

# RECOMENDACIONES PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN LOS LABORATORIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR CON BASE A LOS LINEAMIENTOS DEL DOCUMENTO TÉCNICO "PREPARATION OF VIRAL TRANSPORT MEDIUM- Centers for Disease Control and Prevention SOP#: DSR-052-01- 1600 Clifton Road, NE Page 1 of 5 - Atlanta, GA 30333".



## CONSIDERACIONES COVID 19

**Auditoría y Asesoría en Garantía**

**De la Calidad - ACG Ltda.**

**27-03-2020**

**Edición 1, Volumen 1**

### **Requisitos de Calidad Talento Humano**

1. Se debe contar con Usuarios debidamente capacitados y certificados en el montaje de pruebas especiales (PCR).
2. El usuario debe seguir las recomendaciones del fabricante y sujetarse estrictamente al protocolo establecido por la casa comercial que suministra los reactivos, con el fin de no generar cambios que puedan contribuir a la aparición de interferencias.
3. El profesional debe tener la preparación suficiente para realizar la correcta interpretación y correlación de los resultados obtenidos.
4. Los profesionales que van a realizar el montaje de muestras de PCR, deben contar con los elementos de Bioseguridad Personal, requeridos para la técnica (Guantes de nitrilo, gorro, tapabocas (N95), Bata desechable. Diferentes para cada área (Preparación de reactivos y Extracción).

### **Requisitos de Calidad de las Muestras**

1. Tipo de Muestras: Muestras de Origen Respiratorio (Hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos, esputo, aspirados del trato respiratorio inferior, lavados bronco alveolares, y aspirados nasofaríngeos o de tipo nasal).

2. Toma de Muestras: Utilizar para la toma de muestras Hisopos con punta sintética de Nylon o Dacrón, con ejes de aluminio o plástico (No utilizar hisopos de alginato de calcio o algodón o con ejes de madera).

3. Recolección de las muestras: Debe realizarse por un profesional capacitado; de no hacerlo así, se puede ver afectada la calidad de la muestra con la posibilidad de obtención de resultados Falsos Negativos. Es de resaltar que se debe tomar una cantidad considerable de muestra, de ser insuficiente la cantidad de microorganismo puede afectar el desarrollo y por ende la obtención de resultados exitosos de la PCR.

4. Consideraciones Especiales para tratamiento de Muestras con alto contenido Mucoide: Utilizar una solución que permita la licuefacción del moco en las muestras, con el fin de no tener interferencias durante el montaje de la prueba de Biología Molecular.

5. Transporte de las Muestras: Para el transporte de las muestras, debe emplearse un medio de transporte viral con todos los componentes necesarios para evitar cualquier tipo de contaminación micro-

biológica. Así mismo, realizar control microbiológico de esterilidad de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Es de resaltar que posterior a su preparación, es importante NO CONGELAR, dispensar en alícuotas de aproximadamente 3 ml, almacenar a una temperatura de 2-8°C y rotular el medio de cultivo con la fecha de preparación, puesto que su estabilidad es de un año a partir de la fecha de preparación.

6. Manipulación de las Muestras: Se debe tener en cuenta que inmediatamente tomada la muestra, es necesario emplear tubos estériles con el medio de transporte para ser llevado al laboratorio o al sitio donde se vaya a realizar el procesamiento.

7. Almacenamiento de Muestras: Las muestras deben ser almacenadas de 2 a 8°C hasta por 72 horas post recolección. Si dentro de las 72 horas, las muestras no son procesadas, se deben almacenar a -70°C.

8. Evitar ciclos de congelación y descongelación de las muestras.

### **Requisitos de Calidad del Área**

1. Su laboratorio debe tener dos espacios adecuados para el procesamiento de la PCR, debidamente delimitados y separados con el fin de evitar contaminación cruzada (Área de Extracción y área de Preparación de Reactivos).

2. Si su laboratorio cuenta con luz UV en el área es importante encenderla por lo menos 10 Minutos antes de empezar el procesamiento, teniendo cuidado especial de no irradiar los reactivos y las muestras.

3. Se debe realizar la limpieza del área y todo lo que se va a utilizar durante el procedimiento (Equipos, áreas, pipetas, etc), una vez con agua desionizada o destilada para limpiar las DNAsas del ambiente y posterior a ello, realizar una limpieza con Etanol al 70% con el fin de minimizar el riesgo de contaminación por ácidos nucleicos.

4. Si su laboratorio no cuenta con luz UV, pero sigue las recomendaciones antes descritas, obtendrá un espacio limpio y dispuesto para trabajar sin fuentes probables de contaminación.

5. Utilice un juego de pipetas y puntas específico para cada área (Preparación de reactivos y Extracción).



### **Requisitos de Calidad de los Reactivos**

1. Tenga en cuenta las recomendaciones de almacenamiento de los reactivos sugeridos por la casa comercial.

2. Los reactivos cuya presentación sea liofilizada, deben ser reconstituidos con Agua Estéril libre de RNAsas (50x), suministrada por la casa comercial. Los reactivos deben ser hidratados como mínimo 15 minutos a temperatura ambiente.

3. Evitar ciclos de congelación y descongelación de los reactivos.

4. Cuando esté descongelando sus reactivos, utilizar hielo seco y mantener en frío con el fin de respetar la cadena de frío.

5. Los reactivos deben manipularse en el área limpia (Preparación de reactivos) y en Oscuridad,

puesto que los primers o cebadores requieren dicho manejo para que no haya degradación de sus componentes.

