

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**ELABORACIÓN DE DOCUMENTOS PARA EL MANUAL DE CALIDAD, COMO PARTE DEL SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR- INSTITUTO SELADIS, EN EL MARCO DE LA NB/ ISO 15189: 2022**

**Trabajo Dirigido para optar al Grado de Licenciatura en Bioquímica**

**POSTULANTE: LUIS ALEJANDRO MENDOZA ESCOBAR**

**TUTORA: Dra. ANETH VASQUEZ MICHEL M.Sc.**

**LA PAZ-BOLIVIA  
2024**



*Agradezco a mi familia, cuyos pilares de apoyo y amor incondicional han sido mi fortaleza en cada paso de este camino. A Dios, por guiarme y darme la sabiduría necesaria para alcanzar este logro.*

*De manera especial, dedico este trabajo a la memoria de mi querido abuelito Gonzalo Escobar, cuyo recuerdo y enseñanzas continúan iluminando mi vida. Tu reciente partida deja un vacío enorme, pero tu legado perdura en cada uno de nosotros. Gracias por ser un ejemplo de integridad, sabiduría y cariño.*

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA

ÁREA DE BIOQUÍMICA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO SELADIS DE  
LA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS – UMSA

Trabajo dirigido:

ELABORACIÓN DE DOCUMENTOS PARA EL MANUAL DE CALIDAD, COMO  
PARTE DEL SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD DEL LABORATORIO DE  
MICROBIOLOGÍA MOLECULAR- INSTITUTO SELADIS, EN EL MARCO DE LA NB/  
ISO 15189: 2022

Presentado por: Univ. Luis Alejandro Mendoza Escobar  
Para optar al grado académico de Licenciatura en Bioquímica

Nota numeral.....

Nota literal.....

Ha sido.....

Directora de la Carrera de Bioquímica: Dra. Ximena Taborga

Tutora: Dra. Aneth Vasquez Michel M.Sc.

Tribunal: Dr. Sergio Cabrera Calzadilla, Esp.

Tribunal: Dra. Angélica María Espada Silva M.Sc.

Tribunal: Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya, Esp.

## Tabla de Contenidos

<b>1. Naturaleza del proyecto</b> .....	1
<b>a) Descripción</b> .....	1
<b>b) Justificación</b> .....	2
<b>c) Marco institucional</b> .....	3
<b>1. Presentación de la entidad</b> .....	3
<b>d) Fines</b> .....	4
<b>e) Metas</b> .....	4
<b>f) Beneficiarios</b> .....	5
<b>g) Productos</b> .....	5
<b>h) Localización</b> .....	5
<b>2. Métodos, técnicas y procedimientos empleados</b> .....	5
<b>3. Objetivos y metas alcanzados</b> .....	6
<b>3.1 Objetivo general</b> .....	6
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	6
<b>4. Metas alcanzadas</b> .....	7
<b>5. Conclusiones y recomendaciones</b> .....	7
<b>6. Bibliografía</b> .....	8
<b>7. Anexos</b> .....	12

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

FCFB	Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
IBNORCA	Instituto Boliviano de Normalización y Calidad
IBBA	Instituto Boliviano de Biología de la Altura
IIFB	Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas
IINSAD	Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo
IIQ	Instituto de Investigaciones Químicas
ISO	Organización Internacional de Normalización
LMM	Laboratorio de Microbiología Molecular
NB	Normativa Boliviana
OMS	Organización Mundial de la Salud
POE	Procedimiento Operativo Estandarizado
SELADIS	Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud
SGC	Sistema de Gestión de Calidad
UMSA	Universidad Mayor de San Andrés

## RESUMEN

El laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS desempeña una función importante en investigación y diagnóstico de enfermedades infecciosas, especialmente en la determinación molecular del agente *P. jirovecii*. Actualmente, el laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS carece de un documento oficial que describa los procedimientos analíticos para la detección del *P. jirovecii*, La ausencia de dicho documento puede llevar a inconsistencias en los resultados, errores operativos y una disminución en la eficiencia.

La elaboración de este trabajo logró aportar una documentación comprensiva que detalla las actividades realizadas en el laboratorio de Microbiología Molecular para el análisis clínico de *P. jirovecii* en muestras de esputo. Esta documentación está lista para su uso inmediato, facilitando la aplicación de los procedimientos establecidos y promoviendo una mayor eficiencia en las pruebas diagnósticas. Así, también se elaboraron y codificaron documentos adicionales, como formularios y registros, que son esenciales para la correcta ejecución del procedimiento analítico desarrollado. Estos documentos aseguran la calidad del proceso, permitiendo un seguimiento adecuado y garantizando que todas las actividades se realicen de acuerdo con los estándares establecidos. Esto no solo mejora la organización del trabajo, sino que también promueve la trazabilidad y la documentación de cada fase del análisis.

## **1. Naturaleza del proyecto**

### **a) Descripción**

La calidad es la totalidad de funciones, características o comportamientos de un bien producido o de un servicio prestado, que les hace capaces de satisfacer las necesidades de los usuarios (*Molina et al., 2018*).

El manual de calidad de un laboratorio de análisis clínico es la guía maestra de la organización donde se especifica en general, lo que se hace, quien, cuando, como y en qué lugar se hace, indicando los recursos humanos y económicos, los registros y la resolución de discrepancia (*Ramírez, 2005*).

La documentación se la dispone jerárquicamente como una pirámide, ordenada generalmente de la siguiente forma: en la cima de la pirámide se ubica el documento de mayor importancia denominado manual de calidad; el cual, describe el Sistema de Gestión de Calidad de la Entidad. En el segundo nivel están los procedimientos, que desarrollan operativamente los enunciados del manual de calidad. En el tercer nivel se ubican los instructivos, llamados también instrucciones de trabajo, pues precisan el cómo realizar la tarea, y para sustentarlos se encuentran los registros, que son los formatos firmados, imprescindibles para dar vida al Sistema de Gestión de Calidad (*Correa, 2016*).

El instrumento primario para la aplicación del control de calidad está constituido por los manuales de procedimientos técnicos y administrativos. Se entiende como procedimiento a la descripción precisa, concisa y clara del material, equipo, condiciones, actividades y requerimientos para obtener un producto o un servicio de una calidad definida. Los POE son también documentos y contienen instrucciones paso a paso por escrito que el personal del laboratorio debe seguir de forma meticulosa cuando realice un procedimiento (*OMS, 2015*).

Inicialmente, los manuales de procedimientos deben ser preparados en cada uno de los laboratorios por el personal responsable de ejecutar las tareas descritas, revisadas por los supervisores y autorizados para su uso por la dirección técnica. El manual de procedimientos es un compilado de procedimientos específicos, y sirve como instrumento para la capacitación de personal y para facilitar las auditorías. Los procedimientos deben ser revisados periódicamente y modificados de acuerdo a las necesidades propias del laboratorio (*OPS, 2012*).



El presente proyecto tiene como objetivo principal desarrollar un procedimiento analítico para la detección del *Pneumocystis jirovecii* en muestras de esputo humano mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) utilizando la sonda TaqMan. *Pneumocystis jirovecii* es un hongo oportunista que causa neumonía en individuos inmunocomprometidos.

La identificación rápida y precisa del patógeno es crucial para el diagnóstico y manejo temprano de la enfermedad, dado que las técnicas convencionales como la tinción y el cultivo presentan limitaciones en términos de sensibilidad y tiempo de respuesta.

La metodología basada en qPCR con la sonda TaqMan permite una cuantificación más precisa y específica del ADN del hongo en muestras clínicas, lo que contribuye a mejorar tanto el diagnóstico como la vigilancia epidemiológica de la infección.

La realización de este trabajo busca proporcionar una metodología documentada y detallada que pueda ser implementada en el laboratorio de Microbiología Molecular, en el marco normativo ISO 15189:2022. Los procedimientos analíticos son parte de los documentos que un Manual de Calidad debe tener.

## **b) Justificación**

El laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS desempeña una función importante en investigación y diagnóstico de enfermedades infecciosas, especialmente en la determinación molecular del agente *P. jirovecii*. La elaboración del procedimiento analítico para dicho agente infeccioso proporcionará beneficios tangibles en términos de calidad, eficiencia y cumplimiento normativo. Este trabajo beneficiará al analista clínico de laboratorio en sus actividades diarias, servirá de ayuda en capacitar al nuevo personal y contribuirá al avance de la ciencia. La elaboración de un procedimiento analítico para un laboratorio clínico facilita:

- a) Uniformidad: al elaborar un procedimiento operativo estandarizado, todo el personal de laboratorio podrá realizar los análisis exactamente de la misma forma para esperar el mismo resultado. La uniformidad permite a las personas que utilizan los resultados analíticos observar los cambios que se producen a lo largo del tiempo en los resultados de un mismo paciente.
- b) Exactitud: seguir los procedimientos por escrito ayuda al personal del laboratorio a producir resultados más exactos que si únicamente confiaran en la memoria, porque de esta manera los trabajadores no olvidarán pasos del proceso.

- c) Calidad: conseguir unos resultados uniformes (fiables) y exactos son las principales metas del laboratorio y podrían considerarse la definición de calidad en el laboratorio. Los procedimientos analíticos además de asegurar la uniformidad de las actividades realizadas en el laboratorio, ponen estándares de calidad para minimizar errores y mejorar la reproducibilidad de los resultados (OMS, 2015).
- d) Formación del personal: El procedimiento analítico servirá como guía para el personal nuevo y existente. Facilitará la capacitación y asegurará que todos sigan los mismos pasos.
- e) Cumplimiento normativo: El procedimiento cumple con regulaciones y estándares de calidad indicadas en la norma ISO 15189: 2022.
- f) Documentación: El trabajo realizado servirá como referencia documental para la generación de futuros documentos para el LMM.

Actualmente, el LMM del Instituto SELADIS carece de un documento oficial que describa los procedimientos analíticos para la detección del *P. jirovecii*, La ausencia de dicho documento puede llevar a inconsistencias en los resultados, errores operativos y una disminución en la eficiencia.

Los procedimientos analíticos son herramientas fundamentales para mantener la coherencia y la eficiencia en las operaciones de un laboratorio clínico. Su elaboración contribuye a la calidad del servicio y al cumplimiento de los estándares establecidos. (Stagnaro, D., Camblong, J., & Nicolini, J., 2005).

### **c) Marco institucional**

#### **1. Presentación de la entidad**

El Instituto SELADIS es una Unidad dependiente de la FCFB de la UMSA, que ha definido como Principales Procesos a la Prestación de Servicios, Investigación y Enseñanza, mediante oferta pruebas analíticas básicas, de mediana y alta complejidad bajo un riguroso control de calidad en las Áreas de Bioquímica Clínica, Microbiología y Químico Ambiental, para un diagnóstico integral con responsabilidad y compromiso social. Por otra parte, la investigación en el Instituto, comprende: Diagnóstico en Salud, Fármacos y Medio Ambiente.

El Instituto SELADIS brinda la oportunidad a estudiantes de pregrado de realizar el Internado Rotatorio en las Carreras de Bioquímica y Química Farmacéutica; y en el Postgrado ofrece diversas Especialidades.

El LMM se dedica al diagnóstico e investigación de agentes etiológicos de enfermedades infecciosas aplicando tecnología molecular innovadora y actual. Así mismo busca establecer alianzas estratégicas con otros Institutos de la UMSA (IIFB, IIQ, IBBA, IINSAD) con el fin de realizar investigaciones conjuntas, servicios y enseñanza.

Actualmente, la organización del LMM está bajo el cargo del jefe de laboratorio, Dra. Aneth Vasquez Michel M.Sc. siendo la única responsable.

