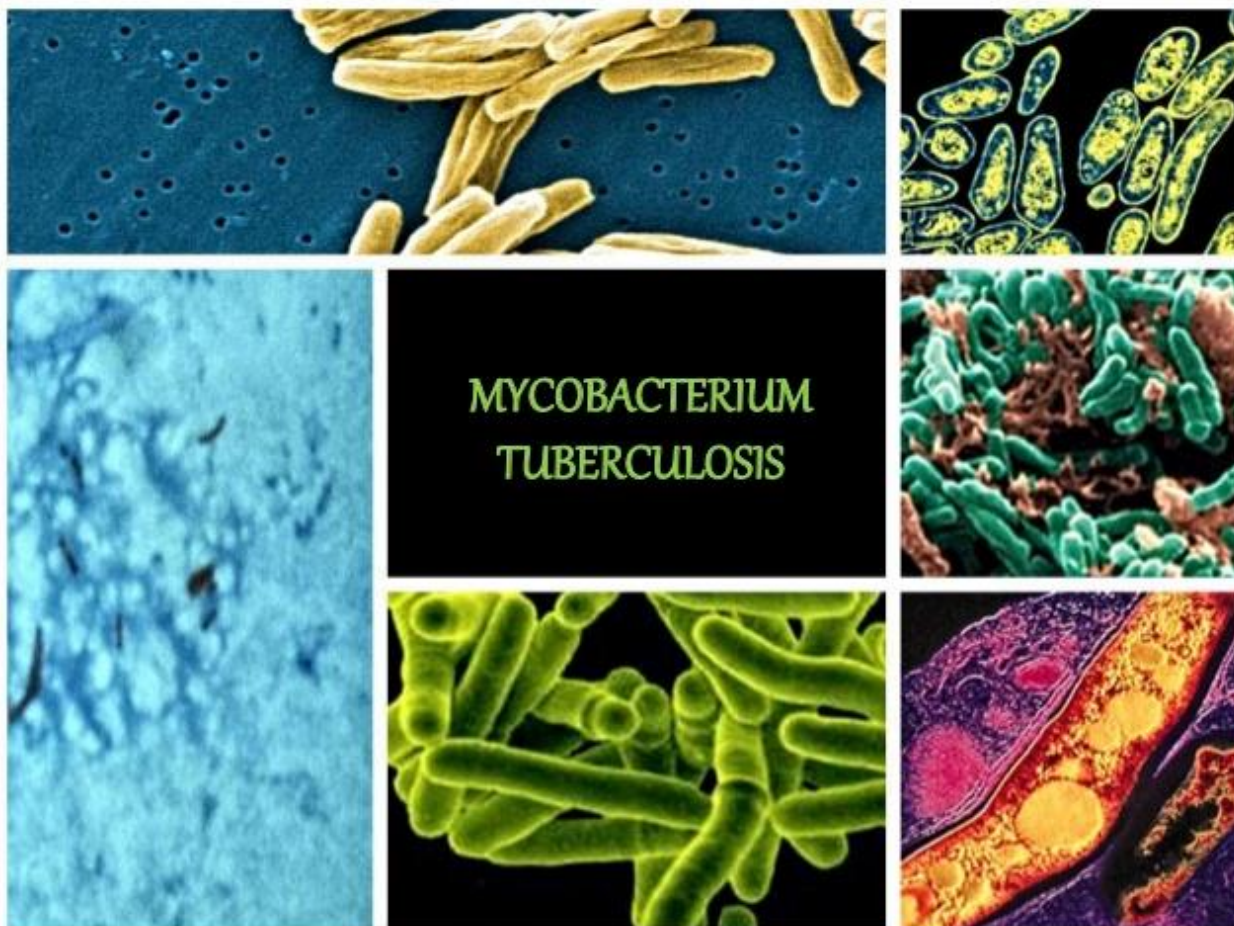


GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REALDETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REAL

SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR e HISTOCOMPATILIDAD



Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Equipo Técnico del Área de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica	<ul style="list-style-type: none">• Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento• Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico• Unidad de Gestión de la Calidad	Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director(e) del Instituto a Nacional de Salud del Niño San Borja

