 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	1 de 17

República de Colombia



Gobernación de Santander

MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas



 República de Colombia Gobernación de Santander	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	2 de 17

TABLA DE CONTENIDO


INTRODUCCIÓN	4
1. OBJETIVO.....	4
2. ALCANCE	4
3. RESPONSABILIDADES.....	4
4. DEFINICIONES, SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRONIMOS	5
5. BIOSEGURIDAD.....	5
6. CONDICIONES GENERALES	6
7. PRECAUCIONES DEL ANÁLISIS.....	8
8. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRAS.....	8
9. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	8
10. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	9
10.1 Extracción manual de ADN kit de ROCHE	9
10.1.1. Preparación de proteinasa K.....	9
10.1.2. Preparación de Buffer de lavado de inhibidor.....	9
10.1.3. Preparación de Buffer de lavado	9
10.1.4. Extracción de ADN.....	10
10.1.4.1. Para extracción de ADN de muestras de tejido ver inserto de la casa comercial.....	11
10.2 Automatizado	11
10.2.1. Propósito	11

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Departamento de Salud Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	3 de 17

10.2.2. Principio.....	11
10.2.2. Recolección, transporte, almacenamiento y pretratamiento de muestras .	11
10.2.2.1. Recolección y almacenamiento de muestras	11
10.2.2.2. Transporte de muestras	11
10.2.2.3. Pretratamiento de muestras	12
11. AMPLIFICACIÓN	12
11.1. Preparación de Master Mix.....	12
11.2. Montaje de PCR	13
11.3. Montaje de PCR	14
11.4. Control de calidad analítica	14
12. ANÁLISIS DE DATOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	15
13. DOCUMENTOS DE REFERENCIA	16
14. ANEXOS	16
15. CONTROL DE CAMBIOS	16

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Departamento de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	4 de 17

INTRODUCCIÓN

El virus Monkeypox está compuesto por una doble cadena de ADN, pertenecen al género orthopoxvirus (OPXV) dentro de la familia Poxviridae, los poxvirus producen enfermedades en humanos y animales; generan la formación de lesiones, nódulos en la piel o erupción cutánea diseminada. Las especies de OPXV patógenas para los seres humanos incluyen el virus de la viruela bovina y el virus de la viruela. MPXV recibe su nombre debido a su detección inicial en monos, sin embargo, se puede encontrar en roedores, y el reservorio aun es indeterminado. Actualmente se han identificado dos clados de MPXV uno endémico en África occidental y otro en la región de la cuenca del Congo, siendo este último asociado a mayor severidad.

1. OBJETIVO

Describir el procedimiento general para el montaje de diagnóstico de Viruela Símica por medio de la técnica de PCR en tiempo real propuesta por Li et-al 2010 en el Laboratorio de Salud Pública de Santander.

2. ALCANCE


Este documento se tomará como referencia en el área de biología molecular del Laboratorio Departamental de Salud Pública para la extracción y amplificación de ácidos nucleicos en muestras sospechosas de Viruela Símica utilizando la técnica de PCR en tiempo real propuesta por Li et-al 2010.

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 del laboratorio 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.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 República de Colombia Gobernación de Santander	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	5 de 17

Personal auxiliar del laboratorio: Se encargará de aplicar los lineamientos descritos en el documento con estándares de calidad para el diagnóstico de Viruela Símica.

4. DEFINICIONES, SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

Ácidos nucleicos: Son polímeros de nucleótidos que se dividen en 2 tipos: el ADN, polímero de desoxirribonucleico y el ARN, polímero de ribonucleico.

Buffer: disolución amortiguadora o disolución reguladora es una mezcla en concentraciones relativamente elevadas de un ácido y su base conjugada.

Costra: Cubierta o corteza exterior que se endurece o seca sobre una cosa húmeda o blanda.

Hisopado orofaríngeo: Parte de la garganta detrás de la cavidad oral. La orofaringe incluye el tercio posterior de la lengua, el paladar blando, las paredes laterales y posteriores de la garganta, y las amígdalas.