Entre otro personal que ocupa el LMM están; el Asistente de Investigación, Internos, Tesistas y Auxiliares de Investigación.

### **1.1 Misión**

Fortalecer las labores docentes, interacción social y de investigación en las áreas relacionadas con las Ciencias Biológicas, que permitan resolver problemas de actualidad y a futuro en algunas de las diversas aplicaciones que actualmente tienen los datos moleculares en la línea de la etiología de enfermedades infecciosas.

### **1.2 Visión**

Ser un laboratorio líder en el estudio, diagnóstico, asesoramiento e investigación de agentes etiológicos de enfermedades infecciosas aplicando tecnología molecular innovadora y actual.

#### **d) Fines**

Proporcionar al LMM, procedimientos escritos que describan el análisis del *P. jirovecii* en muestras de esputo mediante la técnica de qPCR asegurando que el proceso analítico cumpla con criterios de precisión, sensibilidad y especificidad, promoviendo el diagnóstico rápido y confiable.

#### **e) Metas**

Contar con documentación que detalle las actividades que se realizan en el LMM para su inmediato uso y aplicación en las pruebas de análisis clínico del *P. jirovecii*.

Elaborar documentos adicionales (como formularios, registros, etc) para el procedimiento analítico elaborado pueda ejecutarse asegurando la calidad del proceso.

#### **f) Beneficiarios**

1. Personal que realiza actividades en el laboratorio como ser, docentes investigadores, internos, tesistas y técnicos de laboratorio, pasantes y profesionales.
2. Pacientes y usuarios externos.

#### **g) Productos**

El Procedimiento Analítico para la Determinación del *P. jirovecii* en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sondas Taqman.

#### **h) Localización**

El trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnostico e Investigación en Salud (SELADIS), ubicado en la Av. Saavedra 2224 piso 4 de la ciudad de La Paz, Bolivia.

### **2. Métodos, técnicas y procedimientos empleados**

Para desarrollar el procedimiento analítico del *P. jirovecii*, los recursos utilizados fueron:

- Revisión bibliográfica de las normativas vigentes y normalizadas por IBNORCA-Bolivia para establecer un marco referencial sustentable Norma ISO 15189: 2022
- Revisión de documentos normativos de la Institución.
- Revisión de guías para la elaboración POEs.
- Redacción de procedimientos analíticos bajo la supervisión del encargado del laboratorio y del asesor del trabajo.
- Reuniones de asesoramiento con el personal docente encargado del laboratorio, para la elaboración de los protocolos de las pruebas en el LMM.
- Participación de un minicurso online de la nueva versión ISO 15189: 2022 en TCM (plataforma virtual especializado en el ámbito de la Metrología, Calidad y Productividad) que ofreció servicios de formación, consultoría y auditoría a la Industria, Laboratorios e Instituciones.
- Webinars y Seminarios informativos online acerca de la nueva versión Norma ISO 15189:2022.
- Documentación propia del LMM de la norma 15189 2012 tercera edición.
- Norma ISO 15189: 2022 con estándar internacional (versión en idioma inglés).

- Documentación de la OMS y similares (manuales de otras instituciones), para la elaboración de procedimientos analíticos.

### **3. Objetivos y metas alcanzados**

#### **3.1 Objetivo general**

Elaborar el procedimiento analítico para la determinación del *Pneumocystis jirovecii* en muestras de esputo por la técnica qPCR y Sonda Taqman, y en cumplimiento de los requisitos de la norma ISO 15189: 2022, asegurando un enfoque estructurado para gestionar la calidad y la competencia de los análisis clínicos realizados en el laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- a) Desarrollar instructivos detallados y establecer buenas prácticas de bioseguridad específicas para el manejo y procesamiento de muestras de *P. jirovecii*, con el fin de asegurar la seguridad del personal, prevenir la contaminación cruzada y asegurar el cumplimiento de las normativas de bioseguridad en el laboratorio.
- b) Identificar y documentar los materiales, equipos y reactivos necesarios para la determinación de *P. jirovecii*, asegurando la correcta disponibilidad y estandarización de los insumos.
- c) Describir y estructurar las fases del procedimiento analítico, con el fin de asegurar un flujo de trabajo eficiente y preciso para la detección de *Pneumocystis jirovecii*.
- d) Establecer los pasos específicos de la fase pre-analítica, que incluyen la recolección, manejo y preparación de las muestras de esputo, asegurando la calidad de la muestra y para minimizar errores antes del análisis.
- e) Describir el procedimiento de la fase analítica, detallando cada paso del proceso para asegurar la precisión y coherencia en la ejecución del análisis.
- f) Definir los procedimientos de la fase post-analítica, que comprenden la interpretación de resultados, almacenamiento de datos y generación de informes, asegurando un manejo adecuado de la información y el cumplimiento de normativas de seguridad y calidad.
- g) Elaborar y codificar adecuadamente la documentación adicional, como registros, formularios, encuestas e instructivos, que sea necesaria para la correcta ejecución de todas las fases del procedimiento analítico.

h) Incorporar los lineamientos de la normativa ISO 15189:2022 en todas las fases del procedimiento, para asegurar que el laboratorio cumpla con los requisitos internacionales de calidad en el diagnóstico molecular.

#### **4. Metas alcanzadas**

- Se logró aportar una documentación comprensiva que detalla las actividades realizadas en el laboratorio de Microbiología Molecular para el análisis clínico de *P. jirovecii* en muestras de esputo. Esta documentación está lista para su uso inmediato, facilitando la aplicación de los procedimientos establecidos y promoviendo una mayor eficiencia en las pruebas diagnósticas.
- Se elaboraron y codificaron documentos adicionales, como formularios y registros, que son esenciales para la correcta ejecución del procedimiento analítico desarrollado. Estos documentos aseguran la calidad del proceso, permitiendo un seguimiento adecuado y garantizando que todas las actividades se realicen de acuerdo con los estándares establecidos. Esto no solo mejora la organización del trabajo, sino que también promueve la trazabilidad y la documentación de cada fase del análisis.

#### **5. Conclusiones y recomendaciones**

Se desarrollaron instructivos detallados para implementar buenas prácticas de bioseguridad específicas para el manejo y procesamiento de muestras de *P. jirovecii*, lo que permitirá la seguridad del personal, evitar la contaminación cruzada y el cumplimiento de los puntos normativos de bioseguridad.

Se logró identificar y documentar de manera precisa los materiales, equipos y reactivos necesarios para el análisis de *P. jirovecii*, lo que asegurará la correcta disponibilidad y estandarización de los insumos.

La descripción y estructuración de las fases del procedimiento analítico permitió establecer un flujo de trabajo claro y preciso para la detección de *P. jirovecii*.

Se definieron los pasos específicos de la fase pre-analítica, incluyendo la recolección, manejo y preparación de las muestras de esputo, lo que asegurará la calidad de las muestras al iniciar la marcha analítica.

Se logró describir de manera exhaustiva el procedimiento de la fase analítica, esta descripción detallada incluyó cada etapa y sub-etapa del procedimiento.

Se definieron claramente los procedimientos correspondientes a la fase post-analítica, incluyendo la interpretación de resultados, el almacenamiento adecuado de los datos y la generación de informes.

La documentación adicional, como registros, formularios, encuestas e instructivos, fue elaborada y codificada de manera adecuada, lo cual facilitara la correcta ejecución en todas las fases del procedimiento analítico.

La incorporación de los lineamientos de la normativa ISO 15189: 2022 en todas las fases del procedimiento asegurar que el laboratorio cumpla con los requisitos internacionales de calidad para el diagnóstico molecular.

## 6. Bibliografía

Abel, G. (2014). *Best Practices for Maintaining Quality in Molecular Diagnostics*.

Recuperado de [https://www.aacc.org/~media/files/meetings-and-events/resources-from-past-events/conferences/2014/molecular-testing/may-29-and-30/best\\_practices\\_molecular\\_diagnostics\\_slides\\_may\\_30\\_2014.pdf?la=en](https://www.aacc.org/~media/files/meetings-and-events/resources-from-past-events/conferences/2014/molecular-testing/may-29-and-30/best_practices_molecular_diagnostics_slides_may_30_2014.pdf?la=en)

Aguilar J. M & Mansilla C. (2009). *Procedimientos en Microbiología Clínica*.

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia32.pdf>

Balows, A. (2003). Manual of clinical microbiology 8th edition. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 47(4), 625–626. [https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(03\)00160-3](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(03)00160-3)

Carey, R. B., Bhattacharyya, S., Pentella, M., Salfinger, M., & Schuetz, A. N. (2018).

*Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Implementing a Quality Management System in the Medical Microbiology Laboratory*. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(3). <https://doi.org/10.1128/cmr.00062-17>

Correa A. A. (2016). *Documentación de un Sistema de Gestión de Calidad*. CISCI.

<https://www.iiis.org/CDs2016/CD2016Summer/papers/CA109WA.pdf>

Instituto SELADIS: *Documentación Interna del laboratorio de Microbiología Molecular*. (s.

f.). Códigos internos: CMGE-MM-01, CPM-MM-01, DCE-MM-01, ILD-MM-01, IPRB-MM-01, REQ-MM-01, RMA-MM-01, RRM-MM-01, RMS-MM-01, RMT-MM-01.

Elsevier. (2012). *Protocolo de estudio y manejo de la infección por Pneumocystis jirovecii. Infectio.* <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-022-02559-1>

Establishing Molecular Testing in Clinical Laboratory Environments; Approved Guideline. (2011). Recuperado de [https://clsi.org/media/1474/mm19a\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1474/mm19a_sample.pdf)

Forbes, B.A. et al., (1998) *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. 10th Edition, Mosby Inc., St. Louis Missouri. - References - Scientific Research Publishing. [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1100318](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1100318)

Hernández, L. (2021). *Tema: ¿Qué es un manual de calidad?* - B Softgrade. <https://softgrade.mx/manual-de-calidad/>

Hospital Cayetano Heredia. (2018). Resolución Directoral N° 077-2018-HCH-DG. Recuperado de [https://www.hospitalcayetano.gob.pe/PortalWeb/wp-content/uploads/resoluciones/2018/rd/RD\\_077-2018-HCH-DG.pdf](https://www.hospitalcayetano.gob.pe/PortalWeb/wp-content/uploads/resoluciones/2018/rd/RD_077-2018-HCH-DG.pdf)

International Organization for Standardization. (2022). *ISO 15189:2022 Medical laboratories. Requirements for quality and competence. International Version.* Recuperado de <https://www.iso.org/standard/76677.html>

LAFYM. (2010). *Laboratorio de Análisis Microbiológico.* Recuperado de <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/EPSQB1070.pdf>

Laboratorios clínicos — *Requisitos para la calidad y la competencia: ISO 15189:2022(es).* Recuperado de <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15189:ed-4:v1:es:fn:3>

Logical Observation Identifiers Names and Codes LOINC and Nomenclature for Properties



and Units (NPU, NGC) and SNOMED CT. <https://loinc.org>

Manual de Control de Calidad en Laboratorio Clínico: E.S.E Salud. (2017).

[https://www.saludpereira.gov.co/medios/Archivos/Manuales\\_2019/Manual\\_control\\_de\\_calidad.pdf](https://www.saludpereira.gov.co/medios/Archivos/Manuales_2019/Manual_control_de_calidad.pdf)

Manual Básico de Control de Calidad en el Laboratorio de Microbiología. (2007). Recuperado de [https://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/PNADM602.pdf](https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADM602.pdf)

Manual MSD (Merck Sharp & Dohme). (2022). *Neumonía por Pneumocystis jirovecii*.