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-014/INSN-SB/USDXT-PC-V.01	Página 1 de 11
------------------	--------------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REAL**Guía de Procedimiento de detección de Mycobacterium
Tuberculosis de muestra parafinada por PCR en Tiempo Real**

I.	Título.....	3
II.	Finalidad.....	3
III.	Objetivos.....	3
a.	Objetivo General.....	3
b.	Objetivos específicos	3
IV.	Ámbito de aplicación.....	3
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT	3
VI.	Consideraciones Generales.....	3
a.	Definiciones Operativas	3
1.	Definición del Procedimiento.....	3
2.	Aspectos Epidemiológicos importantes	3
3.	Consentimiento Informado.....	4
b.	Conceptos Básicos	4
c.	Requerimientos Básicos.....	5
VII.	Consideraciones Específicas	6
a.	Descripción detallada del Proceso o Procedimiento	6
b.	Indicaciones.....	11
1.	Indicaciones Absolutas.....	11
2.	Indicaciones Relativas.....	11
c.	Riesgos o complicaciones frecuentes.....	11
d.	Riesgos o complicaciones poco frecuentes.....	11
e.	Contraindicaciones	11
VIII.	Recomendaciones.....	11
IX.	Autores, fecha y lugar.....	11
X.	Anexos	11
XI.	Bibliografía.....	11

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REAL

Guía de Procedimiento de detección de Mycobacterium Tuberculosis de muestra parafinada por PCR en Tiempo Real

I. Título

Detección de Mycobacterium Tuberculosis de muestra parafinada por PCR en tiempo real

II. Finalidad

Obtener material genético a partir de muestras fijadas y embebidas en parafina, para la detección molecular del complejo Mycobacterium tuberculosis, utilizando la metodología de Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

III. Objetivos**a. Objetivo General**

Detectar la secuencia de inserción IS6110 del complejo Mycobacterium tuberculosis por PCR Tiempo Real.

b. Objetivo específico

Detectar la secuencia de inserción IS6110 del complejo Mycobacterium tuberculosis en muestras parafinadas.

IV. Ámbito de aplicación

Pacientes del INSNSB con sospecha de infección por Mycobacterium tuberculosis en tejidos, previa inclusión en parafina.

V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT

Detección de Mycobacterium Tuberculosis de muestra parafinada por PCR en tiempo real
CPT : 87556

VI. Consideraciones Generales**a. Definiciones Operativas****1. Definición del Procedimiento**

La tuberculosis es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. Se calcula que una cuarta parte de la población mundial tiene tuberculosis latente, término aplicado a las personas infectadas por el bacilo pero que aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección.

La detección del ADN de M. tuberculosis, es determinar de manera cualitativa, utilizando técnicas de Biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la presencia o ausencia de esta bacteria en las muestras parafinadas que serán enviadas del Servicio de Anatomía Patológica.

2. Aspectos Epidemiológicos importantes

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa, prevenible, curable y con un importante componente social (1). Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia anual de la TB a nivel mundial está

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REAL

disminuyendo lentamente, alrededor de 1,5% desde el año 2000; sin embargo, el número absoluto de casos de TB se viene incrementando. Para el año 2015, se estima que se produjeron: 10,4 millones de casos de TB. 1,2 millones de nuevos casos de TB/VIH y 1,8 millones de defunciones, por lo que el Mycobacterium tuberculosis se ha convertido en el agente infeccioso que más muertes ocasiona, por encima del VIH y la malaria. La TB en el Perú ocupa el décimo quinto lugar de las causas de muerte, y el vigésimo séptimo puesto de carga de enfermedad medida por años de vida saludable perdidos. Afecta, predominantemente, a los estratos sociales más pobres de las grandes ciudades del país. Las tasas notificadas de incidencia (casos nunca tratados por cada 100 mil habitantes) y de morbilidad total (nuevos y antes tratados por cada 100 mil habitantes) han disminuido entre 2 a 3% por año entre los años 2011 a 2015, de 97,4 a 87,6 en incidencia y de 109,7 a 99,5 en morbilidad.

