



SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



**INSTITUTO NACIONAL
DE PERINATOLOGÍA**

ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

Dirección de Investigación
Subdirección de Investigación Clínica
Departamento de
Infectología e Inmunología

Carátula de validación de vigencia

Ciudad de México, a 14 de febrero de 2023.

Se hace referencia al inciso A) del Procedimiento para la validación de vigencia de las normas internas y transversales en el Sistema de Administración de Normas Internas de la APF (SANI). Con fundamento en el artículo 19 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, el **Manual de Procedimientos Técnicos del Laboratorio de Biología Molecular y Virología**, registrado en el Inventario de Normas Internas del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer), se encuentra vigente puesto que el marco jurídico está actualizado y lo descrito en la ejecución de los procedimientos es aplicable hasta el momento. Por lo anterior, la Dirección de Investigación valida la vigencia de la norma interna administrativa:

UR	Clasificación	Nombre	Homoclave	Fecha de publicación/ difusión	Fecha de revisión
Laboratorio de Biología Molecular y Virología	MTP	Manual Técnico de Procedimientos del Laboratorio de Biología Molecular y Virología	INPER-NIS-0177	27/01/2023	05/04/2022

Responsable del documento

Ricardo Figueroa D.

Dr. Ricardo Figueroa Damián
Jefe del Departamento de
Infectología e Inmunología

Autorizó

[Firma]

**Dra. Guadalupe del Carmen
Estrada Gutiérrez**
Directora de Investigación



2023
**Francisco
VILA**



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

**MANUAL TÉCNICO DE PROCEDIMIENTOS
DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y VIROLOGÍA**



CLAVE DEL
LABORATORIO
BM-MT-1/01

BM-CV-1/02

FECHA DE EMISIÓN

DÍA	MES	AÑO
05	04	22

HOJA 1/10

**DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIROLOGÍA**

**MANUAL TÉCNICO DE PROCEDIMIENTOS DEL
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIROLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIROLOGÍA****PRESENTACIÓN**

A partir del 2007, en el Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" (INPer) se incorporó la prueba de cuantificación de carga viral de VIH como apoyo al seguimiento clínico de las mujeres embarazadas seropositivas a VIH atendidas en la Clínica de Atención de Mujeres Embarazadas con VIH/SIDA y Recién Nacidos. La infección por el VIH, al ser un problema de Salud Pública complejo, demanda un enfoque asistencial, un seguimiento con pruebas especiales como la cuantificación de carga viral y la determinación de subpoblaciones de linfocitos, además de aspectos de investigación y que solo pueden tener un mejor manejo cuando se realiza de manera multidisciplinaria. Así mismo, la realización de exámenes de laboratorio especiales para la detección de otras infecciones de transmisión sexual (virus del papiloma humano, Chlamydia, Herpes virus, entre otros) asociadas al VIH, conducen a un manejo integral, sin discriminación y de calidad en las mujeres atendidas en este Instituto.

El Manual Técnico del Laboratorio de Biología Molecular y Virología está estructurado con los elementos, criterios, políticas y normas sobre los procedimientos técnicos que todo el personal asignado al área debe conocer, con la finalidad de cumplir con sus actividades manera óptima.

Este documento representa una importante guía para el personal multidisciplinario involucrado en la atención de mujeres seropositivas a VIH en la Clínica de Atención de Mujeres Embarazadas con VIH/SIDA y Recién Nacidos y para el personal del área médico-biológico.

El Manual de Técnico no se podrá sustituir ni copiar para otros fines en ninguna de sus partes sin previa autorización, en caso de requerirlo, se dará aviso por escrito al área correspondiente. Las modificaciones serán señaladas en el apartado correspondiente.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

**MANUAL TÉCNICO DE PROCEDIMIENTOS
DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y VIROLOGÍA**



CLAVE DEL
LABORATORIO
BM-MT-1/01

BM-CV-1/02

FECHA DE EMISIÓN

DÍA	MES	AÑO
05	04	22

HOJA 3/10

**DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIROLOGÍA**

OBJETIVO DEL MANUAL

Contar con un documento que describa los procedimientos que se realizan en el laboratorio de Biología Molecular y Virología y que sirvan como apoyo al seguimiento clínico de las mujeres embarazadas seropositivas a VIH atendidas en la Clínica de Atención de Mujeres Embarazadas con VIH/SIDA y Recién Nacidos de este Instituto

**DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIROLOGÍA**

MARCO JURÍDICO

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

Ley Orgánica de la Administración Pública Federal

Ley General de Salud

Ley de los Institutos Nacionales de Salud

Ley Federal de las Entidades Paraestatales

Ley Federal de Presupuesto y Responsabilidad Hacendaria

Ley de Infraestructura de la Calidad

Ley General para el Control del Tabaco

Ley General de Responsabilidades Administrativas

Ley General de Transparencia y Acceso a la Información Pública

Ley Federal del Trabajo

Ley Federal de los Trabajadores al Servicio del Estado, reglamentaria del apartado B) del Artículo 123 Constitucional

Ley del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

Ley del Servicio Profesional de Carrera en la Administración Pública Federal

Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados

Ley General de los Derechos de Niñas, Niños y Adolescentes

Ley Federal para Prevenir y Eliminar la Discriminación

Ley General de Acceso de las Mujeres a una Vida Libre de Violencia

Ley del Instituto Nacional de las Mujeres

Ley de la Comisión Nacional de los Derechos Humanos

Estatuto Orgánico del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

Código Civil Federal

Código Penal Federal

Código Federal de Procedimientos Civiles

Código Fiscal de la Federación

Ley de Amparo, Reglamentaria de los artículos 103 y 107 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

**DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIROLOGÍA****REGLAMENTOS**

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Sanidad Internacional

Reglamento de la Ley General de Salud en materia de prestación de servicios de atención médica

Reglamento de la Ley General de Salud, en materia de Control Sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos

Reglamento de la Ley General de Salud en materia de protección social en Salud

Reglamento de la Ley General de Salud en materia de publicidad

Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Control Sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios

Reglamento de Insumos para la Salud

Reglamento de Procedimientos para la Atención de Quejas Médicas y Gestión Pericial de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico

Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios

Reglamento Interior de la Comisión para la Certificación de Establecimientos de Atención Médica

Reglas de operación del Fondo de Salud para el Bienestar.

NORMAS

Norma Oficial Mexicana **NOM-177-SSA1-2013**, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.

Norma Oficial Mexicana **NOM-229-SSA1-2002**, Salud ambiental. Requisitos técnicos para las instalaciones, responsabilidades sanitarias, especificaciones técnicas para los equipos y protección radiológica en establecimientos de diagnóstico médico con rayos X.

Norma Oficial Mexicana **NOM-014-SSA2-1994**, para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del Cáncer Cérvico Uterino.

Norma Oficial Mexicana **NOM-032-SSA2-2014**, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores.

Norma Oficial Mexicana **NOM-034-SSA2-2013**, Para la prevención y control de los defectos al nacimiento.

DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIROLOGÍA

Norma Oficial Mexicana **NOM-035-SSA2-2012**, Para la prevención y control de enfermedades en la peri menopausia y postmenopausia de la mujer. Criterios para brindar atención médica.

Proyecto de Norma Oficial Mexicana **PROY-NOM-036-SSA2-2018**. Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, faboterápicos (sueros) e inmunoglobulinas en el humano.

Norma Oficial Mexicana **NOM-038-SSA2-2010**, Para la prevención, tratamiento y control de las enfermedades por deficiencia de yodo.

Norma Oficial Mexicana **NOM-039-SSA2-2014**, Para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual.

Norma Oficial Mexicana **NOM-041-SSA2-2011**, para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama.

Norma Oficial Mexicana **NOM-045-SSA2-2005**, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales.

Norma Oficial Mexicana **NOM-046-SSA2-2005**, violencia familiar, sexual y contra las mujeres. Criterios para la prevención y atención.

Norma Oficial Mexicana **NOM-004-SSA3-2012** Del Expediente Clínico.

Proyecto de Norma Oficial Mexicana **PROY-NOM-007-SSA3-2017**, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

Norma Oficial Mexicana **NOM-016-SSA3-2012**, Que establece las características mínimas de infraestructura y equipamiento de hospitales y consultorios de atención médica especializada.

Norma Oficial Mexicana **NOM-024-SSA3-2012**. Sistemas de información de registro electrónico para la salud. Intercambio de información en salud.

Proyecto de Norma Oficial Mexicana **PROY-NOM-026-SSA3-2018**, Para la práctica de la cirugía mayor ambulatoria.

Norma Oficial Mexicana **NOM-027-SSA3-2013**, Regulación de los servicios de salud. Que establece los criterios de funcionamiento y atención en los servicios de urgencias de los establecimientos para la atención médica.

Proyecto de Norma Oficial Mexicana **PROY-NOM-028-SSA3-2018**, Regulación de los servicios de salud. Para la práctica de la ultrasonografía diagnóstica.

Proyecto de Norma Oficial Mexicana **PROY-NOM-032-SSA3-2018**, Asistencia social. Prestación de servicios de asistencia social para niñas, niños y adolescentes en situación de riesgo y vulnerabilidad.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

**MANUAL TÉCNICO DE PROCEDIMIENTOS
DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y VIROLOGÍA**



CLAVE DEL
LABORATORIO
BM-MT-1/01

BM-CV-1/02

FECHA DE EMISIÓN

DÍA	MES	AÑO
05	04	22

HOJA 7/10

**DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIROLOGÍA**

Norma Oficial Mexicana **NOM-035-SSA3-2012**, En materia de información en salud.

Norma Oficial Mexicana **NOM-013-NUCL-2009**, Requerimientos de seguridad radiológica para egresar a pacientes a quienes se les ha administrado material radiactivo.

Norma Oficial Mexicana **NOM-055-SEMARNAT-2003**, que establece los requisitos que deben reunir los sitios que se destinarán para un confinamiento controlado de residuos peligrosos, previamente estabilizados.

Norma Mexicana **NMX-R-025-SCFI-2015**. En igualdad laboral y no discriminación.

DISPOSICIONES LEGALES INTERNAS

Condiciones Generales de Trabajo del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, registradas en el Tribunal Federal de Conciliación y Arbitraje expediente R.S.13/83 del 15-06-2018 y autorizadas por la Secretaría de Hacienda y Crédito Público Mediante Oficio N°. 307-A-1622 de fecha 12-06-2018.

Nota: Para lo no previsto dentro de este marco jurídico, se observará lo establecido en el marco jurídico regulatorio del Manual de Organización Específico del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIROLOGÍA

GLOSARIO

Nucleótido: Son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.

DNA (ácido desoxirribonucleico; por sus siglas en inglés): Es una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.

RNA (Ácido ribonucleico; por sus siglas en inglés): Es una molécula que se encuentra en las células y microorganismos, siendo la encargada de dirigir las etapas intermedias de la síntesis de proteínas, regula la expresión genética y algunas veces presenta actividad catalítica.

Biología Molecular: Es la disciplina de la Biología que tiene como objetivo el estudio de los procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista molecular, estudiando la estructura, función y composición de las moléculas biológicamente importantes.

Carga Viral: Es la cuantificación de la infección por virus que se calcula por estimación de la cantidad de partículas virales en los fluidos corporales y se expresa en copias del material genético por unidad de volumen de sangre. Se emplea para control terapéutico de virosis crónicas y control de pacientes inmunosuprimidos.

Diagnóstico molecular: Es una herramienta que engloba un conjunto de técnicas moleculares empleadas para la identificación de agentes etiológicos en enfermedades infecciosas o de transmisión sexual, además de que permite la identificación de defectos moleculares subyacentes en enfermedades de carácter hereditario.

Electroforesis: Es una técnica que permite separa moléculas (como los ácidos nucleicos) según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

Hibridación: Es el proceso por el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencia de bases complementarias en una única molécula de doble cadena, que toma la estructura de doble hélice, donde las bases nitrogenadas quedan ocultas en el interior. Existen dos tipos de hibridación, DNA-DNA y DNA-RNA.

Infecciones de Transmisión sexual: Son un conjunto de afecciones clínicas infectocontagiosas que se transmiten de persona a persona por medio de contacto sexual, algunas de ellas pueden transmitirse durante el embarazo, es decir, de la madre al hijo.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Es una técnica de Biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original o molde.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

MANUAL TÉCNICO DE PROCEDIMIENTOS
DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y VIROLOGÍA



CLAVE DEL
LABORATORIO
BM-MT-1/01

BM-CV-1/02

FECHA DE EMISIÓN

DÍA	MES	AÑO
05	04	22

HOJA 9/10

DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIROLOGÍA

PCR en tiempo real: Es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (DNA).

Plasma: Es la fracción líquida y acelular de la sangre, es decir, se obtiene al dejar a la sangre desprovista de células como los glóbulos rojos y los glóbulos blancos. Está compuesto por un 90% de agua, un 7% de proteínas, y el 3% restante por grada, glucosa, vitaminas, hormonas, oxígeno, gas carbónico y nitrógeno, además de productos de desecho del metabolismo como el ácido úrico.

Polimerasa: Es una enzima capaz de transcribir o replicar los ácidos nucleicos. Resulta indispensable en la división celular (DNA Polimerasa) y en la transcripción de DNA (RNA Polimerasa).