Monkeypox: Es un virus de ADN de doble cadena, miembro del género orthopoxvirus (OPXV) dentro de la familia Poxviridae, los poxvirus. (INS, 2022)

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR): La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad y sensibilidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior.


Vesícula: Área de piel cubierta por una burbuja en relieve, llena de líquido

Viruela símica: Es una zoonosis vírica (enfermedad provocada por virus transmitido de los animales a las personas) que produce síntomas parecidos a los que se observaban en los pacientes de viruela en el pasado, aunque menos graves (OMS, 2022).

5. BIOSEGURIDAD

El desembalaje y extracción de ácidos nucleicos puede manejarse en instalaciones BSL-2, pero con prácticas de trabajo BSL-3 más estrictas. Los trabajadores de

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	6 de 17


laboratorio deben usar equipo de protección, incluidos guantes desechables, batas sólidas con mangas con puños en el Laboratorio de Salud Pública de Santander se cuenta con trajes PAPR para proporcionar una barrera a la exposición de la superficie de la mucosa.

- Traje PAPR
- Overol
- Bata manga larga desechable
- Guantes de nitrilo
- Gorro
- Polainas

6. CONDICIONES GENERALES


- El personal encargado del proceso debe estar entrenado en las técnicas de diagnóstico de Biología Molecular, conocer los factores de riesgos biológicos y las condiciones de bioseguridad, conservación y descarte de material biológico.
- Aplicar normas de Bioseguridad durante el procesamiento de muestras sospechosas y utilizar los elementos de protección personal que incluye: PAPR, traje desechable (overol), bata desechable, polainas, guantes de nitrilo.
- La confiabilidad de los resultados depende de la adecuada recolección de especímenes, almacenamiento, transporte y procesamiento.
- 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 sustancias peligrosas tipo A.
- 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 Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	7 de 17

- No comer, beber ni fumar en áreas de trabajo de laboratorio. Usar guantes desechables sin polvo, 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 en 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). 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 Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	8 de 17

7. PRECAUCIONES DEL ANÁLISIS

- 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.

8. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRAS

Teniendo en cuenta la evidencia científica disponible a la fecha, para diagnóstico molecular específico de viruela símica se deben coleccionar las siguientes muestras, en orden de prioridad:


1. Exudado de lesión cutánea: fluidos de lesiones y costras.
2. Hisopado orofaríngeo: coleccionado por técnica rutinaria, con énfasis en zonas de la cavidad donde se acceda a lesiones visibles.

Estas muestras son consideradas las de mayor probabilidad de detección del virus, siendo las lesiones cutáneas, las muestras que con mayor frecuencia demuestran positividad en el individuo.

9. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
------------	---------	-----------

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 República de Colombia Gobernación de Santander	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	9 de 17

<ul style="list-style-type: none"> • Puntas de pipeta con filtro, estériles y libres de nucleasas • Micropipeta monocal (10-100 y 100-1000 µL) Solución de hipoclorito de sodio a 5000 ppm • Alcohol 95% • Gradillas de plástico de 8x12 • Tijeras • Criocajas • Cinta de enmascarar • Papel absorbente • Marcador con punta fina • Parafilm • Implementos de protección personal para el área de extracción. • Guantes de nitrilo 	<ul style="list-style-type: none"> • Termociclador • Mezclador Vortex • Microcentrífuga • Minispín • Maelstrom 4800 • Cabinas de bioseguridad • Refrigerador a 4°C, -20°C y -80°C • Bloque seco 	<ul style="list-style-type: none"> • Kit de extracción de Roche • Kit de extracción automatizado de TANBead® (M61GA46) • Sondas • Primers • Controles positivos • Enzima Taq • Agua grado biología molecular • Mezcla de reacción de PCR
---	---	--

Tabla 1. Materiales, equipos y reactivos.

10. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El desembalaje y la extracción de ácidos nucleicos se recomiendan realizar en cabina de bioseguridad tipo II, se recomienda hacer la extracción de forma manual y si se va a realizar con un método automatizado inactivar la muestra químicamente. Importante que el Kit de extracción sea DNA/RNA (INS,2022).