3. Consentimiento Informado

No requiere

b. Conceptos Básicos

Con el advenimiento de las tecnologías moleculares, el diagnóstico temprano y rápido de la tuberculosis pulmonar se ha vuelto mucho más fácil que antes; sin embargo, el diagnóstico de TB extrapulmonar sigue siendo un desafío. Para muestras respiratorias, los métodos internos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido ampliamente reemplazados por pruebas comerciales de amplificación de ácidos nucleicos que utilizan técnicas más sensibles y específicas, como la PCR en tiempo real (RT-PCR). Es un desafío para los patólogos diagnosticar la infección por *M. tuberculosis* (MTB) basándose solo en la histología, las pruebas de amplificación de ácido nucleico pueden ser útiles cuando no se dispone de muestras distintas de los tejidos incluidos en parafina (FFPE) fijados con formalina. Se pueden lograr altas sensibilidades mediante métodos de PCR anidados, pero el riesgo de contaminación por arrastre es una gran preocupación. Las sensibilidades de las pruebas moleculares comerciales en la detección de MTB en tejidos FFPE varían mucho y se informó que eran tan altas como el 95%. La metodología, exige cortar cinco secciones de 5 µm de cada bloque para las muestras de biopsia. Cada muestra se desparafinizará con xilol y se procederá a aplicar el protocolo de amplificación por PCR Tiempo Real.

Definiciones:

Mycobacterium tuberculosis: es una bacteria patógena responsable de la mayor cantidad de casos de tuberculosis en el mundo. *M. tuberculosis* es parte de un complejo microbiano de al menos nueve especies: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. orygis*.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Metodología en biología molecular, en la cual se obtiene múltiples copias de una cadena de ADN

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REAL

específica, la cual es aplicada para diagnóstico en la detección de agentes virales, bacterianos y enfermedades humanas.

Muestra parafinada: Tejidos FFPE (fijados en formalina e incluidos en parafina) es una forma de preservación primero fijándola en formaldehído y a continuación, se incluye en un bloque de cera de parafina; esta preparación está destinada para muestras de biopsia que serán utilizadas para algún tipo de examen clínico, investigación ó diagnóstico.

Xilol: Es un derivado dimetilado del benceno. En histología se emplea en los pasos iniciales como disolvente de la parafina en los cortes histológicos (desparafinización).

c. Requerimientos Básicos**➤ Equipos Biomédicos**

- Analizador Genético de Capilares
- Termociclador en Gradiente
- Cabina de Bioseguridad
- Ultracentrifuga refrigerada
- Termoblock
- Vortex
- Micropipetas 1-10 ul
- Micropipeta de 2 – 20 ul
- Micropipetas 20 – 200 ul
- Micropipeta de 100 – 1000 ul
- Congeladora de - 70°C
- Congeladora de - 20°C
- Refrigeradora de 2 a 8°C
- Material médico no Fungible
- Tips con filtro de 1 – 10 ul
- Tips con filtro de 2 – 20 ul
- Tips con filtro de 20 – 200 ul
- Tips con filtro de 100 – 1000 ul
- Tubos de 1.5 ml
- Gradillas para tubos de 2.0 ml
- Gradilla de tubos de 12x75 mm
- Criobox
- Contenedor de desechos biológicos de 1L
- Contenedor de desechos biológicos de 4L
- Tubos de PCR 0.2 ml

➤ Material médico Fungible

- **Reactivos**

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REAL

- ✓ Kit de Extracción de ADN genómico
- ✓ Kit de Amplificación de marcadores STR (24 marcadores)

- **Materiales**

- ✓ Guantes de nitrilo descartables
- ✓ Lentes protectores de policarbonato

- **Soluciones**

- ✓ Etanol Absoluto

- **Recursos Humanos**

- ✓ Técnico de laboratorio
- ✓ Biólogo
- ✓ Médico Patólogo Clínico

VII. Consideraciones Específicas

a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento

Tiempo: 40 minutos

a.1. Preparación de muestra

Al inicio del trabajo:

1. Toda muestra debe ser ingresada con letra legible, especificando el tipo de prueba a realizarse en el Registro General de Toma de Muestra del Servicio de Patología Clínica.
2. Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
3. Toda muestra debe ser considerada potencialmente infecciosa y se deben tomar las precauciones que garanticen la seguridad del flebotomista y de los pacientes.
4. Antes de iniciar cualquier procedimiento, limpiar con alcohol Etilico al 70% o Hipoclorito de sodio al 10 % las superficies de las mesas de trabajo.
5. Utilizar contenedores de descarte para objetos punzo cortantes y biocontaminados.

