

	<b>Montaje y Lectura de PCR en Tiempo Real para la Detección del complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en QuantStudio 5</b>	<b>Código</b>	ILA-19 v.00
		<b>Página</b>	1 de 3

## 1. Objetivo y Alcance

Se presenta en este instructivo los pasos necesarios para realizar el montaje y la lectura de la PCR en tiempo real teniendo en cuenta las recomendaciones del kit de PCR para *Mycobacterium tuberculosis* de la casa comercial GeneProof para la para la detección del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* desde el ADN bacteriano obtenido de muestras clínicas sospechosas y la utilización del equipo QuantStudio 5 en el laboratorio del Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular de la Universidad de Pamplona.

## 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 Placa

Contenedor cuya finalidad será observar el comportamiento de las muestras biológicas evaluadas.

### 3.2 Prueba PCR en tiempo real

Técnica de Laboratorio denominada reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. (Fuente: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>)


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.**

## 4. Contenido


N° DE ACTIVIDAD	ACTIVIDADES	RESPONSABLE
1	<b>PREPARACIÓN DEL EQUIPO</b>	
1.1	El bacteriólogo encargado del área de amplificación una vez proceda al área de amplificación debe dirigirse al área dispuesta como Vestier con la finalidad de colocarse la indumentaria apropiada para el procesamiento de la muestra (bata, uniforme antifluido, elementos de protección personal como tapabocas N95, Careta o Gafas de protección Ocular, y guantes), una vez esté listo procederá al área de mezcla	Profesional responsable del área

Elaboró		Aprobó		Validó	
Firma Monica Alexandra Bustos Carvajal		Firma Freddy Solano Ortega		Firma 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>Montaje y Lectura de PCR en Tiempo Real para la Detección del complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en QuantStudio 5</b>	<b>Código</b>	ILA-19 v.00
		<b>Página</b>	2 de 3

	para recibir el cooler que contiene la placa o las tiras de strip que se dispondrán en el equipo.	
<b>1.2</b>	Antes de iniciar el proceso el profesional debe realizar la limpieza adecuada del termociclador y del equipo anexo a él.	Profesional responsable del área
<b>1.3</b>	Para dar inicio al proceso de amplificación se debe encender primero el computador anexo al termociclador y una vez encendido el mismo se procede a encender el termociclador QuantStudio 5. Una vez se han prendido los equipos el profesional debe realizar la programación en el mismo. Este proceso se deberá realizar con anterioridad para que el termociclador alcance la temperatura óptima de la placa 105°C	Profesional responsable del área
<b>1.4</b>	Para realizar la carga de las tiras o placa se debe acceder al menú de termociclador y seleccionar la opción de apertura de la bandeja sobre la cual se colocarán las muestras.	Profesional responsable del área
<b>1.5</b>	El profesional se debe cerciorar que los tubos estén bien tapados y distribuidos de manera adecuada en la placa del termociclador.	Profesional responsable del área
<b>2</b>	<b>INCLUSIÓN DE LA PROGRAMACIÓN EN EL TERMOCICLADOR</b>	
<b>2.1</b>	En el escritorio se encuentra el programa QuantStudio™ Design & Análisis Software v1.5.1.	Profesional responsable del área
<b>2.2</b>	Se elige la pestaña Properties y se incluye la información que solicita de acuerdo al estudio que se realizará (curva estándar)	Profesional responsable del área
<b>2.3</b>	Se selecciona la pestaña de Method, colocando el perfil térmico a trabajar en la PCR: <ul style="list-style-type: none"> <li>I. 37°C por 2 minutos</li> <li>II. 95°C por 10 minutos</li> <li>III. 45 ciclos de (i) 95°C por 5 segundos; (ii) 60°C por 40 segundos y 72°C por 20 segundos.</li> <li>IV. 4°C infinito</li> </ul>	Profesional responsable del área
<b>2.4</b>	Una vez se ha organizado el perfil térmico debe desplazarse a la pestaña de plato y ahí realizar el mapa que previamente se ha diseñado en el área de master mix y mezcla.	Profesional responsable del área
<b>2.5</b>	Adicionalmente se programarán los blancos a detectar de acuerdo al protocolo siendo necesario la detección del complejo M. tuberculosis y consecuentemente la detección del control de la extracción	Profesional responsable del área
<b>2.6</b>	Para dar inicio al proceso se debe escoger la opción Run en el Menú, y dar click en la opción STAR RUN (CEDIMOL) que se encuentra en el margen superior derecho, y se esperan 1h 5 min a la corrida del programa.	Profesional responsable del área
<b>2.7</b>	Una vez finaliza la corrida se procede a la pestaña de resultados se selecciona la forma de visualización de los mismos y se procede a la lectura de controles y posteriormente de muestras	Profesional responsable del área
<b>3</b>	<b>VALIDACIÓN DE RESULTADOS</b>	
<b>3.1</b>	Para proceder a la validación de los resultados se procede a visualizar el comportamiento de la curva sigmoide de cada uno de los pozos, verificando los siguientes controles: <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Control positivo con curva sigmoide</li> <li>2. Control interno con un CT &lt;38</li> <li>3. Control negativo sin detección en amplificación.</li> </ul> <p><b>NOTA:</b> Sólo serán validadas las muestras que cumplan con las características anteriores.</p>	Profesional responsable del área

	<b>Montaje y Lectura de PCR en Tiempo Real para la Detección del complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en QuantStudio 5</b>	<b>Código</b>	ILA-19 v.00
		<b>Página</b>	3 de 3

<b>3.2</b>	Para reportar cada una de las muestras se deber realizar la validación inicialmente de la corrida indicando que se aprueba el control positivo, el negativo, el control del master mix y el control de extracción.	Profesional responsable del área
<b>3.3</b>	Aquellas muestras sospechosas cuyo Ct sea superior a los 37 ciclos, se sugiere realizar nuevamente el proceso de extracción de la muestra	Profesional responsable del área
<b>3.4</b>	Se procede a reportar en el programa de validación del área de amplificación para posteriormente ser reportado en el software CEDIMOL -UP y por último emitirse el reporte al software del INS	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.
- QuantStudio 5 Brochure
- GeneProof Mycobacterium tuberculosis PCR Kit

## 6. Historia de Modificaciones

<b>Versión</b>	<b>Naturaleza del Cambio</b>	<b>Fecha de Aprobación</b>	<b>Fecha de Validación</b>

## 7. Anexos

No Aplica