10.1 Extracción manual de ADN kit de ROCHE

10.1.1. Preparación de proteinasa K

Tener en cuenta:

- 1 frasco de Proteinasa K (Tapa rosa)

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

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

10.1.2. Preparación de Buffer de lavado de inhibidor


Tener en cuenta:

- 1 frasco de Buffer de lavado de inhibidor (tapa negra).

Añadir 20 ml de etanol al frasco de Buffer tapa negra.

10.1.3. Preparación de Buffer de lavado

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 República de Colombia Gobernación de Santander	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	10 de 17


Tener en cuenta:

- 1 frasco de Buffer de lavado (tapa azul)
- Añadir 80 ml de etanol al frasco de Buffer tapa azul.

10.1.4. Extracción de ADN

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.
2. Para muestras de aspirado Nasofaríngeo realice el siguiente paso:
 - A la muestra realizar vortex durante 2 minutos.
 - Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm
3. Para la extracción de ADN trabajar con 200 uL de la preparación.
4. En tubos de 1.5 ml agregar lo siguiente:
5. 200 microlitros de muestra preparada en el numeral 1
6. 200 microlitros Binding Buffer (tapa Verde)
7. 40 microlitros proteinasa k (reconstituida)
8. Dar vortex e incubar a 70°C por 10 min
9. A continuación, añadir 100 microlitros de isopropanol mezcle por vortex
10. Pipetear esa mezcla de 540 microlitros a un tubo con filtro High pure con tubo de recogida y cerrar la tapa.
11. Después centrifugar por 1 min a 8000 rpm
12. Posteriormente desechar el tubo de recogida.
13. Colocar un nuevo tubo de recogida al tubo con filtro
14. Añadir 500 microlitros de inhibidor Removal Buffer (tapa negra) y cerrar la tapa
15. Centrifugar por 1 min a 8000 rpm
16. Nuevamente desechar el tubo de recogida.
17. Colocar un nuevo tubo de recogida al tubo con filtro
18. Añadir 500 microlitros de Wash buffer (tapa azul) y cerrar la tapa
19. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm
20. Volver a descartar el tubo de recogida
21. Colocar un nuevo tubo de recogida al tubo con filtro
22. Una vez más añadir 500 microlitros de Wash buffer (tapa azul) y cerrar la tapa
23. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm
24. Ahora desechar el líquido que se encuentra en el tubo de recogida y volver a colocarle ese mismo tubo al tubo con filtro
25. Centrifugar por 10 segundos a 13000 o más rpm
26. Ahora sí descartar el tubo de recogida
27. Insertar el tubo con filtro a un tubo de 1.5 ml para recolectar el ADN resuspendido.
28. Añadir 200 microlitros del Elution Buffer precalentado a 70 °C al tubo con filtro.
29. Centrifugar por 1 min a 8000rpm en el tubo de 1.5 ml
30. Descartar el tubo con filtro

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 República de Colombia Gobernación de Santander	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	11 de 17

31. En el tubo de 1.5 ml se encuentra el ADN resuspendido

10.1.4.1. Para extracción de ADN de muestras de tejido ver inserto de la casa comercial

- Adicionar 25- 50 mg de material (muestra)
- 200 uL de Buffer lisis
- 40 uL de proteína K
- Mezclar e incubar 1 hora a 55°C para completar la reacción.
- Agregar 200 uL Binding buffer
- Mezclar e incubar 10 minutos a 70 °C
- Siga el paso del Isopropanol y continúe la extracción anteriormente descrita en el numeral III.

10.2 Automatizado

10.2.1. 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.

10.2.2. 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.


10.2.2. Recolección, transporte, almacenamiento y pretratamiento de muestras

10.2.2.1. Recolección y almacenamiento de muestras

- Espujo, muestras de BAL
- Las muestras se pueden recolectar y obtener en tubos de recolección específicos para su conservación.

10.2.2.2. Transporte de muestras

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 República de Colombia Gobernación de Santander	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	12 de 17

El transporte de la muestra de bacterias debe seguir la ley específica relacionada con el transporte de bacterias y debe mantenerse entre 2 y 25 ° C durante el transporte.