Numeración y Centrifugación

1. Verificar la calidad de la muestra parafinada recepcionada.
2. Numerar en orden correlativo cada una de las muestras extraídas consignando los siguientes datos:
 - Tipo de Examen solicitado
 - Tipo de muestra
 - Fecha de la toma de muestra
 - Procedencia de la muestra: Tejido FFPE

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REAL

Al Final del trabajo:

1. Limpiar la superficie de la mesa de trabajo utilizada.
2. Dejar los materiales utilizados en su lugar respectivo.
3. Eliminar los guantes y/o otros materiales descartables en los reservorios adecuados (bolsa roja).
4. Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible.

a.2. Extracción de ADN genómico (150 minutos)**1. Preparación de reactivos**

- 1.1. Añadir 30ml de etanol absoluto al frasco de Buffer de Lavado.

2. Proceso de Extracción

- 2.1. Rotular en orden ascendente el número de crioviales necesarios según la lista de trabajo del día.
- 2.2. Añadir 1ml de xilol a los cortes de FFPE
- 2.3. Centrifugar a 13000 rpm por 2 min
- 2.4. Retirar el sobrenadante
- 2.5. Añadir 1ml etanol absoluto
- 2.6. Centrifugar a 13000 rpm por 2 min
- 2.7. Retirar el sobrenadante
- 2.8. Agregar 180 ul de buffer de lisis de tejido
- 2.9. Agregar 20 ul de Proteinasa K
- 2.10. Incubar a 56°C por 90 min
- 2.11. Incubar a 90°C por 60 min
- 2.12. Añadir 200ul Buffer de lisis complementario
- 2.13. Añadir Control Interno de extracción-amplificación.
- 2.14. Añadir 200ul alcohol absoluto
- 2.15. Mezclar por Vortex (Aproximadamente durante 5 segundos)

3. Unión a la Columna

- 3.1. Cargar el lisado en una columna de extracción (aprox. 640 ul) utilizando una pipeta de transferencia estéril.
- 3.2. Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 3.3. Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección.

4. Lavados

- 4.1. Agregar 500 ul de Wash Buffer 1
- 4.2. Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 4.3. Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección
- 4.4. Agregar 500 ul de Wash Buffer 2

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REAL

- 4.5. Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 4.6. Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección
- 4.7. Agregar 500 ul de Alcohol absoluto
- 4.8. Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 4.9. Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección
- 4.10. Centrifugar la columna a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente.
- 4.11. Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml.

5. Elución

- 5.1. Agregar 50 ul de Buffer de Elución.
- 5.2. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 5.3. Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 5.4. Proceder a la Cuantificación del ADN eluído.

6. Almacenamiento

- 6.1. Almacenar a -20°C hasta su uso en PCR Tiempo Real

a.3. Amplificación por PCR en tiempo final (120 minutos)

Al inicio del trabajo:

1. Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
2. Encender la Cabina de Bioseguridad asignada para la preparación y cargado de las reacciones de PCR.
3. Retirar los reactivos para la preparación de la mezcla de PCR del sistema de amplificación de Mycobacterium tuberculosis y dejar atemperar.

Preparación de la mezcla de PCR

4. Dispensar 30 ul de la mezcla Mastermix en cada pocillo a utilizar
5. Por cada pocillo, agregar 10 ul de la muestra y 10ul de control de amplificación.
6. Initial denaturation 95°C/1 min
7. Establecer el número de ciclos
8. Denaturación 94°C / 3 seg
9. Alineamiento-extensión 60° / 30 seg
10. Extensión final 60°C / 8 min

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REAL

11. Hold 4°C al infinito

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Estándar											
B	Muestra 1											
C	Muestra 2											
D	Muestra 3											
E	Muestra 4											
F	Muestra 5											
G	Muestra 6											
H	Muestra 7											

