

|  |   |                     |             |
|--|---|---------------------|-------------|
| <br><i>República de Colombia</i><br><i>Gobernación de Santander</i> | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>         BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>         LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>         SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |   | VERSIÓN             | 0           |
|  |   | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |   | PÁGINA              | 1 de 33     |

*República de Colombia*



*Gobernación de Santander*

# MANUAL PARA DETECCIÓN DE BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 2 de 33     |

## TABLA DE CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| 1. OBJETIVO.....  | 4  |
| 2. ALCANCE .....  | 4  |
| 3. RESPONSABILIDADES.....   | 4  |
| 4. DEFINICIONES.....  | 4  |
| 5. CONDICIONES GENERALES .....  | 6  |
| 6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO.....   | 8  |
| 7. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS .....  | 9  |
| 8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA .....   | 10 |
| 9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA .....   | 10 |
| 10. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA .....                                | 11 |
| 10.1. Equipos y materiales .....  | 11 |
| 10.2. Reactivos.....  | 12 |
| 10.2.1. Reactivos para extracción de ácidos nucleicos.....                                      | 12 |
| 10.2.2. Reactivos para PCR en tiempo real .....   | 12 |
| 10.2.3. Reactivos de uso transversal para descontaminación de ácidos nucleicos y limpieza ..... | 12 |
| 10.3. Controles.....  | 12 |
| 10.3.1. Reactivos para controles negativos.....   | 12 |

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 3 de 33     |

|  |    |
|--|----|
| 10.3.2. Reactivos para la adición de controles positivos .....                             | 13 |
| 11. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO .....  | 13 |
| 11.1. Preparación de la muestra .....  | 13 |
| 11.1.1. Hisopado nasofaríngeo y aspirado nasofaríngeo .....                                | 13 |
| 11.1.2. Sonda .....  | 13 |
| 11.2. Extracción de ADN .....  | 14 |
| 11.2.1. Método manual: High Pure PCR Template Preparation Kit.....                         | 14 |
| 11.2.2. Método automatizado: High Pure PCR Template Preparation Reagent Kit – TANBead..... | 16 |
| 11.3. PCR: amplificación de Bordetella spp. B. pertussis, B. parapertussis .....           | 22 |
| 11.3.1. Reconstitución de sondas e iniciadores .....                                       | 22 |
| 11.3.2. Preparación de master mix.....   | 25 |
| 11.3.3. Fase de adición del ADN.....   | 26 |
| 11.4. PCR para ptxS1: confirmación de B. Pertussis .....                                   | 28 |
| 11.4.1. Preparación de master mix.....   | 28 |
| 11.4.2. Fase de adición del ADN.....   | 29 |
| 12. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....  | 29 |
| 12.1. Reglas generales de interpretación de Ct .....                                       | 31 |
| 13. EMISIÓN Y REPORTE DE RESULTADOS .....  | 31 |
| 14. DOCUMENTOS DE REFERENCIA .....   | 32 |
| 15. ANEXOS .....   | 32 |
| 16. CONTROL DE CAMBIOS .....   | 32 |

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 4 de 33     |

## 1. OBJETIVO

Establecer la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la identificación de

- la secuencia de inserción 481 (IS481) de *Bordetella* spp.,
- la secuencia de inserción pIS1001 de *Bordetella parapertussis*,
- del gen de la subunidad 1 de la toxina pertussis (ptxS1)

## 2. ALCANCE

Este documento se tomará como referencia para realizar PCR en tiempo real para búsqueda de *Bordetella* spp, principalmente *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* a partir de muestras nasofaríngeas para el diagnóstico de tos ferina.

## 3. RESPONSABILIDADES

**Coordinador del Laboratorio Departamental de Salud Pública:** se encargará de revisar y aprobar el actual documento, teniendo en cuenta que se cumplan con las normas establecidas, y de esta manera avalar los resultados emitidos por el laboratorio.

**Profesional responsable de la sección de Biología Molecular del Laboratorio Departamental de Salud Pública:** se encargará de aplicar los lineamientos descritos en el documento con estándares de calidad, oportunidad y avalará los resultados que se procesen mediante este ensayo.

## 4. DEFINICIONES

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 5 de 33     |

**Ácido desoxirribonucleico (ADN):** Es un polímero de monómeros de nucleótidos (deoxyadenilato, deoxyguanidilato, deoxycitidilato y timidilato) donde se almacena la información genética y responsable de la transmisión hereditaria.

**Agua grado molecular:** Es agua ultrapura estéril sin DNAsas, RNAsas ni proteasas, sin necesidad de productos químicos como el DEPC (dietilpirocarbonato), un inhibidor de nucleasas tóxico que contamina el agua con iones y compuestos orgánicos.

**Buffer de lavado:** Son aquellas que se oponen a los cambios de pH, cuando se les adicionan ácidos o álcalis (hidróxidos). Su acción se basa principalmente en la absorción de hidrogeniones (H+) o iones hidroxilo (OH-).

**Etanol:** Alcohol que se utiliza para preparación de reactivos. Isopropanol: Alcohol que se utiliza para preparación de reactivos.

**Proteinasa k:** Es una serina proteasa no específica altamente reactiva que pertenece a la familia de proteínas subtilisina. La proteinasa K es capaz de inactivar las RNAsas y las DNAsas y se usa en el aislamiento o preparación de ácidos nucleicos de alto peso Molecular. También es útil para ayudar a caracterizar las enzimas, debido a su especificidad de escisión.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una única copia del fragmento original.

**Termociclador:** Es un equipo del laboratorio de biología molecular, utilizado en la amplificación de las moléculas de ADN mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), debido a que éste, es capaz de realizar ciclos de temperaturas necesarios para que amplifiquen las hebras de ADN.

**Tosferina:** Enfermedad respiratoria bacteriana aguda, prevenible por vacuna, altamente contagiosa, causada por Bordetella pertussis, cuya sintomatología es ocasionada por las toxinas que libera el microorganismo cuando invade el epitelio ciliado respiratorio y afectando el árbol traqueo bronquial del individuo susceptible. Es un bacilo aeróbico, Gram-negativo, pleomórfico, no móvil, que afecta exclusivamente al ser humano y se transmite por partículas de secreciones respiratorias de personas infectadas.

La bacteria B. pertussis se adhiere a las células ciliadas del epitelio nasofaríngeo y del árbol traqueo-bronquial mediante las moléculas de adhesión: hemaglutinina

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 6 de 33     |

filamentosa (HFA), fimbrias, pertactina, y otras proteínas de superficie. Estas, junto con la toxina pertussis (TP), la citotoxina traqueal (CTT), la toxina dermonecrótica (TDN) y la toxina de adenil-ciclasa (TAC), constituyen algunos de los determinantes de patogenicidad. Las manifestaciones clínicas de la tosferina varían según el huésped, y van desde la presencia de tos paroxística con estridor inspiratorio, periodos de apnea y tos emetizante, hasta síntomas leves que pueden ser confundidos con infecciones virales de las vías respiratorias.

## 5. CONDICIONES GENERALES

- El personal encargado del proceso debe estar entrenado en las técnicas de diagnóstico de Biología Molecular, conocer los factores de riesgo biológicos y las condiciones de bioseguridad, conservación y descarte de material biológico.
- Aplicar normas de Bioseguridad durante el procesamiento de muestras respiratorias y utilizar los elementos de protección personal que incluye: traje desechable (Tyvek), bata desechable, polainas, guantes de látex - nitrilo, caretas y protección ocular.
- La confiabilidad de los resultados depende de la adecuada recolección de especímenes, almacenamiento, transporte y procesamiento.
- Esta prueba ha sido validada para muestras respiratorias.
- La sensibilidad del ensayo puede disminuir si las muestras se congelan/descongelan repetidamente o se almacenan durante un período de tiempo más largo.
- Las muestras deben manejarse con las debidas precauciones como material potencialmente infectocontagioso.
- Lea siempre las instrucciones del inserto antes de abrir un estuche nuevo.
- Evite la contaminación microbiana, trabajando con todos los cuidados exigidos bajo las condiciones de bioseguridad tipo 2.
- Los suministros y equipos deben ser de uso dedicado a ciertas áreas de trabajo y no trasladarse de un área a otra.
- No pipetear con la boca.