Recuperado de [Neumonía por Pneumocystis jirovecii - Trastornos pulmonares - Manual MSD versión para profesionales \(msdmanuals.com\)](#)

Manual de Procedimientos Técnicos del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS. (s. f.). Código interno: MP-MM-01.

Manual de Bioseguridad del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS. (s. f.). Código interno: MB-MM-01.

Manual de Calidad del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS. (s. f.). Código interno: MC-MM-01.

Manual de Funciones del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS. (s. f.). Código interno: MF-MM-01.

Manual de Mantenimiento de Equipos del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS. (s. f.). Código interno: ME-MM-01.

Molina, M. A., Diego, Q. M. L., Daniel, U. G., & Sindy, V. A. (2018). *Medicina Legal de Costa Rica: La Calidad en la Atención Médica*.

[https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152004000100007](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152004000100007)

Organización Internacional de Normalización. Traducción Oficial (2023). Requisitos del

Proceso (NB/ISO 15189: 2022-12). Cuarta edición.

Organización Mundial de la Salud. (2012). *Pan American Health Organization*. Recuperado de <https://www.paho.org/en/node/78899>

Organización Mundial de la Salud. (2015). Laboratory Quality Stepwise Implementation tool. [https://extranet.who.int/lqsi/sites/default/files/attachedfiles/LQMS%2016-4%20SOPs\\_0.pdf](https://extranet.who.int/lqsi/sites/default/files/attachedfiles/LQMS%2016-4%20SOPs_0.pdf)

Planning for Laboratory Operations During a Disaster; Approved Guideline. (2014). Recuperado de [https://clsi.org/media/3404/gp36ae\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/3404/gp36ae_sample.pdf)

Pneumocystis jirovecii genesig Advanced Kit. User Manual. <https://www.genesig.com/products/9376-pneumocystis-jirovecii>

Purelink Genomic DNA Kits. Invitrogen User Manual. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182001>

Radiopaedia. (2021). Pulmonary Pneumocystis jirovecii infection. Radiopaedia. Recuperado de <https://radiopaedia.org/articles/pulmonary-pneumocystis-jirovecii-infection-2?lang=us>

Ramírez, E. (2005). OPS - Módulo 3: *Documentación del Sistema de Calidad*: <https://www3.paho.org/spanish/ad/th/s/ev/labs-slides-cgc-mod3.pdf>

Revista Sanitaria de Investigación. (2021). *Detección de Pneumocystis jirovecii por PCR a tiempo real*. *Revista Sanitaria de Investigación*. Recuperado de <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/deteccion-de-pneumocystis-jirovecii-por-pcr-a-tiempo-real/>

Roger, A. J., Braos, J. L., Noguerras, R. M., Morales, R. R., De La Peña Carretero, L., & Sotomayor, M. R. (2012). *La gestión por procesos en el laboratorio clínico como herramienta para disminuir los errores preanalíticos*. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 5(2), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2011.06.001>

Sistema de gestión de la calidad en el laboratorio (LQMS). (2016). Recuperado de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252631/9789243548272-spa.pdf>

Smith, J. (2020). *Manual de detección por qPCR para genesig Advanced Kit para 2019 nCoV*. Recuperado de [manual-qpcr-detection-kits-for-2019-ncov-genesig-advanced-kit.pdf \(vwr.com\)](#)



Stagnaro, D., Camblong, J., & Nicolini, J. (2005). *El manual de procedimientos*. WAC Clearinghouse. <https://wac.colostate.edu/docs/books/encarrera/stagnaro.pdf>

UK Standards for Microbiology Investigations, Health Centre. (2018). Recuperado de [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/682533/Q4i5.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/682533/Q4i5.pdf)

Instituto SELADIS, Universidad Mayor de San Andrés, (2024). <https://www.umsa.bo/es/web/seladis/quienes-somos>

Universidad de Navarra. (2020). *Manual de bioseguridad en el laboratorio de microbiología*. Versión 2. Recuperado de <https://uninavarra.edu.co/wp-content/uploads/2020/03/ST-MA-08-MANUAL-DE-BIOSEGURIDAD-LAB.-DE-MICROBIOLOGIA-V2.pdf>

## **7. Anexos**



	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

**ÁREA DE BIOQUÍMICA  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR-  
INSTITUTO SELADIS**





**PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA LA  
DETERMINACIÓN DEL *PNEUMOCYSTIS  
JIROVECI* EN MUESTRAS DE ESPUTO POR LA  
TECNICA qPCR Y SONDA TAQMAN**

<b>Elaborado por:</b> Univ. Luis Alejandro Mendoza Escobar	<b>Revisado por:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dra. Angelica Maria Espada Silva M.Sc.</li> <li>• Dr. Sergio Cabrera Calzadilla, Esp.</li> <li>• Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya, Esp.</li> </ul>	<b>Aprobado por:</b> Dra. Aneth Vasquez Michel M.Sc.
--	--	---

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. OBJETO</b> .....	3
<b>2. ALCANCE</b> .....	3
<b>3. RESPONSABILIDADES</b> .....	3
<b>4. REFERENCIAS</b> .....	3
<b>5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS</b> .....	5
<b>6. FASES DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO</b> .....	6
6.1 FASE PRE-ANALÍTICA .....	6
6.2 FASE ANALÍTICA .....	11
6.3 FASE POST-ANALÍTICA .....	19
<b>8. ANEXOS</b> .....	21

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

## 1. OBJETO

Establecer las actividades que se deben ejecutar para la determinación del *Pneumocystis jirovecii* en muestras de esputo por la técnica qPCR y Sonda Taqman, realizadas en el Laboratorio de Microbiología Molecular.

## 2. ALCANCE

Las actividades descritas en el presente documento se aplican a todas las muestras de esputo que ingresan al Laboratorio de Microbiología Molecular.

## 3. RESPONSABILIDADES

Para el jefe del Laboratorio:

El jefe de laboratorio tiene la responsabilidad de asegurar que todo el personal que realice la marcha analítica para la determinación de *P. jirovecii* siga rigurosamente las indicaciones establecidas en el documento.

Para el personal de trabajo del Laboratorio:

El presente documento es de cumplimiento obligatorio para todos los trabajadores que ejecuten la marcha analítica para la determinación de *P. jirovecii*.

## 4. REFERENCIAS

Documentación adicional del laboratorio de Microbiología Molecular. (documentos

internos: CMGE-MM-01, CPM-MM-01, DCE-MM-01, ILD-MM-01, IPRB-MM-01, REQ-MM-01, RMA-MM-01, RRM-MM-01, RMS-MM-01, RMT-MM-01)

Elsevier. (2012). *Protocolo de estudio y manejo de la infección por Pneumocystis jirovecii*.

Infectio. <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-022-02559-1>

Hospital Cayetano Heredia. (2018). Resolución Directoral N° 077-2018-HCH-DG.



Recuperado de [https://www.hospitalcayetano.gob.pe/PortalWeb/wp-content/uploads/resoluciones/2018/rd/RD\\_077-2018-HCH-DG.pdf](https://www.hospitalcayetano.gob.pe/PortalWeb/wp-content/uploads/resoluciones/2018/rd/RD_077-2018-HCH-DG.pdf)

International Organization for Standardization. (2022). ISO 15189:2022 Medical laboratories.

Requirements for quality and competence. International Version. Recuperado de <https://www.iso.org/standard/76677.html>

Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. (Ginebra, 2005). OMS.

Manual MSD (Merck Sharp & Dohme). (2022). *Neumonía por Pneumocystis jirovecii*.

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Espudo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

Recuperado de Neumonía por *Pneumocystis jirovecii* - Trastornos pulmonares - Manual MSD versión para profesionales (msdmanuals.com)

Manual de Procedimientos Técnicos del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS. (s. f.). Código interno: MP-MM-01.

Manual de Bioseguridad del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS. (s. f.). Código interno: MB-MM-01.

Manual de Calidad del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS. (s. f.). Código interno: MC-MM-01.

Manual de Funciones del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS. (s. f.). Código interno: MF-MM-01.

Manual de Mantenimiento de Equipos del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS. (s. f.). Código interno: ME-MM-01.

Organización Internacional de Normalización. Traducción Oficial (2023). Requisitos del Proceso (NB/ISO 15189: 2022-12). Cuarta edición.

Radiopaedia. (2021). Pulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection. Radiopaedia.  
<https://radiopaedia.org/articles/pulmonary-pneumocystis-jirovecii-infection-2?lang=us>


Revista Sanitaria de Investigación. (2021). Detección de *Pneumocystis jirovecii* por PCR a tiempo real. Revista Sanitaria de Investigación.  
<https://revistasanitariadeinvestigacion.com/deteccion-de-pneumocystis-jirovecii-por-pcr-a-tiempo-real/>

Smith, J. (2020). Manual de detección por qPCR para genesig Advanced Kit para 2019 nCoV. Recuperado de [manual-qpcr-detection-kits-for-2019-ncov-genesig-advanced-kit.pdf \(vwr.com\)](#)

*Pneumocystis jirovecii* genesig Advanced Kit. User Manual.  
<https://www.genesig.com/products/9376-pneumocystis-jirovecii>

Purelink Genomic DNA Kits. Invitrogen User Manual.  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182001>

Universidad de Navarra. (2020). Manual de bioseguridad en el laboratorio de microbiología.

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

Versión 2. Recuperado de <https://uninavarra.edu.co/wp-content/uploads/2020/03/ST-MA-08-MANUAL-DE-BIOSEGURIDAD-LAB.-DE-MICROBIOLOGIA-V2.pdf>

## 5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

### Materiales

- Tubos cónicos estériles de 15 mL (libre de nucleasas y DNAsas)
- Pipetas desechables estériles
- Toallas y Gorros desechables
- Guantes de nitrilo
- Mascarillas de protección facial
- Recipientes de desecho biológico
- Micropipetas (con sus tips correspondientes) y Tips con filtro
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL y tubos PCR de 0.2 ó 0.5 mL
- Columnas de purificación con sus tubos colectores

### Equipos



- Campana de flujo laminar
- Campana de uso exclusivo para PCR (para preparación el master mix)
- Campana (para cargado de la muestra)
- Centrífuga
- Microcentrifuga
- Refrigerador
- Congelador a -20°C
- Espectrofotómetro
- Vortex
- Spin vortex
- Agitador térmico

### Reactivos

Para la preparación de reactivos en la descontaminación y pretratamiento de muestras (**Revisar el documento: IPR-MM-01**).

- Solución descontaminante (NaOH al 4% y acetil cisteína 1.5%)
- Solución fisiológica al 0.9%
- Alcohol etílico puro 190 proof (grado molecular)
- Solución de Buffer fosfato con pH 7.4



	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

El laboratorio hace uso de los reactivos contenidos en los kits diagnóstico; “PureLink® Genomic DNA Kit. For purification of genomic DNA” y “Genomes Genesig Advanced Kit. Quantification of *Pneumocystis jirovecii*”, para las fases del procedimiento analítico.

## 6. FASES DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

### 6.1 FASE PRE-ANALÍTICA

#### 6.1.1 Recepción de la Muestra



##### 6.1.1.1 Solicitud del Análisis

Cada solicitud de análisis es un acuerdo importante entre el laboratorio y el solicitante (generalmente un médico o profesional de la salud). El paciente debe cumplir los siguientes criterios para solicitar un análisis en el laboratorio.