12. Ingresar los parámetros básicos de los estándares, NTC y de las muestras:

- Definir las posiciones de los estándares en la placa de PCR en el Mx.
- En el menú de la derecha, seleccione e indique:
 - Well type: Standard
 - Collect fluorescence data: FAM, ROX
 - Reference dye: ROX
 - Replicate symbol: none.
- Definir la posición del Control NTC en la Placa de PCR en el Mx.
- En el menú de la derecha, seleccione e indique:
 - Well type: NTC
 - Collect fluorescence data: FAM, ROX, HEX
 - Reference dye: ROX
 - Replicate symbol: none.
- Definir la posición de las muestras en la Placa de PCR en el Mx.
- En el menú de la derecha, seleccione e indique:
 - Well type: Unknown
 - Collect fluorescence data: FAM, ROX, HEX
 - Reference dye: ROX
 - Replicate symbol: none.
- Haciendo doble click en cada pocillo, aparecerá el cuadro de diálogo de información del Pocillo. Introduzca según corresponda:
 - Estándar 01
 - Nombre del Paciente

13. Configurar los parámetros de amplificación PCR con los siguientes datos:

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-014/INSN-SB/USDXT-PC-V.01	Página 9 de 11
------------------	--------------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REAL**Segmento 01**

UDG decontamination (37°C por 2 min.) -- > 01 Ciclo

Segmento 02

Initial denaturation (95°C por 10 min.)

Denaturation (95°C por 5 s)

Annealing (60°C por 40 s) - reading of the fluorescence signal 45 Ciclos

Extensión (72°C por 20 s)

14. Guardar la corrida en la carpeta correspondiente y hacer click en Start para iniciar la corrida.

a.4. Análisis de resultados

1. Cuando el programa de amplificación haya culminado, hacer click en Analysis del menú de la izquierda.
2. Active la pestaña de visualización del canal HEX para verificar la amplificación del control Interno presente en todas las muestras y en el control negativo.
3. Active la pestaña de visualización del canal FAM para verificar la amplificación de los Estándares.
4. Hacer click en Amplificación plot y verifique los Ct de amplificación del Control Interno, Estándares y muestras clínicas.
5. Hacer click en Show Standard Curve y verifique los datos de RSq y % de eficiencia, los cuales deben estar cerca de 1 y 100 %, respectivamente.
6. Para mostrar los resultados de cuantificación, hacer click en Text report.
7. Los resultados se enuncia en términos de DETECTADO – NO DETECTADO, por la naturaleza cualitativa de la muestra.

a.5. Limitaciones y validez de los resultados

- No cambie el ensayo. Es muy recomendable que un paciente monitorizado permanezca con el mismo tipo de ensayo durante el periodo completo de monitorización.
- No cambie la matriz de la muestra. Es muy recomendable usar la misma matriz de muestra durante el periodo completo de monitorización de cada paciente.
- Realizar ensayos de sensibilidad. Diseñar el estudio de quimeras artificiales para valorar la sensibilidad del ensayo.
- Para uso profesional. Este procedimiento es sólo para uso profesional y por personal debidamente formado.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS DE MUESTRA PARAFINADA POR PCR EN TIEMPO REAL**b. Indicaciones****1. Indicaciones Absolutas**

Detección de M. tuberculosis en muestras parafinadas remitidos por el Servicio de Anatomía Patológica del Instituto Nacional del Niño – San Borja (INSN-SB).

2. Indicaciones Relativas

La muestra validada para la detección de M. tuberculosis por PCR a Tiempo Real es: Corte histológico parafinado.

c. Riesgos o complicaciones frecuentes

Ninguna

d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes

Ninguna

e. Contraindicaciones

Ninguna

VIII. Recomendaciones**IX. Autores, fecha y lugar**

Luis Martín Cruz Díaz, Blgo

Andrea Zavaleta Gonzalez, MC

Carla Mendez Rodriguez Chacón, MC

Área de Biología Molecular

Febrero 2019 - Servicio de Patología Clínica

Vigencia: 2 años

X. Anexos

No aplica

XI. Bibliografía

1. Narayanan S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. Am J Clin Pathol. 2000; 113:429 – 452.
2. DNA extraction FFPE. Manual Qiagen DNA Kit.
3. Kit PCR para detección de complejo Mycobacterium tuberculosis. Geneproof.