Replicación: Es el mecanismo que permite al DNA duplicarse (es decir, sintetizar una copia idéntica). De esta manera de una molécula de DNA única, se obtienen dos o más "clones" de la primera.

Sonda: Es un fragmento de DNA (o raramente RNA) de pequeño tamaño, empleado en Biología Molecular como herramienta para detectar la presencia de DNA o RNA de secuencia complementaria parecida o igual, en experimentos de hibridación molecular o PCR para la detección de secuencias específicas.

Suero: Es el componente de la sangre resultante tras permitir la coagulación de ésta y eliminar el coagulo resultante. Es equivalente al plasma, pero sin las proteínas involucradas en la coagulación (fibrinógeno en su mayor parte). El suero es útil en la identificación de algunos analitos en los que no se requiere de la intervención de un anticoagulante, ya que este podría interferir en el resultado alterándolo.

Transmisión vertical: Es el tipo de infección que ocurre durante la gestación, el parto o la lactancia, en donde la madre transmite a su producto algún microorganismo con el cual se encuentra infectada.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Convencionalmente a nivel internacional se abrevia HIV (por sus siglas en inglés).

Virus: Es un agente infeccioso submicroscópico que carece de un metabolismo independiente y sólo puede multiplicarse dentro de las células de otros organismos, por lo que se les cataloga como parásitos intracelulares estrictos.

DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIROLOGÍA

PROCEDIMIENTOS

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

OBJETIVO ESPECÍFICO



1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

1.- Propósito del examen

Cuantificar la carga viral del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en muestras de plasma sanguíneo de mujeres embarazadas seropositivas al VIH, provenientes de los diferentes CAPASITS como apoyo a la resolución de su embarazo o pacientes del INPer de reciente diagnóstico que acuden a su seguimiento ginecobstétrico. Así mismo se les hace la determinación de carga viral a los recién nacidos hijos de mujeres infectadas con VIH, como seguimiento al programa de atención de mujeres embarazadas e infectadas con VIH SIDA.

2.- Principio

La prueba COBAS TaqMan HIV-1 está diseñada para su uso con el sistema High Pure System (HPS). Es una prueba *in vitro* para la determinación cuantitativa del RNA del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), a partir de plasma humano con anticoagulante EDTA. La determinación se basa en la extracción de ácidos nucleicos de manera manual, seguida de la retro transcripción del RNA viral, la amplificación simultánea del cDNA obtenido y la detección en el equipo automatizado COBAS TaqMan 48.

3.- Características del desempeño

La prueba está indicada para usarse conjuntamente con la presentación clínica y otros marcadores analíticos de progreso de la enfermedad para el tratamiento clínico de las pacientes infectadas por HIV-1. Puede utilizarse para evaluar la prognosis del paciente mediante la medición de la concentración de referencia (antes de iniciar el tratamiento) del RNA del HIV-1 o para controlar los efectos de la terapia antirretrovírica, mediante la medición de los cambios en las concentraciones de RNA del HIV-1 en plasma en el curso del tratamiento antirretroviral.

La prueba COBAS TaqMan HIV-1, no está indicada para utilizarse para detectar la presencia de HIV-1 en sangre o hemoderivados, ni como prueba diagnóstica para confirmar la existencia de una infección por HIV-1.

3.1 Límites de detección

- La prueba puede cuantificar el RNA del HIV-1 en un intervalo de 47-10,000,000 copias/mL.
- Basados en los estándares de la OMS (código NIBSC 97/656), una copia de RNA del HIV-1 es equivalente a 1.7 UI

4.- Tipo de muestra

La prueba COBAS TaqMan HIV-1, para uso con el sistema High Pure HPS es una prueba *in vitro* de amplificación de ácido nucleico para la determinación cuantitativa de RNA del virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) en plasma humano.

5.- Preparación de la/el paciente

Se vincula con el procedimiento de extracción de sangre periférica del personal encargado.

**1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)****6.- Tipo de contenedor y aditivos**

Tubo vacutainer de recolección de muestras de 3 mL (tapón morado, de acuerdo al código de colores) con anticoagulante K2 EDTA 5.4 mg, para la adecuada separación de la muestra.

7.- Equipo y reactivos requeridos**7.1 Equipo**

- Equipo automatizado COBAS TaqMan 48. Roche. Número de serie: 4150
- Centrifuga Refrigerada, serie 41051085
- Rotor de Placas High Plate serie 41032179
- CPU serie CZC11638QF
- Impresora Láser serie VNB3L17823
- Software AMPLILINK

7.2 Accesorios

- Dispositivo taponador de bloques de tubos K (P/N: 03339904001)
- K-carrier para el analizador COBAS TaqMan 48 (P/N: 28150397001)
- Transportador de K-carrier (P/N: 03287696001)
- Caja de tubos K de 12 x 96 (P/N: 03137082001)

7.3. Reactivos

- COBAS TaqMan HIV-1 Test (P/N: 03501752 190)
- High Pure System Viral Nucleic Acid Kit (P/N: 03502295 001)

8.- Controles ambientales y de seguridad

- No pipetear las soluciones con la boca
- No comer, beber o fumar en las áreas de trabajo
- Utilizar guantes desechables de nitrilo o latex libres de talco, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule las muestras o reactivos de la prueba
- Las muestras de plasma deben permanecer equilibradas durante 15-30 minutos a temperatura ambiente antes de su uso
- Uso de pipeta serológica estéril y desechable
- Puntas para micro pipetas, estériles, desechables y libres de RNasa y DNasa
- Todos los reactivos de amplificación y detección deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarlos, para ello es necesario sacarlos de su almacenamiento al menos 30 minutos antes de utilizarlos
- No juntar reactivos de diferentes lotes o de diferentes botellas del mismo lote
- No mezcle reactivos de diferentes kits

**1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)**

- No utilice los kits después de su fecha de caducidad
- Manipule muestras y controles como si fuesen materiales infecciosos
- Utilice protección ocular, batas de laboratorio y guantes desechables cuando manipule cualquier reactivo
- Guarde los reactivos del sistema High Pure a temperatura de 15 a 25 °C
- Una vez abiertos los reactivos deben utilizarse durante los siguientes 30 días o hasta la fecha de caducidad, lo que pase primero
- No congele los reactivos, ni los controles. Guárdelos a temperaturas de 2-8 °C
- La mezcla maestra de trabajo, una vez preparada, debe almacenarse en la oscuridad a temperatura de 2-8 °C y usarse dentro de las 2 horas posteriores a su preparación
- La amplificación debe realizarse durante la hora siguiente a la adición de las muestras y los controles procesados a la mezcla de trabajo
- Mientras se encuentre el equipo trabajando, es necesario mantener la temperatura del cuarto a 16 °C

9.- Procedimientos de calibración (trazabilidad metodológica)

Cada juego de pruebas contiene coeficientes de calibración específicos por lote, los cuales se introducen al sistema del equipo mediante el escaneo de una tarjeta de valores de controles, que es suministrada con el kit COBAS TaqMan 48.

Esta tarjeta incluye además de la información de número de lote y caducidad, los valores de 3 coeficientes de calibración o variabilidad (A, B, C) y el intervalo dentro del cual se encuentran los valores de los controles positivo bajo (CPL) y control positivo alto (CPH). Cada juego de valores se puede emplear hasta 4 veces por lote.

10.- Pasos del procedimiento

En cada nuevo lote, hay una ligera variación en los valores de los coeficientes de calibración y los intervalos de los controles positivo bajo y positivo alto, por lo que es indispensable, no mezclar calibradores de distintos lotes.

Cada vez que se emplee un lote diferente de reactivos, se debe proceder a la calibración mediante el escaneo de las tarjetas de calibración incluidas en la prueba.

Para realizar este paso, es necesario eliminar del sistema los registros anteriores de calibradores y escanear con el lector infrarrojo los códigos de barras correspondientes a cada coeficiente o control.

Una vez escaneado el software del equipo indica el intervalo de valores de cada coeficiente o control, que será la base para la cuantificación de las diferentes muestras.

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

11.- Procedimientos de control de calidad

El equipo se calibrará cada vez que haya cambio de lote de reactivo, en ese momento se validan los estándares de cuantificación para determinar los rangos de aceptación de resultados, contemplando el control positivo bajo, control positivo alto y control negativo.

Así mismo, se valida la reproducibilidad del procedimiento con controles externos o muestras de pacientes positivas con carga conocida.

Para asegurar un correcto manejo de las muestras y controles internos durante su procesamiento, se realiza periódicamente la calibración de pipetas, además de llevar un estricto control de los lotes y fechas de caducidad del kit para la preservación adecuada de los reactivos.

De manera alterna se verifica la vida media de la lámpara del equipo mediante mantenimientos preventivos calendarizados, así como las correspondientes actualizaciones de software.

12.- Interferencias

Los niveles elevados de lípidos, bilirrubina, albumina y hemoglobina en las muestras NO interfieren en la determinación cuantitativa del RNA del HIV-1 en esta prueba, así como las muestras provenientes de pacientes con enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, lupus eritematoso, etc.). También se ha observado que el tratamiento antirretroviral, no tiene interferencia sobre el resultado de la cuantificación de carga viral. Como los que se enlistan en la siguiente tabla:

Retrovir	Norvir
Epivir	Kaletra
Hivid	Agenerase
Zerit	Sustiva
Ziagen	Cytovene
Viread	Zovirax
Valtrex	Ronoferon-A
Intron A	Fuzeon

13.- Principios de cálculo

La cuantificación del RNA viral del VIH-1 se realiza con el HIV-1 QS (Estándar de cuantificación), lo que permite una cuantificación más precisa de RNA del VIH-1 en cada muestra. El HIV-1 QS es una construcción de RNA blindado no infeccioso que contiene secuencias de VIH con sitios de unión de cebadores idénticos a los del RNA diana del VIH-1.

El HIV-1 QS se agrega a cada muestra con un número de copias conocido y se lleva a cabo durante la preparación de la muestra, la transcripción inversa, la amplificación por PCR y los pasos de detección del oligonucleótido dividido con doble marcaje. Al hacer el conteo del número de copia presente en la muestra, el equipo resta el número de copias de la QS para determinar el valor real de cada muestra

**1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)****14.- Intervalos de referencia o valores de decisión clínica**

- La prueba puede cuantificar el RNA del HIV-1 en un intervalo de 47- 10,000,000 copias/mL
- Basados en los estándares de la OMS (código NIBSC 97/656), una copia de RNA del HIV-1 es equivalente a 1.7 UI

15.- Reporte de los resultados del examen**15.1 Resultado Negativo**

RNA viral no detectado por este método (<47 copias/ml) en la muestra analizada

15.2 Resultado Positivo

RNA viral detectado por este método (___copias/ml; ___log) en la muestra analizada

Límite de detección del equipo: de 47 a 10,000,000 de copias/mL

16.- Instrucciones para determinar un valor fuera del intervalo

Si las muestras analizadas tienen una carga superior a los límites de detección esta se deberá diluir con plasma humano negativo o con el control negativo la muestra se volverá a analizar, una vez obtenido el resultado en el equipo, se multiplicará por el factor de dilución para el cálculo final de la carga viral.

17.- Valores de alerta o crítico

En aquellas pacientes que aun con tratamiento antirretroviral, presenten carga viral elevada.

En aquellos pacientes que presenten carga viral elevada asociados a falta de adherencia al tratamiento antirretroviral.

En aquellos hijos de madres VIH positivas que presenten carga viral detectable.

18.- Interpretación clínica del laboratorio

El análisis de carga viral consiste en medir la cantidad de copias de RNA del VIH en un volumen concreto de sangre; el resultado se informa como número de copias de VIH por mililitro de sangre (copias/mL). La determinación de la carga viral forma parte del seguimiento clínico de las personas con el VIH y sirve para valorar la respuesta al tratamiento antirretroviral.

19.- Fuentes potenciales de variación

Por degradación de RNA viral debido a almacenamiento inadecuado de muestras o reactivos.

Variación en la emisión de fluorescencia, dando como resultado alteración en la cuantificación viral.

Perdida de estabilidad de los reactivos preparados por no emplearse dentro de los tiempos establecidos en la técnica.

Cuando se mezclan específicamente los controles positivos y negativos, así como el QS, de diferentes lotes.

Por pipeteo inadecuado ya sea de la mezcla maestra, controles o QS.

Por fallas en la corriente eléctrica, que afecten el correcto funcionamiento del equipo.

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

ES RESPONSABILIDAD:

Del personal adscrito al Laboratorio de Biología Molecular y Virología:

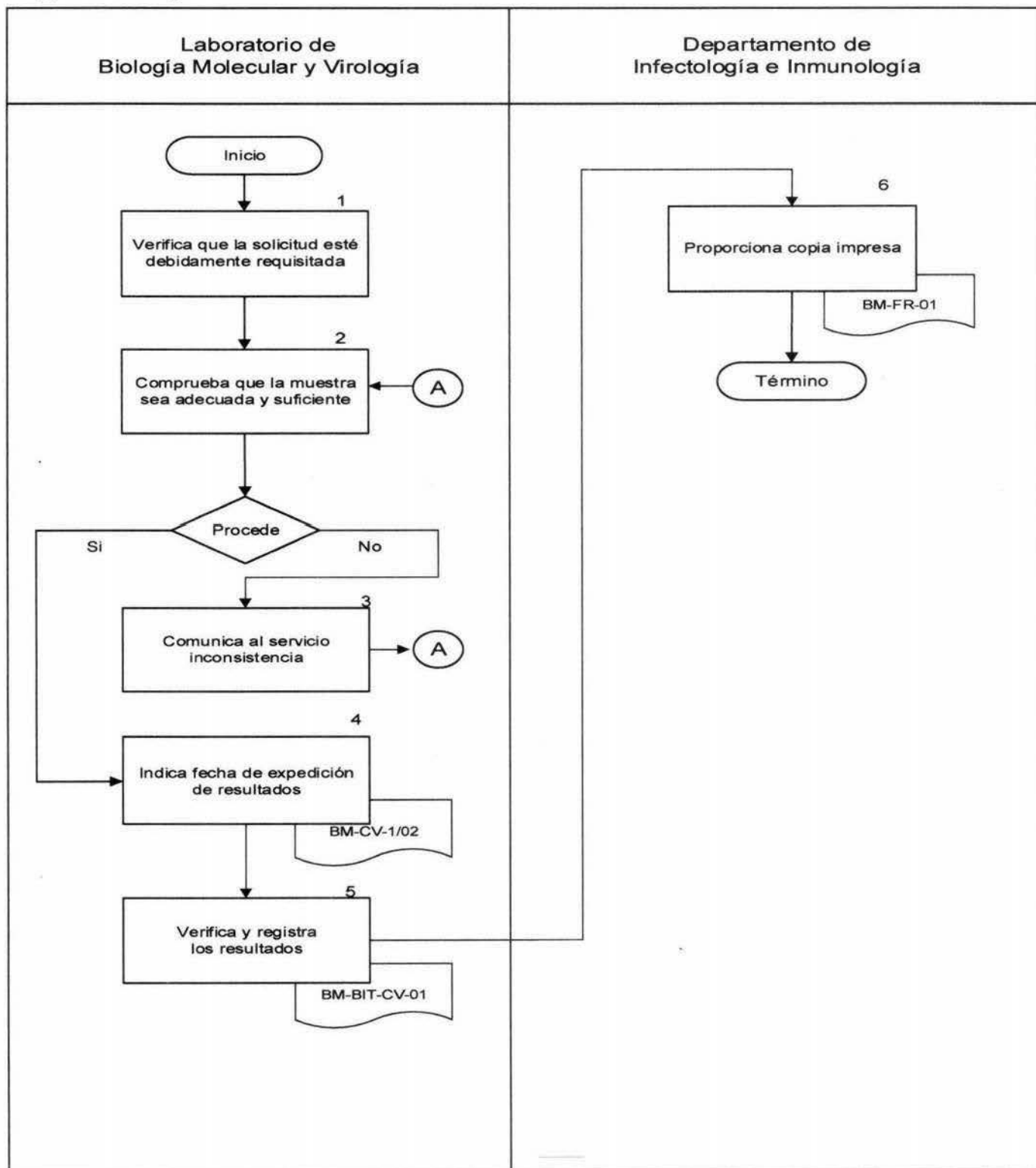
- Verificar que los tubos con muestra de sangre estén debidamente identificados.
- Verificar que los tubos con muestra de sangre tengan el volumen requerido (ver Anexo).
- Registrar en bitácora (BM-BIT-CV-01) los datos de las pacientes y el estudio solicitado.
- Separar y colocar el plasma sanguíneo en tubos nuevos y estériles tipo Eppendorf. Almacenar el plasma, de acuerdo al procedimiento; BM- CV-1/02.
- Realizar la determinación de carga viral de VIH, de acuerdo al manual técnico de procedimientos BM-MP-CV-1/02 y/o instructivos del proveedor.
- Realizar la verificación e impresión de resultados.
- Entregar en tiempo y forma los resultados.
- Solicitar los mantenimientos requeridos para el buen funcionamiento del equipo.

**1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
 INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)**

PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT. N°	DESCRIPCIÓN
Personal de Laboratorio de Biología Molecular y Virología	1	Verifica que la "Solicitud de Estudio de Carga Viral de VIH-1" esté debidamente requisitada
	2	Determina procedencia del estudio, comprueba que la muestra sea adecuada y suficiente (Anexo 1) antes de registrarla en la bitácora correspondiente (BM-BIT-CV-01)
		¿Cumple? o ¿Procede?
	3	No: Comunica al servicio de procedencia que la muestra no cumple con lo especificado en el anexo 1 y regresa a la Act. N° 2
	4	Si: Indica al usuario las fechas de expedición de resultados (BM-CV-1/02)
	5	Verifica y registra los resultados en bitácora de registro (BM-BIT-CV-01)
Personal de Infectología	6	Proporciona copia impresa del resultado al médico/a responsable en el formato correspondiente (BM-FR-01)
		Termina Procedimiento

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

Diagrama de flujo



1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

20. Referencias

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.
2. Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., Gallo, R.C. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
3. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., Markham, P.D. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-503.
4. Curran, J.W., Jaffe, H.W., Hardy, A.M., Morgan, W.M., Selik, R.M., Dondero, T.J. 1988. Epidemiology of HIV Infection and AIDS in the United States. *Science* 239:610-616.
5. Gaines, H., von Sydow, M.A., von Stedingk, L.V. 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* 4:995-999.
6. Tindall, B., and Cooper, D.A. 1991. Primary HIV-1 infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 5:1-14.
7. Daar, E.S., Moudgil, T, Meyer, R.D., Ho, D.D. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *New England Journal of Medicine* 324:961-964.
8. Clark, S.J., Saag, M.S., Decker, W.D. 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine* 324:954-960.
9. Albert J., Abrahamsson B., Nagy K., Aurelius E., Gaines H., Nystrom G., Fenyo E.M. 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 4:107-112.
10. Horsburgh, C.R. Jr., Ou, C.Y., Jason, J., Holmberg, S.D., Longini, I.M. Jr., Schable, C., Mayer, K.H., Lifson, A.R., Schochetman, G., Ward, J.W, et al. 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* 16:637-640.
11. Schnittman, S.M., Psallidopoulos, M.C., Lane, H.C., Thompson, L., Baseler, M., Massari, F., Fox, C.H., Salzman, N.P., Fauci, A.S. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* 245:305-308. Erratum in: *Science* 1989 245, preceding 694.

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

12. Schnittman, S.M., Greenhouse, J.J., Psallidopoulos, M.C., Baseler, M., Salzman, N.P., Fauci, A.S., Lane, H.C. 1990. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Annals of Internal Medicine* 113:438-443.
13. Pantaleo, G., Graziosi, C., Fauci, A.S. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *New England Journal of Medicine* 328:327-335.
14. Piatak, M. Jr., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Lifson, J.D. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259:1749-1754.
15. Fauci, A.S., Schnittman, S.M., Poli, G., Koenig, S., Pantaleo, G. 1991. NIH conference: immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Annals of Internal Medicine* 114:678-693.
16. Coffin, J.M. 1995. HIV-1 population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267:483-489.
17. Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-126.
18. Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H., et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373:117-122. 31.
19. O'Brien, W.A., Hartigan, P.M., Martin, D., Esinhart, J., Hill, A., Benoit, S., Rubin, M., Simberkoff, M.S., Hamilton, J.D. 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *New England Journal of Medicine* 334:426-431.
20. Welles, S.L., Jackson, J.B., Yen-Lieberman, B., Demeter, L., Japour, A.J., Smeaton, L.M., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., D'Aquila, R.T., Reichelderfer, P.A., Richman, D.D., Reichman, R., Fischl, M., Dolin, R., Coombs, R.W., Kahn, J.O., McLaren, C., Todd, J., Kwok, S., Crumpacker, C.S. 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) RNA levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. *Journal of Infectious Diseases* 174:696-703.
21. Coombs, R.W., Welles, S.L., Hooper, C., Reichelderfer, P.S., D'Aquila, R.T., Japour, A.J., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., Richman, D.D., Kwok, S., Todd, J., Jackson, J.B., DeGruttola, V., Crumpacker, C.S., Kahn, J. 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups. *Journal of Infectious Diseases* 174:704-712.

**1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)**

22. Hammer, S., Crumpacker, C., D'Aquila, R., Jackson, B., Lathey, J., Livnat, D., Reichelderfer, P. 1993. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *Journal of Clinical Microbiology* 31:2557-2564.
23. Schochetman, G., George, J.R., ed. AIDS testing: a comprehensive guide to technical, medical, social, legal and management issues. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1994.
24. Mulder, J., McKinney, N., Christopherson, C., Sninsky, J., Greenfield, L., Kwok, S. 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Application to acute retroviral infection. *Journal of Clinical Microbiology* 32:292-300.
25. Dewar, R.L., Highbarger, H.C., Sarmiento, M.D., Todd, J.A., Vasudevachari, M.B., Davey, R.T. Jr., Kovacs, J.A., Salzman, N.P., Lane, H.C., Urdea, M.S. 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *Journal of Infectious Diseases* 170:1172-1179.
26. van Gemen, B., Kievits, T., Schukkink, R., van Strijp, D., Malek, L.T., Sooknanan, R., Huisman, H.G., Lens, P. 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. *Journal of Virological Methods* 43:177-187.
27. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230:1350-1354.
28. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
29. Mullis, K.B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350.
30. Q. Meng, C. Wong, A. Rangachari, S. Tamatsukuri, M. Sasaki, E. Fiss, L. Cheng, T. Ramankutty, D. Clarke, H. Yawata, Y. Sakakura, T. Hirose, and C. Impraim. 2001. Automated Multiplex Assay System for Simultaneous Detection of Hepatitis B Virus DNA, Hepatitis C Virus RNA, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (8):2937-2945.
31. Smith, E.S., Li, A.K., Wang, A.M., Gelfand, D.H., Myers, T.M. 2003. Amplification of RNA: High Temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-Activated Thermostable DNA Polymerase. In *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Dieffenbach C.W. and Dveksler G.S., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 211-219.

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

32. Kwok, S., Sninsky, J.J. 1993. PCR detection of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA sequences. In: Diagnostic Molecular Biology: Principles and Applications. eds. Persing, D.H., Smith, T.F., Smith, F.C., et al. ASM, Washington, D.C.
33. Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125-128.
34. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 10:413-417.
35. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994.
36. Holmes, H., Davis, C., Heath, A., Hewlett, I. and Lelie, N. 2001. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques. *Journal of Virological Methods* 92:141-150.
37. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
38. CLSI. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue. Approved Guideline. CLSI Document M29-A Villanova, PA: CLSI 1997.
39. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.
40. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, and Korber B: HIV-1 Nomenclature proposal: A reference guide to HIV-1 classification. In: Human Retroviruses and AIDS 1999: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences (Kuiken C, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, Mellors JW, Mullins JI, Sodroski J, and Wolinsky S, eds.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1999, pp. 492-505.
41. CLSI. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline. CLSI Document EP5-A. Wayne, PA: CLSI 1999.

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

21. Anexos

Preparación de reactivos.

A) Tampón de eliminación del inhibidor (IRB)

Número de pruebas	Tampón de eliminación del Inhibidor (IRB)	Etanol
12 Pruebas	8.25 mL	5 mL
24 Pruebas	16.5 mL	10 mL
48 Pruebas	todo mL	20 mL

Mezclar por inversión

B) Tampón de lavado (WB)

Número de pruebas	Tampón lavado (WB)	Etanol
12 Pruebas	5 mL	20mL
24 Pruebas	10 mL	40 mL
48 Pruebas	20mL	80 mL

Mezclar por inversión

C) Tampón de elución (ELB)

Número de pruebas	Tampón de elución (ELB)
12 Pruebas	5 mL
24 Pruebas	10 mL

Mezclar por inversión

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

D) Isopropanol

Número de pruebas	Isopropanol
12 Pruebas	5 mL
24 Pruebas	10 mL

E) RNA liofilizado (CAR)

Agregar 0.5 ML de Tampon de elución (ELB) en el tubo de RNA portador (CAR)
Mezclar por inversión y en vortex Conservar a -20 °C Estable durante 28 días

F) Proteinasa K (PK)

Agregar 5 mL de Tampon de elución (ELB) en el frasco de proteinasa K (PK)
Mezclar por inversión y en vortex Conservar a -20 °C Estable durante 28 días

G) Preparar la solución de trabajo (Lysis Binding Working Solution) en tubo Falcón agregando los reactivos en el siguiente orden:

Reactivo	12 Pruebas	24 Pruebas
Tampon de lisis (LYS)	7 mL	14 mL
RNA portador	140 µl	280 µl
VIH-QS	84 µl	168 µl
Proteinasa K	1.4 mL	2.8 mL

Mezclar por inversión

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

A) Preparación de Máster Mix (MMX)

Reactivo	12 Pruebas	24 Pruebas
VIH Master Mix (MMX)	700 µl	Todo el vial
Solución de Manganeso	85 µl	170 µl

Mezclar por inversión.

No usar vortex.

Usar dentro de las 2 horas de preparada (proteger de la luz).

**1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)**

Instructivo para la recepción y aceptación de muestras para la cuantificación de carga viral de VIH.

BM-IRAM-01.

El personal de Laboratorio de Biología Molecular y Virología, será responsable de revisar el cumplimiento y la adecuada ejecución de los siguientes puntos:

- Se asegura que la solicitud del estudio corresponda a la prueba requerida y verifica que los datos del paciente estén completos.
- Constata que los datos del tubo con sangre que recibe, corresponden a los de la solicitud de estudio.
- Verifica que el tubo con la muestra sanguínea contenga como mínimo un volumen de 3 mL o hasta la capacidad máxima del tubo (5mL de muestra), y sea un tubo de tapón morado con anticoagulante K2 EDTA 5.4 mg, tanto para muestras de pacientes pediátricos, así como para pacientes adultos.
- Se asegura que la muestra no presente coágulos.
- Después de realizada la toma, el envío de las muestras al Laboratorio de Biología Molecular y Virología se deberá realizar a la brevedad, en un plazo no mayor a 1 h. Durante este tiempo, las muestras deberán mantenerse a temperatura ambiente hasta su entrega.
- Si la muestra fue centrifugada antes de la entrega al laboratorio, el plasma sanguíneo deberá trasvasarse a un tubo estéril y entregarse inmediatamente. Si la demora en la entrega es hasta una hora, el plasma deberá refrigerarse de 4-8 0C. Si la entrega se prolonga por más tiempo, es preferible congelar a -20 0C hasta su procesamiento. El volumen mínimo requerido para esta prueba es de 600 µL.
- Las muestras se rechazarán si están: hemolizadas, lipémicas o con un volumen menor a lo especificado. - - Las muestras se rechazarán si no haya datos del paciente o si los datos del tubo no son los mismos que la solicitud del examen.

Muestras concesionadas.

En este caso:

- Se aceptarán aquellas muestras de recién nacidos prematuros o en estado crítico, con un volumen mínimo de 1 mL de sangre total en el tubo correspondiente.
- Se aceptarán aquellas muestras provenientes de pacientes recién nacidos prematuros o en estado crítico, con un volumen mínimo de 300 µL de plasma.

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

Instructivo para la separación y manejo interno de las muestras para la cuantificación de carga viral de VIH.

BM-ISM-01.

- Una vez aceptada la muestra, la separación del plasma deberá realizarse de inmediato en una centrífuga clínica a 1000 x g durante 10 min a temperatura ambiente.
- Un volumen total de 600 µL de plasma será transferido a tubos tipo Eppendorf de polipropileno de 1.5 mL, los cuales se etiquetarán con un número de control interno.
- Los tubos se colocarán en una caja de poliestireno identificada como "muestras de trabajo CV-VIH" y se almacenarán a -20 °C hasta su procesamiento.
- El total de la muestra se resguardará a una temperatura de -20 °C en una caja de poliestireno identificada como "muestras de resguardo CV-VIH", la cual servirá para ser procesada en caso de alguna contingencia no prevista.
- El tubo original con el resto de la sangre se desechará de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA-1-2002.
- Previo a la determinación de carga viral de VIH, las muestras se descongelarán a temperatura ambiente.
- Para la cuantificación de la carga viral de VIH, se seguirá de acuerdo al Manual Técnico de Procedimientos del Laboratorio de Biología Molecular BM-MT-CV-01 y/o a las especificaciones del proveedor.

**1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)****Glosario**

Nucleótido: Son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.

DNA (ácido desoxirribonucleico; por sus siglas en inglés): Es una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.

RNA (Ácido ribonucleico; por sus siglas en inglés): Es una molécula que se encuentra en las células y microorganismos, siendo la encargada de dirigir las etapas intermedias de la síntesis de proteínas, regula la expresión genética y algunas veces presenta actividad catalítica.

Biología Molecular: Es la disciplina de la Biología que tiene como objetivo el estudio de los procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista molecular, estudiando la estructura, función y composición de las moléculas biológicamente importantes.

Carga Viral: Es la cuantificación de la infección por virus que se calcula por estimación de la cantidad de partículas virales en los fluidos corporales y se expresa en copias del material genético por unidad de volumen de sangre. Se emplea para control terapéutico de virosis crónicas y control de pacientes inmunosuprimidos.

Diagnóstico molecular: Es una herramienta que engloba un conjunto de técnicas moleculares empleadas para la identificación de agentes etiológicos en enfermedades infecciosas o de transmisión sexual, además de que permite la identificación de defectos moleculares subyacentes en enfermedades de carácter hereditario.

Electroforesis: Es una técnica que permite separa moléculas (como los ácidos nucleicos) según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

Hibridación: Es el proceso por el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencia de bases complementarias en una única molécula de doble cadena, que toma la estructura de doble hélice, donde las bases nitrogenadas quedan ocultas en el interior. Existen dos tipos de hibridación, DNA-DNA y DNA-RNA.

Infecciones de Transmisión sexual: Son un conjunto de afecciones clínicas infectocontagiosas que se transmiten de persona a persona por medio de contacto sexual, algunas de ellas pueden transmitirse durante el embarazo, es decir, de la madre al hijo.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Es una técnica de Biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

**1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)**

PCR en tiempo real: Es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (DNA).

Plasma: Es la fracción líquida y acelular de la sangre, es decir, se obtiene al dejar a la sangre desprovista de células como los glóbulos rojos y los glóbulos blancos. Está compuesto por un 90% de agua, un 7% de proteínas, y el 3% restante por glucosa, vitaminas, hormonas, oxígeno, gas carbónico y nitrógeno, además de productos de desecho del metabolismo como el ácido úrico.

Polimerasa: Es una enzima capaz de transcribir o replicar los ácidos nucleicos. Resulta indispensable en la división celular (DNA Polimerasa) y en la transcripción de DNA (RNA Polimerasa).

Replicación: Es el mecanismo que permite al DNA duplicarse (es decir, sintetizar una copia idéntica). De esta manera de una molécula de DNA única, se obtienen dos o más "clones" de la primera.

Sonda: Es un fragmento de DNA (o raramente RNA) de pequeño tamaño, empleado en Biología Molecular como herramienta para detectar la presencia de DNA o RNA de secuencia complementaria parecida o igual, en experimentos de hibridación molecular o PCR para la detección de secuencias específicas.

Suero: Es el componente de la sangre resultante tras permitir la coagulación de ésta y eliminar el coágulo resultante. Es equivalente al plasma, pero sin las proteínas involucradas en la coagulación (fibrinógeno en su mayor parte). El suero es útil en la identificación de algunos analitos en los que no se requiere de la intervención de un anticoagulante, ya que este podría interferir en el resultado alterándolo.

Transmisión vertical: Es el tipo de infección que ocurre durante la gestación, el parto o la lactancia, en donde la madre transmite a su producto algún microorganismo con el cual se encuentra infectada.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Convencionalmente a nivel internacional se abrevia HIV (por sus siglas en inglés).

Virus: Es un agente infeccioso submicroscópico que carece de un metabolismo independiente y sólo puede multiplicarse dentro de las células de otros organismos, por lo que se les cataloga como parásitos intracelulares estrictos.

Otros

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

DOCUMENTOS INTERNOS

MANUALES.

1. Manual técnico de procedimientos (BM-MT-01).
2. Carpeta espejo de mantenimiento preventivo y correctivo de equipos (BM-CEM-01).
3. Manual para manejo de residuos (BM-MR-01).

INSTRUCTIVOS.

1. Criterios para la aceptación y manejo de muestras sanguíneas para la cuantificación de carga viral de VIH (BM-IAM-01).
2. Manejo, almacenamiento y desecho de muestras para carga viral de VIH (BIOL-MOL-P-02).

REGISTROS.

1. Bitácora de registro de muestras (BM-BRM-01).
2. Bitácora de uso de centrífuga clínica (BM-BCC-02).
3. Bitácora de uso de centrífuga de placas (BM-BCP-03).
4. Bitácora de uso de Termociclador TaqMan 48 (BM-BTER-04).
5. Bitácora de uso de campana de bioseguridad (BM-BCB-05).
6. Bitácora de entradas y salidas de reactivos de laboratorio (BM-BREAC-06).

FORMATOS.

1. Formato de solicitud de estudios del laboratorio de Biología Molecular.

Clave del estudio: 3604. "Carga viral cuantitativa del virus de la inmunodeficiencia huma (VIH).

Clave: del formato: 3120-11

2. Formato de emisión de resultados (BM-FRESUL-01).

DOCUMENTOS EXTERNOS

1. Instructivo para la cuantificación de la carga viral de VIH de acuerdo a las especificaciones del proveedor. COBAS TaqMan HIV-1 Test, ROCHE.

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

RECONOCIMIENTO DE SUPLENCIAS

CRITERIO DE TEMPORALIDAD PARA EL PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

- El procesamiento de las muestras para la cuantificación de carga viral de VIH dependerá del número de muestras enviadas al laboratorio. Cabe mencionar que es requisito obligado contar con un mínimo de 9 muestras de plasma sanguíneo y/o un máximo de 21 muestras para realizar la prueba. De tal manera que el tiempo estimado desde la recepción, procesamiento y entrega de resultados, dependerá de cuando se colecten el número de muestras necesarias para realizar la corrida.
- En caso de muestras URGENTES, se tomará una decisión consultándolo con el jefe de Departamento y/o con el responsable del laboratorio.

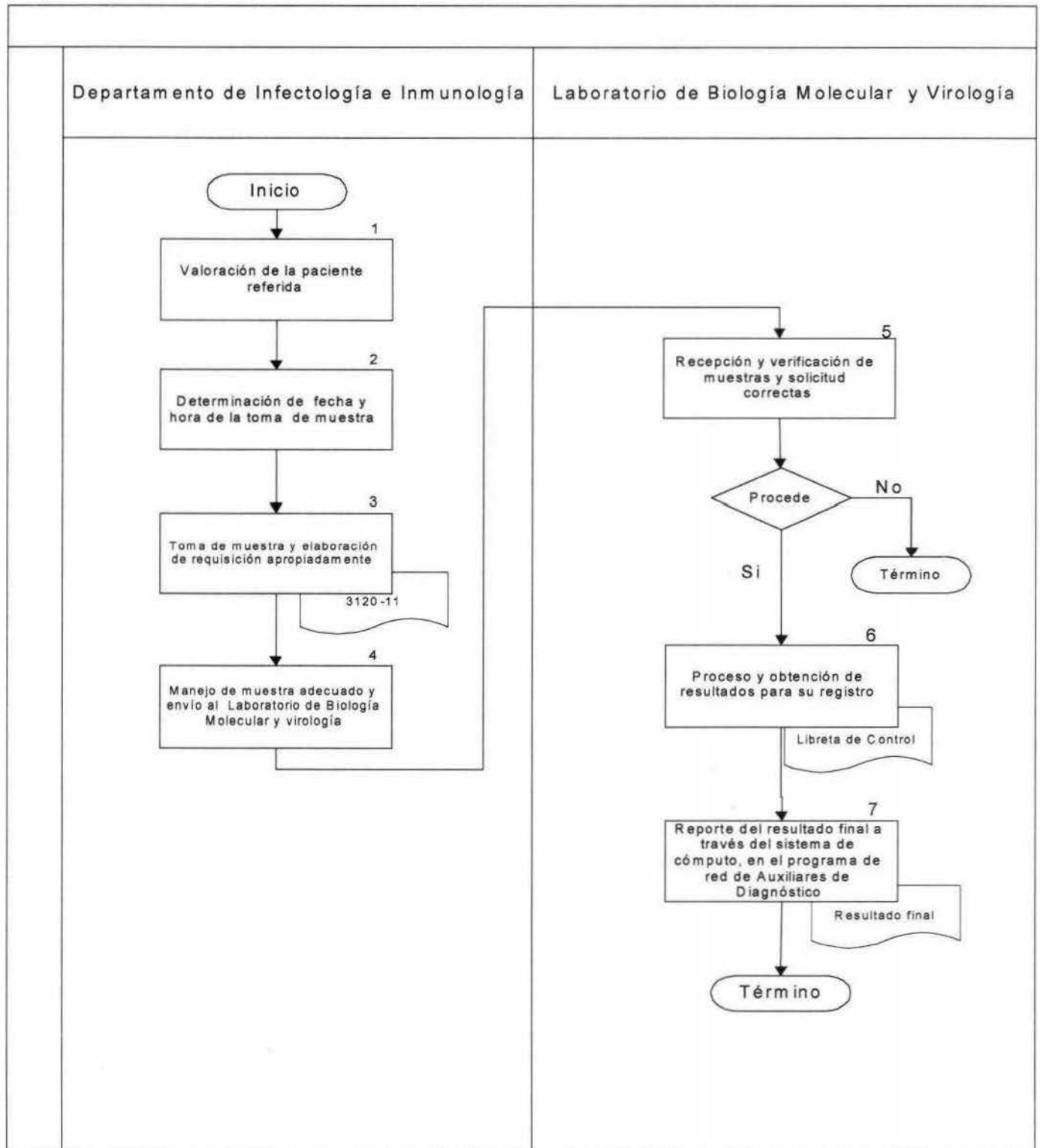
EMISIÓN DE RESULTADOS.

- Una vez terminada la prueba, el software del equipo emite los resultados. Estos resultados se verifican y se validan tomando en cuenta los valores de referencia de los controles internos y del coeficiente de variabilidad.
- Una vez validados los resultados, se aceptan o se rechazan.
- Se hace un respaldo impreso de los resultados obtenidos.
- Los resultados se transcriben en la bitácora de registro de muestras (BM-BRM-01).
- Los resultados se emiten de manera impresa al médico infectólogo encargado, de acuerdo al formato BM-FRESUL-01 en un plazo no mayor a 24 h, posterior a la validación de los mismos.

Retrovir	Norvir
Epivir	Kaletra
Hivid	Agenerase
Zerit	Sustiva
Ziagen	Cytovene
Viread	Zovirax
Valtrex	Ronoferon-A
Intron A	Fuzeon

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

Diagrama de flujo



1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

UNIDAD QUE INTERVIENE	ACT. N°	DESCRIPCIÓN
Personal del Laboratorio de Biología Molecular y Virología	10.1	Separa el plasma sanguíneo, centrifugando a 956 x g durante 10 min. Coloca 600 µL de la muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 µL y la almacena a -13 °C hasta su procesamiento (BIOL-MOL-P-01).
	10.2	Para llevar a cabo la cuantificación de carga viral de VIH, el plasma sanguíneo se descongela a temperatura ambiente y se comienza el procedimiento de acuerdo a la siguiente metodología:
	10.3	Todos los reactivos (de extracción, amplificación y detección) deberán estar a temperatura ambiente antes de su uso.
	10.4	Preparar los siguientes reactivos al momento: B) Tampón de eliminación del inhibidor (IRB) C) Tampón de lavado (WB) D) Tampón de elución (ELB) E) Isopropanol F) RNA portador (CAR) G) Proteinasa K (PK) H) Lysis Binding Working Solution Nota: La preparación se especifica en el anexo. EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO 4.1 Las muestras y controles se mezclan en vortex durante 20 seg. 4.2 Empleando el kit High Pure System Viral Nucleic Acid Kit, ROCHE, se procede a realizar la extracción del RNA viral. 4.3 Se marca cada uno de los pozos de la placa blanca para lisis celular (Lysis Rack White), de acuerdo al número de identificación de cada muestra que se procesará, así como de los controles. 4.4 Se agregan 625 µL de la solución de lisis (Lysis Binding Working Solution) en cada pozo de la placa blanca para lisis celular, enseguida se adicionan 500 µL de cada muestra y de los controles. La placa se mezcla en vortex por 10 seg.

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

4.5 Incubar la placa blanca para lisis celular en baño María a 50 °C/10 min. La altura del agua no debe rebasar los pozos.

4.6 Terminado el tiempo de incubación, sacar y secar la placa blanca para lisis celular y centrifugar a 4600 x g/20 seg.

4.7 Agregar 350 µL de isopropanol a cada pozo. Mezclar la placa blanca por inversión, por 10 seg, y posteriormente en vortex por 10 seg.

4.8 Centrifugar a 4600 x g/20 seg.

4.9 Preparar la placa amarilla con filtro (Filter Tube Rack) adaptada a un contenedor de desechos (Waste Rack). Se marca cada uno de los pozos, de acuerdo al número de identificación de cada muestra que se procesará, así como de los controles (seguir el mismo orden que en la placa anterior).

4.10 De la placa blanca de lisis celular transferir 750 µL de cada pozo a la placa amarilla en las posiciones correspondientes.

4.11 Centrifugar a 4600 x g/2 min.

4.12 Transferir el remanente de la placa blanca de lisis celular a la placa amarilla en las posiciones correspondientes. Descartar la placa blanca de lisis celular.

4.13 Centrifugar a 4600 x g/2 min. Terminada la centrifugación, remplazar el contenedor de desechos (Waste Rack) por uno nuevo.

4.14 Agregar a cada pozo de la placa amarilla 400 µL del IRB sin tocar pared del pozo y evitando salpicaduras.

4.15 Centrifugar a 4600 x g/2 min.

4.16 Agregar 700 µL de la solución de lavado (Wash Buffer) sin tocar pared del pozo y evitando salpicaduras.

4.17 Centrifugar a 4600 x g/2 min. Reemplazar nuevamente el contenedor de desechos (Waste Rack) por uno nuevo

4.18 Agregar nuevamente 700 µL de la solución de lavado (Wash Buffer) sin tocar pared del pozo y evitando salpicaduras.

4.19 Centrifugar a 4600 x g/ 3 min. Descartar el contenedor de desechos y Colocar la placa azul (Elution Rack).



1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

4.20 Agregar a cada pozo 75 µL de Buffer de elución (ELB) precalentado a 70°C, dispensar la solución en el centro del filtro sin tocar la membrana de la columna con la punta

4.21 Incubar a temperatura ambiente/3 min

4.22 Centrifugar a 4600 x g/ 3 min. Descartar la placa amarilla y colocar la cubierta azul (Cover Rack), respetando las marcas de orientación e identificación de muestras y controles.

4.23 El eluido resultante (material genético purificado), se empleará para la PCR.

4.24 La estabilidad del eluido en la placa azul (Elution Rack).es de 2 horas a una temperatura de 4°C

Termina Procedimiento

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

5

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA MAESTRA ó MASTER MIX (MMX)

5.1 Para la amplificación del material genético viral y cuantificación de la carga, se empleará el kit COBAS TaqMan HIV-1 Test ROCHE.

5.2 Sacar los reactivos del refrigerador y estabilizarlos a temperatura ambiente/15 min. Proteger de la luz.

5.3 Preparar la Mezcla de reacción (Master Mix) de acuerdo al número de muestras a procesar y conforme al procedimiento descrito en el anexo.

5.4 Colocar en la gradilla de amplificación (K-carrier), el número de tubos de reacción (K-tubes) que se utilizarán. Verificar que la gradilla (K-tubes) esté ocupado con las posiciones obligatorias: 1-2-5-20-23-24, que marca el proveedor.

5.5 Destapar todos los tubos de reacción (K-tubes), empleando una llave especial.

5.6 Agregar 50 µL de la MMX.

5.7 Tapar cada uno de los tubos de reacción (K-tubes) empleando una llave especial.

5.8 Enseguida, de manera individual se abre cada tubo de reacción y se agregan 50 µL del eluido y se cierra inmediatamente. Así sucesivamente para cada uno de los tubos.

5.9 Iniciar la amplificación por PCR en tiempo real en el equipo automatizado COBAS TaqMan48, ROCHE.

5.10 La mezcla de reacción es estable de 4-8 °C hasta por 1 hora

Termina Procedimiento.



1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

6

**PROGRAMACIÓN DEL EQUIPO AUTOMATIZADO
COBAS TAQMAN 48, ROCHE.**

6.1 Encender la PC y el equipo

6.2 Introducir la contraseña para acceder al menú principal de la computadora.

6.3 Seleccionar el programa Amplilink.

6.4 Introducir la contraseña para acceder al menú principal del programa.

6.5 Capturar por cada nuevo lote de reactivos, los valores correspondientes a los controles, a partir de la tarjeta que se incluye en cada kit.

6.6 Crear la lista de trabajo correspondiente de acuerdo a las muestras y controles procesados.

6.7 Verificar que en la lista estén ocupadas las posiciones obligatorias: 1-2-5-20-23-24.

6.8 Salvar la lista de trabajo.

6.9 Abrir el Termociclador.

6.10 Verificar que la orientación de la gradilla de amplificación (K-carrier), coincida con la posición del Termociclador en el equipo y colocarla dentro del Termociclador.

6.11 Cerrar el Termociclador

6.12 Presionar el botón de comienzo (Start)

Termina Procedimiento

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

7

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

7.1 Verificar en pantalla, finalización de proceso.

7.2 Abrir el Termociclador, desde el software.

7.3 Sacar el K-Carrier del Termociclador.

7.4 Cerrar el Termociclador, desde el software.

7.5 Observa y analiza resultados de controles (control positivo bajo, control positivo alto y control negativo):

- Si los controles son válidos, (de acuerdo al rango establecido en las tarjetas de control) proceder a validar resultados.
- Si los controles están fuera de rango, el software manda aviso de error e invalida toda la corrida, por lo que será necesario repetir la prueba.

7.6 Validar resultados y guardar la información en el equipo.

7.7 Salir del sistema.

7.8 Apagar el equipo y PC

Termina Procedimiento

1. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
µL	micro litros
Biol-Mol	Biología Molecular
Biol-Mol-F	Biología Molecular Formato
BM-MT	Biología Molecular Manual Técnico de laboratorio
Biol-Mol-P	Biología Molecular Protocolo
Biol-Mol-R	Biología Molecular Bitácora de Registro
CAR	del inglés, Carrier RNA, ARN liofilizado
CN	Control Negativo
CPH	Control Positivo Alto
CPL	Control Positivo Bajo
ELB	del inglés Elution Buffer, Tampón de elución
g	gravedad
h	horas
IRB	del inglés Internal Removal Buffer; Tampón de eliminación del inhibidor
Log	logaritmo
min	Minutos
mL	mililitros
MMX	del inglés Master Mix, Mezcla Maestra
OMS	Organización Mundial de la Salud
PC	del inglés Personal Computer, Computadora
PCR	del inglés Polymerase Chain Reaction, Reacción en cadena de la polimerasa
PK	del inglés Proteinase K, Proteínasa K
QS	del inglés Quantific Standard, Estándar de cuantificación
RNA	Acido Ribonucleico, del inglés (Ribonucleic Acid)
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundos
UI	Unidades Internacionales
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WB	del inglés Wash Buffer, Tampón de lavado

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA *CLART HPV4* DE GENÓMICA

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO
LA METODOLOGÍA *CLART HPV4* DE GENÓMICA



2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA *CLART HPV4* DE GENÓMICA

OBJETIVO ESPECÍFICO

**2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA****1.- Propósito del examen**

Identificar la presencia de genotipos del virus del papiloma humano (VPH) de alto y bajo grado en muestras cervicovaginales de mujeres con diagnóstico o sospecha de infección por VPH provenientes de los diferentes servicios de atención médica del Instituto, así como de mujeres seropositivas a VIH como apoyo a su seguimiento en la Clínica de Atención de Mujeres Embarazadas con VIH/SIDA y Recién Nacidos.

2.- Principio

La detección de genotipos de VPH mediante la prueba CLART HPV4 está basada en la amplificación por PCR de punto final de un fragmento de la región L1 del virus, la secuencia es altamente conservada entre los distintos tipos de VPH y al mismo tiempo presenta variaciones suficientes que permiten la diferenciación de cada tipo de VPH con sondas específicas.

Los productos amplificados por PCR, y marcados con biotina, hibridan con sus sondas complementarias específicas, inmovilizadas en áreas bien definidas en microarreglos. Después de dos incubaciones; primero, con un conjugado de estreptavidina peroxidasa, y segundo, con un sustrato de o-dianisidina, aparece un precipitado en aquellas regiones del microarreglo donde ha tenido lugar la hibridación específica entre los productos de amplificación y sus sondas específicas.

El análisis e interpretación automática de resultados se lleva a cabo con el lector CAR® (CLINICAL ARRAY READER), en el cual se emplean softwares diseñados y validados por el fabricante.

3.- Características del desempeño

La prueba está indicada para usarse conjuntamente con la presentación clínica y otros marcadores analíticos de presencia o progreso de la enfermedad o para el tratamiento clínico de las pacientes infectadas por VPH. Puede utilizarse para evaluar la prognosis del paciente, mediante la diferenciación de genotipos de alto riesgo oncogénico, los cuales están asociados al desarrollo de cáncer cérvico uterino (CaCu) y genotipos de bajo riesgo oncogénico. Con la finalidad de dar seguimiento a la efectividad del tratamiento médico o implementar medidas preventivas de infección, reinfección o desarrollo de CaCu.

La sensibilidad analítica se basa en la amplificación específica de la región L1 (región de la proteína principal de la cápside viral) de los diferentes genotipos de VPH incluidos en la prueba de genotipificación.

3.1 Límites de detección

No hay un límite de detección en esta prueba. La metodología empleada (CLART HPV4), detecta la presencia hasta de 35 tipos de VPH asociados a infecciones genitales, en los que se incluyen; 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68a y b, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89.

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

Los resultados en las muestras analizadas pueden presentar un genotipo viral (infección única) o varios genotipos virales (coinfección con más de dos genotipos virales). El reporte se hace colocando el genotipo identificado, seguido de su clasificación; alto grado oncogénico y/o bajo grado oncogénico.

4.- Tipo de muestra

La prueba CLART HPV4, en conjunto con el lector CAR y softwares, está validada para muestras cervicovaginales, muestras parafinadas y muestras de citología en base líquida.

5.- Preparación de la/el paciente

Las muestras cérvico-vaginales se tomarán en los servicios de Microbiología y Colposcopia, de acuerdo a sus procedimientos de toma de muestra.

6.- Tipo de contenedor y aditivos

Las muestras se depositarán en tubos cónicos de 15 mL con tapón de rosca, los cuales contienen 2 mL de medio de transporte y solución conservante tamponada con base de metanol.