- **Obtención de la Orden Médica:** El paciente debe visitar a su médico para obtener una orden médica específica que indique el análisis deseado. Esta orden debe incluir detalles como el tipo de muestra requerida (en este caso, la muestra de esputo).
- **Toma de Muestra:** La muestra no se toma en el Instituto SELADIS, por lo que la muestra deberá ser tomada por el personal de salud o por el mismo paciente, habiendo seguido el instructivo de recolección y transporte de muestra (**Revisar el documento: RTM-MM-01**).
- **Criterios que la muestra debe cumplir:**
  - a) El paciente no debe estar en tratamiento con antibióticos, como mínimo 72h previo a la recolección de la muestra.
  - b) Se deben recolectar las expectoraciones en ayunas en un frasco estéril adquirido en la farmacia, las expectoraciones pueden ser:
    - Purulenta (espesa y de color verde o amarillento).
    - Mucopurulenta (mezcla de mucosidad clara y pus).
    - Sanguinolenta (con rastros de sangre).
  - c) El volumen mínimo requerido es de 3 mL de esputo (tres flemas).
  - d) No debe contener restos de alimentos, por lo que el paciente debe encontrarse en ayunas al momento de la toma de muestra.
  - e) No se debe remitir la muestra después de 24 horas desde su obtención o recolección.

##### 6.1.1.2 Consentimiento del Paciente para el Procesamiento de su Muestra

Es fundamental que el paciente otorgue su consentimiento informado para el procesamiento de su muestra, este consentimiento asegura que el paciente comprende y acepta los procedimientos que se llevarán a cabo, así como el uso de sus datos para fines diagnósticos y de investigación. El consentimiento del paciente es esencial para garantizar la transparencia y la ética en nuestro

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

Laboratorio, protegiendo sus derechos y privacidad en todo momento (**Revisar el documento: CPM-MM-01**).

### 6.1.1.3 Datos Epidemiológicos y Factores Clínicos

Realizar encuestas a los pacientes para determinar factores epidemiológicos no solo es esencial para el diagnóstico preliminar, sino que también juega un papel fundamental en el análisis clínico de la muestra (**Revisar el documento: DCE-MM-01**).

#### 6.1.1.3.1 Sospecha Clínica

Las preguntas incluidas en la encuesta (documento: DCE-MM-01) proporcionan al analista clínico información crítica para el procesamiento y análisis de la muestra de esputo del paciente, especialmente cuando se sospecha la presencia de *P. jirovecii*.

#### 6.1.1.3.2 Historial de enfermedades inmunosupresoras (preguntas sobre VIH, cáncer, tratamientos inmunosupresores)

*P. jirovecii* es una infección oportunista que afecta principalmente a pacientes con sistemas inmunitarios debilitados. El historial de enfermedades como VIH/SIDA o el uso de medicamentos inmunosupresores da una señal clara de que el paciente está en alto riesgo de desarrollar esta infección.



#### 6.1.1.3.3 Tratamiento con antibióticos (pregunta sobre el uso de antibióticos en los últimos 30 días)

El uso reciente de antibióticos puede interferir con la flora bacteriana del esputo, lo que podría complicar el diagnóstico diferencial con otras infecciones bacterianas. Además, algunos antibióticos pueden dificultar la detección del patógeno si el paciente ha estado en tratamiento, lo que requiere que el analista interprete los resultados microbiológicos con mayor cautela.

#### 6.1.1.3.4 Síntomas respiratorios (preguntas sobre tos, dificultad para respirar, tipo de esputo, fiebre, etc.)

Los síntomas respiratorios como la tos productiva y la descripción del esputo son cruciales para identificar el tipo de muestra y su idoneidad para el análisis. Un esputo purulento, mucopurulento o sanguinolento puede estar asociado a infecciones activas, lo que refuerza la necesidad de buscar *P. jirovecii* y otros patógenos respiratorios.

#### 6.1.1.3.5 Historial epidemiológico (preguntas sobre contacto con personas enfermas, viajes recientes)

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

Si el paciente ha estado en contacto con personas inmunocomprometidas o en entornos de alto riesgo (hospitales, centros de trasplantes), esto puede aumentar la sospecha de *P. jirovecii* o de coinfecciones.

Este factor puede dirigir al analista a buscar infecciones cruzadas o coinfecciones con otros patógenos nosocomiales.

#### **6.1.1.3.6 Condiciones pulmonares preexistentes (preguntas sobre enfermedades pulmonares crónicas)**

Enfermedades pulmonares crónicas como la EPOC o la fibrosis quística pueden alterar la presentación de las infecciones respiratorias, incluyendo *P. jirovecii*. El analista podría observar un esputo más viscoso o dificultades en la recolección de una muestra adecuada.

#### **6.1.1.3.7 Factores relacionados con el tabaco (preguntas sobre si el paciente es fumador o exfumador)**

El tabaquismo afecta la función pulmonar y la producción de esputo, lo que puede influir en la calidad de la muestra. Los fumadores pueden tener mayor dificultad para producir esputo suficiente o pueden tener un esputo mixto (contaminado por partículas del tabaco), lo que dificulta la interpretación de los resultados.

#### **6.1.1.3.8 Viajes recientes y exposición a entornos de riesgo (preguntas sobre viajes o contacto con personas inmunocomprometidas)**



Si el paciente ha estado en áreas con brotes de infecciones respiratorias o ha tenido contacto con personas inmunocomprometidas, el analista podría ampliar el espectro de patógenos a buscar, incluyendo otros hongos y bacterias endémicas de esas zonas.

#### **6.1.1.3.9 Datos adicionales (otras enfermedades o factores relevantes)**

Información adicional sobre otras enfermedades o tratamientos permite al analista tener un panorama más claro del estado general de salud del paciente, lo que ayuda a decidir el tipo de pruebas más adecuadas, las condiciones especiales que pueda necesitar la muestra y la interpretación de los resultados finales.

### **6.1.2 Factores que Influyen en el Desempeño del Análisis**

#### **6.1.2.1 Selección de la Muestra**

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

El analista de laboratorio debe asegurar la recepción de una muestra de esputo de alta calidad, representativa y libre de contaminantes (revisar los criterios de la muestra del punto 6.1.1.1).

### 6.1.2.2 Sensibilidad y Especificidad de la qPCR

La qPCR es altamente sensible para detectar *P. jirovecii* en muestras respiratorias, sin embargo, también se puede detectar ADN residual o portación subclínica. Prestar atención a la especificidad para evitar falsos positivos, la presencia de inhibidores de la PCR (sales en alta concentración, detergentes con alta capacidad desnaturizante, agregados proteicos o sustancias químicas como la hematoxilina), puede afectar los resultados.



### 6.1.3 Registro para la Recepción de la Muestra

- ✓ Una vez recibida la muestra por el personal de salud, los datos concernientes al paciente ingresan al sistema del Laboratorio SELADIS.
- ✓ El sistema se vincula con cada Laboratorio del Instituto.
- ✓ La persona que procesará la muestra deberá hacer uso del computador de escritorio del laboratorio (código: CE-MM).
- ✓ Iniciar sesión en el usuario: Microbiología Molecular
- ✓ Mediante el motor de búsqueda Google Chrome o Microsoft Edge, ingresar al sistema usando el siguiente url:  
[https://seladis.umsa.bo/inicio?p\\_p\\_id=com\\_liferay\\_login\\_web\\_portlet\\_LoginPortlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&saveLastPath=false&\\_com\\_liferay\\_login\\_web\\_portlet\\_LoginPortlet\\_mvcRenderCommandName=%2Flogin%2Flogin](https://seladis.umsa.bo/inicio?p_p_id=com_liferay_login_web_portlet_LoginPortlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&saveLastPath=false&_com_liferay_login_web_portlet_LoginPortlet_mvcRenderCommandName=%2Flogin%2Flogin), o en caso contrario, acceder al sitio oficial del Instituto SELADIS (<https://seladis.umsa.bo/>) y mediante el mismo acceder al sistema. Los datos de ingreso son confidenciales y solo los tiene el jefe de laboratorio, por lo que es necesario preguntar por los mismos.
- ✓ Una vez en el sistema, se mostrarán los datos de ingreso de la muestra que deberán ser llenados.
- ✓ Posteriormente, imprimir la derivación.
- ✓ Llenar los datos de la derivación en el registro de recepción de muestras propio del Laboratorio (**Revisar el documento: RRM-MM-01**).

### 6.1.4 Recomendaciones para Cada Etapa de la Marcha Analítica

Se describen los cuidados en bioseguridad y buenas prácticas de laboratorio que el analista de laboratorio debe cumplir, algunas recomendaciones son específicas para cada etapa de la fase analítica (se indican en las columnas de Recomendaciones).



- a) Durante todo el procesamiento de la muestra, utilizar un EEP compuesto por:

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Espudo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

- ✓ Guantes de nitrilo, al manipular materiales infecciosos o muestras biológicas. Cambiar los guantes frecuentemente si se nota que están contaminados o si se han manipulado materiales fuera de la campana.
  - ✓ Mascarilla N95, para proporcionar mayor protección contra aerosoles que podrían contener *Pneumocystis jirovecii*.
  - ✓ Gorro desechable, para evitar la contaminación de las muestras con cabello u otras partículas.
  - ✓ Bata de laboratorio con mangas ajustadas, preferiblemente impermeable.
  - ✓ Gafas de seguridad o un protector facial para proteger los ojos contra posibles salpicaduras o aerosoles.
  - ✓ Protección respiratoria de mayor nivel (como mascarillas faciales) en áreas de alto riesgo o cuando haya mayor producción de aerosoles.
  - ✓ Cubrecalzado desechable, para evitar la contaminación de los zapatos y la diseminación del patógeno fuera del área de trabajo.
- b) Los cuidados que debe tener en la Campana de Flujo Laminar son:
- ✓ Verificar que la campana esté limpia, libre de reactivos residuales y materiales
  - ✓ Desinfectar las superficies de la campana antes de manipular cualquier material o reactivo, utilizando una solución de alcohol etílico (grado molecular).
  - ✓ Irradiar la campana de flujo laminar o la campana de bioseguridad con luz ultravioleta (UV), como mínimo 15 minutos antes de comenzar el trabajo, esto ayudara a eliminar cualquier contaminante presente.
  - ✓ Evitar movimientos bruscos dentro de la campana para no alterar el flujo de aire, lo que podría aumentar el riesgo de contaminación.
- c) Al usar reactivos altamente corrosivos como sales ácidas o bases fuertes, trabajar en áreas separadas (mesón A, B o C del laboratorio).
- d) En todo el procesado de la muestra trabajar en la campana de seguridad biológica para evitar la dispersión de partículas.
- e) En los pasos de centrifugación, revisar que el rotor esté equilibrado y que el tubo esté bien cerrado.
- f) Limpiar y desinfectar todo el equipo utilizado al finalizar el procedimiento, incluyendo pipetas, vortex y la superficie de la campana (**Revisar el documento: ILD-MM-01**).

### 6.1.5 Etapa de Reconstitución de Reactivos

- a) Realizar un “Spin” Antes de Abrir los Reactivos.
- ✓ Realizar una centrifugación muy breve (10 segundos máximo) antes de abrir los reactivos. Esto ayudará a evitar que queden partículas en la tapa de los tubos.

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Espudo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

b) Reconstitución de los Componentes del Kit.

- ✓ Reconstituir los componentes del kit en agua libre de nucleasas (DNAsas/RNAsas), en función a la tabla 1:

Tabla 1

COMPONENTE A RESUSPENDER	VOLUMEN DE AGUA
<b>Pre-PCR pack</b>	
P. jirovecii primer/probe mix (Frasco C1)	165 uL
Internal extraction control primer/probe mix (Frasco C2)	165 uL
Endogenous control primer/probe mix (Frasco C3)	165 uL
Oasing TM Or PresisionPLUS TM 2x qPCR Mastermix	525 uL (sin ROX)
<b>Pre-PCR heat-sealed foil</b>	
Internal extraction control DNA (Frasco A1)	600 uL

- ✓ Posteriormente, mezclar adecuadamente en un vortex.
- ✓ Almacenar la solución reconstituida a -20 °C.

c) Reconstitución del Control Positivo de Templado:

- ✓ Reconstituir el reactivo P. jirovecii Positive Control Template (RED) de tapa ROJA en 500 µL de agua libre de nucleasas.