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|   |  |                     |             |
|---|--|---------------------|-------------|
|  <p>República de Colombia<br/>DEPARTAMENTO DE SALUD<br/>Gobernación de Santander</p> | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|   |  | VERSIÓN             | 0           |
|   |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|   |  | PÁGINA              | 7 de 33     |

- No comer, beber ni fumar en áreas de trabajo de laboratorio. Usar guantes desechables de nitrilo, bata de laboratorio y protección para los ojos al manipular especímenes y reactivos. Lavarse bien las manos después de manipular especímenes y reactivos de prueba.
- Evite la contaminación de reactivos al retirar alícuotas de los tubos de reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta desechables esterilizadas y resistentes a aerosoles.
- No agrupar reactivos de diferentes lotes o tubos en el mismo lote.
- No usar después de su fecha de caducidad.
- No reutilizar artículos desechables.
- La sensibilidad del ensayo puede disminuir si las muestras se congelan/descongelan repetidamente o se almacenan durante un período de tiempo más largo.
- El flujo de trabajo en el laboratorio debe proceder de manera unidireccional.
- Usar guantes desechables y cambiarlos antes de ingresar a otras áreas. Si los guantes se contaminan, cambiarlos inmediatamente.
- Cuidado de no contaminar los reactivos con ácidos nucleicos extraídos, productos de PCR ni controles positivos. Para evitar la contaminación de los reactivos, se recomienda el uso de puntas con filtro.
- Usar áreas de trabajo separadas y segregadas para cada experimento.
- Almacenar materiales positivos separados de los reactivos del kit.
- Se deben seguir los procedimientos de seguridad de laboratorio al manipular los especímenes (consulte Bioseguridad del laboratorio Departamental de Salud Pública, Laboratorios de Microbiología y Biomedicina y los documentos del CLSI). Limpiar y desinfectar completamente todas las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0.5% (en agua desionizada o destilada) y alcohol al 90%. Los componentes del producto (residuos del producto, embalaje) pueden considerarse como residuos de laboratorio. Desechar los reactivos y desechos no utilizados según las regulaciones federales, estatales y locales aplicables.

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|   |  |                     |             |
|---|--|---------------------|-------------|
|  <p>República de Colombia<br/>GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SALUD<br/>Gobernación de Santander</p> | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|   |  | VERSIÓN             | 0           |
|   |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|   |  | PÁGINA              | 8 de 33     |

- No utilice los reactivos transcurrida la fecha de caducidad. Se debe evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que puede afectar a su rendimiento y producir resultados erróneos.
- No modifique el Procedimiento del ensayo ni utilice reactivos de otros fabricantes ni de otros lotes, a menos que se indique que el reactivo pueda utilizarse. No reduzca el tiempo de incubación recomendado.
- Antes del uso, deje que los reactivos y las muestras alcancen una temperatura entre 18°C y 30°C. Después del uso, vuelva a almacenarlos bajo las condiciones antes indicadas.
- Para almacenar los reactivos y las muestras utilice refrigeradores exclusivos para su almacenamiento.
- Ningún reactivo o elemento que este derramado, dañado, averiado y vencido deberá ser utilizado. Si ocurre cualquier contacto con la piel, lave con abundante agua.
- No exponga los reactivos a la luz intensa ni a vapores de hipoclorito durante el almacenamiento o la incubación.

## 6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO

La PCR en tiempo real es una variación de la PCR convencional que permite la cuantificación de genes de interés en cualquier matriz evitando el proceso de la electroforesis. Se emplea una sonda (fragmento de ADN) complementaria a una secuencia intermedia del ADN que se está amplificando. Esta sonda contiene adherida una molécula fluorescente y una inhibidora de fluorescencia en el otro extremo de la sonda llamada "quencher" de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción del ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser excitada por el láser del equipo. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR es proporcional a la cantidad de ADN que se encuentra en el eluido. Para que la técnica tenga validez es necesario tener controles de ADN del blanco de estudio para realizar análisis tanto cualitativos como cuantitativos del gen de interés.

A continuación, se describe la presencia o ausencia de las secuencias de inserción entre las especies de Bordetella como blanco para PCR en el diagnóstico de tos ferina:

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 9 de 33     |

| Presencia/ número de copias por genoma <sup>a</sup> |                     |                         |                    |                                       |   |
|---|---------------------|-------------------------|--------------------|---------------------------------------|---|
| Secuencia de inserción                              | <i>B. pertussis</i> | <i>B. parapertussis</i> | <i>B. holmesii</i> | <i>B. bronchiseptica</i> <sup>b</sup> | Referencias   |
| IS481   | +/>50               | -/NA                    | +/8-10             | (+) <sup>c</sup> /ND                  | Houard S, et al. 1989.<br>Reischl U, et al. 2001.<br>Tatti KM, et al. 2011. |
| pIS1001   | -/NA                | +/~20                   | -/NA               | (+) <sup>d</sup> /1-7                 | Roorda L, et al. 2011.<br>Tatti KM, et al. 2011.<br>van der Zee A, 1996.    |
| hIS1001   | -/NA                | -/NA                    | +/3-5              | -/NA                                  | Antila M, et al. 2006.<br>Tatti KM, et al. 2011.                            |
| IS1002  | +/4-8               | +/9                     | -/NA               | - <sup>e</sup> /1                     | Roorda L, et al. 2011.<br>van der Zee A, 1996.                              |

<sup>a</sup> Símbolos y abreviaciones: +, presente en todos los aislamientos; (+), presente en algunos aislamientos; -, ausente en todos los aislamientos, NA, no aplica; ND, no determinado.  
<sup>b</sup> Aislamientos obtenidos de humanos.  
<sup>c</sup> Uno de 73 aislamientos procedentes de humanos fueron positivos.  
<sup>d</sup> Cuatro de 73 aislamientos procedentes de humanos fueron positivos.  
<sup>e</sup> En ocasiones se encontró en aislamientos procedentes de animales.

**Tabla 1.** Equipos Secuencias de inserción de Bordetella usadas como blanco para PCR (Adaptado de Loeffelholz.2012)

## 7. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

• No se ha definido una región específica de amplificación que pueda ser universalmente recomendada, sin embargo, las dianas de amplificación usadas por el CDC y la OMS como consenso son:

- La secuencia de inserción IS481 de Bordetella spp.
- La secuencia de inserción IS1001 de *B. parapertussis*
- La subunidad 1 del gen de la toxina pertussis ptxS1A.
- La secuencia de inserción hIS1001 de Bordetella holmesii.

• La IS481 es un multicopia en el genoma de la bacteria lo que aumenta la sensibilidad del ensayo, por lo tanto, tenga en cuenta que el líder técnico debe cuidar en cada paso del proceso la manipulación de la muestra (desde la extracción hasta la adición de ADN), para evitar contaminación y obtener resultados falsos positivos. Para ello, tenga en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Cambiarse los guantes en cada procedimiento especialmente cuando se contaminen con muestras para disminuir la contaminación de otras muestras.
- Cuando sospeche que algún proceso este contaminado repita la prueba.
- Mantener equipos, puntas y pipetas separados por procesos.

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 10 de 33    |

## 8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

La detección de especies de Bordetella es adecuada si la muestra es tomada dentro de las etapas catarral y paroxística como también haber sido tomada de la zona posterior de la nasofaringe por la alta concentración de la bacteria en esta zona.

La muestra debe ser tomada antes del tratamiento antimicrobiano o la profilaxis; en el caso que no se hubiera sido posible tomar la muestra durante este lapso, se puede considerar tomar la muestra “post-tratamiento” sí y solo si, se obtiene dentro de las 72 horas siguientes. Toda muestra debe ser etiquetada con los siguientes datos básicos:

- Nombre completo y edad del paciente.
- Número documento de Identificación.
- Fecha de la toma.

Se debe diligenciar formato con la siguiente información:

- Edad y sexo.
- Diagnóstico presuntivo.
- Tiempo de evolución de la enfermedad.
- Síntomas.
- Etapa de la enfermedad.
- Tratamiento con antibiótico
- Historia clínica
- Para el embalaje de muestras se debe etiquetar los aspirados como sustancia biológica Categoría B UN 3373.
- Tipo de muestra: aspirado nasofaríngeo
- Conservación de la muestra: Almacene los tubos a 4°C y transpórtelos al laboratorio dentro de las 24 horas siguiente a la recolección en una nevera con bolsas de hielo para mantener la temperatura de 4°C.
- Se debe laminar para el cultivo dentro de las 24 horas siguiente a la recolección de la muestra por lo tanto el transporte oportuno al laboratorio es esencial.