7.- Equipo y reactivos requeridos

7.1 Equipo

- Lector CAR® (CLINICAL ARRAY READER), GENOMICA
- Centrifuga
- Vórtex
- Termobloque
- Bomba vacío
- Cabina de Seguridad Biológica
- Software de procesamiento de imagen SAICLART® propiedad de GENOMICA
- Termociclador para PCR en punto final

7.2 Reactivos

- KIT PARA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (AT-1104-48-MT).
Contiene: solución de lisis, columnas de purificación con silica gel, tubos receptores para desechos, alcohol al 96%, solución para la elución del DNA.
- CLART HPV4, KIT PARA LA AMPLIFICACIÓN DE VPH (AT-0115-45).
Contiene: tubos para PCR con mezcla maestra (agua, buffer 10 X, dNTPs 200 µM, MgCl 1.5 mM, iniciadores universales) en congelación (a -20 °C).
- CLAR HPV4 GENOTIPADO (CS-0215-48).
Contiene: placas de poliestireno de fondo plano, en tiras de ocho pozos que contienen en el fondo microarreglos agrupados con los diferentes genotipos de VPH, solución de hibridación, de lavado y de detección

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

8.- Controles ambientales y de seguridad

- No pipetear las soluciones con la boca
- No comer, beber o fumar en las áreas de trabajo
- Utilizar guantes desechables de nitrilo o latex libres de talco, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule las muestras o reactivos de la prueba
- Las muestras cérvico-vaginales deben permanecer de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente antes de su uso
- Uso de pipeta serológica estéril y desechable
- Puntas para micro pipetas, estériles, desechables y libres de RNasa y DNasa.
- Todos los reactivos de amplificación y detección deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarlos, para ello es necesario sacarlos de su almacenamiento al menos 15 minutos antes de utilizarlos
- No juntar reactivos de diferentes lotes o de diferentes botellas del mismo lote
- No mezcle reactivos de diferentes kits
- No utilice los kits después de su fecha de caducidad
- Manipule muestras y controles con las medidas de seguridad requeridas, ya son materiales potencialmente infecciosos
- Una vez terminada la prueba, almacene los reactivos de la prueba de genotipificación, de acuerdo a las del proveedor
- Una vez abiertos los reactivos deben utilizarse durante los siguientes 30 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra primero
- La mezcla maestra de trabajo, una vez preparada, debe almacenarse a temperatura de 2-8 °C y usarse dentro de las 2 horas posteriores a su preparación
- La amplificación debe realizarse durante la hora siguiente a la adición de las muestras y los controles procesados a la mezcla de trabajo
- Mientras se encuentre el equipo trabajando, es necesario mantener la temperatura del cuarto a 16 °C

9.- Procedimientos de calibración (trazabilidad metodológica)

El equipo es calibrado una vez al año por el Departamento de Ingeniería de la casa comercial. Durante este procedimiento, se verifica la sincronización óptima del software con las aperturas de las compuertas en donde se inserta la placa con los microarreglos. Enseguida, se verifica que los controles internos de extracción y amplificación estén presentes y alineados en microarreglos que permitirán discriminar la presencia de los diferentes genotipos entre los de alto grado y bajo grado. Finalmente, se lleva a cabo una lectura de la placa para el reconocimiento de cada uno de los pozos, con el software del equipo.

**2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA****10.- Pasos del procedimiento**

En cada nuevo lote, hay una ligera variación en los valores de los coeficientes de calibración y los intervalos de los controles internos, por lo que es indispensable, no mezclar reactivos de distintos lotes.

El equipo se calibra cada año y está listo para su uso, las placas con los microarreglos contienen controles internos que permiten corroborar la identificación óptima de los genotipos encontrados y discriminar de las muestras negativas.

11. Procedimientos de control de calidad

- Es importante realizar una buena toma de muestra, para ello se debe realizar un exudado enérgico o un raspado en la zona cervical que asegure una suficiente cantidad de células, esto garantizará buena cantidad de DNA con una extracción y purificación de calidad
- Se debe evitar la degradación del DNA por inadecuada extracción y purificación de ácidos nucleicos, por presencia de residuos orgánicos en el purificado, por inapropiado resguardo de las muestras o por la presencia de inhibidores de la DNA polimerasa (hemoglobina, restos de parafina, sales, restos orgánicos, etc.)
- Verificar que los reactivos de extracción, amplificación y detección, no estén caducos y evitar mezclar reactivos de diferentes lotes
- Empleo de un control interno de DNA genómico, necesario para la confirmación de un verdadero resultado negativo, ya que nos informa de la presencia de DNA del paciente en la muestra, aunque no haya amplificación de ningún tipo de VPH
- Un control interno de amplificación, el cual nos permitirá distinguir entre los casos de inhibición de la reacción de PCR y aquéllos en los que no se encontró DNA en la muestra
- Mantenimiento preventivo calendarizado y correctivo cuando se requiera

12.-Interferencias

Existen sustancias que pueden interferir con los resultados de la genotipificación de VPH y en particular con la reacción de amplificación. Las interferencias más comunes a considerar para esta prueba son:

- Presencia de hemoglobina y exceso de restos celulares
- Presencia de ácido acético o yodina
- Utilización de muestras no adecuadas o no validadas en este sistema.
- La conservación inadecuada de las muestras
- Restos de sustancias orgánicas (fenol, cloroformo, etc.)

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

13. Principios de detección de genotipos

La detección está basada en una amplificación por PCR de un fragmento de la región L1 del virus, mediante una PCR de punto final, seguida de la visualización en microarray de baja densidad.

La secuencia elegida es altamente conservada entre los distintos tipos de VPH, y al mismo tiempo presenta variaciones suficientes como para poder diferenciar al genotipo específico de VPH con sondas específicas.

Cada pocillo de la placa contiene los siguientes oligonucleótidos:

- Un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen CFTR humano. Éste es el control de extracción de DNA genómico o control del DNA del paciente.
- Un par de oligonucleótidos que amplifican un plásmido modificado incluido en el tubo de amplificación / pocillo y que se usa como control de amplificación de la reacción de PCR.
- Oligonucleótidos específicos para VPH.

14. Intervalos de referencia o valores de decisión clínica

La prueba no maneja valores de referencia, sin embargo, la prueba identifica hasta 35 genotipos diferentes, clasificados como de riesgo oncogénico y de bajo riesgo oncogénico. Esto tiene un valor clínico importante, ya que el médico especialista valorará el resultado obtenido con la presencia o ausencia de lesiones premalignas o malignas en cérvix y tomará una decisión de tratamiento o seguimiento a corto o largo plazo para discriminar desarrollo de CaCu.

15. Reporte de resultados del examen

Resultado de la genotipificación	Controles	Interpretación
Positivo	Conforme	Reportar el genotipo o genotipos identificados, de acuerdo a su clasificación
Negativo	Conforme	Negativo

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

16. Instrucciones para determinar un resultado no concluyente (Aplica para todos los genotipos)

INTERPRETACIÓN	CAUSA	SOLUCIÓN
NO HAY DNA	Se debe a que no hay DNA en la muestra	Repetir la PCR y/o repetir la extracción. Si el resultado de la amplificación es el mismo a la corrida anterior, se deberá solicitar una nueva toma de muestra
PCR INHIBIDA	Presencia de sustancias que inhiben la reacción de amplificación, principalmente sobre la actividad de la DNA polimerasa	Repetir la extracción o solicitar una nueva toma de muestra

17. Valores de alerta o crítico

- Cuando en las muestras analizadas existe un elevado número copias de uno o varios genotipos de VPH puede suceder que no se amplifiquen los dos controles o alguno de ellos y aparezca una lectura de "SIN SEÑAL", lo cual nos lleva a solicitar una segunda muestra para emitir un resultado definitivo
- Cuando se identifican genotipos de alto riesgo oncogénico en infecciones con un solo genotipo o en infección múltiple. Estos genotipos están asociados al desarrollo de cáncer (el médico responsable, dará seguimiento a la paciente para descartar resolución o persistencia de la infección)

18. Interpretación clínica del laboratorio

La prueba de genotipificación de VPH, incluye 35 genotipos virales, los cuales se clasifican en genotipos con riesgo oncogénico y genotipos de bajo riesgo oncogénico, la presencia de estos, en las muestras analizadas tiene un valor clínico importante. El médico especialista valorará el resultado obtenido en la genotipificación con la presencia o ausencia de lesiones premalignas o malignas en cérvix y tomará una decisión de tratamiento o seguimiento a corto o largo plazo para prevenir el desarrollo de CaCu.

19. Fuentes potenciales de variación

- Degradación de DNA viral debido a manejo o almacenamiento inadecuado de muestras o reactivos
- Por pipeteo inadecuado ya sea de la mezcla maestra, muestra o soluciones
- Por fallas en la corriente eléctrica, que afecten el correcto funcionamiento del equipo
- Presencia de sustancias inhibitoras
- Presencia de un número elevado de copias de DNA de cualquier genotipo de VPH

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA *CLART HPV4* DE GENÓMICA

ES RESPONSABILIDAD:

Del personal adscrito al Laboratorio de Biología Molecular y Virología:

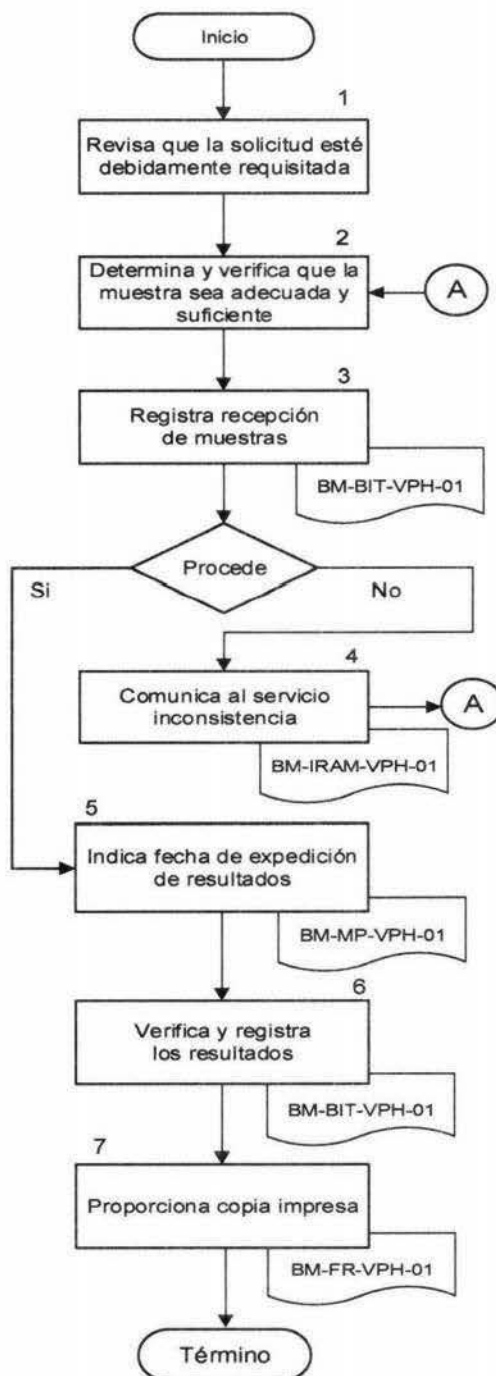
- Verificar que los tubos con muestra de exudado cérvico-vaginal estén debidamente identificados
- Verificar que los tubos con muestra de exudado cérvico-vaginal tengan la cantidad mínima requerida (BM-IRAM-VPH-01)
- Registrar en bitácora (BM-BIT-VPH-01) de genotipificación del virus del papiloma humano (VPH) los datos de las pacientes y el estudio solicitado
- Separar y colocar las muestras de exudado cervico-vaginal en tubos nuevos y estériles tipo eppendorf. Almacenar las muestras, de acuerdo al instructivo para la recepción y aceptación de muestras para la genotipificación de VPH (BM-ISM-VPH-01)
- Realizar la genotipificación de VPH, de acuerdo al manual técnico de procedimientos BM-MP-VPH-01 y/o instructivos del proveedor
- Realizar la verificación e impresión de resultados
- Entregar en tiempo y forma los resultados
- Solicitar los mantenimientos requeridos para el buen funcionamiento del equipo

**2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
 EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA**

PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT. N°	DESCRIPCIÓN
Personal de Laboratorio de Biología Molecular y Virología	1	Revisa que la "Solicitud de Estudio Genotipificación del Virus del Papiloma Humano", esté debidamente requisitada
	2	Determina procedencia del estudio, verifica que la muestra sea adecuada y suficiente (BM-IRAM-VPH-01), ver anexo
	3	Registra en la bitácora de recepción de muestras (BM-BIT-VPH-01)
		¿Cumple? o ¿Procede?
	4	No: Comunica al servicio de procedencia, en caso de que la muestra no cumpla con lo especificado (BM-IRAM-VPH-01) y regresa a la Act. N° 2
	5	Si: Indica al usuario las fechas de expedición de resultados (BM-MP-VPH-01).
	6	Verifica y registra los resultados en bitácora de registro (BM-BIT-VPH-01)
	7	Proporciona copia impresa del resultado al médico responsable en el formato correspondiente (BM-FR-VPH-01)
		Termina Procedimiento

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

Personal de Laboratorio de
Biología Molecular y Virología



**2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA****20. Referencias**

1. Bosch, F.X., Lorincz, A., Muñoz, N., Majer, C.J.L.M. and Shah K.V.: "The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer". J. Clin. Pathol. 55, 244-265 (2002).
2. Calleja-Macías, I.E., Villa, L.L., Prado, J.C. et al. "Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, 58, for close relatives of human papilloma virus type 16". Journal of Virology. 79, 13630-13640 (2005).
3. Chranioti A., Spathis A., Aga E., Merustoudis C. Pappas A., Panayiotides I. and Karakitsos P. "Comparison of two commercially available methods for HPV Genotyping: CLART HPV2 and Linear Arrays HPV Genotyping Test". Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology. Volumen 34, number 5, October 2012.
4. De Villiers, E.M.: "Heterogeneity of the human papillomavirus group". J. Virol. 63, 4898-4903 (1989).
5. Dunne, E.F., Unger E.R., Sternberg m., McQuillan G., Swan D.C., Patel S.S., Markowitz L.E.: "Prevalence of VPH infection among females in the United States". JAMA, February 28, 2007- Vol 297, nº 8.
6. Flavio, L.: "VPH genotyping: are different hybridization methods comparable in detecting high risk infections?" 23rd International papillomavirus conference and clinical workshop. September 2006. Praga.
7. Garbugliaa A. R., Piselli P., Lapaa D., Sias C., Del Nonnoc F., Baiocchic A., Cimagliab C., Agrestab A. and Capobianchia M. R. "Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy". Journal of Clinical Virology. JCV-2429 (2012).
8. Goldman B., Rebolj M., Rygaard C., Preisler S., Ejegod DM, Lyngaa E., and Jesper Bonde. "Patterns of cervical coinfection with multiple human papilloma virus types in a screening population in Denmark". Vaccine 2013 Mar 15;31 (12): 1604-9.
9. Kjær S.K., Frederiksen K., Munk C., Iftner T. Long-term Absolute Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 or Worse Following Human Papillomavirus Infection: Role of Persistence. J Natl Cancer Inst. 2010 Sep 14.
10. Muñoz, N., Bosch, X., Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J.F. y Meijer, C.J.L.M. "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer". N. Engl. J. Med. 348, 518-527 (2003).