## 6.2 FASE ANALÍTICA



### 6.2.1 Flujo de Trabajo para el procesamiento de la Muestra

Durante cada etapa de detección del *Pneumocystis jirovecii* registrar todos los pasos y resultados que vaya obteniendo (**Revisar el documento: RMA-MM-01**).



El laboratorio hace uso de los kits diagnóstico:

- PureLink® Genomic DNA Kit. For purification of genomic DNA.
- Genomes Genesig Advanced Kit. Quantification of *Pneumocystis jirovecii*.

#### 6.2.1.1 Etapa de Descontaminación y Pretratamiento de Muestras

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

SUB-ETAPAS	INDICACIONES	RECOMENDACIONES
<b>Cargado de la Muestra y la Solución Descontaminante</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>En un tubo Eppendorf de 5mL y utilizando una pipeta desechable, añadir 1mL de la muestra.</li> <li>Agregar 1mL de la solución descontaminante al tubo con la muestra, de manera que la relación volumen-solución descontaminante sea pareja (1:1). Este procedimiento debe realizar en el mesón "A" del laboratorio para precautelar el cuidado de los materiales o equipos próximos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Revisar que tanto el tubo como la pipeta desechable estén estériles.</li> <li>Evitar salpicaduras y derrames.</li> <li>Mantener las proporciones adecuadas (1:1) y por precaución evitar inhalar los vapores de NaOH.</li> <li>Cerrar bien el tubo para evitar fugas.</li> </ul>
<b>Homogeneización</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Agitar vigorosamente el tubo en un vortex hasta que la solución esté completamente homogeneizada.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Realiza esta operación con cuidado para evitar salpicaduras.</li> </ul>
<b>Fase de Reposo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente, no más de 15 minutos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mantener el tubo tapado y evita la exposición prolongada.</li> </ul>
<b>Detención de la Reacción</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Agregar 1mL de solución buffer de fosfatos pH 7.4, para detener la reacción.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Manipular la solución buffer con cuidado y evita el contacto directo con la piel o los ojos.</li> </ul>
<b>Centrifugación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifugar el tubo a 3000 rpm durante 15 minutos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Después de la centrifugación, retirar el tubo con precaución para evitar derrames.</li> </ul>
<b>Eliminación del Sobrenadante</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desechar el líquido sobrenadante al recipiente de desechos biológicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eliminar el líquido sobrenadante cuidadosamente en el recipiente.</li> <li>Cuidar de no verter el sobrenadante directamente al desagüe.</li> </ul>
<b>Resuspensión del Precipitado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Añadir 1mL de solución fisiológica al precipitado (la parte celular que queda en el fondo del tubo) y resuspenderlo adecuadamente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Asegurar el uso de una pipeta nueva y estéril para esta operación.</li> </ul>

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Espudo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

**Nota:** Al finalizar su procedimiento, el esputo debe encontrarse libre de contaminación salival u otro debris celular. Si aún observa células epiteliales en exceso, es posible que persista la contaminación y deba repetir el procedimiento.

### 6.2.1.2 Etapa de Extracción de ADN



SUB-ETAPAS	INDICACIONES	RECOMENDACIONES
<b>Adición de la Proteínkinasa K en la Muestra Descontaminada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Añadir 50µL de la muestra (suspensión obtenida después de la descontaminación) en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.</li> <li>• Añadir 180µL de Purelink Genomic Digestion Buffer y 20µL de “Proteínkinasa K” (inmediatamente tomado del refrigerador).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evitar salpicaduras al añadir la muestra.</li> <li>• Manipular la “Proteínkinasa K” con cuidado y evitar inhalación de vapores.</li> </ul>
<b>Incubación y Centrifugación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incubar el tubo a 56 °C, durante 30 minutos.</li> <li>• Realizar una centrifugación breve (10 minutos) para separar los componentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durante la incubación a 56 °C, evitar el contacto directo con el tubo caliente.</li> </ul>
<b>Adición de la RNAsa A</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agregar 20 µL de “RNAsa A” al lisado.</li> <li>• Mezclar rápidamente (con movimientos de inversión) y luego incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Realizar movimientos rápidos al agregar la “RNAsa A” para evitar derrames.</li> </ul>
<b>Adición del Buffer de Lisis y Control Interno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Añadir 200 µL del Buffer de lisis/Binding Buffer y el control interno de extracción proporcionado en el kit de PCR.</li> <li>• Mezclar durante 30seg en el vortex hasta homogeneizar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manipular los reactivos con precaución, siguiendo las proporciones indicadas para evitar derrames y pérdida de reactiva.</li> </ul>
<b>Segunda Incubación y Centrifugación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incubar nuevamente a 56 °C durante 30 minutos.</li> <li>• Realizar otra centrifugación de 10 minutos para separar los componentes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evitar el contacto directo con el tubo caliente, esperar al menos 5 minutos para continuar.</li> </ul>
<b>Adición del Etanol Etilico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agregar 200 µL de Alcohol etílico puro 190 proof al tubo y mezclar en vortex durante 10 seg.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evitar la inhalación de vapores</li> </ul>



	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

### 6.2.1.3 Etapa de Purificación de ADN

SUB-ETAPAS	INDICACIONES	RECOMENDACIONES
<b>Transferencia a la Columna</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transferir todo el volumen obtenido en el protocolo de extracción (~500 µL) a una columna marcada con su tubo colector (identificado: TP).</li> <li>Centrifugar la columna a 10,000 rpm durante 1 minuto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Al manipular la columna, evitar tocar la base.</li> </ul>
<b>Descarte y Limpieza</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Descartar la elución y colocar la columna en un nuevo tubo colector.</li> <li>Añadir 450 µL de Wash Buffer 1 a la columna y centrifugar a 10,000 rpm durante 1 minuto.</li> <li>Descartar la elución y coloca la columna en otro tubo colector.</li> <li>Agregar 450 µL de Wash Buffer 2 a la columna y centrifugar a 10,000 rpm durante 1 minuto.</li> <li>Finalmente descartar el tubo de recolección.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Descartar la elución con cuidado.</li> <li>Anadir los Buffers con precisión y evitar hacer burbujas al momento de su uso.</li> <li>Evita tocar la base de la columna.</li> </ul>
<b>Elución del ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Colocar la columna en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL.</li> <li>Añadir 25 µL de Buffer de elución de ADN a la columna.</li> <li>Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y luego centrifugar a 10,000 rpm durante 1 minuto.</li> <li>Repetir el paso anterior con otros 25 µL de Buffer de elución de ADN</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Manipular el Buffer de elución con cuidado.</li> <li>Cumplir con los tiempos de incubación y centrifugación</li> </ul>
<b>Almacenamiento del Tubo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Guardar el ADN purificado a - 20 °C.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Para el almacenamiento del tubo, etiquetar correctamente el tubo con el código que corresponda.</li> </ul>

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41



**Nota:** Obtener una cantidad adecuada de ADN purificado, esto debe evaluarse mediante espectrofotometría (**Revisar el documento: CMGE-MM-01**). Si la concentración es muy baja (menores a 20 ng/μL) no será suficiente para seguir procesando la muestra, por lo cual debe repetirse esta etapa.

#### 6.2.1.4 Reconstitución de Reactivos

Asegurar que los reactivos (la solución de reconstitución y el control positivo de templado) previamente preparados y almacenados a -20 °C (revisar el punto 6.1.6) estén situados en la sección superior del refrigerador, lejos de cualquier otra solución próxima.

#### 6.2.1.5 Preparación de la Curva Estándar para la Cuantificación

SUB-ETAPAS	INDICACIONES	RECOMENDACIONES
<b>Preparación de la Mix (Solo para la Curva Estándar)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Calcular el volumen de reactivos necesario según el número de muestras que se analizarán.</li> <li>Para este paso, realizar los cálculos en función a la siguiente tabla 2.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Descongelar los reactivos en un área controlada (Mesón B del laboratorio) y evitar que entren en contacto con superficies no estériles</li> <li>En general, se espera que la curva de calibración tenga un R<sup>2</sup> lo más cercano posible a 1.</li> <li>Pero valores superiores a 0.95 entran dentro de un rango aceptable y suelen indicar una buena linealidad y precisión,</li> </ul>
<b>Preparación de las Diluciones Seriadas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Seguir los pasos que se explican en la tabla 3.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Al preparar la primera dilución a partir de la solución madre, utilizar agua libre de nucleasas (grado molecular) y reactivos previamente verificados para asegurar que estén libres de contaminantes.</li> <li>Manipular las alícuotas en un ambiente estéril dentro de la campana y utilizar pipetas estériles con puntas con filtro para</li> </ul>

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41



		evitar la contaminación cruzada. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evitar exponer las soluciones diluidas fuera de la campana o en áreas que no estén debidamente desinfectadas.</li> <li>• Revisar de que todos los tubos estén correctamente rotulados (con la codificación del laboratorio) para evitar errores en el manejo de las diluciones.</li> </ul>
--	--	--

Tabla 2

COMPONENTE	VOLUMEN
Oasing TM Or PresisionPLUS TM 2x qPCR Mastermix	10 uL
P. jirovecii primer/probe mix (Frasco C1)	1 uL
Agua libre de nucleasas (Frasco B1)	4 uL
<b>Volumen final por muestra</b>	<b>15 uL</b>

Tabla 3



Paso	Acción
<b>Preparar la solución madre</b>	Tener lista la solución madre que se va a diluir, asegurándose de que esté correctamente preparada.
<b>Primera dilución (1:10)</b>	Tomar 100 µL de la solución madre con una pipeta y añadir a un tubo nuevo que contenga 900 µL de agua libre de nucleasas.
<b>Mezclar la dilución</b>	Colocar el tubo en un vortex y mezclar bien para homogeneizar la solución.
<b>Segunda dilución (1:100)</b>	Tomar 10 µL de la primera dilución y añadir a otro tubo nuevo con 990 µL de agua libre de nucleasas.
<b>Mezclar nuevamente</b>	Colocar el tubo en un vortex y mezclar bien para homogeneizar la solución.
<b>Diluciones subsiguientes</b>	Repetir el proceso: Tomar 10 µL de la dilución anterior y añadir a un tubo con 990 µL de agua libre de nucleasas, mezclar bien.
<b>Obtener diluciones finales</b>	Continuar con el proceso hasta obtener las diluciones deseadas, como 1:10, 1:100, 1:1000, etc., siguiendo la misma proporción de dilución (1:100).