## 9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

- Las muestras nasofaríngeas se conservan de 4 °C a 8 °C debidamente rotuladas cuando están en fase de procesamiento (quince días).
- Para mantener las muestras nasofaríngeas como “back up” por más de 15 días de almacenamiento se debe mantener de -20 a -70°C.

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 11 de 33    |

- Los ADN obtenidos se pueden mantener de 4 °C a 8 °C debidamente rotulados cuando están en procesamiento (quince días).
- Para mantener los eluidos de ADN como “back up” por más de 15 días se deben mantener de -20 a -70 °C debidamente rotulados.

## 10. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA

### 10.1. Equipos y materiales

| Equipos   |
|---|
| Termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System - BioRad   |
| Neveras de congelación -20°C y -80°C                                |
| Cabina de flujo laminar para manejo de muestras                     |
| Cabina de flujo laminar para extracción de ADN de muestras clínicas |
| Estación de PCR para preparación de mezcla                          |
| Estación de PCR para adición de ADN                                 |

**Tabla 2.** Equipos usados para la técnica.

| Materiales  |   |
|---|---|
| Pipetas automáticas de 200 µL y 1000 µL ubicadas en la cabina de flujo laminar para extracción de muestras  | Alcohol<br>Trozos de gasa<br>Papel aluminio   |
| Pipetas automáticas de 10 µL, 200 µL y 1000 µL ubicada en la estación de PCR para preparación de mezcla   | Puntas con filtro estériles para pipeta de 10 µL, 200 µL y 1000 µL.                       |
| Pipeta automática de 10 µL ubicada en la estación de PCR para adición de ADN  | Toallas absorbentes<br>Toallas absorbentes cortadas en cuadros                            |
| Agitador tipo vórtex- Cabina de flujo laminar para extracción de muestras   | Criocajas<br>Gradillas  |
| Agitador tipo vórtex- Estación de PCR para preparación de mezcla  | Marcador de vidrio<br>3 Sharpie   |
| Baño serológico temperado a 56°C±5, 65°C ±5   | Recipiente para descartar puntas y líquidos   |
| Microcentrífuga   | Cooler<br>Bolsas rojas pequeñas   |
| Termociclador (Se debe realizar la configuración del ensayo (canales, tiempos, ciclos y temperaturas) siguiendo las instrucciones de acuerdo con el | Placa óptica de 96 pozos o tiras de 8 pozos (tener en consideración la plataforma de PCR) |

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 12 de 33    |

|   |  |
|---|--|
| software del fabricante)                              |  |
| Tubos de microcentrífuga cónicos estériles de 1,5 ml. | Tapas para placas o tiras para equipos de PCR en tiempo real (tener en consideración la plataforma de PCR) |

**Tabla 3.** Materiales usados para la técnica.

## 10.2. Reactivos

### 10.2.1. Reactivos para extracción de ácidos nucleicos

- kit HP PCR TEMPLATE REPARATION KIT ROCHE (proteínasa K, búfer AW1, AW2, AE y AL)
- Isopropanol
- Etanol (96-100%)

### 10.2.2. Reactivos para PCR en tiempo real

- PerfeCTa Multiplex qPCR ToughMix
- Diluciones de trabajo de los iniciadores: IS481 –pIS1000 –ptxS1
- Alícuotas de sondas
- Agua estéril grado molecular para PCR

### 10.2.3. Reactivos de uso transversal para descontaminación de ácidos nucleicos y limpieza

- Etanol al 70%
- DNAaway (si existe disponibilidad, sino usar hipoclorito de sodio 0,5%)
- Hipoclorito de sodio
- Agua estéril tipo I (grado molecular)
- Alcohol antiséptico 70%

## 10.3. Controles

### 10.3.1. Reactivos para controles negativos

Se realizan controles negativos para verificar que no hubo contaminación durante los procesos de extracción, preparación de reactivos y en la adición del ADN.

- Control de extracción: se coloca agua grado molecular a un tubo o pozo por cada diez muestras procesadas.
- Control de reactivos: se añade agua grado molecular a un tubo o pozo al final de la preparación de la master mix.

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 13 de 33    |

- Control de adición: Dejar un tubo o pozo expuesto por cada diez ADN adicionados, después de cada control negativo de extracción.

### **10.3.2. Reactivos para la adición de controles positivos**

El ADN de los controles positivos es extraído de cultivos puros de las siguientes cepas del CDC:

- ptxS1&IS481 = Bordetella pertussis A639
- pIS1001 = Bordetella parapertussis F585
- hIS1001 = Bordetella holmesii C690

## **11. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Se realiza en cinco etapas: preparación de la muestra, extracción de ADN, preparación de reactivos para PCR y finalmente PCR y análisis de resultados.

### **11.1. Preparación de la muestra**

Debido que las muestras llegan al laboratorio en diferentes recipientes como: trampas de trake, tubos 13X100, crioviales, frascos para liofilización, entre otros; es necesario normalizar el recipiente a crioviales. El objetivo de este procedimiento es minimizar el riesgo de contaminación por manipulación excesiva de las muestras. Este procedimiento se debe realizar de la siguiente forma:

#### **11.1.1. Hisopado nasofaríngeo y aspirado nasofaríngeo**

- Mezclar fuertemente en un vórtex por cinco segundos
- Con una pipeta de 1000µL obtener 800 a 1000 µL de la muestra y dispensarla en un criovial de 2mL.
- Descartar el hisopo.
- Marcar el criovial con la etiqueta de central de muestras y escribir en la etiqueta el consecutivo de acuerdo con la base de datos.
- Guardar a 4-8°C antes de su procesamiento (15 días).

#### **11.1.2. Sonda**

- La sonda se usa para tomar el aspirado nasofaríngeo.
- Obtener el material del aspirado inyectando 1000µL de solución salina o caldo casaminoácidos en la sonda.
- Mezclar fuertemente en un vórtex por cinco segundos.
- Con una pipeta de 1000µL obtener la muestra de 800 a 1000 µL y dispensarla en un criovial de 2mL.

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 14 de 33    |

- Descartar la sonda.
- Marcar el criovial con la etiqueta de central de muestras y escribir en la etiqueta el consecutivo de acuerdo con la base de datos.
- Guardar a 4-8°C antes de su procesamiento.

## 11.2. Extracción de ADN

### 11.2.1. Método manual: High Pure PCR Template Preparation Kit



#### A. Preparación de Proteinasa K [3]

El kit trae 1 frasco de Proteinasa K (Tapa fucsia)

Disolver la proteinasa K en 4.5 ml de agua grado molecular.

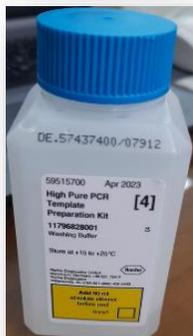
Nota: Se requieren 40 microlitros de proteinasa K por cada muestra.



#### B. Preparación de Buffer de eliminación de inhibidores [4a]

En el kit viene 1 frasco de Buffer de eliminación de inhibidores (tapa negra).

Añadir 20 ml de etanol al frasco de Buffer tapa negra, una vez reconstituido marque la casilla ¿Done?  Que viene en el recuadro amarillo y escriba la fecha.



#### C. Preparación de Buffer de lavado [4]

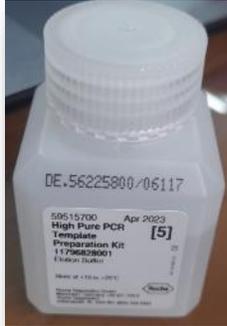
El kit cuenta con 1 frasco de Buffer de lavado (tapa azul)

¿Añadir 80 ml de etanol al frasco de Buffer, una vez reconstituido marque la casilla Done?  Que viene en el recuadro amarillo y escriba la fecha.

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 15 de 33    |

## Procedimiento



1. En un tubo estéril adicionar Buffer elution (Tapa transparente) teniendo en cuenta que para cada muestra se requieren 200 microlitros, cierre el tubo y precaliente a 70°C. En el área de extracción está disponible el Thermo-shaker, programarlo a 70°C y dejar el buffer allí hasta su uso.



