

	Preparación de Tiras o Tubos con 1-step RT-PCR Polymerasa Mix TIB MOLBIOL para la Detección de SARS CoV-2	Código	ILA-08 v.00
		Página	1 de 3

1. Objetivo y Alcance

En este protocolo se establecen los lineamientos para la preparación adecuada del Master Mix o mezcla que contiene la enzima Polimerasa de 1-step RT-PCR Polymerasa Mix TIB kit y los primers y sonda para la detección del SARS-CoV2 a partir de RNA viral obtenido de muestras clínicas en el laboratorio del Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular de la Universidad de Pamplona.

El propósito es la adecuada preparación del Master Mix que permita la síntesis de cDNA que sirva para la detección de los genes E y RdRp según el protocolo Charite - Berlín y que llevaran a la identificación de SARS-CoV2.

2. Responsable

El responsable de ejecutar el presente procedimiento es un profesional en el área de Bacteriología y Laboratorio Clínico y/o Microbiología y Bioanálisis Clínico con experiencia en Biología Molecular

3. Definiciones

3.1 Placa

Recipiente utilizado para poder observar diferentes tipos de muestras biológicas

3.2 Prueba RT-qPCR

Técnica de Laboratorio denominada reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa.

(Fuente: <https://web.archive.org/web/20120106172047/http://www.rtpcr.co.uk/>)

3.3 Cabina de flujo laminar

Básicamente es un espacio, mediante el cual se le da un tratamiento específico al aire, permitiendo trabajar en una zona con un control estricto de partículas no viales extremando el control de contaminación.

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 Diana Patricia Bohada Lizarazo		Firma Freddy Solano Ortega		Firma Jhon Arvery Arenas	
Fecha	30 de septiembre de 2020	Fecha	19 de marzo de 2021	Fecha	25 de marzo de 2021

INFORMACIÓN DOCUMENTADA NO CONTROLADA

	Preparación de Tiras o Tubos con 1-step RT-PCR Polymerasa Mix TIB MOLBIOL para la Detección de SARS CoV-2	Código	ILA-08 v.00
		Página	2 de 3

4. Contenido

N° DE ACTIVIDAD	ACTIVIDADES	TIEMPO	RESPONSABLE																
1	PREPARACIÓN																		
1.1	<p>Antes de iniciar atemperar los reactivos incluidos en el Kit</p> <p>a. Ponerse los elementos de protección personal antes de iniciar el trabajo.</p> <p>b. Desinfectar la superficie de trabajo con alcohol antiséptico al 70%</p> <p>c. Preparar el Master Mix de PCR como se indica a continuación</p>	10 minutos	Profesional responsable del área																
1.2	<p>Se realiza el cálculo de los volúmenes de reactivos a adicionar multiplicando por el número de muestras a procesar, de acuerdo con la tabla que se presenta a continuación:</p> <table border="1" data-bbox="483 821 922 1041"> <thead> <tr> <th>Componente</th> <th>Volumen por reacción</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>gPCR Mix 2X</td> <td>10,0 µl</td> </tr> <tr> <td>Primer-sonda Gen E/Gen RdRp</td> <td>0,5 µl</td> </tr> <tr> <td>Control reacción</td> <td>0,5 µl</td> </tr> <tr> <td>Agua libre Nucleasas</td> <td>4,0 µl</td> </tr> <tr> <td>Volumen Master Mix</td> <td>15 µl</td> </tr> <tr> <td>ARN/Control Positivo / Control Negativo</td> <td>5 µl</td> </tr> <tr> <td>Volumen Total</td> <td>20 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>Se registran los cálculos y el mapa de la posición de las muestras en el cuaderno de registro diario de Preparación de Master Mix</p>	Componente	Volumen por reacción	gPCR Mix 2X	10,0 µl	Primer-sonda Gen E/Gen RdRp	0,5 µl	Control reacción	0,5 µl	Agua libre Nucleasas	4,0 µl	Volumen Master Mix	15 µl	ARN/Control Positivo / Control Negativo	5 µl	Volumen Total	20 µl	5 minutos	Profesional responsable del área
Componente	Volumen por reacción																		
gPCR Mix 2X	10,0 µl																		
Primer-sonda Gen E/Gen RdRp	0,5 µl																		
Control reacción	0,5 µl																		
Agua libre Nucleasas	4,0 µl																		
Volumen Master Mix	15 µl																		
ARN/Control Positivo / Control Negativo	5 µl																		
Volumen Total	20 µl																		
1.3	Se limpia cuidadosamente la superficie de trabajo y las pipetas con suficiente alcohol y secar con servilletas. Encender la luz ultravioleta durante 15 minutos antes de iniciar la PCR.	15 minutos	Profesional responsable del área																
2	PROCESO																		
2.1	Se toma un vial de 1,5 ml y marcar como MM (Master Mix).	1 minutos	Profesional responsable del área																
2.2	Se seleccionan tubos de PCR de 0.2 ml (tiras x 8 tubos) o platos de PCR (96 pozos) estériles de acuerdo con el número de muestras a procesar. Se ubican los strips o la placa de PCR en el cooler de acuerdo con lista de trabajo. Se registra la posición de cada muestra de la lista del mapa de la corrida del software del termociclador	10 minutos	Profesional responsable del área																
2.3	Se retira del congelador los reactivos a utilizar y se procede a colocarlos en la gradilla de refrigeración. Se prepara la Master Mix siguiendo los cálculos realizados previamente. Se mezcla en vortex antes de agregar cada reactivo, excepto la Taq polimerasa.	10 minutos	Profesional responsable del área																
2.4	Adicione 20 µl de la MM a cada tubo de PCR.	10 minutos	Profesional responsable del área																
2.5	Llevar la placa con el mix de PCR al área de carga de RNA.	1 minuto	Profesional responsable del área																

	Preparación de Tiras o Tubos con 1-step RT-PCR Polymerasa Mix TIB MOLBIOL para la Detección de SARS CoV-2	Código	ILA-08 v.00
		Página	3 de 3

2.6	Se limpia el área de trabajo y las micropipetas con Etanol 70% y prender Luz UV por 15 min	15 minutos	Profesional responsable del área
2.7	Llenar formatos FLA-66 "Monitoreo de Luz Ultravioleta" FLA-63 "Monitoreo Temperatura Ambiental", FLA-64 "Monitoreo Humedad Ambiental"	15 minutos	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.
- TIB MOLBIOL - LightMix SarbecoV E-gene plus EAV control Cat No. 40-0776-96
- TIB MOLBIOL - LightMix Modular SARS-CoV-2 (COVID19) RdRp Cat No.53-0777-96
- TIB MOLBIOL - Liophilized 1 -step RT-PCR Polymerase Mix Cat No. 90-9999-96

6. Historia de Modificaciones

Versión	Naturaleza del Cambio	Fecha de Aprobación	Fecha de Validación

7. Anexos

No aplica