

# virotype<sup>®</sup> Influenza A H5/H7/H9 RT-PCR Kit Manual de uso

Para la detección simultánea de ARN de los subtipos H5, H7 y H9 del Influenza A virus

---

Certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal, n.º MA: FLI-C 072



96 reacciones (n.º de catálogo VT282705)



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,  
04103 Leipzig, Alemania

# Contenido

Contenido del kit .....	3
Uso previsto .....	3
Símbolos .....	4
Control de calidad .....	4
Almacenamiento .....	5
Información de seguridad .....	5
Introducción .....	6
Principio .....	6
Extracción del ARN .....	7
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario .....	9
Notas importantes .....	10
Precauciones generales .....	10
Protocolo: RT-PCR en tiempo real para la detección de ARN de los subtipos H5, H7 y H9 del Influenza A virus .....	12
Cuestiones importantes antes de comenzar .....	12
Antes de comenzar .....	12
Procedimiento .....	13
Análisis e interpretación de los datos .....	16
Interpretación de los resultados .....	16
Índice de cambios .....	20

# Contenido del kit

<b>virotype Influenza A H5/H7/H9 RT-PCR Kit</b>	<b>(96)</b>
<b>N.º de catálogo</b>	<b>VT282705</b>
<b>Número de reacciones</b>	<b>96</b>
RT-PCR Mix (mezcla de RT-PCR) (tubo con tapón amarillo), incluye enzimas y el sistema de control interno	2 × 990 µl
Primers/Probes (primers/sondas) (tubo con tapón morado)	1 × 210 µl
Positive Control (control positivo) (tubo con tapón rojo)	1 × 150 µl
Negative Control (control negativo) (tubo con tapón azul)	1 × 150 µl
Manual de uso	1

## Uso previsto

El virotype Influenza A H5/H7/H9 RT-PCR Kit está diseñado para detectar y diferenciar simultáneamente el ARN de los subtipos H5, H7 y H9 del Influenza A virus. El kit permite la detección de ARN en exudados traqueales y cloacales, así como también en muestras fecales y de tejido, en sobrenadante de cultivo celular y membranas filtrantes (p. ej., tarjetas FTA®) procedentes de aves.

Este kit está autorizado por el Friedrich-Loeffler-Institut y ha sido certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal (FLI-C 072) para su uso en Alemania en procedimientos de diagnóstico veterinario.

**Para uso exclusivo en el ámbito veterinario.**

## Símbolos



Fabricante legal



Número de lote



Fecha de caducidad



Límites de temperatura para almacenamiento



Manual de uso



Número de catálogo



Número de material



Proteger de la luz



Para muestras procedentes de aves

## Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de INDICAL, cada lote del virotype Influenza A H5/H7/H9 RT-PCR Kit se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

# Almacenamiento

Los componentes del virotype Influenza A H5/H7/H9 RT-PCR Kit deben almacenarse a una temperatura comprendida entre  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Evite repetir el ciclo de descongelación-congelación (>2 veces), ya que esta práctica reduce la sensibilidad del ensayo. Congele los componentes en alícuotas únicamente si van a utilizarse de forma intermitente.

## Información de seguridad

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes. Puede solicitarlas a su representante de ventas local o por correo electrónico a **[compliance@indical.com](mailto:compliance@indical.com)**.

Todos los residuos de muestras y los objetos que han estado en contacto con las mismas deben descontaminarse o eliminarse como material potencialmente infeccioso.

# Introducción

El virotype Influenza A H5/H7/H9 RT-PCR Kit es un ensayo de PCR múltiple diseñado para la detección y la diferenciación simultánea de ARN de los subtipos H5, H7 y H9 del Influenza A virus. El kit permite la detección de ARN en exudados traqueales y cloacales, así como también en muestras fecales y de tejido, en sobrenadante de cultivo celular y membranas filtrantes (p. ej., tarjetas FTA®) procedentes de aves.

Los virus del género *Influenzavirus* A pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Presentan una gran diversidad genética y una amplia gama de virulencia. Los virus Influenza A se agrupan en cepas de baja y alta patogenicidad. Las anseriformes son el reservorio natural de los virus avian influenza de baja patogenicidad (Low-pathogenic avian influenza viruses, LPAIV). Los virus avian Influenza de alta patogenicidad (Highly pathogenic avian Influenza viruses, HPAIV) pertenecen a los subtipos H5 o H7 y pueden causar peste aviar en las aves de corral domésticas, lo que conlleva pérdidas económicas importantes. Todas las infecciones con los subtipos H5 o H7 son de declaración. Las infecciones con el subtipo H9 suelen provocar síntomas más leves en las vías respiratorias y en la producción de huevos. Las infecciones concomitantes con otros patógenos causan enfermedades respiratorias que pueden dar lugar a infecciones graves con una mortalidad alta. Además, el avian Influenza de subtipo H9 puede contribuir a reagrupaciones genéticas debido a la amplia distribución y circulación simultáneas (especialmente en Asia).

## Principio

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma

de un patógeno. En la PCR en tiempo real, el producto amplificado se identifica mediante marcadores de fluorescencia. Estos suelen estar ligados a sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente al producto amplificado. La supervisión de las intensidades de la fluorescencia durante la serie de PCR (es decir, en tiempo real) permite detectar el producto acumulado sin necesidad de volver a abrir los tubos de reacción posteriormente.

El virotype Influenza A H5/H7/H9 RT-PCR Kit contiene todos los reactivos necesarios para la detección y la diferenciación de ARN del Influenza A, subtipos H5, H7 y H9 incluidos un Positive y un Negative Control. Con este kit, tanto la transcripción inversa como la PCR tienen lugar en un tubo de reacción, lo que reduce el riesgo de contaminación.

Un control interno excluye la posibilidad de resultados negativos falsos.

El kit utiliza cuatro combinaciones específicas de primer/sonda:

- Fluorescencia FAM™ para ARN de Influenza A subtipo H5
- Fluorescencia HEX™ para ARN de Influenza A subtipo H7
- Fluorescencia Cy®5 para ARN de Influenza A subtipo H9
- Fluorescencia Texas Red® para el control interno

Un Positive Control permite verificar la funcionalidad de la mezcla de reacción para la amplificación de los patógenos diana.

## Extracción del ARN

El virotype Influenza A H5/H7/H9 RT-PCR Kit está diseñado para la detección y diferenciación simultánea de ARN de los subtipos H5, H7 y H9 del Influenza A virus en exudados traqueales y cloacales, así como también en muestras fecales y de tejidos y membranas filtrantes.

Antes de realizar la RT-PCR en tiempo real, debe extraerse ARN vírico del material de partida. INDICAL ofrece una amplia gama de kits validados diseñados para la extracción de ARN y ADN de muestras de animales.

Extracción basada en microesferas magnéticas:

- **IndiMag® Pathogen Kit** (SP947457)
- **IndiMag Pathogen Kit w/o plastics** (SP947257)
- **IndiMag Pathogen IM48 Cartridge** (SP947654P608, SP947654P224)
- **IndiMag Pathogen KF96 Cartridge** (SP947855P196)

Extracción basada en columnas de centrifugado:

- **IndiSpin® Pathogen Kit** (SP54104, SP54106)
- **IndiSpin QIAcube® HT Pathogen Kit** (SP54161)

INDICAL recomienda efectuar protocolos específicos de pretratamiento para la extracción de ARN vírico de distintos tipos de muestras. Para obtener más información sobre la extracción automática y manual de ARN de Influenza A de diferentes tipos de muestras, consulte el manual respectivo o póngase en contacto con el servicio de asistencia de INDICAL a través de [support@indical.com](mailto:support@indical.com).

Si la RT-PCR en tiempo real no se realiza inmediatamente después de la extracción, almacene el ARN a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o bien a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para un almacenamiento más prolongado.

# Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Pipetas
  - Puntas de pipeta exentas de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros
  - Tubos Eppendorf® de 1,5 ml estériles
  - Consumibles exentas de nucleasas (sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa). Debe prestarse especial atención para evitar la contaminación con nucleasas de todos los reactivos y consumibles utilizados para configurar la PCR a fin de realizar una identificación sensible de los ácidos nucleicos víricos
  - Dispositivo para enfriamiento o hielo
  - Centrífuga de mesa con rotor para tubos de 1,5 ml
  - Termociclador en tiempo real con canales de fluorescencia adecuados
  - Software adecuado para el termociclador en tiempo real elegido
- Nota:** Utilice el Rotor-Gene® Q solo en combinación con el software Q-Rex
- Tubos y tapones de tiras adecuados o microplaca óptica de 96 pocillos con película adhesiva óptica o tapa para el termociclador en tiempo real elegido

# Notas importantes

## Precauciones generales

El usuario debe proceder siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones:

- Utilice puntas de pipeta exentas de nucleasas con filtros.
- Almacene y extraiga el material positivo (muestras, controles positivos y amplicones) en procedimientos independientes con respecto al resto de reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en una sala separada físicamente.
- Descongele todos los componentes en hielo antes de iniciar el ensayo.
- Cuando se hayan descongelado, mezcle los componentes mediante inversión y centrifúgelos brevemente.
- No utilice los componentes del kit de prueba si están caducados.
- **Importante:** Conserve las muestras y los controles en hielo o en un bloque de enfriamiento durante la configuración de las reacciones.

## Control negativo

Como mínimo debe incluirse una reacción de control negativo en cada serie de PCR. Esta acción permite evaluar la contaminación de la reacción.

## Control positivo

Si el procedimiento de la PCR se realiza en muestras no conocidas, se recomienda efectuar una reacción de control positivo en la serie de PCR que contenga una muestra con ARN vírico diana. Un control positivo permite demostrar la funcionalidad del ensayo del patógeno, p. ej., que la mezcla de reacción se ha configurado correctamente.

Utilice 5 µl del Positive Control suministrado con el virotype Influenza A H5/H7/H9 RT-PCR Kit para probar que la diana se ha amplificado correctamente.

## Control interno

Para una mayor seguridad y comodidad en el proceso, se incluye un ensayo de control interno en forma de un juego de primer/sonda adicional en la mezcla maestra. De este modo se puede supervisar la amplificación.

# Protocolo: RT-PCR en tiempo real para la detección de ARN de los subtipos H5, H7 y H9 del Influenza A virus

## Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea el apartado “Notas importantes”, en la página 10 antes de comenzar.
- Incluya como mínimo un control positivo (Positive Control) y un control negativo (Negative Control) para cada serie de PCR.
- Antes de comenzar el procedimiento, lea detenidamente el protocolo y familiarícese con el funcionamiento del termociclador para PCR en tiempo real elegido.
- El ARN es inestable. Lleve a cabo el protocolo sin interrupción.
- **Importante:** Asegúrese de mezclar bien la RT-PCR Mix viscosa antes de su uso.

## Antes de comenzar

- Descongele todos los reactivos en hielo y protéjalos de la luz.
- Conserve los reactivos en hielo o en un bloque de enfriamiento durante la configuración de la Master Mix y la Reaction Mix.
- Antes de utilizarlos, centrifugue brevemente los reactivos.

## Procedimiento

1. Antes de utilizarla, mezcle la RT-PCR Mix invirtiéndola 5 veces o hasta que se mezcle bien y, a continuación, centrifugue brevemente para recoger los líquidos.
2. Prepare la Master Mix de acuerdo a la tabla 1 inmediatamente antes de su uso.

La Master Mix contiene todos los componentes necesarios para una reacción de PCR, excepto la muestra. Prepare un volumen de Master Mix que sea un 10 % mayor de lo que necesita para la cantidad total de reacciones de PCR.

La tabla 1 indica los volúmenes que se necesitan según la cantidad de reacciones. No se recomienda almacenar la Master Mix preparada.

Tabla 1. Preparación de la Master Mix

Componente	Cantidad de reacciones		
	1	24	96
RT-PCR Mix (tapón amarillo)	18 µl	432 µl	1728 µl
Primers/Probes (tapón morado)	2 µl	48 µl	192 µl
<b>Volumen total</b>	<b>20 µl</b>	<b>480 µl</b>	<b>1920 µl</b>

3. Mezcle bien la Master Mix preparada (si es posible mezcle con una agitadora vorticial durante poco tiempo) y recoja los fluidos mediante una centrifugación corta.
4. Pipetee 20 µl de la Master Mix en cada tubo de reacción. Después, añada 5 µl de ARN de muestra (tabla 2).

Incluya reacciones de control positivo y negativo.

Positive Control: utilice 5 µl del control positivo (Positive Control) en lugar de ARN de muestra.

Negative Control: utilice 5 µl del control negativo (Negative Control) en vez de ARN de muestra.

Tabla 2. Preparación de la Reaction Mix

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
Master Mix	20 µl
Muestra	5 µl
<b>Volumen total</b>	<b>25 µl</b>

5. Cierre los tubos de reacción con los tapones correspondientes e **invierta enérgicamente al menos 5 veces**. A continuación, centrifugue brevemente para recoger los líquidos.
6. Defina los filtros para los marcadores indicador en el software del termociclador de acuerdo con la tabla 3.

Tabla 3. Configuración de los filtros para el indicador

<b>Patógeno/control interno</b>	<b>Indicador</b>
Influenza A subtipo H5	FAM
Influenza A subtipo H7	HEX/ JOE™ <sup>1</sup>
Influenza A subtipo H9	Cy5
Internal Control	Texas Red/ROX™ <sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Utilice la opción apropiada para su termociclador.

<sup>2</sup> ROX como uso de marcador de referencia interna **debe desactivarse** para su uso con ABI PRISM® Sequence Detection Systems (Applied Biosystems®)

7. Ejecute el protocolo RT-PCR en tiempo real según la tabla 4.

Tabla 4. Protocolo de RT-PCR en tiempo real para Influenza A H5/H7/H9

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
<b>Transcripción inversa</b>	50 °C	10 min	1
<b>Activación inicial</b>	95 °C	2 min	1
<b>Ciclado en 2 pasos</b>			
Desnaturalización	95 °C	5 s	40
Hibridación/extensión*	60 °C	30 s	

\* Recopilación de datos de fluorescencia, tiempo de análisis aproximado 67 min (Stratagene Mx3005P)

# Análisis e interpretación de los datos

## Interpretación de los resultados

Para que el ensayo sea válido, la fluorescencia FAM, HEX, Cy5 y Texas Red del Positive Control deben emitir una señal con un  $C_T^1 < 35$ . El Negative Control debe emitir una señal de fluorescencia Texas Red y no debe mostrar una señal en los canales FAM, HEX y Cy5.

Los resultados siguientes pueden obtenerse si se trabaja con muestras no conocidas. Los resultados posibles de las muestras también se resumen en la tabla 5 en la página 19.

**Nota:** Tenga en cuenta que, según el termociclador utilizado, puede aparecer interferencia entre los canales de fluorescencia (p. ej., Rotor-Gene Q, AriaMx). A la hora de analizar los datos, active la opción “*crosstalk correction/ crosstalk compensation*” (Corrección de interferencia / compensación de interferencia). Puede obtener más información en el documento de información técnica específica del producto o poniéndose en contacto con el equipo de asistencia técnica de INDICAL a través del correo electrónico [support@indical.com](mailto:support@indical.com).

**Para que la muestra se considere positiva para el Influenza A virus subtipo H5 y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:**

- La muestra emite una señal en los canales FAM y Texas Red.
- El Positive Control emite una señal en todos los canales.
- El Negative Control no emite ninguna señal en los canales FAM, HEX y Cy5.

---

<sup>1</sup> Ciclo umbral ( $C_T$ ): ciclo en que el gráfico de amplificación cruza el umbral, es decir, cuando aparece el primer aumento claramente detectable de la fluorescencia

**Para que la muestra se considere positiva para el Influenza A virus subtipo H7 y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:**

- La muestra emite una señal en los canales HEX y Texas Red.
- El Positive Control emite una señal en todos los canales.
- El Negative Control no emite ninguna señal en los canales FAM, HEX y Cy5

**Para que la muestra se considere positiva para el Influenza A virus subtipo H9 y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:**

- La muestra emite una señal en los canales Cy5 y Texas Red.
- El Positive Control emite una señal en todos los canales.
- El Negative Control no emite ninguna señal en los canales FAM, HEX y Cy5.

**Importante:** una muestra puede dar un resultado positivo para más de un subtipo. A continuación, se obtendrán resultados positivos en los canales FAM y/o HEX y/o Cy5, además de la señal de fluorescencia de Texas Red. Puede encontrar información sobre una interpretación detallada de los posibles resultados en la tabla 5 en la página 19.

Tenga en cuenta que unas concentraciones muy altas de ARN de Influenza A en la muestra pueden reducir la señal del control interno (Texas Red) o incluso suprimirla debido a la competencia.