**Imagen 1.** Thermo-Shaker

2. Mezclar todas las muestras en un agitador tipo vórtex durante 5s.
3. En tubos de 1.5 ml agregar lo siguiente:
  - 200 microlitros de muestra
  - 200 microlitros Tissue-lysis Buffer (tapa blanca) **[1]**
  - 200 microlitros Binding Buffer (tapa Verde)
  - 40 microlitros proteinasa k (reconstituida)

Dar vortex e incubar a 70°C por 10 min (en el Thermo-Shaker)

4. A continuación, añadir 100 microlitros de isopropanol mezcle por vortex
5. Pipetear esa mezcla de 540 microlitros a un tubo con filtro High pure con tubo de colección y cerrar la tapa.

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 16 de 33    |



**Imagen 2. a.** Tubos de colección



**Imagen 2. b.** Tubos con filtro

6. Después centrifugar por 1 min a 8000 rpm
7. Posteriormente desechar el tubo de colección.
8. Poner un nuevo tubo de recogida al tubo con filtro
9. Añadir 500 microlitros de inhibidor Removal Buffer (tapa negra) y cerrar la tapa
10. Centrifugar por 1 min a 8000 rpm
11. Nuevamente desechar el tubo de colección
12. Poner un nuevo tubo de recogida al tubo con filtro
13. Añadir 500 microlitros de Wash buffer (tapa azul) y cerrar la tapa
14. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm
15. Volver a descartar el tubo de recogida
16. Poner un nuevo tubo de recogida al tubo con filtro
17. Una vez más añadir 500 microlitros de Wash buffer (tapa azul) y cerrar la tapa
18. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm
19. Desechar el líquido que se encuentra en el tubo de colección y volver a ponerle ese mismo tubo al tubo con filtro.
20. Centrifugar por 10 segundos a 13000 o más rpm
21. Descartar el tubo de colección
22. Insertar el tubo con filtro a un tubo de 1.5 ml para recolectar el ADN resuspendido
23. Añadir 200 microlitros del Elution Buffer precalentado a 70 °C al tubo con filtro
24. Centrifugar por 1 min a 8000rpm en el tubo de 1.5 ml
25. Descartar el tubo con filtro
26. En el tubo de 1.5 ml se encuentra el ADN resuspendido (eluido).

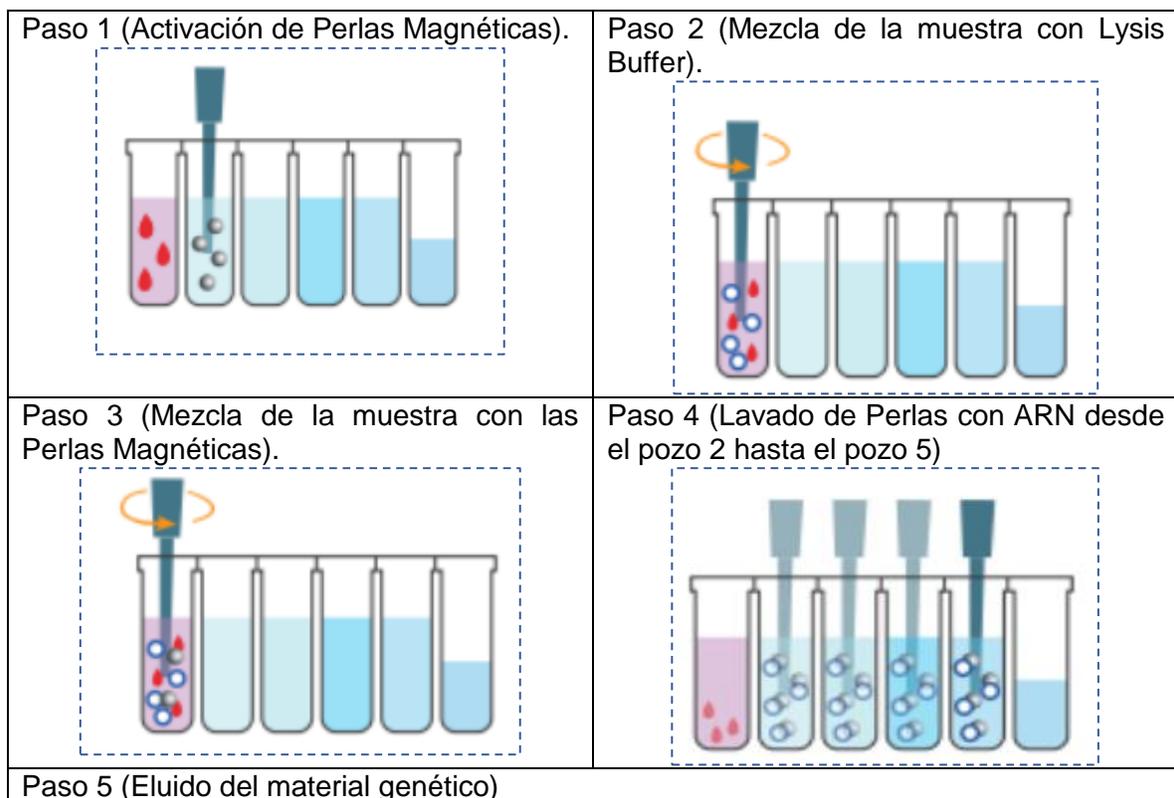
### **11.2.2. Método automatizado: High Pure PCR Template Preparation Reagent Kit – TANBead**

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL</b><br><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 17 de 33    |

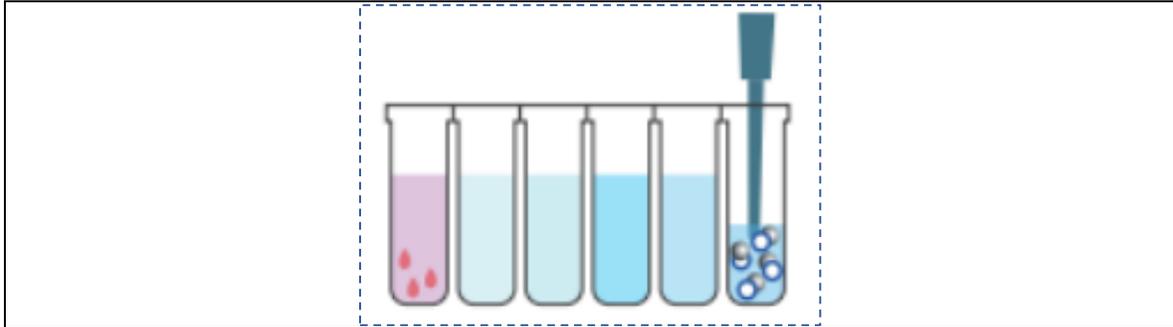
**Propósito.** El kit de extracción de ácidos nucleicos TANBead® (M61GA46) proporciona un método simple y conveniente para el aislamiento de ADN de bacterias Gram positivas, Gram negativas o bacterias positivas o negativas como *Mycobacterium tuberculosis*. El producto de ácido nucleico se puede analizar directamente, como PCR, digestión de restricción, PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado), etc. Con un simple tratamiento de muestras, no necesita centrifugaciones repetidas, reduciendo el tiempo de procesamiento manual y bajando el riesgo de contaminación cruzada.