6. La mezcla de los reactivos debe hacerse de forma suave.

7. Si va a realizar alícuotas de reactivos, Hágalo uno a uno, en oscuridad, refrigere de 2 a 8°C y Nunca congele.

8. No utilice reactivos vencidos.

9. Monitoree constantemente el rendimiento de los reactivos y los ensayos.

### **Requisitos de Calidad de Los Controles**

1. Para la preparación de los Controles es necesario realizarlo en área limpia (área de preparación de reactivos) para evitar contaminación.

2. Evitar ciclos de congelación y descongelación.

3. Cuando esté descongelando, mantener en frío con hielo seco.
4. Utilizar Agua libre de RNAasas
5. Desechar siempre aquello que NO utilice.
6. Haga alícuotas de volúmenes pequeños.
7. Cada control debe extraerse y procesarse en cada ejecución.
8. Siempre incluir control positivo y control negativo con cada amplificación y detección.
9. Siempre que se trabaje con muestras clínicas, utilizar matrices provenientes de material humano.

### Requisitos de Calidad Extracción

1. Utilice un reactivo de extracción. Revise las condiciones del fabricante.
2. Verifique si requiere de la utilización de un Buffer de lisis de acuerdo a la técnica que esté empleando.
3. Realice los lavados pertinentes con el Buffer de Lavado tal cual como le indica el protocolo, con el fin de quitar interferencias e inhibidores.
4. Verifique si su técnica necesita de Buffer de Elución y siga las indicaciones del fabricante.
5. Siga paso a paso las indicaciones del Protocolo de Extracción del fabricante.
6. Utilice puntas de filtro nuevas y estériles, para la dispensación de muestras y reactivos.
7. Incluir control de Extracción positivo por cada corrida y cada vez que empiece un nuevo lote de reactivo.

### Requisitos de Calidad Preparación de la Master Mix (Mezcla Maestra) y Amplificación de PCR

1. Recuerde que la preparación de la mezcla maestra varía según la cantidad de muestras, que usted tenga para su procesamiento.
2. Debe prepararse en el espacio dispuesto para tal fin: Preparación de Reactivos.
3. Haga el cálculo necesario para la preparación de la Master mix.
4. Cuando tenga un N de 14 muestras, incluyendo controles, prepare una reacción de más.



5. Cuando tenga un N de más de 15 muestras, incluyendo controles, prepare dos reacciones de más.
6. El volumen final de la reacción de la master mix por muestra es de 15ul. (5ul de Agua+ 5ul de máster mix + 5ul de Primers)
7. Dispense 15ul de master mix en cada uno de los tubos de PCR, utilizando puntas de filtro.
8. Durante el montaje de la corrida, sirva primero el control negativo, luego, sirva sus muestras y termine con el control positivo. Lo anterior garantiza que no vaya a tener ningún tipo de contaminación cruzada.
9. El control negativo siempre debe ser dispensado en el área de preparación de reactivos.
10. El control positivo debe ser dispensado en el área donde se dispensen las muestras.
11. Para Evitar la contaminación cruzada, tape y destape cada tubo de acuerdo a como lo requiera el montaje.
12. No marque los tubos de PCR con Sharpie o marcador, puesto que esto interfiere con la lectura de fluorescencia emitida por el termociclador.
13. Siempre realice una mezcla al terminar de dispensar tanto muestras como reactivos, con el fin de asegurar que el volumen requerido para la reacción quede en el fondo y debidamente homogenizado, de no hacerlo puede obtener resultados inconclusos e inválidos.

### Fallas de Detección en el Procedimiento

1. Extracción inadecuada de Ácidos Nucleicos.
2. Pérdida o degradación de ARN

3. Material celular humano ausente o insuficiente, debido a la mala recolección o pérdida de la integridad de la muestra.
4. Configuración y ejecución de ensayos inadecuada.
5. Mal funcionamiento de los reactivos o del equipo.
6. Pobre amplificación de Primers.
7. Verificar interferencias de medicamentos (Hasta las fechas no reportadas).

## Referencias

PREPARATION OF VIRAL TRANSPORT MEDIUM- Centers for Disease Control and Prevention SOP#: DSR-052-01- 1600 Clifton Road, NE Page 1 of 5 - Atlanta, GA 30333

Primer and Probe Sets- CDC 2019-nCoV Real-Time

RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use under CDC's Emergency Use Authorization (EUA): <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorization>

Processing of Sputum Specimens for Nucleic Acid Extraction - HHS.gov U.S. Department of Health & Human Services - Centers for Disease Control and Prevention CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel - For Emergency Use Only Instructions for Use Catalog # 2019-nCoV-EUA-011000 reactions For In-vitro Diagnostic (IVD) Use Rx Only - CDC-006-00019, Revision: 02 CDC/DDID/NCIRD/ Division of Viral Diseases Effective: 3/15/2020

**TENEMOS LA RESPUESTA QUE USTED NECESITA**



**DRA. ALBA C. GARZON Y SU GRUPO  
ASESOR ACG**

## NUESTROS PRÓXIMOS EVENTOS

### DIPLOMADO

GARANTÍA DE LA CALIDAD CON ÉNFASIS EN CALIDAD ANALÍTICA Y ENFOQUE DE RIESGO

2020

100% VIRTUAL

Inicio del **22 DE ABRIL**  
al **30 DE MAYO del 2020**  
Viernes de **5:00 pm - 9:00 pm**  
Sabados de **8 am a 12 m**

Costo: \$1'950.000

Duración 90 horas.

Comuníquese a las líneas:  
3143584620 - 3114437922