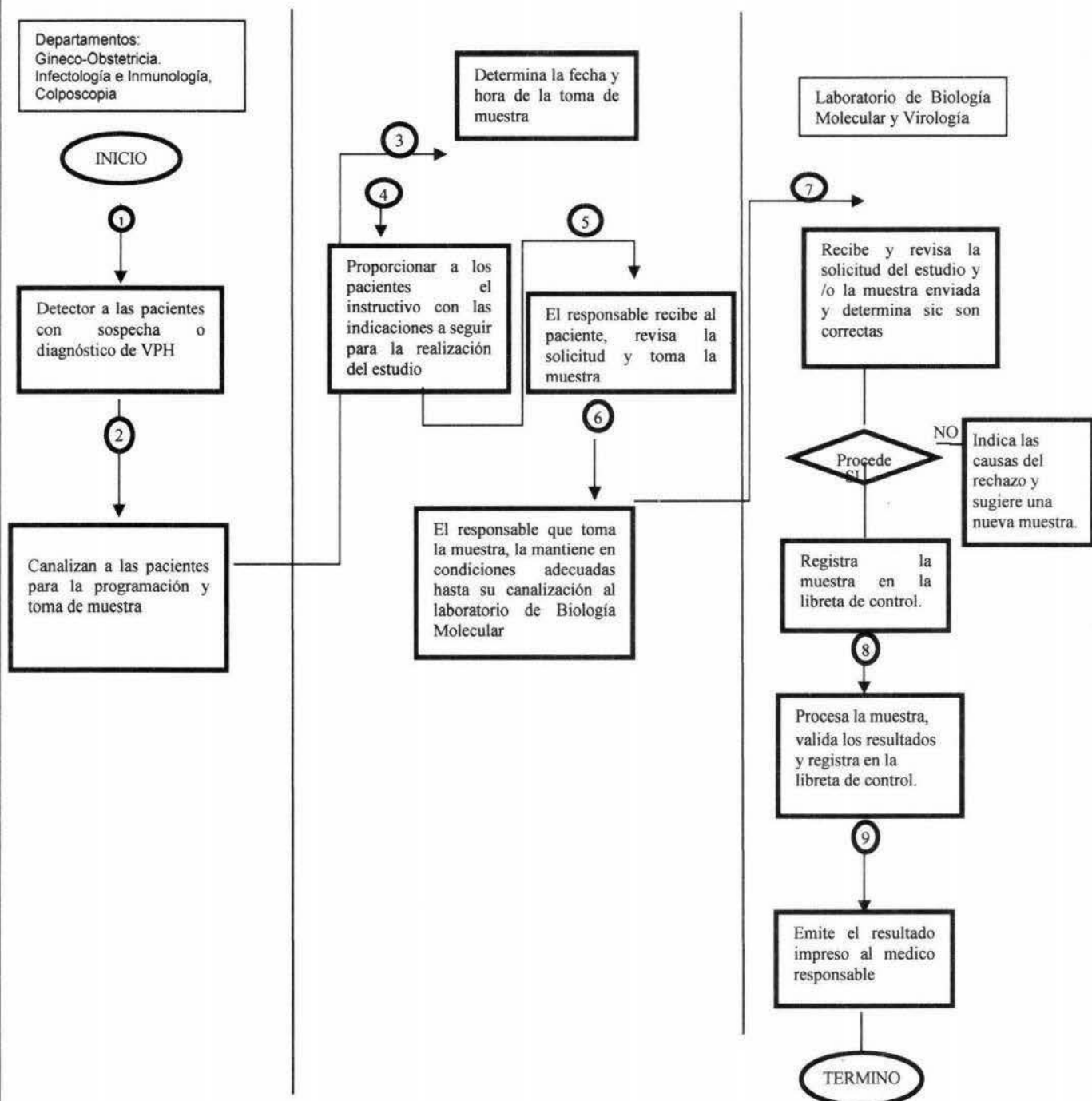
2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

11. Pista, A., Freire de Oliveira C., Lopes C., and Cunha M. J., on behalf of the CLEOPATRE Portugal Study Group. "Human Papillomavirus Type Distribution in Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3 and Cervical Cancer in Portugal A CLEOPATRE II Study". International Journal of Gynecological Cancer & Volume 23, Number 3, March 2013.
12. Ronco G., P. Giorgi-Rossi, F. Carozzi, M. Confortini, P. Palma, A. Mistro, B. Ghiringhello, S. Girlando, A. Gillio-Tos, L. Marco, C. Naldoni, P. Pierotti, R. Rizzolo, P. Schincaglia, M. Zorzi, M. Zappa, N. Segnan, J. Cuzick. "Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial". Lancet Oncol. 2010 Mar;11(3):249-57.
13. Suarez Moya, A., Esquivias Gómez, J.I., Vidart Aragón, J.A. Picazo de la Garza, J.J.: "Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del Papilloma humano en muestras genitales". Rev. Esp. Quimioterap., Junio 2006; Vol. 19 (Nº2); 161-166.
14. Verdasca, N.; A. Coelho; F. Ribeiro; A. Pista.: "Detection of VPH ADN from cervical samples in a group of portuguese women: comparison of two VPH genotyping assays". 24th internacional papillomavirus conference and clinical workshop, Nov 3-9, 2007, 14.- 14.
15. Beijing, P.R.China." Verdasca, N., A. Coelho, F. Ribeira, A. Pista.: "Detection of VPH ADN from cervical samples in a group of portuguese women: comparison of two VPH genotyping assays". 23rd International papillomavirus conference and clinical workshop. September 2006. Praga.



2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

21. Diagrama de flujo



**2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
 EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA**
23. Anexos
A) ETANOL AL 96%

Númer o de muestr as	Etanol 96%
1	210 µL
8	1.68 mL
16	6.48 mL

Mezclar por inversión

 Conservar a
 temperatura ambiente

B) SOLUCION TL DILUIDA

Númer o de muestr as	TL Conce ntrado	Agua destila da
1	1 mL	9 mL
8	8 mL	72 mL
16	16 mL	144 mL

Mezclar por inversión

 Conservar a
 temperatura ambiente

C) SOLUCION CJ DILUIDA

Númer o de muestr as	Solució n CJ	Solució n DC
1	9 µL	1 mL
8	72 µL	8 mL
16	144 µL	16 mL

Mezclar por inversión

 Conservar a
 temperatura ambiente

**2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA****Instructivo para la recepción y aceptación de muestras para la Genotipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH). (BM-IRAM-VPH-01)**

El personal de Laboratorio de Biología Molecular y Virología, será responsable de verificar el cumplimiento y la adecuada ejecución de los siguientes puntos:

- Se asegura que la solicitud del estudio corresponda a la prueba requerida y verifica que los datos del paciente estén completos.
- Constata que los datos del tubo con la muestra que recibe, correspondan a los de la solicitud de estudio.
- Verifica que el volumen de la muestra contenga un mínimo de 2 mL.
- Una vez tomada la muestra, el envío al laboratorio de Biología Molecular y Virología se deberá realizar en un plazo no mayor a 3 h, (mantener a temperatura ambiente), si por alguna causa no es posible entregar las muestras en el laboratorio, estas, se resguardarán en refrigeración durante 7 días como máximo.
- El volumen mínimo requerido para esta prueba es de 1 mL.
- Las muestras se rechazarán si contienen una cantidad excesiva de sangre o de moco.
- Las muestras se rechazarán si son colocadas en un volumen menor a lo especificado.
- Las muestras se rechazarán si se utilizó un medio de transporte diferente al indicado.
- Las muestras se rechazarán si no hay datos del paciente o si los datos del tubo no son los mismos que la solicitud del examen.
- **Una vez aceptada la muestra**, se almacenará en refrigeración a 4 °C durante una semana como máximo o se congelará a -20 °C hasta su procesamiento para la extracción y purificación de DNA total.

Muestras concesionadas.

En este caso:

- Se aceptarán aquellas muestras provenientes de pacientes extra INPer, previo acuerdo entre el coordinador del laboratorio y el jefe de área. Se deberán cumplir los mismos requisitos que las muestras de procedencia interna.
- En casos especiales, se valora la aceptación de la muestra con un volumen menor al mililitro.
- **Una vez aceptada la muestra**, se almacenará en refrigeración a 4 °C durante una semana como máximo o se congelará a -20 °C hasta su procesamiento para la extracción y purificación de DNA total.

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

Instructivo para la separación y manejo interno de las muestras para la Genotipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH). (BM-ISM-VPH-01)

Separación de las muestras.

- Las muestras refrigeradas y las muestras congeladas, deberán alcanzar la temperatura ambiente antes de su separación.
- Enseguida, se mezclarán en vórtex durante 30 segundos.
- Posteriormente, las muestras se separarán en dos alícuotas; en la primera, se depositarán 200 µL en tubos tipo eppendorf nuevos, estériles, libres de DNAsas y RNAsas de 1.5 mL, los cuales se emplearán para la extracción y purificación de DNA.
- El DNA se almacenará a -20 °C hasta su procesamiento (amplificación de la región conservada L1 del VPH, mediante una PCR universal de punto final). Las muestras se guardarán en cajas de poliestireno etiquetadas como "Muestras de trabajo- Genotipos-VPH".
- El resto de la muestra (segunda alícuota) se depositará en tubos tipo eppendorf nuevos, estériles y libres de DNAsas y RNAsas de 1.5 mL y se emplearán para ser procesadas en caso de alguna contingencia, por lo que se mantendrá a una temperatura de -20 °C en una caja de poliestireno identificada como "Muestras de resguardo-Genotipos-VPH".
- El tubo original con el resto de la muestra se desechará de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA-1-2002.
- La genotipificación de VPH, se seguirá de acuerdo al Manual Técnico de Procedimientos del Laboratorio de Biología Molecular BM-MT-VPH-01 y/o a las especificaciones del proveedor.

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

Glosario

DNA. Ácido desoxirribonucleico. Portador de las instrucciones genéticas para el desarrollo y la función de un organismo. Permite la transmisión de información genética de una generación a la siguiente.

Cáncer. Crecimiento maligno, autónomo y desregulado de células. Dicho crecimiento da lugar a tumores, que pueden invadir partes adyacentes y distantes del cuerpo, a la par que destruyen tejidos normales y compiten por los nutrientes y el oxígeno.

CaCu. Cáncer cervicouterino, que se manifiesta en el cuello uterino. Asociado frecuentemente a la infección por el virus del papiloma humano (VPH) y se transmite por contacto sexual.

Cérvix. cuello del útero.

Lesiones premalignas. Lesiones asintomáticas presenta en el cuello de uterino, mucho antes de la aparición del cáncer; pueden recibir el nombre de neoplasia cervical intraepitelial (NIC).

ITS. Infecciones de transmisión sexual.

VPH. Virus del papiloma humano.

Hibridación: Producir un híbrido por complementariedad de bases entre un fragmento de ácido nucléico (DNA-DNA) (DNA-RNA).

Regiones L. Regiones codificadoras de proteínas tardías (*late*).

L1. Proteína mayor o principal de la cápside del virión del VPH.

Colposcopia. Técnica complementaria ginecológica que tiene su fundamento en las imágenes obtenidas al incidir la luz del colposcopio sobre distintos tejidos del tracto genital inferior.

Raspado endocervical. Porción de tejido epitelial extraído del conducto endocervical para ser sometido a examen de anatomía patológica.

PCR (polimerase chain reaction). Reacción en cadena de la polimerasa. Técnica de amplificación del genoma. Permite el diagnóstico molecular del VPH.

Genotipo. Constitución genética de un organismo o célula; se refiere también al grupo específico de alelos heredados en un locus.

Genotipos de alto riesgo o de riesgo oncogénico. Genotipos de VPH asociados al desarrollo de cáncer de cervicouterino, tumores de vulva, vagina, entre otros.

Genotipos de bajo riesgo o de bajo riesgo oncogénico. Genotipos de VPH asociados al desarrollo de condilomas.

Microarrays. Son una herramienta que permite realizar análisis genéticos diversos basados en la miniaturización de procesos biológicos.

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

Otros

DOCUMENTOS INTERNOS

MANUALES.

1. Manual técnico de procedimientos (BM-MT-01).
2. Carpeta espejo de mantenimiento preventivo y correctivo de equipos (BM-CEM-01).
3. Manual para manejo de residuos (BM-MR-01).

INSTRUCTIVOS.

1. Instructivo para la recepción y aceptación de muestras para la Genotipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH). (BM-IRAM-VPH-01)
2. Instructivo para la separación y manejo interno de las muestras para la Genotipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH). (BM-ISM-VPH-01)

REGISTROS.

1. Bitácora de registro de muestras (BM-BRM-VPH-01).
2. Bitácora de uso de centrífuga clínica (BM-BCC-02).
3. Bitácora de uso de termociclador de punto final (BM-BTPF-03).
4. Bitácora de uso de Analizador de placas CAR (BM-CAR-04).
5. Bitácora de uso de campana de bioseguridad (BM-BCB-05).
6. Bitácora de entradas y salidas de reactivos de laboratorio (BM-BREAC-06).

FORMATOS.

1. Formato de solicitud de estudios del laboratorio de Biología Molecular.
Clave del estudio: Genotipificación del virus del papiloma humano (VPH).
Clave: del formato:
2. Formato de emisión de resultados (BM-FRES-VPH-01).

DOCUMENTOS EXTERNOS

1. Instructivo para la genotipificación del virus del papiloma humano (VPH) CLART HPV4, de acuerdo a las especificaciones del proveedor, GENOMICA.

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

RECONOCIMIENTO DE SUPLENCIAS

Suplencias		
Nombre	Dr. en C. Saúl Flores Medina	M. en C. Carmen Selene García Romero
Puesto-Cargo	Coordinador de laboratorio	Químico "A"
Firma		
Actividades	- Procesamiento de las muestras - Supervisión de resultados obtenidos. - - Firma de resultados antes de entrega final al médico infectólogo. - - Encargado de calendarizar el mantenimiento de equipos. - - Encargado de solicitar la compra y entrega de reactivos. - - Toma de decisiones y solución de problemas.	- - Recepción, registro de las muestras - Control de inventario. -- Registro de entradas y salidas de reactivos.
Suple a:	Dr. en C. Saúl Flores Medina.	M. en C. Carmen Selene García Romero.
Rubrica		

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

CRITERIO DE TEMPORALIDAD PARA EL PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

- Las determinaciones dependerán del número de muestras enviadas al laboratorio. Para realizar la prueba se requiere un número mínimo de 8 muestras cervicovaginales de pacientes con sospecha o diagnóstico previo de infección por VPH o un máximo de 96 muestras.
- El tiempo estimado desde la recepción, procesamiento y entrega de resultados, dependerá del lapso en que se colecten el número de muestras necesario para realizar la corrida.
- Serán tomados en cuenta los casos URGENTES de genotipificación solicitados por el área clínica, siempre y cuando se justifique la realización de la prueba.

EMISIÓN DE RESULTADOS.

- Una vez terminada la prueba, el software del equipo emite los resultados, los cuales se verifican y validan tomando en cuenta los controles internos de la prueba.
- Una vez validados los resultados, se aceptan o se rechazan.
- Se hace un respaldo impreso de los resultados obtenidos.
- Los resultados se transcriben en la bitácora de registro de muestras (BM-BIT-VPH-01)
- Los resultados se emiten de manera impresa al médico infectólogo encargado, de acuerdo al formato BM-FR-VPH-01 en un plazo no mayor a 7 días.

**2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
 EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA**

PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT. N°	DESCRIPCIÓN
Personal de Laboratorio de Biología Molecular y Virología	1	Separa la muestra cervico-vaginal en dos alícuotas, según instructivo (BM-ISM-VPH-01). La muestra se almacenará a -20 °C hasta su procesamiento (BM-VPH-01)
	2	Para llevar a cabo la Genotipificación de VPH, la muestra cervico-vaginal se descongela a temperatura ambiente y se comienza el técnica, de acuerdo al manual técnico de procedimientos (BM-VPH-01), de la siguiente manera:
	3	Todos los reactivos (de extracción, amplificación y detección) deberán estar a temperatura ambiente antes de su uso.
	4	Preparar los siguientes reactivos al momento: Etanol al 96% Solución <i>TL</i> diluida de acuerdo al número de pozos requeridos. Solución <i>CJ</i> diluida de acuerdo al número de pozos requeridos. Nota: La preparación se especifica en el anexo. 4.1 Las muestras y controles se mezclan en vórtex durante 30 seg. 4.2 Empleado el kit para extracción de ácidos nucleicos (AT-1104-48-MT), se procede a realizar la extracción del DNA viral. 4.3 Previamente, se marcan cada uno de los pozos de CLART-Strip® (CS), correspondientes al número de muestras a procesar, así como los controles. 4.4 En un tubo tipo Eppendor de 1.5 mL, colocar 200 µL de muestra y añadir 180 µL de Buffer T1. 4.5 Añadir 25 µL de la solución de Proteinasa <i>K</i> . Mezclar en vórtex por espacio de 30 segundos. 4.6 Incubar a 56°C/ 1 h, en baño María o en termomixer con agitación constante 4.7 Terminado el tiempo de incubación, añadir a cada muestra 200 µL de Buffer B3. Mezclar en vórtex por 30 segundos

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

4.8 incubar a 70°C durante 10 min.

4.9 Añadir 210 µL de etanol al 96% a cada muestra y agitar en vórtex

**** En caso de formarse un precipitado blanquesino, recuperarlo y continuar con el procedimiento ****

4.10 Preparar una columna de purificación por muestra y colocarla en un tubo de elusión de 2 mL.

4.11 Añadir la muestra y centrifugar a 15,000 X g / 1 min.

4.12 Descartar el fluido filtrado y el tubo de elusión de 2 mL

4.13 Colocar la columna en otro tubo de elusión y añadir 500 µL de Buffer BW.

4.14 Centrifugar nuevamente a 15,000 X g / 1 min

4.15 Descartar el fluido filtrado y el tubo de elusión de 2 mL

4.16. Colocar la columna en otro tubo colector y añadir 600 µL de Buffer B5.

4.17. Centrifugar a 15,000 X g / 1 min. Posteriormente, descartar el fluido filtrado

4.18. Colocar la columna en otro tubo de elusión.

4.19 Centrifugar a las mismas condiciones

4.20 Colocar la columna en un tubo nuevo tipo eppendor de de 1.5 mL

4.21 Eluir el DNA DN con 100 µL del Buffer BE **(previamente calentado a 70°C).**

4.22 Centrifugar a 15,000 X g / 1 min.

4.23 Recuperar el filtrado (aproximadamente 100 µL).

4.24 Almacenar a -20°C hasta su procesamiento

Termina Procedimiento



2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

10.5

REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN.

5.1 Descongelar el DNA a temperatura ambiente

5.2 Añadir 5 µl de muestra de DNA extraído a cada uno de los tubos para PCR.

5.3 Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas:

1 ciclo	98°C 5 min
45 ciclos	98°C 15 seg 55°C 15 seg 72°C 30 seg
1 ciclo	72°C 1,0 min
4°C continuo hasta retirada del tubo/ placa	

5.4 Colocar los tubos de PCR para la amplificación en el termociclador e iniciar el programa.

**La duración de la amplificación es de
aproximadamente 2 horas.**

5.5 Las muestras se congelarán -20°C hasta su procesamiento.

Termina Procedimiento

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

10.6

**PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA
VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO**

6.1 Encender el equipo CAR® para realizar la auto-calibración (dura unos minutos).

6.2 Los tubos de PCR se descongelarán a temperatura ambiente y enseguida se desnaturalizará el material genético en el termociclador a una temperatura de 95°C durante 10 minutos.

6.3 Pasado el tiempo, los tubos se colocan en un recipiente con hielo o a 4°C.

6.4 Se eligen los pozos (CS; tiras de ocho pozos) donde se llevará a cabo la hibridación y en donde se encuentran los microarreglos.

Para cada CS que se vaya a procesar, preparar 10 mL de TL diluido, diluyendo 1 mL de TL en 9 mL de agua destilada. Agitar suavemente.

6.4 Añadir 200 µL de TL diluido a cada pocillo antes de usarlo.

Resuspender 10-15 veces con la pipeta multicanal.

6.5 Retirar la solución de lavado de los pocillos con pipeta o con bomba de vacío.

6.6 añadir a cada pocillo 100 µL de SH atemperado a Temperatura ambiente, evitando generar espuma.

6.7 Añadir a cada pocillo de CS, 10 µL de producto amplificado desnaturalizado.

6.8 Cubrir el adaptador de placa microtiter y los CSs con la tapa de plástico, e incubar en el termomixer a 65 °C/ 30 min, con agitación constante a 550 rpm.

6.9 Después de la incubación, retirar la placa del termomixer y aspirar la solución de incubación de los pocillos del CS con una bomba de vacío.

6.10 Añadir 200 µL de TL diluido a cada pocillo, resuspendiendo de 10- 15 veces con la pipeta multicanal.

6.11 Aspirar la solución de lavado con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío.

6.12 Repetir los pasos 6.10 y 6.11

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

La lectura debe llevarse a cabo inmediatamente después de retirar RE.

6.23 Colocar el adaptador de placa microtiter junto con los CS a analizar en la bandeja del CAR®. El CAR® automáticamente llevará a cabo la lectura y emitirá el informe de resultados.

Termina Procedimiento.

Preparar la Solución CJ diluida 15 minutos antes de que finalice la hibridación, y mantener en hielo.

6.13. Aspirar el TL diluido de los pocillos sin dejar ningún resto, y añadir 100 µL de Solución CJ

6.14 Incubar a 30°C/ 15 min y a 550 rpm.

6.15 Sacar la placa y retirar la solución rápidamente con pipeta o bomba de vacío multicanal.

6.16 añadir 200 µL de TL diluido a cada pocillo, resuspendiendo 10-15 veces

6.17 Aspirar el TL diluido con la pipeta o bomba de vacío procurando eliminar el mayor volumen posible.

6.18 Repetir la operación dos veces más.

6.19 Eliminar por completo el TL diluido de los pocillos.

6.20 A continuación, añadir 100 µL de RE a cada pocillo

6.21 Incubar a 25°C/ 10 min en el termomixer sin agitación.

6.22 Retirar completamente la solución RE usando pipeta o bomba de vacío.

2. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EMPLEANDO LA METODOLOGÍA CLART HPV4 DE GENÓMICA

	10.7	LECTURA DE LA (S) MUESTRA (S) 7.1 Encender el equipo auto-CLART® plus. 7.2. Colocar el soporte con el número de CSs a leer en el equipo y seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla. 7.3. Seleccionar "Nuevo análisis" en el menú inicio. 7.4. Indicar el número de CSs necesarios presionando la cruz que aparece en cada columna. 7.5. Seleccionar el tipo de ensayo "HPV-4" o "HPV-4S" del listado. Para llevar a cabo el mismo ensayo en todos los CSs presione "Auto Select". Después pulse la flecha de dirección derecha para continuar. 7.6. En la pantalla de "Configuración del análisis" seleccionar "Lectura" y pulse la flecha de dirección derecha para continuar. 7.7. Cuando ha terminado la lectura, el auto-CLART® plus emite una señal acústica para indicar la finalización del test.
	10.8	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS El análisis de resultados y la emisión del informe correspondiente serán llevados a cabo de manera automática por el equipo, CAR® 8.1 Observa y analiza resultados de controles (control positivo y control negativo): -Si los controles genómicos y de amplificación son válidos, proceder a aceptar resultados y realizar el reporte de genotipos detectados en cada muestra. -Si los controles genómicos y de amplificación no son válidos, el software manda aviso de error e invalida la muestra, por lo que será necesario repetir la prueba. 8.2 Validar resultados y guardar la información en el equipo. 8.3 Salir del sistema. 8.4 Apagar el equipo y PC Termina Procedimiento



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

**MANUAL TÉCNICO DE PROCEDIMIENTOS
DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y VIROLOGÍA**



CLAVE DEL
LABORATORIO
BM-MT-1/01

BM-CV-1/02

FECHA DE EMISIÓN

DÍA	MES	AÑO
05	04	22

HOJA 1/2

HOJA DE FIRMAS

HOJA DE FIRMAS



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

MANUAL TÉCNICO DE PROCEDIMIENTOS
DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y VIROLOGÍA



CLAVE DEL
LABORATORIO
BM-MT-1/01

BM-CV-1/02

FECHA DE EMISIÓN

DÍA	MES	AÑO
05	04	22

HOJA 2/2

HOJA DE FIRMAS

ELABORÓ

M. EN C. CARMEN SELENE GARCÍA ROMERO
QUÍMICA

DR. EN C. SAÚL FLORES MEDINA
COORD. DE LABORATORIO

REVISÓ

DR. EN C. SAÚL FLORES MEDINA
COORD. DE LABORATORIO

AUTORIZÓ

DR. RICARDO FIGUEROA DAMIÁN
JEFE DE DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA