

Protocolo de RT-PCR en tiempo real – Cepa vacunal 17D del virus de la fiebre amarilla (YFV)

1. Mezcla

Componente	Volumen por reacción	Volumen para 10 reacciones	Volumen para 50 reacciones
agua (libre de ARNasa/ADNasa)	6.4 µl *	64 µl *	320 µl *
tampón de reacción (2x)	12.5 µl *	125 µl *	625 µl *
cebador forward (100 µM)	0.25 µl	2.5 µl	12.5 µl
cebador reverse (100 µM)	0.25 µl	2.5 µl	12.5 µl
sonda (25 µM)	0.15 µl	1.5 µl	7.5 µl
enzima	0.5 µl *	5 µl *	25 µl *
Total por reacción		15 µl	

2. ARN

Añadir **10 µl** de ARN a los 15 µl de mezcla.

Incluir **controles** positivos y negativos para evaluar la validez de la corrida.

3. Ciclaje

1 ciclo de:

50°C por 30 min * (transcripción inversa)

95°C por 2 min * (activación de la ADN polimerasa, “hot start”)

45 ciclos de PCR de:

95°C por 15 segundos

64°C por 1 min

4. Interpretación

validez de la prueba: los controles positivos y negativos deben tener el resultado esperado

5. Cebadores y sondas

Hughes HR et al., Development of a real-time reverse transcription-PCR Assay for global differentiation of yellow fever virus vaccine-related adverse events from natural infections. *J Clin Microbiol.* 2018;**56**(6)

Forward 5'- GTATTCTGTGGATGCTGACC

Reverse 5'- TATCCCGGTTTCAGGTTGTG

Sonda (R) 5'- CTCACCCAGTTGCAG

Los nucleótidos en negrita en la sonda son de tipo LNA (locked nucleic acid, ácido nucleico bloqueado).

* Los volúmenes y tiempos indicados son para uso del estuche SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, número de catálogo: 11732-020 o 11732-088) y deben ajustarse cuando se utilizan otras enzimas.