10.2.2.3. 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.
 - 4) Retire con cuidado el papel de aluminio del Auto Plate.
 - 5) Transferir el lisado a la columna #1/#7 del Auto Plate.
 - 6) Coloque el Auto Plate en la plataforma del instrumento. Asegúrese de que el chafalán de Auto Plate mire hacia la parte inferior izquierda.
 - 7) Monte las puntas: Maelstrom 4800: Vaya a la página Puntas y presione la región de las sugerencias de montaje.
 - 8) Seleccione el programa: "61G"
- Los parámetros se dan en la siguiente sección.
- 9) Saque con cuidado Auto Plate cuando termine el programa.
 - 10) Utilice una micropipeta para transferir el ácido nucleico purificado de la columna #6/ #12 a un tubo limpio.
 - 11) Deseche las placas usadas y las puntas giratorias.

11. AMPLIFICACIÓN

11.1. 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, luego, poner luz UV por 20 minutos, finalmente limpiar con otro papel absorbente impregnado con alcohol al 95%. En esta parte se debe incluir dentro de la cabina la bolsa de desechos para que reciba la luz UV.
2. Sacar los reactivos que se encuentran en el congelador a -20°C para que se atemperen y dar inicio a la preparación de la master mix. Es importante mantenerlos protegidos de la luz.
3. Una vez estén descongelados los reactivos se procede a preparar la mix en un vial estéril previamente marcado con la fecha del día de la preparación. Agregar cada reactivo con su valor correspondiente de acuerdo a los cálculos realizados

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 República de Colombia Gobernación de Santander	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	13 de 17

anteriormente, se debe hacer de forma cuidadosa, evitando contaminación con los guantes.

COMPONENTES DE LA REACCIÓN	VOLUMEN EN μL X 1 REACCIÓN
Agua	2.9 μL
2x Mezcla de Reacción de PCR	10 μL
Primer F (10 μM)	0.4 μL
Primer R (10 μM)	0.4 μL
Sonda (10 μM)	0.25 μL
Primer Rnasa P F (10 μM)	0.4 μL
Primer Rnasa P R (10 μM)	0.4 μL
Sonda Rnasa P(10 μM)	0.25 μL
DNA	5 μL


Tabla 2. Componentes y volúmenes para una reacción

NOTA: Se debe preparar un 10% más de mix para los errores que se puedan presentar en el pipeteo. El analista decidirá si prepara master mix para toda la semana o por montaje.

11.2. Montaje de PCR

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 20 minutos, finalmente limpiar con otro papel absorbente impregnado con alcohol al 95%. En esta parte se debe incluir dentro de la cabina la bolsa de desechos para que reciba la luz UV.
2. Se pone a descongelar la master mix dentro de la cabina de bioseguridad.
3. Una vez este descongelada, servir 15 μL 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.
4. Pasar por la exclusiva los tubos ya servidos con la master manteniendo la cadena de frío para el área de adición.
5. Hacer limpieza de la cabina de adición como se indica en el paso 1.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	14 de 17

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

7. Se añaden 5 uL de eluidos de ADN a cada tubo, cuidando cualquier tipo de contaminación y haciéndose de forma rápida.

8. Finalmente se adicionan los controles: primero control de extracción, control negativo y de último el control positivo.

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

11.3. Montaje de PCR

REACCIÓN	VARIABLES	ETAPA 1	PASO 1	PASO 2
GENÉRICA	TIEMPO	30 seg	15 seg	40 seg
	TEMPERATURA	95°C	95°C	95°C
	CICLOS	1	40	

Tabla 3. Programación del equipo


11.4. Control de calidad analítica

La RT-PCR en tiempo real es un método sensible y debe utilizarse siguiendo estrictamente los procedimientos de control y garantía de calidad. Cumplir con estas directrices ayudará a minimizar la posibilidad de obtener resultados falsos negativos y falsos positivos. Los controles de la prueba deben realizarse al mismo tiempo que todas las muestras de la prueba.

Todos los controles de la prueba deben ser examinados antes de la interpretación de los resultados de las muestras. Si los controles no arrojan los resultados esperados, los resultados de las muestras no se pueden interpretar correctamente.