**Para que la muestra se considere negativa para los subtipos H5, H7 y H9 del Influenza A virus y el ensayo sea válido, deben cumplirse los criterios siguientes:**

- La muestra emite una señal únicamente en el canal Texas Red.
- El Positive Control emite una señal en todos los canales.
- El Negative Control no emite ninguna señal en los canales FAM, HEX y Cy5.

Una señal positiva de Texas Red excluye la posibilidad de inhibición, ya que el control interno se ha amplificado correctamente.

**Para que los resultados de la muestra se consideren no concluyentes y el ensayo no sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:**

- La muestra no emite ninguna señal en ninguno de los canales.

Si no se detecta ninguna señal, incluso del canal Texas Red (control interno), el resultado se considera no concluyente. La ausencia de señal para el gen constitutivo indica la inhibición de la PCR u otro error.

Para realizar una comprobación de inhibición, recomendamos una dilución de 1:5 de ARN de muestra en agua sin nucleasas.

Compruebe que no haya una señal de fluorescencia en los canales FAM, HEX, Cy5 y Texas Red para la reacción del control positivo (Positive Control). La ausencia de señal para el Positive Control indica que se ha producido un error, que podría deberse a una configuración incorrecta de la mezcla de reacción o a condiciones inadecuadas de los ciclos.

Tabla 5. Tabla de interpretación de resultados\*

<b>FAM</b>	<b>HEX</b>	<b>Cy5</b>	<b>Texas Red/ROX (IC)</b>	<b>Resultado de la muestra</b> Positivo en Influenza A subtipo
X			(X)	H5
	X		(X)	H7
		X	(X)	H9
X	X		(X)	H5 y H7
X		X	(X)	H5 y H9
	X	X	(X)	H7 y H9
X	X	X	(X)	H5 y H7 y H9
			X	Negativo en H5 y H7 y H9
				No concluyente

\* La interpretación de los resultados de las muestras puede determinarse siempre que se realicen reacciones de control positivo y negativo. El Positive Control debe emitir una señal en los canales FAM, HEX, Cy5 y Texas Red. El Negative Control debe emitir una señal en el canal Texas Red y ninguna señal en los canales FAM, HEX y Cy5. Para obtener una explicación detallada de los resultados posibles de las muestras, consulte el apartado “Análisis e interpretación de los datos” en la página 16.

INDICAL ofrece una amplia gama de kits para ELISA así como kits para PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real para la detección de patógenos de animales.

Visite [www.indical.com](http://www.indical.com) para obtener más información sobre productos afosa, bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype, Svanovir y virotype.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o el manual del usuario del kit de INDICAL correspondiente.

## Notas

## Acuerdo de licencia limitada para el virotype Influenza A H5/H7/H9 RT-PCR Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. INDICAL no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual y los protocolos adicionales disponibles en [www.indical.com](http://www.indical.com). Algunos de estos protocolos adicionales los han proporcionado usuarios de INDICAL para usuarios de INDICAL. INDICAL no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, INDICAL no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, INDICAL no garantiza que este kit y/o su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. INDICAL niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas. INDICAL se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidos los costes procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite [www.indical.com](http://www.indical.com).

**Marcas comerciales:** afosa, bactotype<sup>®</sup>, cador<sup>®</sup>, cattletype<sup>®</sup>, flocktype<sup>®</sup>, pigtype<sup>®</sup>, Svanovir<sup>®</sup>, virotype<sup>®</sup> (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); ABI PRISM<sup>®</sup> (Applied Biosystems); FAM<sup>™</sup>, HEX<sup>™</sup>, JOE<sup>™</sup>, ROX<sup>™</sup> (Life Technologies Corporation); Cy<sup>®</sup>, FTA<sup>®</sup> (GE-Healthcare); Eppendorf<sup>®</sup> (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH); Aria<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).. Las sondas de las que se ha obtenido licencia han sido fabricadas por Integrated DNA Technologies, Inc. Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

HB-2521-EN-005 © 2020-2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

## Índice de cambios

Manual de uso	Versión	Cambio
HB-2521-EN-005	Diciembre 2022	Procedimiento de especificación (mezcla de reactivos)
HB-2521-EN-004	Marzo 2022	Cambios editoriales
HB-2521-EN-003	Noviembre 2021	Corrección tabla 1, página 13