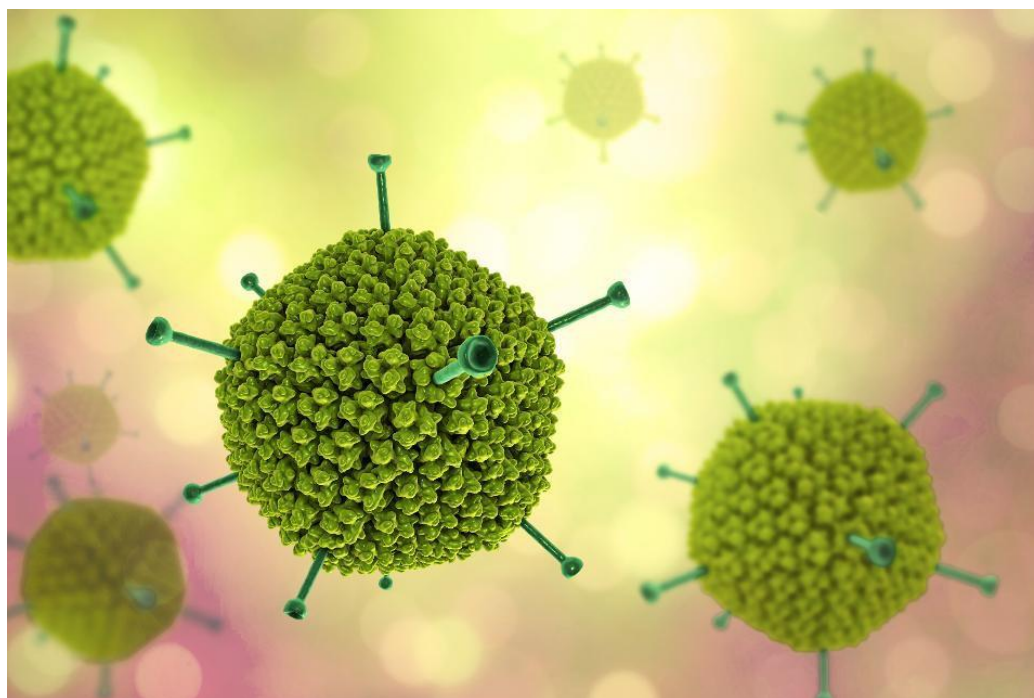


GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL**Guía de Procedimiento para Determinación de Carga Viral
de Adenovirus (ADV) por PCR en Tiempo Real****Servicio de Patología Clínica
Sub Unidad de Apoyo al Diagnóstico**

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Equipo Técnico del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica.	<ul style="list-style-type: none">• Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento• Unidad de Gestión de la Calidad	Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director (e) del Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL

**Guía de Procedimiento para Determinación de Carga Viral
de Adenovirus (ADV) por PCR en Tiempo Real**

I.	Titulo.....	3
II.	Finalidad.....	3
III.	Objetivos	3
IV.	Ámbito de Aplicación	3
V.	Nombre del proceso o Procedimiento y Código CPT	3
VI.	Consideraciones Generales.....	3
	a. Definiciones Operativas.....	3
	1 Definición del procedimiento	3
	2 Consentimiento informado.....	4
	b. Conceptos Básicos	4
	c. Requerimientos Básicos	4
VII.	Consideraciones Específicas	5
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento	5
	b. Indicaciones	13
	1 Indicaciones Absolutas.....	13
	2 Indicaciones Relativas	13
	c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes	13
	d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes	13
	e. Contraindicaciones	13
VIII.	Autores, Fecha y Lugar	14
IX.	Bibliografía.....	14



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL

**Guía de Procedimiento para Determinación de Carga Viral
de Adenovirus (ADV) por PCR en Tiempo Real**

I. Título

Procedimiento para determinación de Carga Viral de Adenovirus (ADV) por PCR en Tiempo Real.

II. Finalidad

Determinar los procedimientos técnicos para la correcta determinación de la carga viral de Adenovirus (ADV) por PCR en tiempo real.

III. Objetivos

Realizar el procedimiento de Cuantificación de la Carga Viral de Adenovirus (ADV), por PCR en tiempo Real (qPCR) a partir de muestras de plasma, orina, lavado bronco alveolar (LBA) y líquido cefalorraquídeo (LCR).

IV. Ámbito de Aplicación

El presente procedimiento será aplicado por el laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica del INSN - San Borja

V. Nombre del proceso o Procedimiento y Código CPT

Determinación de Carga Viral de Adenovirus (ADV) por PCR en Tiempo Real.
CPT: 8780005

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1 Definición del procedimiento

Este ensayo utiliza la amplificación por PCR en tiempo Real del ADN del Adenovirus (ADV). La detección se basa en la amplificación de una secuencia altamente conservada del gen E2B. La cuantificación se realiza por detección de fluorescencia en el canal del FAM para cada una de las muestras biológicas y extrapolando dicho valor de fluorescencia en una curva de Calibración Estándar. Las unidades de reporte son en copias/ml.



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL

2 Consentimiento informado

No requiere

b. Conceptos Básicos

- **La carga viral** es la cuantificación de las partículas virales en muestras clínicas humanas (Sangre total, plasma, suero, orina, LCR, etc), utilizando técnicas de Biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), amplificaciones de señal mediante Sondas, etc.
- **El adenovirus (ADV)** es endémico en la población general y con frecuencia causa enfermedad grave en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en los pacientes pediátricos. El contagio es posible por contacto directo o por fómites, y el virus es extremadamente resistente a diferentes agentes físicos y químicos. Los métodos de qPCR permiten detectar la presencia del virus y monitorizar el desarrollo de la enfermedad así como la respuesta al tratamiento.

c. Requerimientos Básicos

Recursos Humanos

- Médico Patólogo Clínico.
- Biólogo.
- Técnico de Laboratorio.

Equipos Biomédicos

- Termociclador en Tiempo Real
- Cabina de Bioseguridad Clase II-A2
- Ultracentrifuga refrigerada
- Termobloque de calor seco
- Vórtex
- Micropipetas 1-10 µl
- Micropipeta de 2 – 20 µl
- Micropipetas 20 – 200 µl
- Micropipeta de 100 – 1000 µl
- Congeladora de - 70 °C
- Congeladora de - 20 °C
- Refrigeradora de 2 - 8 °C

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL**Material médico no Fungible**

- Tips con filtro de 1 – 10 µl
- Tips con filtro de 2 – 20 µl
- Tips con filtro de 20 – 200 µl
- Tips con filtro de 100 – 1000 µl
- Crioviales de 2.0 ml
- Gradillas para tubos de 2.0 ml
- Gradilla de tubos de 12 x 75 mm
- Criobox
- Contenedor de desechos biológicos de 1L
- Contenedor de desechos biológicos de 4L
- Placas de PCR
- Tapas de microtubos de 0.2 ml para PCR en Tiempo Real.

Material médico Fungible

- **Reactivos**
 - Kit de Extracción de ADN viral (IVD).
 - Kit de PCR en Tiempo Real para Detección y Cuantificación de Adenovirus (IVD).
- **Materiales**
 - Papel absorbente.
 - Guantes de nitrilo
 - Gafas protectoras.
- **Soluciones**
 - Etanol Absoluto

VII. Consideraciones Específicas**a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento**

Procedimientos

Tiempo: 380 minutos

- **Preparación de la Muestra (50 Minutos)**



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL

Al inicio del trabajo

- 1 Toda muestra debe ser ingresada con letra legible, especificando el tipo de prueba a realizarse en el Registro General de Toma de Muestra del Servicio de Patología Clínica.
- 2 En caso de las muestras referidas, verificar la legibilidad de los nombres tanto del paciente como del médico solicitante al momento de recepcionar la muestra.
- 3 Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
- 4 Toda muestra debe ser considerada **potencialmente infecciosa** y se deben tomar las precauciones que garanticen la seguridad del flebotomista y de los pacientes.
- 5 Antes de iniciar cualquier procedimiento, limpiar con alcohol Etílico al 70% o Hipoclorito de sodio al 10 % las superficies de las mesas de trabajo.
- 6 Utilizar contenedores de descarte para objetos punzo cortantes y biocontaminados.

Numeración

- 1 Verificar la calidad de las muestras de sangre obtenidas, por ejemplo: hemólisis, lipemia, ictericia, etc (Describir en la orden de ser el caso).
- 2 Numerar en orden correlativo cada una de las muestras extraídas consignando los siguientes datos:
 - Tipo de Examen solicitado
 - Tipo de muestra
 - Fecha de la toma de muestra
 - Procedencia de la muestra: Sangre Periférica (Punción) o Catéter venoso central (CVC)
- 3 La numeración asignada debe estar indicada en la orden de laboratorio como en el tubo que contiene la muestra. Ejemplo:
 - ADV-PLASMA/01-10-18 • BKV-LBA/01-10-18
 - ADV-LCR/01-10-18
- 4 Reposar las muestras extraídas en posición vertical por 20 minutos a temperatura ambiente.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL**Transporte y Almacenamiento**

- 1 Rotular en orden correlativo los tubos o crioviales necesarios que se enviarán al laboratorio según la cantidad de muestras, indicando los siguientes datos:

- Nombre del Paciente
- Numeración asignada según tipo de examen solicitado
- Fecha de toma de muestra.

Ejemplo:

Pablo Ruiz Fernández
1ADV-PLASMA/01-10-18

- 2 Para obtener la muestra de plasma necesaria para el estudio; centrifugar las muestras de SANGRE; extraídas en tubos con EDTA; a 3000 rpm y/o 1100 g por 20 minutos, transferir el plasma (sobrenadante) a un criovial de almacenamiento (tapa rosca) de 2 ml o viales de 1,5 ml, debidamente rotulado. Utilizar pipetas de transferencia estériles de 3 ml.
- 3 La muestra de orina debe obtenerse en forma aséptica en tubo o frasco estéril, luego de un aseo prolijo con agua en la zona genital. Homogeneizar la muestra en vórtex por 10 segundos, tomar una alícuota con pipeta estéril de transferencia de 3 ml y transferir un volumen representativo en crioviales de 2 ml.
- 4 En caso de que el proceso no se realice el mismo día de toma de muestra, el almacenaje de las muestras procederá de acuerdo a parámetros de estabilidad de muestra, tal como se detalla en el siguiente cuadro:

VIRUS	Muestra	Almacenaje	Estabilidad de la Muestra
Adenovirus (ADV)	Lavado Broncoalveolar (LBA)	Refrigeración (4 °C)	48 horas
	Líquido Céfaloraquídeo (LCR)	Refrigeración (4 °C)	48 horas
	Orina	Congelación (-70 °C)	> 72 horas
	Plasma	Congelación (-70 °C)	> 72 horas

Al Final del trabajo

- 1 Limpiar la superficie de la mesa de trabajo utilizada.
- 2 Dejar los materiales utilizados en su lugar respectivo.
- 3 Eliminar los guantes y/o otros materiales descartables en los reservorios adecuados (bolsa roja).
- 4 Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL➤ **Extracción de ADN Viral (120 Minutos)****Preparación de los reactivos**

1. Extraer del congelador de -20°C el Control Interno de Extracción (IC) y dejar a temperatura ambiente.
2. Separar (según el número de muestras clínicas y controles a procesar) las columnas de extracción y rotularlas con el número de muestra correspondiente de acuerdo a la lista de trabajo.
3. Agregar 20 mL de Etanol absoluto a la solución removedora de inhibidores de PCR (Inhibitor Removal Buffer) y mezclar por inversión. Dejar indicado en el frasco la fecha de preparación.
4. Agregar 40 mL de Etanol absoluto a la solución de lavado 2 (Wash Buffer) y mezclar por inversión. Dejar indicado en el frasco la fecha de preparación.
5. Agregar 5 mL de buffer de elución al frasco que contiene el liofilizado de Proteinasa K, mezclar hasta disolver.

Proceso de Extracción

1. Encender la Cabina de Bioseguridad asignada para la extracción de ácidos nucleicos. Ver PC-BM-I-004: INSTRUCTIVO DE MANEJO CABINA DE BIOSEGURIDAD CLASE II TIPO A2.
2. Rotular en orden ascendente el número de crioviales necesarios según la lista de trabajo del día.
3. Mezclar por vórtex vigorosamente las muestras y controles (Aproximadamente por 10 segundos).
4. Dispensar 25 µL de Proteinasa K a cada criovial que se va a utilizar según la lista de trabajo del día.
5. Agregar 5 µL de Control Interno de Extracción (IC) a cada criovial que se va a utilizar según la lista de trabajo del día.
6. Mezclar por vórtex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos).
7. Agregar 200 µL de las muestras y Control NTC (Buffer de elución), según corresponda.
8. Agregar 200 µL del Binding Buffer a cada muestra.
9. Mezclar por vórtex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos).
10. Incubar a 70°C por 10 minutos en un termobloque de calor seco.
11. Sacar las muestras y mezclar vigorosamente en el vórtex (Aproximadamente por 10 segundos).

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL

12. Agregar 100 µL de Binding Buffer a cada muestra.
13. Mezclar por vórtex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos).
14. Trasvasar el contenido de cada criovial en las columnas de extracción identificadas (utilizar pipetas de transferencia de 3 mL).
15. Centrifugar a 11 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
16. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
17. Agregar 500 µL de solución removedora de inhibidores (Inhibitor Removal Buffer) a cada columna.
18. Centrifugar a 11 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
19. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
20. Agregar a cada columna 500 µL de buffer de lavado (Wash Buffer).
21. Centrifugar a 11000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
22. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
23. Agregar a cada columna 500 µL de buffer de lavado (Wash Buffer).
24. Centrifugar a 11000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
25. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
26. Centrifugar a 11 000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente para secar las columnas.
27. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
28. Agregar 50 µL de la solución del Buffer de Elución, directamente a la membrana de sílice de las columnas.
29. Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente.
30. Centrifugar a 11 000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente.
31. La solución eluida contiene ADN viral para el proceso de amplificación. Si no se usa el mismo día congelar a -20°C por un máximo de 24 horas.

➤ **Amplificación por PCR en Tiempo Real (180 Minutos)****Al inicio del trabajo**

1. Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
2. Encender la Cabina de Bioseguridad asignada para la preparación y cargado de las reacciones de PCR. Ver PC-BM-I-004: INSTRUCTIVO DE MANEJO CABINA DE BIOSEGURIDAD CLASE II TIPO A2.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL

- Retirar los reactivos para la preparación de la mezcla de PCR y los controles de Amplificación del congelador de -20 °C y dejar a temperatura ambiente.
- Cortar las filas necesarias de la placa de PCR con sus respectivas tapas.

Preparación de la mezcla de PCR

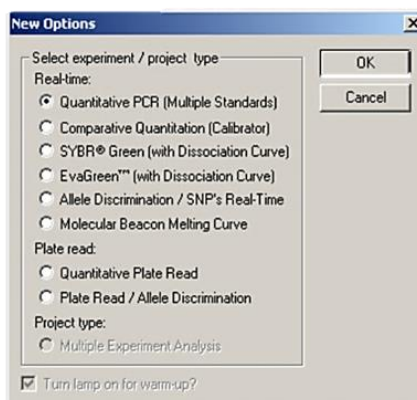
- Dispensar 30 µL de la master Mix en cada pocillo de la placa de PCR.
- Agregar 10 µL de los Estándares, Control NTC y muestras según el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Estándar 01	Muestra 4										
B	Estándar 02	Muestra 5										
C	Estándar 03	Muestra 6										
D	Estándar 04	Muestra 7										
E	NTC	Muestra 8										
F	Muestra 1	Muestra 9										
G	Muestra 2	Muestra 10										
H	Muestra 3	Muestra 11										

- Eliminar las burbujas presentes en la solución.
- Tape cada pocillo con las tapas especiales para reacciones en PCR en tiempo Real. No tocar las tapas con los dedos.
- Coloque la placa cargada en el bloque térmico del Termociclador en tiempo Real y cierre la tapa del equipo.

Programación del equipo MX3500P System (Stratagene)

- Ingresar al software Mx y elegir Quantitative PCR en la ventana new Options Screen.





GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL

2. Ingresar los parámetros básicos de los estándares, NTC y de las muestras:
 - a. Definir las posiciones de los estándares en la placa de PCR en el Mx.
 - b. En el menú de la derecha, seleccione e indique:
 - i. Well type: Standard
 - ii. Collect fluorescence data: FAM, ROX
 - iii. Reference dye: ROX
 - iv. Replicate symbol: none.
 - c. Definir la posición del Control NTC en la Placa de PCR en el Mx.
 - d. En el menú de la derecha, seleccione e indique:
 - i. Well type: NTC
 - ii. Collect fluorescence data: FAM, ROX, HEX
 - iii. Reference dye: ROX
 - iv. Replicate symbol: none.
 - e. Definir la posición de las muestras en la Placa de PCR en el Mx.
 - f. En el menú de la derecha, seleccione e indique:
 - i. Well type: Unknown
 - ii. Collect fluorescence data: FAM, ROX, HEX
 - iii. Reference dye: ROX
 - iv. Replicate symbol: none.
 - g. Haciendo doble click en cada pocillo, aparecerá el cuadro de diálogo de información del Pocillo. Introduzca según corresponda:
 - Estándar 01
 - Estándar 02
 - Estándar 03
 - Estándar 04
 - Control NTC
 - Nombre del Paciente
3. Configurar los parámetros de amplificación PCR con los siguientes datos:
 - ✓ Segmento 01
 - UDG decontamination (37°C por 2 min.) -- > 01 Ciclo

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL✓ Segmento 02

- Initial denaturation (95°C por 10 min.)
 - Denaturation (95°C por 5 s)
 - Annealing (40°C por 40 s)
 - reading of the fluorescence signal
 - Extensión (72°C por 20 s)
- } 45
ciclos

4. Guardar la corrida en la carpeta correspondiente y hacer click en Start para iniciar la corrida.

➤ **Análisis de datos y validación de parámetros de amplificación (30 minutos)**

1. Cuando el programa de amplificación haya culminado, hacer click en Analysis del menú de la izquierda.
2. Active la pestaña de visualización del canal FAM para verificar la amplificación de los Estándares.
3. Active la pestaña de visualización del canal HEX para verificar la amplificación del control Interno presente en todas las muestras y en el control negativo.
4. Hacer click en Amplificación plot y verifique los Ct de amplificación del Control Interno, Estándares y muestras clínicas.
5. Hacer click en Show Standard Curve y verifique los datos de RSq y % de eficiencia, los cuales deben estar cerca de 1 y 100 %, respectivamente.
6. Para mostrar los resultados de cuantificación, hacer click en Text report.
7. Utilice la siguiente fórmula para calcular la concentración de una muestra en unidades (genoma, copias, UI) por 1 ml:

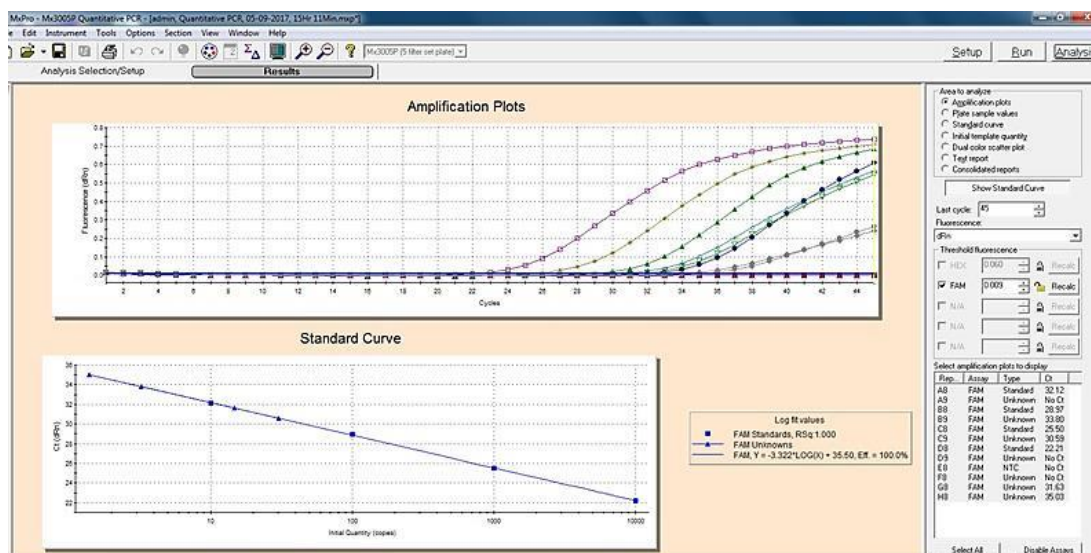
$$\text{Concentración} = \frac{cVZ \times E0}{I}$$

cVZ = concentración de la muestra en unidades/μL

E0 = Volumen de elución en μL

I = Volumen de muestra usado en mL

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL



b. Indicaciones

1 Indicaciones Absolutas

Cuantificación de ADN viral de ADV en pacientes pediátricos remitidos por los diversos servicios del Instituto Nacional del Niño – San Borja (INSN-SB).

2 Indicaciones Relativas

- Cuantificación de ADN viral de ADV en pacientes pediátricos hospitalizados o por consulta de los diferentes servicios del INSN-SB.
- Las muestras validadas para la detección de ADN viral de ADV por PCR a Tiempo Real son: Plasma, Orina, Líquido Cefalorraquídeo (LCR) y Lavado Broncoalveolar (LBA).

c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes

Ninguno

d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes

Ninguno

e. Contraindicaciones

Ninguna



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE ADENOVIRUS (ADV) POR PCR EN TIEMPO REAL

VIII. Autores, Fecha y Lugar

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja

Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular-Servicio de Patología Clínica.

Sub Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Fecha de Elaboración: Marzo 2019

Vigencia: 02 años

Autores:

- | | |
|---|-------------------------|
| 1. Blgo. Luis Eduardo Grados Molina | lgrados@insnsb.gob.pe |
| 2. Blga. Giannina Wendy Tineo Pozo, MsC (C) | gtineo@insnsb.gob.pe |
| 3. Dra. Carla Méndez Chacón Rodríguez | cmendez@insnsb.gob.pe |
| 4. Dra. Andrea de María Zavaleta González | azavaleta@insnsb.gob.pe |
| 5. Blga. Madeley Aliaga Zamudio, MsC(C) | maliaga@insnsb.gob.pe |
| 6. Blgo. Luis Martín Cruz Diaz, MsC (C) | lcruz@insnsb.gob.pe |

IX. Bibliografía

- Ghebremedhin B. Human Adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. European Journal of Microbiology and Immunology 4 (2014) 1, pp. 26-33
- Narayanan S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. Am J Clin Pathol. 2000; 113:429 – 452.
- Protection of laboratory workers from infectious disease transmitted by blood, body fluids and tissue. Tentative Guideline. NCCLS Document M29-T Villanova, PA:NCCLS, 1989. erase chain reactions. Gene. 93(1):125-128.
- GeneProof ADV Virus (ADV) PCR kit insert.