, España. 2010

10. HISTORIAL DE CAMBIOS

VERSION	FECHA	DESCRIPCION DEL CAMBIO
0	01/07/2015	Nueva emisión

REALIZO:

QFB. ELBA PATRICIA ASCENCIO ESPARZA



O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"

	NOMBRE DEL MANUAL	FECHA DE IMPLEMENTACIÓN	01/07/2015
	MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN VIRUS RESPIRATORIOS	Página 12 de 12	
	ÁREA DE APLICACIÓN	CLAVE	VERSIÓN
	MICROBIOLOGIA	MP-SDADLP-016	0

AUTORIZACIONES:

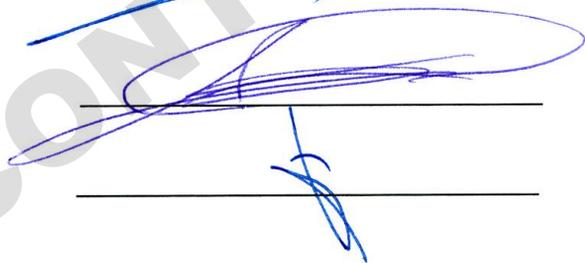
Dr. Francisco Martin Preciado Figueroa
Director De La Unidad



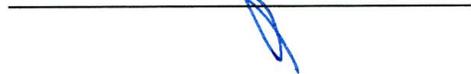
Dr. Luis Alberto Ibarra Verdugo
Subdirector De Servicios Auxiliares De
Diagnóstico, Tratamiento Y Paramédico
De La Unidad Hospitalaria.



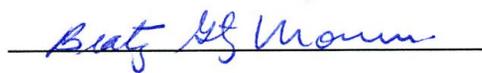
Dr. Francisco Javier Navarro Rodríguez
Jefe de Auxiliares de Diagnóstico y Tto.



Dr. Fernando Antonio Velarde Rivera
Jefe Del Laboratorio De Patología Clínica Y
Banco De Sangre.



Mtra. Beatriz Gutiérrez Moreno
Gerente de Calidad.



COPIA NO CONTROLADA