


|   |   |               |             |
|---|---|---------------|-------------|
|  | <b>Extracción de ADN a partir de Muestras Clínicas para la Detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> | <b>Código</b> | ILA-16 v.00 |
|   |   | <b>Página</b> | 1 de 3      |

## 1. Objetivo y Alcance

El objetivo del presente instructivo es establecer los pasos básicos para el proceso de extracción del ADN de *Mycobacterium tuberculosis* desde muestras provenientes de pacientes con posible diagnóstico de tuberculosis que ingresan al Laboratorio del Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular de la Universidad de Pamplona.

Se indicará la manera mediante la cual se obtendrá el ADN de *Mycobacterium tuberculosis* necesario para realizar el proceso de amplificación.

## 2. Responsable

El proceso será ejecutado por un profesional del área de Bacteriología o Microbiología Clínica, o profesiones afines que tenga experiencia en Biología molecular.

## 3. Definiciones

### 3.1 Cabina de Bioseguridad

Instrumento usado para la protección del personal, la muestra y el medio ambiente al momento de la manipulación de sustancias de riesgo para las personas y para el ambiente. (Fuente: <http://www.ingeniarg.com/blog/29-funcionamiento-de-las-cabinas-de-bioseguridad>)

### 3.2 Vórtex

Equipo que agita y mezcla diferentes tipos de fluidos. (Fuente: <https://www.balanzascobos.com/htm/productos/ofertas/agitador-para-tubos-de-ensayo-Vortex-Mixer.htm>)


### 3.3 Lisis

Proceso mediante el cual se rompe la membrana plasmática y se liberan los elementos celulares. (Fuente: <https://www.lifeder.com/lisis-celular/>)

Las demás definiciones que aplican para el presente Documento se encuentran contempladas en la **Norma NTC ISO 9001 vigente Sistema de Gestión de la Calidad. Fundamentos y vocabulario.**


| Elaboró                                   |                     | Aprobó                        |                     | Validó                                 |                          |
|---|---------------------|-------------------------------|---------------------|--|--------------------------|
| Firma<br>Monica Alexandra Bustos Carvajal |                     | Firma<br>Freddy Solano Ortega |                     | Firma<br>Mabel Johanna Coronel Acevedo |                          |
| <b>Fecha</b>                              | 14 de julio de 2021 | <b>Fecha</b>                  | 14 de julio de 2021 | <b>Fecha</b>                           | 22 de septiembre de 2021 |

\*\*\*INFORMACIÓN DOCUMENTADA NO CONTROLADA\*\*\*

|   |   |               |             |
|---|---|---------------|-------------|
|  | <b>Extracción de ARN a partir de Muestras Clínicas para la Detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> | <b>Código</b> | ILA-16 v.00 |
|   |   | <b>Página</b> | 2 de 3      |

#### 4. Contenido

| N° DE ACTIVIDAD | ACTIVIDADES   | RESPONSABLE                      |
|-----------------|---|----------------------------------|
| <b>1</b>        | <b>LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN</b>  |                                  |
| <b>1.1</b>      | El bacteriólogo encargado del área de extracción una vez ingresa a su horario laboral debe dirigirse al área dispuesta como Vestier con la finalidad de colocarse la indumentaria apropiada para el procesamiento de la muestra (bata, uniforme antifuído, elementos de protección personal como tapabocas N95, Careta o Gafas de protección Ocular, y guantes), una vez esté listo procede al área de extracción.  | Profesional responsable del área |
| <b>1.2</b>      | Se ingresa al área de extracción y todos los días antes de iniciar cualquier procedimiento se debe realizar la limpieza y desinfección de las superficies donde se realizarán las actividades propias de la extracción, desinfectando cabinas de bioseguridad, mesones y materiales a utilizar como las micropipetas, usando para estas áreas Hipoclorito de sodio 0,5% y Etanol 70%. Adicionalmente se alistan los elementos que se usan durante el procesamiento como pipetas, frascos o bolsas de descarte con el respectivo inactivador como lo es el hipoclorito y demás elementos necesarios. | Profesional responsable del área |
| <b>1.3</b>      | Una vez se han desinfectado áreas e instrumentos de uso se procede a colocar por 30 a 60 minutos Luz ultravioleta con la finalidad de terminar el proceso de desinfección del área antes de procesar.   | Profesional responsable del área |
| <b>2</b>        | <b>PROCESO</b>  |                                  |
| <b>2.1</b>      | Utilice el mini kit QIAamp de Qiagen<br><br>La cantidad de muestra a usar es 200 ul, las muestras pequeñas deben ajustarse a 200 µl con PBS antes de cargarlas. Para muestras de más de 200 µl, la cantidad de tampón de lisis y otros reactivos añadidos a la muestra antes de la carga debe aumentarse proporcionalmente.<br><br>Caliente 200 ul de la muestra en cuando se refiera a muestras respiratorias  | Profesional responsable del área |
| <b>2.2</b>      | Agregue 200 ul de tampón AL, agitar en vórtex durante 15 segundos.  | Profesional responsable del área |
| <b>2.3</b>      | Incubar a 56 ° C durante 10 minutos.  | Profesional responsable del área |
| <b>2.4</b>      | Centrifugue el recipiente que contiene la muestra con la finalidad de eliminar las gotas que se puedan encontrar adheridas a la tapa  | Profesional responsable del área |
| <b>2.5</b>      | Agregar 200 ul de etanol grado molecular a la muestra para posteriormente mezclar y agitar en el vórtex durante 15 seg. Después de mezclar, centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.   | Profesional responsable del área |
| <b>2.6</b>      | Aplicar la mezcla (620 ul) a la columna de centrifugado QIAamp Mini intentando no mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000g (8000 rpm) durante 1 minuto. Coloque la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de recolección limpio de 2 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado.  | Profesional responsable del área |
| <b>2.7</b>      | Abrir la columna de centrifugado QIAamp Mini y agregar 500 ul de Buffer AW1 sin mojar. Cierre la tapa y centrifugue a 6000g (8000 rpm) durante 1 minuto. Coloque la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de recolección limpio de 2 ml y deseche el tubo de recolección que contiene el filtrado.   | Profesional responsable del área |

|   |   |               |             |
|---|---|---------------|-------------|
|  | <b>Extracción de ARN a partir de Muestras Clínicas para la Detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> | <b>Código</b> | ILA-16 v.00 |
|   |   | <b>Página</b> | 3 de 3      |

|      |   |                                  |
|------|---|----------------------------------|
| 2.8  | <p>Abrir la columna de centrifugado QIAamp Mini y agregar 500 ul de Buffer AW2. Cerrar la tapa y centrifugar a máxima velocidad (20.000 X go 14.000 rpm) durante 3 minutos.</p>   | Profesional responsable del área |
| 2.9  | <p>Recomendado: ubicar la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de recolección nuevo de 2 ml y descartar el tubo de recolección anterior con el filtrado. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.</p>   | Profesional responsable del área |
| 2.10 | <p>Ubicar la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado. Abrir la columna de centrifugado QIAamp Mini y agregar 50 ul de Buffer AE. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 6000g (8000 rpm) durante 1 minuto.</p>   | Profesional responsable del área |
| 2.11 | <p>El ADN purificado podrá usarse de inmediato y deberá entregarse al área de mezcla para su procesamiento, de no usarse inmediatamente podrá ser almacenado a -20°C durante una semana o -80°C durante 5 años<br/>Si se va a almacenar el ADN purificado, se recomienda la elución en Tampón AE (Tris · Cl 10 mM; EDTA 0,5 mM; pH 9,0) y se recomienda el almacenamiento entre -30 y -15 ° C. Si el pH alto o el EDTA afectan la muestra use agua para la elución. Sin embargo, asegúrese de que el pH del agua sea de al menos 7,0 (el agua desionizada de determinadas fuentes puede ser ácida). El ADN almacenado en agua está sujeto a degradación por hidrólisis ácida.</p> | Profesional responsable del área |
| 2.12 | <p>Como todo proceso una vez finalizado se debe realizar la desinfección y limpieza de las áreas usadas para ello deberán limpiar con Hipoclorito de sodio 0,5% y Etanol 70%, y posteriormente se aplicará luz Ultravioleta tanto a la cabina de bioseguridad y al área de extracción.<br/>Se deberá cumplir con el diligenciamiento de los formatos FLA-66 “Monitoreo de luz Ultravioleta”, FLA-63 “Monitoreo Temperatura Ambiental” FLA-64 “Monitoreo Humedad Ambiental” del área de extracción.</p>  | Profesional responsable del área |

## 5. Documentos de Referencia

- NTC ISO 9000 vigente Sistema Integrado de Gestión. Fundamentos y vocabulario.
- NTC ISO 9001 vigente Sistema Integrado de Gestión. Requisitos.
- Ley 962 de 2005 “Antitrámites”
- Ley 594 de 2000 Archivo General de la Nación
- QIAamp DNA Mini Kit Disponible en:  
<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en> QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. For DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, dried blood spots (QIAamp DNA Mini Kit only),

## 6. Historia de Modificaciones

| Versión | Naturaleza del Cambio | Fecha de Aprobación | Fecha de Validación |
|---------|-----------------------|---------------------|---------------------|
|         |                       |                     |                     |
|         |                       |                     |                     |

## 7. Anexos

No aplica