	Montaje y Lectura de PCR en Tiempo Real para la Detección de SARS-CoV-2 en QuantStudio 5	Código	ILA-10 v.00
		Página	1 de 3

1. Objetivo y Alcance

En este instructivo se establecen los lineamientos para el montaje y la lectura de la RT-PCR en tiempo real siguiendo las recomendaciones del kit 1-step RT-PCR Polymerasa Mix TIB MOLBIOL para la para la detección del SARS-CoV2 a partir de ARN viral obtenido de muestras clínicas y la utilización del equipo QuantStudio 5 en el laboratorio del Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular de la Universidad de Pamplona.

En esta etapa se inicia el proceso de la amplificación de los genes del virus del SARS CoV-2 cuando se programa el Termociclador y se llega a determinar la ausencia o presencia del virus en la muestra del paciente. Una vez ocurre se da la interpretación de una prueba positiva o negativa de acuerdo con lo obtenido.

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/>)

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

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

	Montaje y Lectura de PCR en Tiempo real para la Detección de SARS-CoV-2 en QuantStudio 5	Código	ILA-10 v.00
		Página	2 de 3

N° DE ACTIVIDAD	ACTIVIDADES	TIEMPO	RESPONSABLE
1	PREPARACIÓN DEL EQUIPO		
1.1	Ponerse los elementos de protección personal antes de iniciar el trabajo.	10 minutos	Profesional responsable del área
1.2	Se realiza asepsia de manos y de la zona del equipo con alcohol antiséptico al 70%.	10 minutos	Profesional responsable del área
1.3	Enciende el termociclador QuantStudio 5 y posteriormente el computador. El equipo se puede programar desde el computador, abriendo el programa QuantStudio™ Design & Analisis Software. En el termociclador no sale ningún aviso	10 minutos	Profesional responsable del área
1.4	Para colocar los tubos en el equipo, el bloque de 96 tubos es motorizado y se abre automáticamente, dando click en el icono de la flecha, en la parte derecha superior de la pantalla del termociclador	2 minutos	Profesional responsable del área
1.5	Tape bien los tubos de reacción, centrifúgelos y no escriba sobre sus tapas. Se colocan en gradilla del equipo para ingresarlos en el bloque motorizado	2 minutos	Profesional responsable del área
2	PROGRAMACIÓN DE LA CORRIDA EN EL TERMOCICLADOR		
2.1	Se abre el programa QuantStudio™ Design & Analisis Software v1.5.1.	10 minutos	Profesional responsable del área
2.2	Se selecciona la pestaña Properties y diligencia la información que solicita	2 minutos	Profesional responsable del área
2.3	Se selecciona la pestaña de Method, colocando el perfil térmico a trabajar en la PCR: Gen E: I. 55°C por 10 minutos II. 94°C por 3 minutos III. 45 ciclos de (i) 94°C por 15 segundos; (ii) 58°C por 30 segundos. Gen RdRP: I. 55°C por 10 minutos II. 94°C por 3 minutos III. 45 ciclos de: (i) 94°C por 15 segundos; (ii) 58°C por 30 segundos.	15 minutos	Profesional responsable del área
2.4	Se selecciona Plate y para programar seleccionar Advanced Setup y en Targets se adicional con el icono de (+ Add) los targets que se deseen trabajar con sus respectivos reporteros, y Quencher y para el ingreso de muestras o controles (positivo o negativo) se adicionan en Sample usando el botón de (+ Add) y allí sobre el nombre que aparece podemos editar la muestra o el control que se va a trabajar.	15 minutos	Profesional responsable del área
2.5	Una vez organizados los targets y las muestras o controles por trabajar se proceden a generar el mapa mediante el cual se trabajará en el equipo, seleccionando el pozo respectivo y en la pestaña Quick Setup, se despliega la muestra a trabajar el target a detectar.	15 minutos	Profesional responsable del área
2.6	Se continúa con la opción Run en el Menu, seleccionando la opción STAR RUN (CEDIMOL) que se encuentra en el margen	5 minutos	Profesional responsable del área

	Montaje y Lectura de PCR en Tiempo real para la Detección de SARS-CoV-2 en QuantStudio 5	Código	ILA-10 v.00
		Página	3 de 3

	superior derecho, y se esperan 1 hora y 15 minutos a la corrida del programa.		
2.7	En la pestaña de resultados se obtienen las respectivas gráficas para cada una de las muestras o controles analizados.	5 minutos	Profesional responsable del área
3	VALIDACIÓN DE RESULTADOS		
3.1	<p>Se debe observar el comportamiento de la curva sigmoide de cada uno de los pozos, verificando los siguientes controles:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Control positivo con valor Ct inferior a 32. 2. Control negativo sin detección en amplificación. 3. Muestras que presenten valor Ct inferior a 32, para el gen EVA <p>NOTA: Sólo las muestras que cumplan con las características anteriores, serán validadas.</p>	Depende del número de muestras procesadas	Profesional responsable del área
3.2	A continuación, se reportan los resultados de las diferentes muestras como Positivas o Negativas de acuerdo con el inserto del kit	Tiempo depende del número de muestras procesadas	Profesional responsable del área
3.3	Las muestras clínicas cuyo Ct sea superior a los 37 ciclos, se recomienda realizar extracción nuevamente de la muestra	10 minutos	Profesional responsable del área
3.4	Las muestras que cumplan con los criterios establecidos en la actividad 2.1 y que sean Positivas para el Gen E se confirmaran con el Gen RdRp	15 minutos	Profesional responsable del área
3.5	Se procede a reportar en el software CEDIMOL -UP y luego reportar al software del INS	3 horas	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
- Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases
- Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19)
- Laboratory Guidelines for Detection and Diagnosis of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Infection

6. Historia de Modificaciones

Versión	Naturaleza del Cambio	Fecha de Aprobación	Fecha de Validación

7. Anexos

No Aplica