**Principio.** La capa de dióxido de silicio que recubre las perlas magnéticas puede adsorber moléculas cargadas negativamente para purificar el ácido nucleico de las muestras.



| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 18 de 33    |

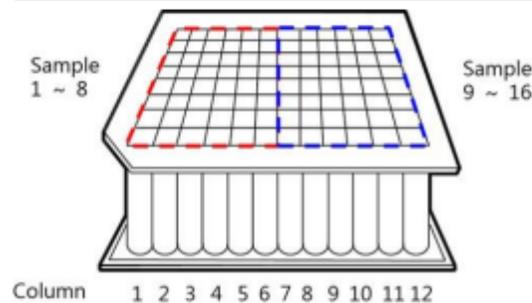


### Componentes reactivos

| <b>M61GA46</b>       |            |  |
|----------------------|------------|---|
| Auto Plates          | 6          | Placa de 96 pocillos con tampones reactivos   |
| Tampón de incubación | 25 ml      | Tampón Tris, tensioactivos, pH 8,0  |
| Tampón de elución    | 1.5 ml x 2 | Agua libre de nucleasas   |
| Lisozima             | 40 mg      | Agregue 1 ml de tampón de elución antes de usar y almacene a -20 ° C                |
| Proteinasa K         | 1 ml       | Proteinasa K, almacene a 4°C  |
| Spin tips            | 96         | Caja ensamblada de puntas giratorias  |
| Protocolo            | 1          | Guía de instrucciones para el usuario   |

#### **Contenido del Auto Plate**

| Placa | Solución tampón    | Volumen |
|-------|--------------------|---------|
| 1/7   | Tampón de lisis    | 500 µl  |
| 2/8   | Tampón de lavado 1 | 800 µl  |
| 3/9   | Perlas magnéticas  | 800 µl  |
| 4/10  | Tampón de lavado 2 | 800 µl  |
| 5/11  | Tampón de lavado 2 | 800 µl  |
| 6/12  | Tampón de elución  | 130 µl  |



### Almacenamiento y vida útil

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 19 de 33    |

1. Los componentes a temperatura ambiente (15-35°C) se pueden almacenar hasta la fecha de vencimiento etiquetada en la caja.
2. La proteinasa K se transporta a temperatura ambiente. Cuando es recibido, por favor almacene a 2 - 8°C.
3. La lisozima se transportó a temperatura ambiente. Cuando lo reciba, guárdelo a -20° C.
4. La congelación y descongelación repetidas puede provocar la disminución de la actividad de la lisozima.

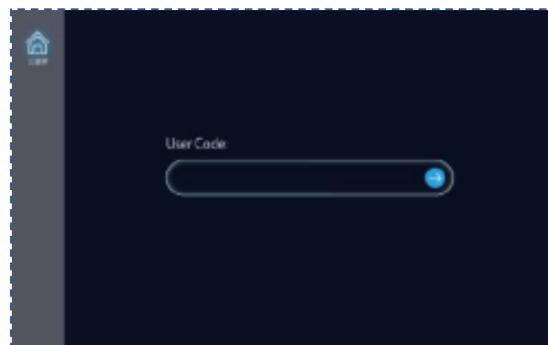
Instrumento adecuado: Maelstrom 8 & Maelstrom 4800

Pretratamiento de muestras

1. Centrifugue el cultivo a 3000 RPM durante 2 minutos.
2. Después de eliminar el sobrenadante completamente, agregue 200 µL de tampón de incubación, 10 µL de Lisozima y 10 µL de Proteinasa K.
3. Después de mezclar bien, incubar a 60 ° C durante 20 a 30 minutos.

Maelstrom 4800

4. Realice la limpieza del equipo
5. Encienda el equipo e Ingrese con la clave 333



| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 20 de 33    |

### Descripción de la pantalla



1. **Tip:** Para cargar o descargar las puntas en el equipo.
2. **Run:** Para ejecutar el protocolo de extracción.
3. **Reports:** Para la trazabilidad de las extracciones realizadas.
4. **UV Lamp:** Para programar, prender o apagar la Luz UV.

6. Dar un ciclo de UV de 20 min. Para activar la lámpara UV pulse en **TOUCH ON/OFF** para encenderla o apagarla, el equipo permite cambiar el tiempo que se necesita encendida la luz



Continúe con el proceso de preparación de la muestra

7. Retire con cuidado el papel de aluminio del Auto Plate.
8. Transferir el lisado a la columna #1/#7 del Auto Plate.
9. Coloque el Auto Plate en la plataforma del instrumento.

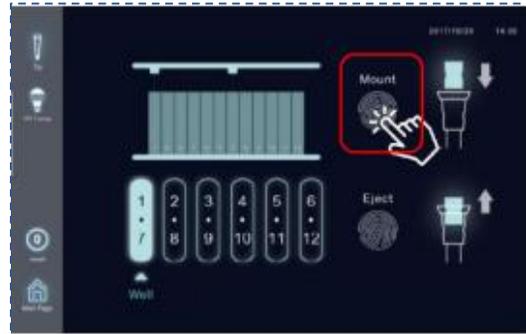
Asegúrese de que el chaflán de Auto Plate mire hacia la parte inferior izquierda.

10. Monte las puntas:

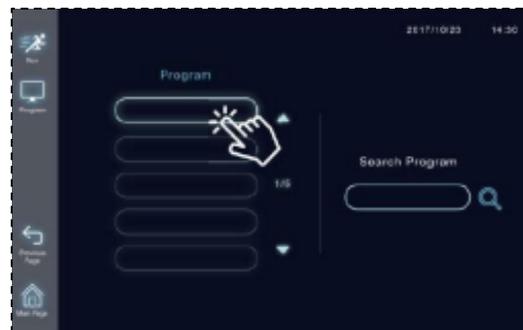
Maelstrom 4800: Vaya a la página Puntas y presione la región de las sugerencias de montaje.

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 21 de 33    |



11. Después de poner las puntas, pulse la opción RUN. Seleccione el programa: "61G"



12. El equipo preguntará si está seguro de que cargó las puntas, pulse en la opción **YES** para iniciar la corrida.



Saque con cuidado Auto Plate cuando termine el programa.

13. Al finalizar la corrida, en las columnas #6 y #12 de cada plato encontrará el eluido obtenido, las puntas se descartarán en la columna 3 y 9, pulse en el menú principal UV Lamp para dar un ciclo de UV al equipo.

14. Utilice una micropipeta para transferir el ácido nucleico purificado de la columna #6/ #12 a un tubo limpio.

15. Deseche las placas usadas y las puntas giratorias.

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 22 de 33    |

### 11.3. PCR: amplificación de Bordetella spp. B. pertussis, B. parapertussis

#### 11.3.1. Reconstitución de sondas e iniciadores

a. Antes de iniciar la reconstitución de sondas y primers es necesario que verifique primero las secuencias como se muestra en la tabla 3 y segundo, verificar la concentración o cantidad inicial de síntesis de la sonda o iniciadores para que las concentraciones finales sean las adecuadas:

| Blanco                     | Iniciador y Sonda       | Secuencia (5'→3')             | Tamaño amplicón (pb) | Concentración Óptima (nM) |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------------|
| <b>IS481<sup>a</sup></b>   | 852U18                  | CAAGGCCGAACGCTTCAT            |                      | 100                       |
|                            | 894L24                  | GAGTTCTGGTAGGTGTGAGCGTAA      | 66                   | 100                       |
|                            | 871U22P <sup>b</sup>    | CAGTCGGCCTTGCGTGAGTGGG        | No aplica            | 300                       |
| <b>pIS1001<sup>c</sup></b> | 135U17                  | TCGAACGCGTGAATGG              |                      | 300                       |
|                            | 199L20                  | GGCCGTTGGCTTCAAATAGA          | 65                   | 300                       |
|                            | 157U21P <sup>f</sup>    | AGACCCAGGGCGCACGCTGTC         | No aplica            | 100                       |
| <b>ptxS1<sup>g</sup></b>   | 402U16                  | CGCCAGCTCGTACTTC              |                      | 700                       |
|                            | 442L15                  | GATACGGCCGGCATT               | 55                   | 700                       |
|                            | 419U22P <sup>h</sup>    | AATACGTGACACTTATGGCGA         | No aplica            | 300                       |
| <b>hIS1001</b>             | BHIS41U20               | GCGCACAGCGAGACAGAATC          |                      | 100                       |
|                            | BHIS91L17               | GCCGCCTTGGCTCACTT             | 67                   | 100                       |
|                            | BHIS62U28P <sup>c</sup> | CGTGACAGATAGGCTTTTAGCTTGAGCGC | No aplica            | 100                       |

<sup>a</sup>Acceso a GenBank número M28220.

<sup>b</sup>Sonda 5' unido con 6-carboxifluoresceína (FAM) y 3' unido con minor groove binder (MGB).

<sup>c</sup>Acceso a GenBank número X66858.

<sup>f</sup> Sonda 5' unido con 4,7,2'-tericloro-7'-fenil6-carboxifluoresceína (VIC) y 3' unido con 6-carboxifluoresceína (FAM)

<sup>g</sup>Acceso a GenBank número M14378.

<sup>h</sup>Sonda 5' unido con minor groove binder (MGB) y 3' unido con 6-carboxifluoresceína (FAM)

<sup>i</sup>GenBank accession no. M14378.

<sup>c</sup>Sonda 5' unido con minor groove binder (MGB) y 3' unido con 6-carboxifluoresceína (VIC o NED)

**Tabla 4.** Iniciadores y sondas utilizados para el ensayo de PCR en tiempo real

Los primers y sondas fueron sintetizadas por la casa comercial abm, en la tabla 4 se muestra el inserto

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

Custom Service Report

**Service Summary**  
C132 - Primer Synthesis – 25 nmol

**Sample Information**

|        | Oligo Sequence           | GC % |
|--------|--------------------------|------|
| 852U18 | CAAGGCCGAACGCTTCAT       | 55.6 |
| 894L24 | GAGTTCTGGTAGGTGTGAGCGTAA | 50   |
| 135U17 | TCGAACGCGTGAATGG         | 58.8 |
| 199L20 | GGCCGTTGGCTCAAATAGA      | 50   |
| 402U16 | CGCCAGCTCGTACTTC         | 62.5 |
| 442L15 | GATACGGCCGCATT           | 60   |

**Deliverables**

Lot Number: L22G10B  
Date of Manufacture: 08/2022  
Storage condition: -25 °C to -15 °C  
Deliverable Form: Lyophilized, 25 nmol  
Reconstitution: Recommend re-suspending the lyophilized oligos using DNase and RNase-free  $H_2O$ .

| Purification | Sequence Name | Sequence                 | Tm °C | nmoles |
|--------------|---------------|--------------------------|-------|--------|
| Standard     | 852U18        | CAAGGCCGAACGCTTCAT       | 56.1  | 31.8   |
| Desalting    |               |                          |       |        |
| Standard     | 894L24        | GAGTTCTGGTAGGTGTGAGCGTAA | 58.2  | 26.2   |
| Desalting    |               |                          |       |        |
| Standard     | 135U17        | TCGAACGCGTGAATGG         | 55.7  | 24.5   |
| Desalting    |               |                          |       |        |
| Standard     | 199L20        | GGCCGTTGGCTCAAATAGA      | 55.6  | 30     |
| Desalting    |               |                          |       |        |
| Standard     | 402U16        | CGCCAGCTCGTACTTC         | 53    | 27.9   |
| Desalting    |               |                          |       |        |
| Standard     | 442L15        | GATACGGCCGCATT           | 52.3  | 33.6   |
| Desalting    |               |                          |       |        |

**Tabla 4a.** Iniciadores y sondas utilizados para el ensayo de PCR en tiempo real

Custom Service Report

www.abmgen.com

**Service Summary**  
C134 - Primer Synthesis – 100 nmol (Min Guarantee: 1.5 DD)  
C137 - Primer Synthesis – 250 nmol (Min Guarantee: 3.0 DD)

**Sample Information**

|         | Oligo Sequence                  |
|---------|---------------------------------|
| 871U22P | FAM-CAGTCGGCCTTGGGTGAGTGGG-BHQ1 |
| 419U22P | FAM-AATACGTCGACACTTATGGCGA-BHQ1 |
| 157U21P | HEX-AGACCCAGGGCGACGCTGTC-BHQ1   |

**Deliverables**

Lot Number: L22G29N, L22G29D, L22G29P  
Date of Manufacture: 08/2022  
Storage condition: -25 °C to -15 °C  
Deliverable Form: Lyophilized. Minimum guaranteed yield is 1,500 (C134), or 3,000 (C137).  
Reconstitution: Recommend re-suspending the lyophilized oligos using DNase and RNase-free  $H_2O$ .

| Purification | Sequence Name | Sequence                        | MW g/mol | Tm °C | nmoles (DD) |
|--------------|---------------|---------------------------------|----------|-------|-------------|
| HPLC         | 871U22P       | FAM-CAGTCGGCCTTGGGTGAGTGGG-BHQ1 | 7915.4   | 64.9  | 20.5 (4.8)  |
| HPLC         | 419U22P       | FAM-AATACGTCGACACTTATGGCGA-BHQ1 | 7835.4   | 56.1  | 15.3 (3.9)  |
| HPLC         | 157U21P       | HEX-AGACCCAGGGCGACGCTGTC-BHQ1   | 7715.8   | 67    | 41 (9.7)    |

**Tabla 4b.** Iniciadores y sondas utilizados para el ensayo de PCR en tiempo real

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  <p>República de Colombia<br/>GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SANTANDER</p> | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 24 de 33    |

Para reconstituir las sondas y los primers se debe multiplicar el valor de los nmoles por 10 para obtener una solución stock de 100 µM. Ejemplo:

Para el primer 852U18 que viene en una concentración 31,8 nmoles se reconstituye así:

$$31,8 \times 10 = 318 \mu\text{M de agua libre de DNAsas}$$

Se debe agregar 318 µM de agua libre de DNAsas

**b.** Preparación de las soluciones de trabajo de sondas y primers (concentración 10X)

**Sondas:** Una vez reconstituidas con un agua grado biología molecular ó buffer a 100µM, es necesario hacer alícuotas de trabajo para mantener la estabilidad de los reactivos. Las alícuotas se realizan de acuerdo a las concentraciones estandarizadas en la PCR y al número de reacciones a utilizar. El siguiente ejemplo de reconstitución de sondas se realizará para una placa óptica de 96 pozos:

**\*Volumen de una reacción para IS481, pIS1001 & hIS1001= 0,84µL**

97 pozos \*(0,84µL/1 pozo) = 81,48 µL, se calcula por 97 pozos por error de pipeteo.

$$\begin{aligned} V_1 &= X \\ C_1 &= 100\mu\text{M} \\ V_2 &= 81,48 \mu\text{L} \\ C_2 &= 10 \mu\text{M} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} X * 100\mu\text{M} &= 81.48 \mu\text{L} * 10 \mu\text{M} \\ X &= (81.48 \mu\text{L} * 10 \mu\text{M} / 100\mu\text{M}) \\ X &= 8,148 \mu\text{L de sonda} \end{aligned}$$

El volumen final es 81,48 µL de sonda a una concentración de 10µM.

Agregar 73.332 de H2O más 8,148 µL de sonda para obtener un volumen final de 81,48 µL

**\*Volumen de una reacción para ptxS1 = 2.5 µL**

(97 pozos) \*(2,5 µL/1 pozo) = 242,5 µL, se calcula por 97 pozos por error de pipeteo.

$$\begin{aligned} V_1 &= X \\ C_1 &= 100\mu\text{M} \\ V_2 &= 242,5 \mu\text{L} \end{aligned}$$

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 25 de 33    |

$$C_2 = 3 \mu\text{M}$$

$$X * 100\mu\text{M} = 242,5 \mu\text{L} * 3 \mu\text{M}$$

$$X = (242,5 \mu\text{L} * 3 \mu\text{M} / 100\mu\text{M})$$

$$X = 7,275\mu\text{L de sonda}$$

El volumen final es 242,5  $\mu\text{L}$  de sonda a una concentración de 3 $\mu\text{M}$ .  
Agregar 235,2  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O más 7,3  $\mu\text{L}$  de sonda para obtener un volumen final de 242,5  $\mu\text{L}$ .

**Iniciadores:** Se debe reconstituir un iniciador como un stock con TE o agua grado biología molecular.

Para ello se puede realizar con el cálculo realizado anteriormente para las sondas IS481, pIS1001 & hIS1001 o preparar una solución 1/10 así:

Si se requiere preparar 50  $\mu\text{L}$  de primers a 10X se debe agregar 5  $\mu\text{L}$  del primer y 45  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular.

### 11.3.2. Preparación de master mix

1. Se inicia con la limpieza de la cabina de bioseguridad, se limpia con un papel absorbente impregnado con hipoclorito a 5000 ppm, quitar el exceso con etanol al 70% luego, poner luz UV por 15 minutos. Incluir dentro de la cabina los guantes y los materiales necesarios para realizar la mezcla. En el caso que tenga DNAaway no realice el procedimiento anterior. Agregar la solución pura en la cabina y luego encienda por 15 minutos la lámpara de luz ultravioleta.

2. Sacar los reactivos que se encuentran en el congelador a -20°C para que se descongelen en una cava a temperatura de de 4°C a 8°C. Es importante mantenerlos protegidos de la luz.

3. Realizar los cálculos para preparar la mezcla maestra de reactivos según el número de las muestras a procesar, los controles positivos, los tres controles negativos (extracción, reactivos y muestra) y una reacción adicional de volumen por error de pipeteo que se puede calcular con el formato "HOJA DE TRABAJO GENES IS481 - pIS1001 DE BORDETELLA", con base en la siguiente tabla:

| COMPONENTES DE LA REACCIÓN       | VOLUMEN EN $\mu\text{L}$ X 1 REACCIÓN |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| PerfeCTa Multiplex qPCR ToughMix | 12,50                                 |

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 26 de 33    |

|                              |      |
|------------------------------|------|
| Iniciador Forward IS481 FP   | 0,84 |
| Iniciador Reverse IS481 RP   | 0,84 |
| Sonda IS481 FAM              | 0,84 |
| Iniciador Forward pIS1001 FP | 0,84 |
| Iniciador Reverse pIS1001 RP | 0,84 |
| Sonda pIS1001 HEX            | 0,84 |
| Agua libre de nucleasas      | 3,46 |
| ADN                          | 4    |
| Volumen Final                | 21,0 |

**Tabla 5.** Componentes y volúmenes para una reacción

Nota. Tener en cuenta que por cada 15 muestras se debe montar 1 control de extracción y un control de adición y por cada placa de 96 muestras de deben procesar 1 control de reactivos y 2 controles positivos.

4. Una vez estén descongelados los reactivos mezclar en agitador vórtex todos los reactivos por 3s (iniciadores, sondas, agua de PCR y master mix)

5. Tomar un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril previamente marcado con la fecha del día de la preparación y adicionar en el siguiente orden los reactivos: agua, master mix PerfeCTa Multiplex qPCR ToughMix, iniciadores diluidos y sondas de acuerdo con los cálculos realizados en la HOJA DE TRABAJO GENES IS481 - pIS1001 DE BORDETELLA.

6. Agregar cada reactivo con su valor correspondiente de acuerdo a los cálculos realizados anteriormente, se debe hacer de forma cuidadosa, evitando contaminación con los guantes. Una vez se hayan agregado, mezclar y almacenar a -20°C.

7. Mezclar en agitador vórtex por 3 s y dispense 21 µL de la mezcla en los strips de tubos low profile (previamente marcados) utilizando de soporte un cooler para mantener la cadena de frío de la master mix y Sellar los tubos de los strips con tapas ópticas transparentes.

**Nota:** Para almacenar y transportar la placa se deberá utilizar papel aluminio para mantener la oscuridad y conservar las sondas hasta su uso.

8. Registre el lote producido en el formato de HOJA DE TRABAJO GENES IS481 - pIS1001 DE BORDETELLA.

Al finalizar la preparación de la master mix se deberá limpiar la cabina de la misma forma que se realizó en el paso número 1.

### 11.3.3. Fase de adición del ADN

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 27 de 33    |

1. Se inicia con la limpieza de la cabina de bioseguridad, se limpia con un papel absorbente impregnado con hipoclorito a 5000 ppm, luego, poner luz UV por 15 minutos, finalmente limpiar con otro papel absorbente impregnado con alcohol al 95%. Se debe mantener en la estación los siguientes insumos y micropipetas con la UV:

- Micropipeta 1-10 µL
- Puntas de 10 µL con filtro
- Papeles cortados a 2 cm<sup>2</sup> aproximadamente
- Papel absorbente

2. Descongelar la master mix dentro de la cabina de bioseguridad.

3. Descongelar en cadena de frío (-20°C a 4°C) los controles positivos:  
S481 = B. pertussis A639 y  
pIS1001 = B. paraptussis F585

4. Por medio de la exclusiva se pasan los ARN extraídos para ser adicionados a la master mix.

5. Añadir 4 µl de eluidos de ADN a cada tubo, cuidando cualquier tipo de contaminación y haciéndose de forma rápida, destapando cada tubo de los eluidos con una toalla absorbente con el fin de no contaminar los guantes y por tanto los otros eluidos.

6. Incluir controles:

- Servir el control de extracción correspondiente a 15 muestras extraídas.
- Por cada 15 muestras deje abierto el tubo mientras sirve los eluidos este servirá de control de adición.
- Colocar un control de reactivo cuando el lote es nuevo (es una reacción que no se expone a nada, por tanto, siempre deberá permanecer cerrada durante todo el proceso).
- Posteriormente utilizar el control positivo de cada especie de acuerdo con los blancos a amplificar. Éste paso se debe realizar en el área destinada exclusivamente para adicionar ADN de controles positivos.

7. Poner nuevamente los controles positivos y eluidos a -70°C.

8. Centrifugar la placa o los tubos de PCR para concentrar la reacción en el fondo de la placa o el tubo para que se optimice la reacción.

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL</b><br><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 28 de 33    |

9. Llevar los tubos o la placa al termociclador CFX-96 y utilice las siguientes condiciones de temperatura, tiempos y canal para realizar la PCR:

Programar el termociclador (CFX-96) como se indica en el manual de uso del equipo

| # de paso | PASOS CICLAJE        | TEMPERATURA | TIEMPO   | CICLOS |
|-----------|----------------------|-------------|--|--------|
| 1         | Activación de la UDG | 50 °C       | 2 min  | 1      |
| 2         | Denaturación inicial | 95 °C       | 10 min   |        |
| 3         | Denaturación         | 95 °C       | 15 seg   |        |
| 4         | Anillamiento         | 58°C        | 60 seg (en este momento se debe tomar la foto) | 45     |
| 5         | Tiempo total         |             | 1 hora y 45 minutos                            |        |

**Tabla 6:** Perfil térmico

#### 11.4. PCR para ptxS1: confirmación de B. Pertussis

Esta prueba se realiza únicamente si IS481 y/o pIS1001 son positivos

##### 11.4.1. Preparación de master mix

Realizar los pasos 1 y 2 de igual manera que para la preparación de la master mix para los genes IS481 y pIS1001

3. Realizar los cálculos para preparar la mezcla maestra de reactivos según el número de las muestras a procesar, los controles positivos, los tres controles negativos (extracción, reactivos y muestra) y una reacción adicional de volumen por error de pipeteo que se puede calcular con el formato “HOJA DE TRABAJO EN PTXS1 DE BORDETELL”, con base en la siguiente tabla:

| COMPONENTES DE LA REACCIÓN       | VOLUMEN EN µL X 1 REACCIÓN |
|----------------------------------|----------------------------|
| PerfeCTa Multiplex qPCR ToughMix | 12,50                      |
| Iniciador Forward ptxS1          | 2,5                        |
| Iniciador Reverse ptxS1          | 2,5                        |
| Sonda ptxS1 FAM                  | 2,5                        |
| Agua libre de nucleasas          | 1                          |
| ADN                              | 4                          |
| Volumen Final                    | 21,0                       |

**Tabla 7:** Componentes y volúmenes para una reacción para el gen ptxS1

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 29 de 33    |

Seguir los pasos 4 al 8 que para la preparación de la master mix para los genes IS481 y pIS1001.

#### 11.4.2. Fase de adición del ADN

Seguir los pasos 1 al 11 que para la adición del ADN para los genes IS481 y pIS1001.

12. Llevar los tubos o la placa al termociclador CFX-96 y utilice las siguientes condiciones de temperatura, tiempos y canal para realizar la PCR:

Programar el termociclador (CFX-96) como se indica en el manual de uso del equipo

| # de paso | PASOS CICLAJE        | TEMPERATURA | TIEMPO   | CICLOS |
|-----------|----------------------|-------------|--|--------|
| 1         | Activación de la UDG | 50 °C       | 2 min  | 1      |
| 2         | Denaturación inicial | 95 °C       | 10 min   |        |
| 3         | Denaturación         | 95 °C       | 15 seg   | 45     |
| 4         | Anillamiento         | 57°C        | 60 seg (en este momento se debe tomar la foto) |        |
| 5         | Tiempo total         |             | 2 horas  |        |

**Tabla 8:** Perfil térmico para amplificación del gen PTXS1

## 12. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Colocar las gráficas en escala logarítmica
- Colocar la línea de umbral de acuerdo con las unidades de fluorescencia.
- Para validar los resultados deben cumplir con los criterios de control de calidad analítico

Tabla 16. Límite inferior de detección de controles positivos para validación de controles

|                  | Resultado (Ct)            | Interpretación   | Posible problema | Acción            |
|------------------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|
| Control positivo | Dentro del intervalo de + | Control aprobado | Ninguno          | Validar la prueba |

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  <p>República de Colombia<br/>GOBIERNO DEPARTAMENTO DE SALUD<br/>Gobernación de Santander</p> | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 30 de 33    |

|                       |                          |                     |  |   |
|-----------------------|--------------------------|---------------------|--|---|
| Control positivo      | Fuera del intervalo de + | Control no aprobado | Denaturación /pipeteo                        | Usar nuevos controles y dos muestras positivas conocidas para verificar el Ct |
| Control positivo      | NA                       | Control no aprobado | No se agregó el control/ se denaturó/pipeteo | Usar nuevos controles y dos muestras positivas conocidas para verificar el Ct |
| Control de adición    | NA                       | Negativo            | Ninguno                                      | Validar la prueba   |
| Control de extracción | NA                       | Negativo            | Ninguno                                      | Validar la prueba   |
| Control de reactivos  | NA                       | Negativo            | Ninguno                                      | Validar la prueba   |
| Control de adición    | Entre 1 a 45             | Positivo            | Contaminación                                | Repetir el montaje desde PCR de las muestras positivas                        |
| Control de extracción | Entre 1 a 45             | Positivo            | Contaminación                                | Repetir desde la extracción las muestras positivas                            |
| Control de reactivos  | Entre 1 a 45             | Positivo            | Contaminación                                | Realizar nueva mezcla maestra   |

**Tabla 9:** controles positivos para validación de corrida

En la interpretación de los resultados se debe tener en cuenta los criterios de validación de los controles positivos y negativos (reactivos, extracción y de reactivos) de acuerdo con el numeral 13 de este documento. Después de validar el montaje se debe registrar los Ct en el formato de datos primarios y hacer la correlación de acuerdo con los criterios expresados en la siguiente interpretación:

| Blancos y umbrales | IS481+ (Ct<35)        | IS481+ (Ct35≤40)    | IS481-                  |
|--------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------|
| ptxS1+ (Ct<40)     | <i>B. pertussis</i>   | <i>B. pertussis</i> | <i>B. parapertussis</i> |
| ptxS1-             | <i>Bordetella.spp</i> | Indeterminado       | Negativo                |

**Tabla 7a.** Interpretaciones según el resultado de IS481 & ptxS1

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 31 de 33    |

| Blancos y umbrales | pIS1001+ (Ct<40)      | pIS1001+ (Ct≥40) | pIS1001-   |
|--------------------|-----------------------|------------------|--|
| ptxS1+ (Ct<40)     | <i>B. paraptussis</i> | Negativo         | <i>B. pertussis</i> o<br><i>B. bronhiseptica</i> |
| ptxS1-             | <i>B. paraptussis</i> | Negativo         | Negativo   |

**Tabla 7b.** Interpretaciones según el resultado de pIS1001 & ptxS1

| Especies                                    | IS481 | pIS1001 | ptxs1 |
|---|-------|---------|-------|
| <i>B. pertussis</i>                         | +     | -       | +     |
| <i>Bordetella spp</i>                       | +     | -       | -     |
| <i>B. paraptussis</i>                       | -     | +       | +/-   |
| <i>B. pertussis</i> y <i>B. paraptussis</i> | +     | +       | +/-   |

**Tabla 7.** Consolidación Valores e interpretación resultados

## 12.1. Reglas generales de interpretación de Ct

- Los resultados del ensayo de PCR se consideran negativos si el valor de **Ct es mayor a 40**. Si se repite la PCR y la extracción y los controles están bien y sigue reiteradamente el mismo resultado se debe considerar como sospechosa.
- Una muestra se considera positiva para *B. pertussis* si el valor de Ct de IS481 y ptxS1 es menor de 40
- Si una muestra es positiva para *ptxS1* y negativo para *IS481* e *pIS1001*, se considera probablemente *B. bronhiseptica* por la razón que el 64,4% son positivas para esta prueba.
- Si una muestra es positiva para *IS481* con un Ct menor de 35 y negativo para ptxS1, se considera probablemente *B. holmesii* (comprobar con hIS1001).
- Si una muestra tiene un valor de Ct mayor o igual a 35 pero inferior a 40 para *IS481* y negativo para *ptxS1*, se considera indeterminado o se puede informar como *Bordetella spp.*
- Si una muestra es positiva para *pIS1001* con un valor de Ct menor a 40, se considera positiva para *B. paraptussis*.

## 13. EMISIÓN Y REPORTE DE RESULTADOS

El Laboratorio Departamental de Salud pública emitirá un resultado individual cargado por el analista combinando los datos del paciente desde la base de datos

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|  |  |                     |             |
|--|--|---------------------|-------------|
|  | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|  |  | VERSIÓN             | 0           |
|  |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|  |  | PÁGINA              | 32 de 33    |

con el formato MI-GS-RG-476 “INFORME DE RESULTADO DE ENSAYO” LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA-SANTANDER.

#### 14. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Instituto Nacional de Salud. (2022). Transferencia del diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas para amplificación de ácidos nucleicos: tosferina.

Instituto Nacional de Salud. (2017). GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE Bordetella pertussis. Obtenido de <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Gu%C3%ADa%20para%20la%20vigilancia%20por%20labotatorio%20de%20Bordetella%20spp.pdf>.

Instituto Nacional de Salud. (2022). Protocolo de Vigilancia de Tosferina. Obtenido de [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/Pro\\_Tosferina.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/Pro_Tosferina.pdf)

#### 15. ANEXOS

- Formato: HOJA DE TRABAJO GENES IS481 - pIS1001 DE BORDETELLA.
- Formato: HOJA DE TRABAJO EN PTXS1 DE BORDETELLA.
- Formato: MI-GS-RG-476 “INFORME DE RESULTADO DE ENSAYO” LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA-SANTANDER.
- Formato: “REGISTRO DE DATOS DE PACIENTES PARA VERIFICACIÓN DE MUESTRAS A PROCESAR”

#### 16. CONTROL DE CAMBIOS

| CONTROL DE CAMBIOS |            |                               |  |  |
|--------------------|------------|-------------------------------|--|--|
| VERSIÓN            | FECHA      | DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO        | REVISÓ   | APROBÓ   |
| 0                  | 26/04/2023 | Emisión inicial del documento | Alba Rocío Orduz Amézquita<br><b>Líder Grupo LDSP</b><br><br>German Eduardo Marín Cárdenas<br><b>Director de Salud Integral</b><br><br>Diego Sánchez Báez<br><b>Coordinador Grupo de</b> | Javier Alonso Villamizar Suarez<br><b>Secretario de Salud de Santander</b> |

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |

|   |  |                     |             |
|---|--|---------------------|-------------|
|  <p>República de Colombia<br/>GOBIERNO DE SANTANDER<br/>Gobernación de Santander</p> | <b>MANUAL PARA DETECCIÓN DE<br/>BORDETELLA POR PCR EN TIEMPO REAL<br/>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE<br/>SALUD PÚBLICA</b> | CÓDIGO              | MI-GS-MA-62 |
|   |  | VERSIÓN             | 0           |
|   |  | FECHA DE APROBACIÓN | 26/04/2023  |
|   |  | PÁGINA              | 33 de 33    |

|  |  |  |   |  |
|--|--|--|---|--|
|  |  |  | <b>Apoyo a la Gestión y<br/>Calidad</b><br><br>César Ernesto Sánchez<br>Aranda<br><b>Director de Planeación y<br/>Mejoramiento en Salud</b> |  |
|--|--|--|---|--|

| Versión | Elaboración                                     | Revisión Técnica        | Revisión de Calidad     |
|---------|---|-------------------------|-------------------------|
| 0       | Yenny Paola Mayorga<br>Ayleen Priscilla Delgado | Yury Katherine Quintero | Alejandra Galvis Vargas |