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Espudo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

### 6.2.1.6 Preparación de la Mix y Cargado de ADN

SUB-ETAPAS	INDICACIONES	RECOMENDACIONES
<b>Calculo del Volumen de Reactivos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Realizar los cálculos en función a la siguiente tabla 2, pero adicionar 1uL del reactivo Internal extraction control primer/probe mix (Frasco C2) y calcular para un volumen final de 15uL.</li> <li>Para este cometido, usar 3uL del frasco B1.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Descongelar los reactivos en un área controlada (Mesón B del laboratorio) y evitar que entren en contacto con superficies no estériles</li> </ul>
<b>Preparación de la Mix</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Preparar el volumen total de Mix en un tubo para PCR (de capacidad 0,2 ó 0,5ml).</li> <li>Mezclar los reactivos en un tubo Eppendorf.</li> <li>Utilizar un vortex para homogeneizar la mezcla durante 10 seg.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Al usar cada reactivo, dar un breve giro al tubo para asegurarte de que esté bien mezclado.</li> <li>No generar burbujas ni retirar demasiado reactivo al pipetear.</li> <li>Llevar los tubos con cuidado para evitar derrames o contaminación cruzada.</li> </ul>
<b>Cargado de ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Descongelar el ADN previamente extraído.</li> <li>Agitar en vortex durante 1 minuto, revisar que el ADN esté completamente homogeneizado antes de continuar.</li> <li>Centrifugar el tubo durante 2 minutos para asegurar que el ADN se encuentre en el fondo, esto ayudará a concentrar el ADN en la parte inferior del tubo.</li> <li>Dispensar 5 µL de ADN y 1 µL del ADN de control de extracción interno en un tubo nuevo y esteril.</li> <li>Tapar y sellar los tubos con plástico esteril.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Para descongelar el tubo con ADN, colocar el tubo en un baño de agua a temperatura ambiente o en un termociclador.</li> <li>El ADN de control de extracción interno es una muestra de referencia que se utiliza para verificar la calidad de la extracción.</li> <li>Durante todo el proceso, eliminar cualquier burbuja de aire y evitar que haya gotas en las paredes de los tubos, ya que esto podría afectar los resultados</li> </ul>

### 6.2.1.7 Análisis en Tiempo Real de la Curva

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

SUB-ETAPAS	INDICACIONES	RECOMENDACIONES
<b>Ciclos de Amplificación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cargar la mezcla de reacción en el equipo de qPCR.</li> <li>• El equipo calentará y enfriará la muestra repetidamente en ciclos.</li> <li>• Durante cada ciclo, la enzima de polimerasa amplificará específicamente el ADN de <i>Pneumocystis jirovecii</i> si está presente.</li> <li>• El equipo detectará la fluorescencia emitida por las sondas unidas al ADN amplificado en tiempo real.</li> <li>• El equipo registrará el número de ciclos (Ct) necesarios para que la fluorescencia alcance un umbral predefinido.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para el uso del termociclador, revisar el manual instructivo del equipo: Applied Biosystems – StepOne Real-Time PCR (Código del laboratorio: TM-1).</li> </ul>

## 6.2.2 Aseguramiento de la Calidad

### 6.2.2.1 Control de Calidad Interno

Debe asegurar la precisión y confiabilidad de sus resultados en cada corrida de qPCR, para eso tendrá que hacer uso de controles positivos y negativos.

- **Controles Positivos**

**Control Positivo Exógeno**

**Descripción:** Utiliza ADN o ARN externo que contiene el objetivo de interés.

**Propósito:** Verificar que las condiciones de la reacción de PCR son óptimas y que no hay inhibidores presentes en la muestra.

**Indicaciones:** Preparar una mezcla de reacción de 20 µL que incluya 2 µL de ADN sintético.



**Control Positivo Endógeno:**

**Descripción:** Utiliza un objetivo nativo presente en la muestra experimental, diferente del objetivo bajo estudio.

**Propósito:** Corregir las diferencias de cantidad y calidad entre las muestras.

**Indicaciones:** Utilizar una muestra de esputo que se sabe que contiene el gen de referencia humano, como la beta-actina, en una concentración de aproximadamente 10 ng/µL. Preparar una mezcla de reacción de 20 µL que incluya 2 µL de la muestra de esputo.

- **Controles Negativos**

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

### **Control Negativo de No Plantilla (NTC)**

**Descripción:** Reacción de qPCR sin ADN o ARN plantilla.

**Propósito:** Detectar cualquier contaminación en los reactivos de la PCR.

**Indicaciones:** Preparar una mezcla de reacción de 20 µL que incluya todos los reactivos excepto la muestra de ADN.

### **Control Negativo de Extracción**

**Descripción:** Muestra que ha pasado por todo el proceso de extracción, pero sin ADN objetivo.

**Propósito:** Verificar que no hay contaminación durante el proceso de extracción.

**Indicaciones:** Utilizar 2 µL de agua estéril que ha pasado por todo el proceso de extracción. Prepare una mezcla de reacción de 20 µL que incluya 2 µL de agua estéril.

- **Implementación en una Corrida de qPCR**

**Paso 1:** Prepare sus muestras experimentales y añada los controles positivos y negativos en tubos o pocillos separados.

**Paso 2:** Realice la qPCR siguiendo el protocolo del kit Genomes Genesig Advanced (Quantification of *Pneumocystis jirovecii*)

**Paso 3:** Analice los resultados. Los controles positivos deben mostrar amplificación, indicando que la reacción de PCR es funcional. Por otro lado, los controles negativos no deben mostrar amplificación, confirmando la ausencia de contaminación

### **6.2.2.2 Control de Calidad Externo**

El control de calidad es fundamental en los laboratorios clínicos para garantizar resultados precisos y confiables. Sin embargo, las razones por las cuales nuestro laboratorio de Microbiología Molecular no realiza dicho control son:



- Limitaciones de recursos:** Estos programas a menudo requieren costos adicionales, como la adquisición de muestras de referencia o la inscripción en programas de evaluación externa. Además, que no hay ningún otro laboratorio en la región que realice la determinación de *P. jirovecii* por la técnica qPCR.
- Acceso a muestras de referencia:** Obtener muestras de referencia adecuadas para el control de calidad externo es muy complicado.

## **6.3 FASE POST-ANALÍTICA**

### **6.3.1 Análisis de Resultados**

#### **6.3.1.1 Interpretación**

Si el Ct es bajo, es probable que la muestra sea positiva para *P. jirovecii*. Pero, si el Ct es alto, se debe considerar la posibilidad de una infección subclínica o la necesidad de repetir la prueba.

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41

### 6.3.1.2 Intervalos de Referencia

- Ct Bajo:** En pacientes con infección activa por *P. jirovecii*, se espera un Ct bajo. Los valores de Ct pueden variar, pero en general, un Ct menor a 30 se considera bajo lo que sugiere una alta carga de ADN del hongo en la muestra.
- Ct Intermedio:** Un Ct intermedio puede indicar una carga moderada de ADN de *Pneumocystis jirovecii*. Valores entre 30 y 35 podrían considerarse intermedios.
- Ct Alto:** Un Ct alto (más ciclos requeridos) sugiere una menor cantidad de ADN del hongo o incluso ausencia del agente. Valores superiores a 35 se consideran altos.

### 6.3.2 Criterios para Solicitudes de Análisis Adicionales

Si se requiere un análisis adicional (por ejemplo, repetir la prueba), el analista clínico debe cumplir el límite de tiempo establecido por el laboratorio (24 horas desde la toma de la muestra original). Esto garantiza que el ADN de *P. jirovecii* no se degrade con el tiempo.

### 6.3.3 Tiempo de Espera para los Resultados

El tiempo de espera para obtener los resultados puede variar según la carga de trabajo del laboratorio, la prioridad clínica y la capacidad del equipo. En general, los resultados están disponibles en aproximadamente 48 horas.


### 6.3.4 Entrega de Resultados

Una vez que usted ha procesado las muestras siguiendo los protocolos establecidos, proceda a ingresar los resultados en el sistema de la Institución como se explica a continuación:

- Ingresar los resultados al formulario propio del Laboratorio (**Revisar el documento: RSM-MM-01**).
- Realizar el reporte que corresponde en el sistema de Laboratorios SELADIS, como se muestra en la imagen de abajo.



- Realizar la impresión de dos copias.

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>	<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
		<b>Código:</b> PA-MM-01
	Procedimiento Analítico para la Determinación del <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Muestras de Esputo por la Técnica qPCR y Sonda Taqman	<b>Versión:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 1/9/24
		<b>Páginas:</b> 41



4. Llevar una copia a la unidad de recepción y toma de muestra para que esta posteriormente haga la entrega al paciente. La otra copia hacer firmar con el personal que recibió el resultado.
5. La copia firmada por el personal se la resguarda en un archivador de documentos perteneciente del Laboratorio.
6. Posteriormente, tras reportar los resultados o cuando ya han sido transmitidos al sistema, revisar y verificar dichos datos para validarlos.
7. Una vez validados, los resultados estarán disponibles para su consulta por parte del personal médico, enfermeras, auxiliares de enfermería o cualquier otro personal que los haya solicitado.

### 6.3.6 Tratamiento de Quejas

Para tratar las quejas referentes al laboratorio registrar y escribirlas en la hoja registro y evaluación de quejas (**Revisar el documento: REQ-MM-01**).

## 8. ANEXOS



	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>				
	Instructivo para la Preparación de Reactivos				<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
	Código: IPR-MM-01	Versión: 01	Fecha: 1/9/24		Página: 1 de 3

Los reactivos que se usaran específicamente en la determinación del *Pneumocystis jirovecii*, seguir los siguientes procedimientos para su debida preparación.



### 1. Solución Descontaminante (NaOH al 4% y Acetil Cisteína al 1.5%)

Materiales:

- Hidróxido de sodio (NaOH) en polvo.
- Acetil cisteína en polvo.
- Agua destilada o desionizada.
- Matraz aforado de 100 mL.
- Espátula.
- Vaso de precipitados y agitador magnético (opcional).

Procedimiento:

1. Pesar 4 gramos de NaOH utilizando una balanza analítica.
2. Disolver el NaOH en 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitados, agitando suavemente.
3. Pesar 1.5 gramos de acetil cisteína.
4. Agregar el acetil cisteína al vaso de precipitados con la solución de NaOH y agitar hasta que ambos componentes estén completamente disueltos.
5. Transferir la solución a un matraz aforado de 100 mL.
6. Completar con agua destilada hasta alcanzar los 100 mL.
7. Almacenar la solución en un frasco limpio y etiquetado. Mantener refrigerada a 4°C si no se usa de inmediato.

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>				
	Instructivo para la Preparación de Reactivos				<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
	Código: IPR-MM-01	Versión: 01	Fecha: 1/9/24		Página: 2 de 3

## 2. Solución Fisiológica al 0.9% (Cloruro de Sodio)

Materiales:

- Cloruro de sodio (NaCl) en polvo.
- Agua destilada o desionizada.
- Matraz aforado de 1 litro.
- Vaso de precipitados.
- Espátula.

Procedimiento:

1. Pesar 9 gramos de cloruro de sodio (NaCl) en una balanza analítica.
2. Disolver los 9 gramos de NaCl en aproximadamente 800 mL de agua destilada en un vaso de precipitados, agitando suavemente para asegurar la disolución completa.
3. Transferir la solución a un matraz aforado de 1 litro.
4. Completar con agua destilada hasta alcanzar el volumen total de 1 litro.
5. Verter la solución en un frasco estéril y etiquetarlo correctamente.
6. Almacenar la solución a temperatura ambiente si se usará dentro de poco tiempo.

## 3. Alcohol Etilico Puro (190 Proof - 95% Etanol)

Materiales:

- Alcohol etílico puro al 95% (190 proof).
- Frasco limpio y seco para almacenamiento (que incluya un tapón estéril).

Procedimiento:

1. Medir la cantidad necesaria de alcohol etílico al 95% (190 proof) usando un frasco medidor.
2. Verter el alcohol en un frasco limpio y seco, asegurándose de que no haya contaminación durante el proceso.

<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
Instructivo para la Preparación de Reactivos			<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
Código: IPR-MM-01	Versión: 01	Fecha: 1/9/24	Página: 3 de 3

3. Cerrar herméticamente el frasco para evitar evaporación.
4. Etiquetar el frasco indicando que contiene alcohol etílico puro al 95%.
5. Almacenar en un lugar fresco y seco, lejos de fuentes de calor y llamas.

#### 4. Solución de Buffer Fosfato con pH 7.4 (PBS)

Materiales:

- Fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).
- Fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).
- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ).
- Agua destilada o desionizada.
- Matraz aforado de 1 litro.
- Balanza analítica.
- Vaso de precipitados.
- pHmetro (para ajustar el pH).

Procedimiento:

1. Pesar los siguientes compuestos:
  - 8 gramos de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ).
  - 0.2 gramos de fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).
  - 1.44 gramos de fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).
2. Disolver todos los componentes en aproximadamente 800 mL de agua destilada en un vaso de precipitados, agitando continuamente para asegurar la disolución completa.
3. Medir el pH de la solución utilizando un pHmetro. Luego, ajustar el pH a 7.4, si es necesario, agregando pequeñas cantidades de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (para bajar el pH) o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (para subir el pH). Luego, transferir la solución a un matraz aforado de 1 litro.
4. Completar el volumen total a 1 litro con agua destilada.
5. Verter la solución en un frasco limpio, etiquetarla correctamente y almacenar a 4°C.

<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
Instructivo para la Recolección y Transporte de Muestras de Esputo			<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
<b>Código:</b> RTM-MM-01	<b>Versión:</b> 01	<b>Fecha:</b> 1/9/24	<b>Página:</b> 1 de 2

Estimado paciente,

A continuación, le proporcionamos las instrucciones detalladas para la correcta recolección y transporte de su muestra de esputo. Seguir estos pasos es fundamental para garantizar la calidad de la muestra y asegurar resultados precisos en sus análisis.

### 1. Preparación del paciente antes de la recolección

- No debe estar en tratamiento con antibióticos, como mínimo 3 días antes de la recolección de muestra.
- Debe comprar un frasco estéril en la farmacia para la recolección de la muestra (con una capacidad de entre 3 a 5mL como máximo). Asegúrese de que el frasco esté sellado y no haya sido manipulado antes de su uso.
- Antes de la recolección, lave bien sus manos y enjuague su boca con agua corriente para eliminar residuos, pero evite usar enjuague bucal o pasta dental.

### 2. Momento de la recolección

La muestra debe recolectarse en las primeras horas de la mañana, justo después de levantarse (con lo que no debe comer antes de la recolección de su muestra). En este momento, las secreciones bronquiales se encuentran más concentradas y son más adecuadas para el análisis.

### 3. Recolección de la muestra de esputo

Tipos de esputo aceptados: La muestra que se recolecte puede ser de cualquiera de los siguientes tipos:

- Purulenta (espesa y de color verde o amarillento).
- Mucopurulenta (mezcla de mucosidad clara y pus).
- Sanguinolenta (con rastros de sangre).

La cantidad mínima requerida es de 3 mL, para tener una referencia visual más clara puede seguir cualquier de los siguientes tres criterios:

- En frascos estériles para recolección de muestras, normalmente hay marcas de medición que indican volúmenes. Busque en el frasco la línea que marca 3 mL, que le ayudará a verificar que está recolectando la cantidad mínima necesaria.
- Si el frasco no tiene marca de volumen, puede visualizar que 3 mL es apenas suficiente para cubrir el fondo de un frasco pequeño, ocupando un área similar al tamaño de tres monedas pequeñas.
- El volumen de 3mL de esputo puede equivaler tres flemas, asegúrese de recolectar al menos esta cantidad.

<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
Instructivo para la Recolección y Transporte de Muestras de Esputo			<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
<b>Código:</b> RTM-MM-01	<b>Versión:</b> 01	<b>Fecha:</b> 1/9/24	<b>Página:</b> 2 de 2

#### 4. Instrucciones para recolectar el esputo

- Tome una respiración profunda para llenar sus pulmones de aire.
- Tosa profundamente desde el pecho, no desde la garganta. El objetivo es obtener secreciones de los pulmones, no saliva.
- Escupa el esputo directamente en el frasco estéril. Asegúrese de que el frasco no entre en contacto con su boca ni con otras superficies.

Cierre bien el frasco inmediatamente después de la recolección para evitar fugas o contaminación.

#### 5. Transporte de la muestra

- Almacenamiento temporal: Si no puede entregar la muestra de inmediato, manténgala refrigerada (entre 2°C y 8°C) hasta que pueda transportarla. No congele la muestra.  
**NOTA:** Tome en cuenta que un *refrigerador* común de casa generalmente tiene una temperatura que oscila entre 2°C y 8°C, mientras que la sección de *congelador* suele estar a temperaturas de -18°C o menos.
- Plazo para entregar la muestra: La muestra debe ser remitida al laboratorio en un plazo no mayor a 24 horas desde el momento de la recolección. Las muestras que lleguen después de este tiempo pueden no ser válidas para el análisis.



#### 6. Consideraciones adicionales

- Para la toma de muestra, no toque el interior del frasco o la tapa para evitar contaminar la muestra.
- Asegúrese de que el frasco esté correctamente etiquetado con su nombre, número de identificación (si es necesario), y la fecha y hora de recolección.

#### 7. Entrega de la muestra

Lleve la muestra directamente al laboratorio e informe al personal si ha seguido todas las instrucciones mencionadas anteriormente. Si tiene alguna duda o dificultad durante la recolección de la muestra, no dude en comunicarse con su médico o con el laboratorio.

Gracias por su colaboración.

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
	Consentimiento Informado para el Procesamiento de Muestras de Esputo		<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular	
	<b>Código:</b> CPM-MM-01	<b>Versión:</b> 01	<b>Fecha:</b> 1/9/24	

**Nombre Completo del Paciente:** \_\_\_\_\_ **Fecha:** \_\_\_\_\_

**Diagnóstico o Sospecha Clínica:** \_\_\_\_\_ **Tipo de Intervención:** Procesamiento de Muestra

### Información Importante



*Pneumocystis jirovecii*, es uno de los patógenos oportunistas más importantes que afectan a individuos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) y pacientes con inmunodepresión debida a otras causas, en los que produce una neumonía grave con una alta tasa de morbilidad y mortalidad. El desarrollo de técnicas moleculares para la identificación de este patógeno ha permitido estudiar mejor su epidemiología y poner en evidencia que la neumonía constituye solo la punta del iceberg de la infección por *P. jirovecii* en la especie humana.

### ¿Qué es el procesamiento de muestras de esputo?

El procesamiento de muestras de esputo tiene como objetivo detectar la presencia del agente, *P. jirovecii* y consiste en:

- **Obtención de la muestra:** Primero, necesitamos obtener una muestra de tu esputo. El esputo es esa mucosidad que puedes toser desde tus pulmones y para recolectarla se te informara como debes hacerlo.
- **Preparación del laboratorio:** Una vez que tenemos la muestra, la llevamos al laboratorio. Allí, los técnicos se aseguran de que todo esté limpio y libre de contaminantes.
- **Procesamiento:** La muestra de esputo se procesa para determinar el material genético del *P. jirovecii* por PCR en tiempo real y sondas Taqman.
- **Resultados:** Una vez terminado el procedimiento, se procederá a comunicar de los resultados al paciente en 48 horas.

**NOTA:** Después del análisis de la muestra, el laboratorio puede utilizar el remanente con fines de investigación u otros estudios. Esto con el fin de contribuir al avance del conocimiento científico. El laboratorio asegura que la confidencialidad e imparcialidad del paciente se mantendrá en todo momento.

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
	Consentimiento Informado para el Procesamiento de Muestras de Esputo		<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular	
	<b>Código:</b> CPM-MM-01	<b>Versión:</b> 01	<b>Fecha:</b> 1/9/24	

### ¿Para qué sirve?

La presencia de dicho agente puede proporcionar información sobre posibles neumonías, bronquitis o infección extrapulmonar, y con dicha información el personal médico podrá proceder con el tratamiento adecuado.

### Riesgos y Consideraciones



El procesamiento de muestras de esputo es seguro porque está bajo normas de aseguramiento de calidad, y se realiza por personal capacitado.

Consecuencias de no realizar el procesamiento: La falta de análisis podría retrasar el diagnóstico de una posible infección respiratoria y/o afectar el tratamiento.

He recibido información sobre el procesamiento de muestras de esputo que se realiza en el laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS, y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Entiendo los riesgos y beneficios, y doy mi consentimiento para el procedimiento.

Firma del Paciente: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
	Encuesta de Datos Clínicos y Epidemiológicos para el Análisis de <i>Pneumocystis jirovecii</i>		<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular	
<b>Código:</b> DCE-MM-01	<b>Versión:</b> 01	<b>Fecha:</b> 1/9/24	<b>Página:</b> 1 de 3	

Estimado paciente, le solicitamos que complete la siguiente información de manera precisa, esto nos permitirá mejorar la calidad del diagnóstico y brindarle un tratamiento adecuado. Su información será tratada de forma confidencial.



### Datos Personales

1. **Nombre completo:** \_\_\_\_\_
2. **Fecha de nacimiento:** \_\_\_\_\_ **Edad:** \_\_\_\_\_
3. **Sexo:**  Masculino  Femenino  Otro
4. **Teléfono de contacto:** \_\_\_\_\_ **Dirección de residencia:** \_\_\_\_\_

### Sección 1: Historia Clínica General

1. **¿Tiene o ha tenido alguna enfermedad pulmonar crónica?**  
 Sí  No  
Si respondió "Sí", por favor, especifique: \_\_\_\_\_
2. **¿Tiene o ha tenido alguna enfermedad que afecte su sistema inmunológico?**  
(Por ejemplo: VIH, cáncer, enfermedades autoinmunes, trasplante de órganos)  
 Sí  No  
Si respondió "Sí", por favor, especifique: \_\_\_\_\_
3. **¿Está en tratamiento con medicamentos inmunosupresores?**  
(Por ejemplo: quimioterapia, corticoides a largo plazo, medicamentos para trasplante)  
 Sí  No  
Si respondió "Sí", por favor, especifique el tipo de medicamento y la duración: \_\_\_\_\_
4. **¿Ha sido diagnosticado con VIH/SIDA?**  
 Sí  No  Prefiero no responder
5. **¿Ha recibido tratamiento con antibióticos en los últimos 30 días?**  
 Sí  No  
Si respondió "Sí", indique el nombre del antibiótico y la duración del tratamiento: \_\_\_\_\_
6. **¿Ha tenido fiebre, escalofríos o sudores nocturnos en los últimos 7 días?**  
 Sí  No  
Si respondió "Sí", ¿desde cuándo? \_\_\_\_\_
7. **¿Presenta dificultad para respirar o sensación de falta de aire?**  
 Sí  No  
Si respondió "Sí", ¿desde cuándo? \_\_\_\_\_



	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
	Encuesta de Datos Clínicos y Epidemiológicos para el Análisis de <i>Pneumocystis jirovecii</i>		<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular	
	Código: DCE-MM-01	Versión: 01	Fecha: 1/9/24	

**8. ¿Ha experimentado pérdida de peso reciente sin causa aparente?**

Sí  No

Si respondió "Sí", indique cuánto peso ha perdido y en cuánto tiempo: \_\_\_\_\_

**Sección 2: Historia Epidemiológica**

**1. ¿Ha estado en contacto con personas que tengan enfermedades respiratorias en las últimas 2 semanas?**

Sí  No

Si respondió "Sí", por favor, describa: \_\_\_\_\_

**2. ¿Ha viajado recientemente fuera del país o a zonas donde haya brotes de enfermedades respiratorias?**

Sí  No

Si respondió "Sí", indique el lugar y la fecha del viaje: \_\_\_\_\_

**3. ¿Reside o trabaja en un entorno donde haya personas inmunocomprometidas?  
(Por ejemplo: hospitales, centros de trasplante, unidades de oncología)**

Sí  No

Si respondió "Sí", por favor, describa: \_\_\_\_\_

**4. ¿Es usted fumador activo o exfumador?**

Activo  Exfumador  Nunca fumé

Si es fumador, ¿cuántos cigarrillos fuma al día? \_\_\_\_\_

Si es exfumador, ¿cuándo dejó de fumar? \_\_\_\_\_

**Sección 3: Síntomas Respiratorios**

**1. ¿Ha presentado tos?**

Sí  No

Si respondió "Sí", ¿desde cuándo? \_\_\_\_\_



**¿La tos es productiva (con flema)?**

Sí  No

**2. Si la tos es productiva, describa las características del esputo (flema):**

- Transparente
- Mucopurulento (mezcla de moco y pus)
- Purulento (espeso y verde o amarillento)
- Sanguinolento (con rastros de sangre)

**3. ¿Ha presentado dolor en el pecho al respirar o toser?**

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
	Encuesta de Datos Clínicos y Epidemiológicos para el Análisis de <i>Pneumocystis jirovecii</i>		<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular	
	<b>Código:</b> DCE-MM-01	<b>Versión:</b> 01	<b>Fecha:</b> 1/9/24	

Sí  No

Si respondió "Sí", ¿desde cuándo? \_\_\_\_\_

**4. ¿Ha presentado sibilancias (silbidos al respirar)?**

Sí  No

**Sección 4: Información Adicional**

**1. ¿Está actualmente bajo tratamiento médico por alguna otra enfermedad no mencionada?**

Sí  No

Si respondió "Sí", por favor, describa: \_\_\_\_\_

**2. ¿Hay algo más que considere relevante para su diagnóstico o tratamiento?**

Sí  No

Si respondió "Sí", por favor, describa: \_\_\_\_\_

Este cuestionario está diseñado para obtener información relevante para la evaluación de su condición y será usado para asegurar un diagnóstico certero. Por favor, comuníquese con su médico si tiene alguna duda.

Gracias por su colaboración.

Firma del Paciente: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_



INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD

Registro para la Recepción de Muestras



Laboratorio: Microbiología Molecular



Código: RRM-MM-01

Versión: 01

Fecha: 1/9/24

**Nota:** Este formulario puede ser usado para cualquier tipo muestra que ingrese al laboratorio.

Código	Apellidos	Nombres	Género (M/F)	Residencia	Muestra	Observaciones	Fecha de Recepción	Fecha de Procesamiento	Fecha de Entrega

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
	Instructivo de Limpieza y Desinfección para el laboratorio de Microbiología Molecular		<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular	
	<b>Código:</b> ILD-MM-01	<b>Versión:</b> 01	<b>Fecha:</b> 1/9/24	

Al establecer un procedimiento estándar para limpiar y desinfectar las áreas de trabajo, equipos e instrumentos en el laboratorio de microbiología molecular, asegura un ambiente libre de contaminantes que puedan interferir en las marchas analíticas que el operador pueda llevar a cabo.

## 1. Materiales y Equipos Necesarios

- Paños de microfibra desechables.
- Solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 0.5% o etanol al 70%.
- Agua destilada o desionizada.
- Guantes desechables y Mascarilla.
- Protección ocular (gafas de seguridad).
- Bolsa para residuos biológicos.



## 2. Procedimiento de Limpieza y Desinfección

### 2.1. Preparación de la Zona

- Usar guantes desechables, mascarilla y gafas de seguridad antes de iniciar el proceso de limpieza.
- Retirar todos los materiales no necesarios de las áreas de trabajo (tubos, pipetas, papel, etc.).
- Desechar cualquier residuo sólido en contenedores específicos para residuos biológicos o químicos, según el tipo de material.

### 2.2. Limpieza de Superficies de Trabajo

- Lavar las superficies de trabajo con un paño húmedo y agua destilada para eliminar polvo o suciedad visible.
- Secar las superficies con un paño limpio.
- Aplicar la solución desinfectante (hipoclorito de sodio al 0.5% o etanol al 70%) sobre la superficie utilizando un paño desechable o rociando directamente.

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
	Instructivo de Limpieza y Desinfección para el laboratorio de Microbiología Molecular		<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular	
	<b>Código:</b> ILD-MM-01	<b>Versión:</b> 01	<b>Fecha:</b> 1/9/24	

- Dejar actuar la solución desinfectante durante al menos 10 minutos.
- Limpiar nuevamente las superficies con un paño limpio y seco.

### 2.3. Limpieza de Equipos

- Desconectar todos los equipos eléctricos (termocicladores, cabinas de bioseguridad, etc.) antes de limpiarlos.
- Limpiar los exteriores de los equipos con un paño húmedo con agua destilada.
- Desinfectar las superficies de contacto frecuentes (botones, paneles, manijas) con una solución de etanol al 70%.
- Evitar rociar directamente la solución desinfectante sobre los equipos electrónicos para prevenir daños.
- Secar completamente las superficies con un paño seco y limpio.



### 2.4. Limpieza y Desinfección de Cabina de Bioseguridad

- Limpiar primero con agua destilada o desionizada para remover cualquier residuo visible.
- Aplicar la solución de etanol al 70% o hipoclorito de sodio en las superficies internas de la cabina, incluyendo el panel de trabajo y las paredes laterales.
- Dejar actuar por 10 minutos antes de secar.
- Usar luz ultravioleta (UV) durante 15 a 30 minutos para desinfección adicional (si la cabina lo permite).

### 2.5. Limpieza de Pisos y Áreas Generales

- Barrer y recoger cualquier residuo visible del suelo.
- Trapear el piso con agua y una solución desinfectante adecuada (hipoclorito de sodio al 0.5% o solución comercial específica para pisos de laboratorio).
- Dejar secar el área completamente antes de retomar cualquier actividad.

### 3. Procedimiento de Desinfección de Instrumentos y Accesorios

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
	Instructivo de Limpieza y Desinfección para el laboratorio de Microbiología Molecular		<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular	
	<b>Código:</b> ILD-MM-01	<b>Versión:</b> 01	<b>Fecha:</b> 1/9/24	

- Sumergir los instrumentos reutilizables (pinzas, espátulas, etc.) en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante al menos 10 minutos.
- Enjuagar con agua destilada para remover los restos de desinfectante.
- Secar los instrumentos con un paño limpio antes de guardarlos en un lugar estéril o volver a usarlos.

#### 4. Eliminación de Residuos

- Depositar los paños desechables y otros residuos en bolsas especiales para desechos biológicos o químicos, según sea el caso.
- Cerrar bien las bolsas de residuos antes de desecharlas en los contenedores correspondientes.

#### 5. Frecuencia de Limpieza

- Realizar la limpieza y desinfección de las superficies de trabajo al inicio y al final de cada jornada laboral.
- Desinfectar equipos y cabinas de bioseguridad diariamente y cada vez que se detecte una posible contaminación.
- Programar una limpieza profunda semanal del laboratorio, cubriendo todas las áreas, incluidos los pisos y zonas de almacenamiento.

#### 6. Consideraciones de Seguridad

- Usar siempre el equipo de protección personal (guantes, mascarilla, protección ocular) durante todo el proceso de limpieza y desinfección.
- Evitar el contacto directo con los productos desinfectantes.



**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD**

Hoja de Registro de la Marcha Analítica para la Determinación del *Pneumocystis jirovecii* en muestras de Esputo

**Laboratorio:** Microbiología Molecular

**Código:** RMA-MM-01

**Versión:** 01

**Fecha:** 1/9/24

**Página:** 1 de 3



Procedimiento	Responsable	Fecha del Procesamiento	Descripción	Parametros Relevantes	Observaciones
Descontaminación y Pretratamiento de Muestras					
Extracción y Purificación de ADN					



**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD**

Hoja de Registro de la Marcha Analítica para la Determinación del *Pneumocystis jirovecii* en muestras de Esputo

**Laboratorio:** Microbiología Molecular

**Código:** RMA-MM-01

**Versión:** 01

**Fecha:** 1/9/24

**Página:** 2 de 3



Procedimiento	Responsable	Fecha del Procesamiento	Descripción	Parametros Relevantes	Observaciones
Reconstitución de Reactivos					
Preparación de la Curva Estándar para la Cuantificación					





**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD**

Hoja de Registro de la Marcha Analítica para la Determinación del *Pneumocystis jirovecii* en muestras de Esputo

**Laboratorio:** Microbiología Molecular

**Código:** RMA-MM-01



**Versión:** 01

**Fecha:** 1/9/24

**Página:** 3 de 3



Procedimiento	Responsable	Fecha del Procesamiento	Descripción	Parametros Relevantes	Observaciones
Preparación de la Mix y Cargado de ADN					
Análisis en Tiempo Real de la Curva					

	<b>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD</b>			
	Instructivo para Determinar la Cantidad de ADN mediante Espectrofotometría			<b>Laboratorio:</b> Microbiología Molecular
	<b>Código:</b> CMGE-MM-01	<b>Versión:</b> 01		<b>Fecha:</b> 1/9/24

Para asegurar que la cantidad de ADN en su muestra es la indicada, siga los siguientes pasos.

### 1. Preparación del Espectrofotómetro:

- Enciende el espectrofotómetro y asegúrate de que esté calibrado correctamente.
- Limpia la cubeta de cuarzo con agua ultrapura o etanol y sécala cuidadosamente.

### 2. Medición de la Muestra de ADN:

- Prepara una solución de ADN diluida (generalmente en buffer Tris-EDTA, TE) con una concentración conocida.
- Coloca la cubeta en el espectrofotómetro y ajusta la longitud de onda a 260 nm (absorbancia máxima del ADN).
- Llena la cubeta con la solución de ADN diluida.

### 3. Registro de la Absorbancia:

- Realiza una lectura de absorbancia ( $A_{260}$ ) para la muestra de ADN.
- Anota el valor obtenido.

### 4. Cálculo de la Concentración de ADN:

- Utiliza la ley de Beer-Lambert:  $A = \epsilon \cdot C \cdot l$ , donde:
  - (A) es la absorbancia medida.
  - ( $\epsilon$ ) es el coeficiente de extinción molar del ADN (generalmente 50  $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{cm}$ ).
  - (C) es la concentración de ADN en  $\text{mg}/\text{mL}$ .
  - (l) es la profundidad de la cubeta (generalmente 1 cm).

### 5. Interpretación:

- Si la concentración es adecuada (rango de 20-100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), el ADN está listo para su uso.
- Si la concentración es muy baja, considera repetir la extracción o concentrar la muestra.



INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD



Hoja de Registro de Salidas de Muestras

Laboratorio: Microbiología Molecular

Código: RSM-MM-01

Versión: 01

Fecha: 1/9/24

**Nota:** Este formulario puede ser usado para cualquier tipo de muestras procesadas.

Código	Apellidos	Nombres	Muestra	Fecha de Recepción	Fecha de Procesamiento	Fecha de Entrega	Resultado	Cuantificación (ng/uL)	Observaciones



**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES EN SALUD**



Hoja de Registro y Evaluación de Quejas

**Laboratorio:** Microbiología Molecular

**Código:** REQ-MM-01

**Versión:** 01

**Fecha:** 1/9/24

**Nota:** Esta hoja de registro es parte del documento de Reclamaciones y Mejora Continua.

Nombre Completo del Paciente	Fecha de la Queja	Descripción de Queja	Responsable de Registro de la Recepción de la Queja	Análisis de Causas	Acciones Tomadas	Observaciones	Cierre de la Queja	Comunicación con el Cliente