- El control “Control Positivo” de la prueba debe mostrar resultado positivo y estar dentro del rango de valores de CT esperado (>23-<27ciclos). Si este control es negativo, se debe repetir el corrido completo.
- El control “Control Negativo” debe mostrar resultado negativo. Si es positivo, se debe:

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	15 de 17

» Repetir el corrido de las muestras que mostraron resultado positivo. Si el resultado positivo es en la totalidad de la placa, se debe extraer DNA nuevamente en las muestras, usando nuevos reactivos» Limpiar la posible contaminación del DNA de las superficies.

- El control “NTC” debe mostrar resultado negativo. Si es positivo, se debe:» Realizar limpieza general del área de preparación de mezclas de reacción.» Realizar un corrido nuevamente con controles positivos y negativos para verificar el resultado.

Si los controles son adecuados, se debe repetir el corrido de las muestras y se asume contaminación durante el proceso de adición del DNA» Si el resultado se mantiene positivo, se debe preparar nueva mezcla de reacción usando material totalmente nuevo, y descartar las diluciones de reactivos de trabajo.

Si se han realizado todos los controles de forma adecuada, proceder a analizar cada muestra. Los verdaderos positivos deben producir curvas exponenciales con fases logarítmicas, lineales y mesetas.

Nota: Los moderadamente positivos producirán altos valores CT que en ocasiones están desprovistos de una fase de meseta; sin embargo, se observará la curva exponencial.

12. ANÁLISIS DE DATOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS


El resultado generado para un par de iniciadores y su sonda se interpreta como positivo si:

- La reacción genera una curva de crecimiento sigmoideo de fluorescencia en vista lineal que cruce el umbral dentro del CT 40 (40 ciclos) y ser consistente con las tres fases: exponencial, lineal y de meseta en la vista logarítmica.

- Si realiza amplificación en la reacción genérica y del clado África occidental estas deben ser concordantes. Si esto no sucede se debe repetir el ensayo. El resultado generado para un par de iniciadores y su sonda se interpreta como negativo si:

- La reacción no genera una curva de crecimiento sigmoideo de fluorescencia en “vista lineal” y tampoco se observan las fases correspondientes en “vista logarítmica”.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	16 de 17

- La reacción genera una curva de crecimiento de fluorescencia NO sigmoideal y no típica de amplificación de DNA. El resultado se interpreta como inválido si:

Cuando no hay amplificación del gen de RNasa P ni del gen la fracción del genoma blanco que corresponda a cada virus

Como consideraciones generales, se debe tener en cuenta que:

- Un resultado negativo no excluye la infección con el virus que se está investigando en la muestra, y no deben ser el único criterio para definir si existe infección.
- Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional y con acompañamiento de otro si lo considera necesario.
- La recolección, el almacenamiento y el transporte adecuados de las muestras son esenciales para obtener resultados correctos

13. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Detección de Viruela Símica (virus Mokeypox) mediante técnica de PCR en tiempo real. Instituto Nacional de Salud, 2022.

Viruela Símica, Organización Mundial de la Salud, 2022.

TANBead® Kit de extracción de ácidos nucleicos Gram Bacteria DNA Auto Plate M61GA46 (para uso con el Maelstrom 8 & Maelstrom 4800).

14. ANEXOS

Formato: HOJA DE TRABAJO MPVX


Formato: MI-GS-RG-476 “INFORME DE RESULTADO DE ENSAYO” LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA-SANTANDER.

Formato: “CONFIRMACIÓN DE DATOS EN EL ROTULO DE MUESTRAS A PROCESAR”

15. CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE MONKEYPOX VIRUS DEL ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-64
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	17 de 17

VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	26/04/2023	Emisión inicial del documento	Alba Rocío Orduz Amézquita Líder Grupo LDSP German Eduardo Marín Cárdenas Director de Salud Integral Diego Sánchez Báez Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad César Ernesto Sánchez Aranda Director de Planeación y Mejoramiento en Salud	Javier Alonso Villamizar Suarez Secretario de Salud de Santander

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas