

 <p>República de Colombia Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	1 de 35

República de Colombia



Gobernación de Santander

MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL EN EL

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	2 de 35

ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	5
1. OBJETIVO.....	6
2. ALCANCE	6
3. RESPONSABILIDADES.....	6
4. DEFINICIONES	6
5. CONDICIONES GENERALES	8
6. MARCO NORMATIVO	10
7. ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL	10
8. PRECAUCIONES DEL ANÁLISIS.....	10
9. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	11
10. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	11
11. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	11
11.1 Fundamento del método de ensayo	11
11.2 Equipos y materiales	12
11.2.1. <i>Materiales generales</i>	12

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	3 de 35

11.2.2. Materiales usados por kit de extracción	12
11.2.2.1. Materiales usados por kit de extracción	13
11.2.2.2. Consideraciones importantes	13
11.2.2.3. Preparación Buffer de lisis y unión LB.....	14
11.2.2.4. Preparación de las placas de extracción	14
11.2.2.5. Procedimiento de extracción kit MGIEAS y NUCLEIC ACID.....	14
11.2.3. Procedimiento de extracción kit comercial TANBEAD NUCLEIC ACID EXTRACTION	15
11.2.4. Procedimiento de extracción manual kit XIAMEN ZEESCAN BIOTECH	15
11.2.4.1. Sección 1. Preparación del lisado a partir de la muestra.....	15
11.2.4.2. Sección 2. Purificación de ARN.....	16
11.2.4.2.1. Lavado de ARN	16
11.2.4.2.2. Elución de ARN	17
12. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	18
12.1 Fundamento del método de ensayo	18
12.2 Equipos	18
12.3 Materiales y reactivos.....	18
12.4 Descripción del procedimiento	19
12.4.1. Materiales generales	19
12.4.1. Preparación del master mix.....	21
12.5 Montaje de PCR	22

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	4 de 35

13. CONTROL DE CALIDAD ANÁLITICO.....	24
14. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.....	24
15. PRUEBA RÁPIDA DETECCIÓN CUALITATIVA DE ANTÍGENO SARS-CoV224	
15.1 Condiciones para la toma de muestra.....	24
15.2 Fundamento del método de ensayo	25
15.3 Control de calidad analítico	25
15.4 Descripción del procedimiento	26
16. DOCUMENTOS DE REFERENCIA	34
17. ANEXOS	35
18. CONTROL DE CAMBIOS	35

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	5 de 35

INTRODUCCIÓN

El Virus de Novo de familia coronavirus reportado en el año 2019 según la Organización Mundial de la Salud COVID-19 es una enfermedad infecciosa causada por el virus SARS-CoV-2. Produce síntomas similares a los de la gripe, entre los que se incluyen fiebre, tos seca, disnea, mialgia y fatiga. Actualmente la metodología Estándar de oro (Gold Estándar) para la detección de ARN viral de SARS-CoV-2 es la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (rRT-PCR) en muestras respiratorias de todo paciente sintomático o contacto asintomático de SARS-CoV por medio de la extracción y amplificación de ácidos nucleicos usando diferentes técnicas de Biología Molecular. Así mismo según la necesidad de la emergencia sanitaria mundial las pruebas de detección de antígeno son un método de diagnóstico alternativo para SARS-CoV-2 (COVID-19) consiste en la detección de proteínas de la nucleocápside del virus, capta esas partículas con menos de 1000 copias del virus a diferencia de la RT-PCR que requiere al menos 10 veces más de copias para detectar el material genético de este. En menos de 30 minutos se obtiene el resultado. Es fácil de usar y de implementar en los laboratorios.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	6 de 35

1. OBJETIVO

Definir las diferentes técnicas de biología molecular utilizadas en el laboratorio departamental de salud pública tales como la extracción y amplificación de ácidos nucleicos mediante RT-PCR y pruebas rápidas de antígeno para SARS-CoV-2

2. ALCANCE

Este documento se tomará como referencia en el área de biología molecular del Laboratorio Departamental de Salud Pública, para la extracción y amplificación de ácidos nucleicos en muestras respiratorias utilizando la técnica manual y automatizada que permita detectar la infección de SARS- CoV-2 COVID-19 por PCR en tiempo real y por pruebas rápidas para la detección de antígeno.

3. RESPONSABILIDADES

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

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

- **Personal auxiliar del laboratorio** quien se encargará de aplicar los lineamientos descritos en el documento con estándares de calidad para la prueba rápida detección cualitativa de antígeno SARS-CoV-2.

4. DEFINICIONES

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

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	7 de 35

Aspirado nasofaríngeo: Es una prueba que detecta virus y bacterias que causan infecciones respiratorias. La prueba se hace tomando una muestra de células de la parte superior de la nariz y la garganta.

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

Características de desempeño de una prueba: Se refiere a los parámetros y medidas que tiene una prueba con el fin de evaluar su desempeño, entre los cuales están: sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión, límite de detección entre otros.

COVID-19: Es la enfermedad infecciosa causada por el coronavirus que se ha descubierto más recientemente. Tanto este nuevo virus como la enfermedad que provoca eran desconocidos antes de que estallara el brote en Wuhan (China) en diciembre de 2019. Actualmente la COVID-19 es una pandemia que afecta a muchos países de todo el mundo.

Hisopado nasofaríngeo: Es un examen con el que se analiza una muestra de las secreciones de la parte superior de la garganta, por detrás de la nariz, para detectar organismos que puedan causar enfermedad.

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

Pruebas de detección de antígeno: Es un método de diagnóstico alternativo para SARS-CoV-2 (COVID-19), que consiste en la detección de proteínas de la nucleocápside del virus, capta esas partículas con menos de 1000 copias del virus a diferencia de la RT-PCR que requiere al menos 10 veces más de copias para detectar el material genético de este. En menos de 30 minutos se obtiene el resultado y tiene facilidad en su uso y en la implementación en los Laboratorios.

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

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	8 de 35

5. CONDICIONES GENERALES

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

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	9 de 35

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

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SALUD Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	10 de 35

- Para los kits de pruebas rápidas de antígeno para SARS CoV-2 almacene a temperatura ambiente, 2-30°C / 36-86°F, fuera del alcance de la luz solar directa. Los materiales del kit son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la caja exterior. No congelar el kit. **Transporte:** Muestras en gradilla en cava con T° de refrigeración 2°C - 8°C.

6. MARCO NORMATIVO

- Lineamientos para el uso de pruebas molecular RT-PCR y pruebas de antígeno y serológicas para SARS-CoV-2 (COVID19) en Colombia GIPS21.
- Lineamientos para el uso de pruebas en el laboratorio de salud pública LSP en el marco de la emergencia sanitaria por COVID 19 en Colombia
- Protocolo de verificación (Validación secundaria) para pruebas moleculares de PCR en tiempo real (RT-q PCR) para la detección de SARS-CoV-2.

7. ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Tapabocas N95
- Careta
- Gafas
- Overol
- Bata manga larga desechable
- Guantes no estériles
- Gorro
- Polainas

8. PRECAUCIONES DEL ANÁLISIS

- No utilice los reactivos transcurrida la fecha de caducidad. Se debe evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que puede afectar a su rendimiento y producir resultados erróneos.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	<p>MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	11 de 35

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

9. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

La recolección de la muestra se deberá seguir recomendaciones para toma de muestras de virus respiratorios dadas por el Instituto Nacional de Salud y Ministerio de Salud. Las muestras se identificarán según el código asignado por el sistema de información.

10. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El procesamiento de las muestras se deberá realizar antes de las 48 horas, en caso no ser realizado en este tiempo se deberán congelar a -80 °C, así mismo las muestras procesadas serán guardadas según procedimiento de almacenamiento de muestras.

11. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

11.1 Fundamento del método de ensayo

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	12 de 35

Los kits utilizan tecnología de perlas magnéticas de sílice microesféricas, lo que permite la unión, el lavado y elución de los ácidos nucleicos de manera óptima. Están diseñados para la extracción y purificación de ARN mediante lisis química (proteínasa K) seguida de la unión del RNA a las perlas magnéticas. Las perlas capturan el material genético permitiendo que las proteínas y otros contaminantes se eliminen mediante lavados obteniendo finalmente el ARN en un buffer de elución o agua libre de RNAsa.

11.2 Equipos y materiales

11.2.1. Materiales generales

- Puntas de pipeta con filtro, estériles y libres de nucleasas
- Micropipeta monocanal (10-100 y 100-1000 µL)
- Refrigerador a 4°C y -20°C
- Solución de hipoclorito de sodio a 5000 ppm
- Alcohol 95%
- Gradillas de plástico de 8x12
- Vortéx
- Tijeras
- Criocajas
- Cinta de enmascarar
- Papel absorbente
- Marcador con punta fina
- Parafilm
- Implementos de protección personal para el área de extracción.
- Guantes de nitrilo

11.2.2. Materiales usados por kit de extracción

KIT MGIEASY MAGNETIC BEADS	KIT COMERCIAL TANBEAD NUCLEIC ACID EXTRACTION	KIT XIAMEN ZEESAN BIOTECH
Equipo Maelstrom 9600	Equipo Maelstrom 9600	Centrifuga

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	13 de 35

<ul style="list-style-type: none"> • 5 placas de extracción • 1 caja de puntas de extracción. • Tubos falcón de 50 mL 	Placas Automatizadas 6 Placa de 96 pozos con tampón reactivo.	Tubo Eppendorf de 2,0 ml y 1,5 ml
Etanol (EtOH) al 96-100%	1 caja de puntas de extracción.	Kit: Tampón de Lisis para ARN, Suspensión de Partículas Magnéticas, Tampón de Lavado R1, R2 y R3, Tampón de Elución de ARN y 0.5 mg de Poli A
Kit: Buffer MW1, MW2, de elusión EB (Agua libre de RNasa), Proteinasa K, Perlas magnéticas, Buffer MLB y Enhancer Buffer	Proteinasa K (refrigerada de 2°C-8°C)	Soporte magnético

Tabla 1. Materiales usados por kit de extracción

11.2.2.1. Materiales usados por kit de extracción

	REACTIVO	PAQUETE Y CANTIDAD	
		96 REACCIONES	1728 REACCIONES
CAJA 1	Buffer MLB	20 mL* 1 frasco	400 mL*1 frasco
	Buffer MW1	12 mL*2 frascos	420 mL*1 frasco
	Buffer MW2	12 mL*1 frascos	220 mL*1 frasco
	Agua libre de RNasa	10 mL*1 frasco	180 mL*1 frasco
	Proteinasa K	1.5 mL*1 frasco	28 mL*1 frasco
	Perlas Magnéticas	1.5 mL*1 frasco	28 mL*1 frasco
CAJA 2	Buffer Enhancer	100µL*1 frasco	2 mL* 1 frasco

Tabla 2. Componentes principales y especificaciones

REACTIVO	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	PERIODO DE VIGENCIA
Buffer Enhancer	-25°C a -15°C	12 meses
Proteinasa K	2°C a 8°C	12 meses
Perlas Magnéticas	2°C a 8°C	12 meses
Otros	0°C a 30°C	12 meses

Tabla 3. Condiciones para almacenamiento de reactivos y vigencia.

11.2.2.2. Consideraciones importantes

- El buffer MW1 y MW2 se reconstituyen una única vez con etanol previo al uso inicial del kit.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	14 de 35

- El buffer de lisis y unión se prepara para cada montaje y no debe exceder 30 minutos de su preparación para ser utilizado.
- Agitar muy bien las perlas magnéticas antes de su uso
- El buffer MLB es un detergente por ello puede formar espuma, debido a eso se debe homogenizar cuidadosamente y pipetear donde NO este la espuma.
- En caso de que el buffer MLB se precipite colóquelo a 37°C por 10 minutos y homogenízalo antes del uso

11.2.2.3. Preparación Buffer de lisis y unión LB

Para preparar el buffer de lisis y unión agregue las siguientes cantidades: por muestra se requieren 200µl de buffer MLB, 250µl de etanol absoluto, 15µl de proteinasa K, 15µl perlas magnéticas (recuerde dar vortex a las perlas magnéticas 15 segundos antes de adicionarlas en la preparación) y 1µl de buffer Enhancer. Se debe realizar en un tubo falcon de 50mL, tenga en cuenta la cantidad de muestras a procesar para realizar los cálculos correspondientes.

11.2.2.4. Preparación de las placas de extracción

Realice el siguiente procedimiento para cada una de las muestras:

- De la preparación del buffer de lisis y unión (literal 9.2) pipetee 460µl al pozo de la placa de extracción debidamente rotulada como LB y sellarla con Parafilm.
- Servir en el pozo de la placa de extracción 500µL del buffer de lavado MW1 y sellarla con Parafilm.
- Servir en el pozo de la placa de extracción 500µL del buffer de lavado MW2 sellarla con Parafilm.
- Servir en el pozo de la placa de extracción 600µL de etanol (EtOH) al 96-100% sellarla con Parafilm.
- Servir en el pozo de la placa de extracción 50µL del Buffer de elusión EB o Agua libre de RNAsa sellarla con Parafilm.
- Pasar por la esclusa las 5 placas rotuladas correctamente al área de alistamiento y extracción.

11.2.2.5. Procedimiento de extracción kit MGIEAS y NUCLEIC ACID

1. Adicionar 200µl de muestra del tubo inicial en la placa de buffer de lisis previamente preparado.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	15 de 35

2. Monte las puntas de extracción o giratorias en el equipo.
3. Coloque las placas en el portaplacas del equipo como lo vaya indicando
4. Cerciorarse que la esquina faltante de la base mira hacia la parte inferior izquierda
5. Programar según la guía rápida para el uso del equipo Maelstrom 9600 para extracción de ácidos nucleicos.
6. Una vez finalizada la extracción el equipo emite una señal de alarma.
7. Retirar y tapan la placa de buffer de elusión.
8. Pasar la placa de buffer de elusión al área de adición para continuar con el proceso de amplificación.
9. Al finalizar la extracción encender la luz UV del equipo por 20 minutos.
10. Apagar el equipo siguiendo las instrucciones de la guía rápida para el uso del equipo Maelstrom 9600.

11.2.3. Procedimiento de extracción kit comercial TANBEAD NUCLEIC ACID EXTRACTION

1. Retire cuidadosamente el papel de aluminio en la placa automatizada.
 2. Agregue 300 µl de la muestra y 10 µl de proteinasa K dentro de los pozos de la placa 1 (placa rellena con tampón de lisis).
- Nota: La relación de volumen de la mezcla y el tampón de lisis es de aproximadamente 300 µl: 600 µl.
3. Seleccione un programa "665".
 4. Siga la guía que se muestra en la pantalla y coloque las placas cuidadosamente. Asegúrese de que la esquina faltante de la placa esté orientada hacia el panel de la puerta.
 5. Cuando finalice el programa, retire cuidadosamente la placa automatizada marcada a como EB.
 6. Pasar la placa de EB al área de adición para seguir con el procedimiento.
 7. Deseche las placas automatizadas usadas y las puntas giratorias en la caneca de recuperación de desechos.
 8. Colocar la luz UV del equipo durante 20 minutos.
 9. Apagar el equipo siguiendo los lineamientos de la Guía rápida para el uso del Equipo Maelstrom 9600.

11.2.4. Procedimiento de extracción manual kit XIAMEN ZEESCAN BIOTECH

11.2.4.1. Sección 1. Preparación del lisado a partir de la muestra

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	16 de 35



Diagrama de Flujo de Aislamiento de ARN Viral

1. Agite la muestra a fondo con vórtex durante más de 1 minuto para asegurarse de que sea homogénea.
2. Transfiera 1000 μ L de muestra a un tubo de centrifuga de 2 mL y luego agregue 5 μ L de solución de PolyA (1 mg/mL) a la muestra.
3. Agite con vórtex la suspensión de Partículas Magnéticas durante 30 segundos para garantizar que esté completamente suspendida,
4. Transfiera 50 μ L de suspensión de partículas magnéticas a la muestra, agite la muestra en vórtex para mantener las partículas en estado suspendido por 5 minutos.
5. Continúe con el Paso de Lavado de ARN en la sección 2.

11.2.4.2. Sección 2. Purificación de ARN

11.2.4.2.1. Lavado de ARN

1. Coloque el tubo de centrifuga que contiene la muestra de la sección 1 en el soporte magnético durante 60 segundos, hasta que las partículas magnéticas se adsorban completamente en el lado del soporte magnético, pipetee el líquido del tubo de la manera más limpia posible.
2. Retire el tubo de centrifuga del soporte magnético, transfiera 800 μ L del Tampón de Lavado R1 al tubo, agite con vórtex durante 20 segundos.
3. Coloque el tubo de centrifuga en el soporte magnético durante 60 s, hasta que las partículas magnéticas se adsorban completamente en el lado de los soportes magnéticos.
4. Pipetee el líquido fuera del tubo de la manera más limpia posible.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	17 de 35

5. Retire el tubo de centrifuga del soporte magnético, transfiera 1000 µL de Tampón de Lavado R2 al tubo.
6. Transfiera la mezcla a un nuevo tubo de centrifuga de 1,5 mL con pipeta para evitar que el paso de elución final esté contaminado por la solución de sal residual de la tapa del tubo de centrifuga y sus bordes.
7. Agite con vórtex la mezcla durante 20 segundos.
8. Coloque el tubo de centrifuga en el soporte magnético durante 30 s, hasta que las partículas magnéticas se adsorban completamente en el lado del soporte magnético
9. Pipetee el líquido de la manera más limpia posible.
10. Retire el tubo de centrifuga del soporte magnético, transfiera 1000 µL de Tampón de Lavado R3 al tubo, agite con vórtex durante 5 segundos
11. Coloque inmediatamente el tubo de centrifuga en el soporte magnético durante 20 segundos, hasta que las partículas magnéticas se adsorban completamente en el lado del soporte magnético.
12. Pipetee el líquido del tubo de la manera más limpia posible.

11.2.4.2.2. Elución de ARN

1. Transfiera 60 µL de Tampón de Elución de ARN en el tubo de centrifuga, agite con vórtex durante 5 minutos.
2. Coloque el tubo de centrifuga en el soporte magnético durante 30 segundos, hasta que las partículas magnéticas se adsorban completamente en el lado del soporte magnético.
3. Transfiera con cuidado el líquido a un nuevo tubo de centrifuga, que es la solución de ARN de virus purificado.
4. Llevar al área de adición para continuar con el proceso de PCR.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	18 de 35

12. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

12.1 Fundamento del método de ensayo

La metodología utilizada en el laboratorio Departamental de Salud Pública se basa en el protocolo Charité Berlín, avalado por la Organización Mundial de la Salud el cual se basa en una RT-qPCR.

Este protocolo se basa en la detección de un marcador, el gen E. Los ensayos para los genes E se entienden como protocolos de tamizaje para detectar cualquier beta-coronavirus asociado a murciélagos (no detectan coronavirus humanos comunes). Se está realizando la detección del gen E del SARS- CoV-2 mediante una sonda marcada con el fluoroforo FAM y el gen RNase P humano como control interno mediante una sonda marcada con el fluoroforo HEX. La fluorescencia emitida se detecta mediante un termociclador de PCR en tiempo real CFX96 marca Biorad y permite confirmar una muestra con sospecha clínica de infección por el virus SARS-CoV-2. Utilizando el kit comercial Biorad.

12.2 Equipos

EQUIPOS
Termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System - BioRad
Neveras de congelación -20°C y -80°C
1 Cabina de flujo laminar en adición
1 Cabina de flujo laminar para Pre-PCR

Tabla 4. Equipos

12.3 Materiales y reactivos

MATERIALES	REACTIVOS
Tubos low profile	Supermix iTaq 2X
Tapas para los tubos	Enzima de retrotranscripción
Viales de 1.5 mL	Gen E – Forward 10 uM

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	19 de 35

Micropipetas 10-100ul, 2-20ul	Gen E – Reverse 10 uM
Puntas 200 ul , 20 ul	Gen E – FAM 10 uM
Papel aluminio	RNase – F 10 uM
Culer	RNase – R 10 uM
Criocajas	RNase – HEX 10 uM
1 Sharpie	Agua libre de nucleasas
1 Cinta de enmascarar	Supermix iTaq 2X
Alcohol	Enzima de retrotranscripción
Papel absorbente	Gen E – Forward 10 uM
Gradillas	Gen E – Reverse 10 uM
Bolsas rojas pequeñas	Gen E – FAM 10 uM

Tabla 5. Materiales y reactivos

12.4 Descripción del procedimiento

12.4.1. Materiales generales

Realice la reconstitución de las soluciones stock de los primers y sondas.

REACTIVO	PREPARACIÓN
SONDAS: Presentación: 80 nmol	<p style="text-align: center;">SOLUCIÓN DE ALMACENAMIENTO 100x</p> <p>Preparar a una concentración de 100µM</p> <p style="text-align: center;">100 µM=100X10⁻⁶ mol/L</p> <p>Se debe tener en cuenta la concentración de las sondas en nanomolar. Este valor se multiplica por 100 y esta es la cantidad de agua que se le debe agregar. En el caso de una sonda con una concentración de 80nm se agregaría 800uL de agua para obtener una solución 100X</p> <p style="text-align: center;">Vol= cantidad/concentración</p> <p style="text-align: center;">100 µM= 80nm/800 µL</p>

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	20 de 35

	<u>PROCEDIMIENTO</u>
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hacer un spin a los tubos 2. Añadir 800 µL de H₂O libre de RNAsas o TRIS 3. Dejar reposar por 1 minuto 4. Dar vortex de 2500-2800 rpm durante 15 segundos 5. Alicuotar según lo requerido
	PREPARACIÓN PARA SOLUCIÓN DE TRABAJO 10x NOTA: <i>se utiliza 0.25 µL de la solución por cada reacción. Luego de tener el volumen final:</i>
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se realiza una dilución Stock 1:10 de la sonda, que sería: 1 µL de sonda 100x + 9 µL de H₂O libre de RNAsas
	EJEMPLO: $0.25 \mu L \times 120 Rx = 30 \mu L$ de volumen final Entonces: $3 \mu L$ de sonda 100x + $27 \mu L$ H ₂ O libre de RNAsas
	<ol style="list-style-type: none"> 2. Alicuotar y conservar a -20°C NOTA: <i>Tener en cuenta que las soluciones no se pueden descongelar más de 5 veces, es necesario preparar lo suficiente para el procesamiento</i>
PRIMERS: Presentación 300 nmol	SOLUCIÓN DE ALMACENAMIENTO 200x $300 \mu M = 100 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ Vol = cantidad/concentración $300 \mu M = 300 \text{ mol} / 3000 \mu L$ Esta es la presentación a la que llegaron pero se prepara a 200 µM ya que la preparación no es posible en un solo vial por el volumen, entonces: 200 µM = 1500 µL
	<u>PROCEDIMIENTO</u>
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hacer un spin a los tubos 2. Añadir 1500 µL de H₂O libre de RNAsas 3. Dejar reposar por 1 minuto 4. Dar vortex de 2500-2800 rpm durante 15 segundos

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	21 de 35

	<p>5. Alicuotar según lo requerido</p> <p>PREPARACIÓN PARA SOLUCIÓN DE TRABAJO 10x</p> <p>NOTA: Para cada reacción de PCR se requieren 0.5ul de Primers</p> <p>1. Se realiza una dilución Stock 1:20 del primer, que sería :</p> <p>EJEMPLO:</p> <p><i>120 reacciones requieren 60 µL</i></p> <p><i>60 µL_{10x} (1:20) = 3 µL_{200x} + 57 µL H₂O libre de RNAsas</i></p> <p><i>Para preparar 6 alícuotas de 60 µL_{10x} = 18 µL_{200x}</i></p> <p>2. Alicuotar y conservar a -20 °C</p>
--	--

Tabla 6. Preparación de reactivos para todos los ensayos de RT-PCR tiempo real.

12.4.1. Preparación del master mix

1. Se inicia con la limpieza de la cabina de bioseguridad, se limpia con un papel absorbente impregnado con hipoclorito a 5000 ppm, luego, poner luz UV por 15 minutos, finalmente limpiar con otro papel absorbente impregnado con alcohol al 95%. En esta parte se debe incluir dentro de la cabina la bolsa de desechos para que reciba la luz UV.

2. Sacar los reactivos que se encuentran en el congelador a -20°C para que se atemperen y dar inicio a la preparación de la master mix. Es importante mantenerlos protegidos de la luz.

3. Una vez estén descongelados los reactivos se procede a preparar la mix en un vial estéril previamente marcado con la fecha del día de la preparación. Agregar cada reactivo con su valor correspondiente de acuerdo a los cálculos realizados anteriormente, se debe hacer de forma cuidadosa, evitando contaminación con los guantes.

COMPONENTES DE LA REACCIÓN	VOLUMEN EN µL X 1 REACCIÓN
Supermix iTaq 2X	10 µL
Enzima de retrotranscripción	0.5 µL

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	22 de 35

Gen E – Forward 10 uM	0.5 µL
Gen E – Reverse 10 uM	0.5 µL
Gen E – FAM 10 uM	0.25 µL
RNase – F 10 uM	0.5 µL
RNase – R 10 uM	0.5 µL
RNase – HEX 10 uM	0.25 µL
Agua libre de nucleasas	2 µL
Volumen de muestra RNA	5 µL
Volumen final de reacción	20 µL

Tabla 7. Componentes y volúmenes para una reacción, Kit comercial Biorad

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

4. Una vez se hayan agregado, mezclar y almacenar a -20 °C.
5. Al finalizar la preparación de la master mix se deberá limpiar la cabina de la misma forma que se realizó en el paso número 1.

12.5 Montaje de PCR

1. Se inicia con la limpieza de la cabina de bioseguridad, se limpia con un papel absorbente impregnado con hipoclorito a 5000 ppm, luego, poner luz UV por 15 minutos, finalmente limpiar con otro papel absorbente impregnado con alcohol al 95%. En esta parte se debe incluir dentro de la cabina la bolsa de desechos para que reciba la luz UV.
2. Se pone a descongelar la master mix dentro de la cabina de bioseguridad.
3. Una vez este descongelada, servir 15 ul en los strips de tubos low profile (previamente marcados) utilizando de soporte un cooler para mantener la cadena de frio de la master mix y Sellar los tubos de los strips con tapas ópticas transparentes.
4. Pasar por la exclusiva los tubos ya servidos con la master manteniendo la cadena de frio para el área de adición.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

5. Hacer limpieza de la cabina de adición como se indica en el paso 1.
6. Por medio de la exclusiva se pasan los ARN extraídos para ser adicionados a la master mix.
7. Se añaden 5ul de eluidos de RNA a cada tubo, cuidando cualquier tipo de contaminación y haciéndose de forma rápida.
8. Finalmente se adicionan los controles: primero control de extracción, control negativo y de último el control positivo.
9. Programar el termociclador (CFX-96) como se indica en el manual de uso del equipo

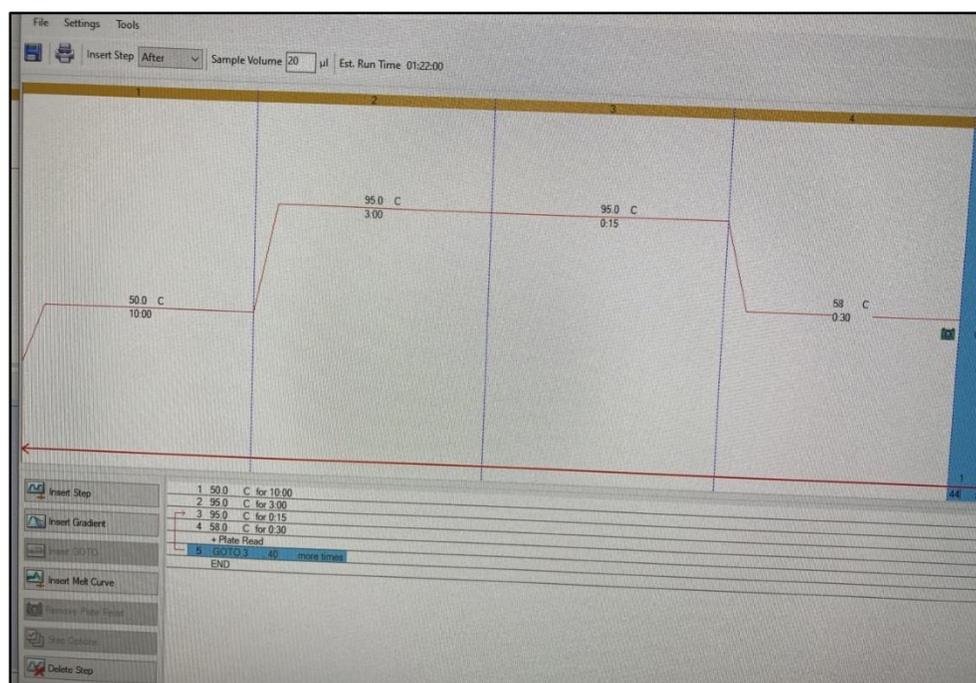


Imagen 1. Programación del Protocolo

PASOS CICLAJE	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
---------------	-------------	--------	--------

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	24 de 35

Retrotranscripción	50 °C	10 min	1
Activación	95 °C	3 min	
Desnaturalización	95 °C	15 seg	44
Anillaje/ Extensión	58°C	60 seg	

Tabla 6. Perfil térmico

13. CONTROL DE CALIDAD ANÁLITICO

Cada montaje de la prueba RT-PCR incluirá, un control positivo, un control negativo y control de extracción para garantizar de forma interna el control de calidad. Control de calidad externo se llevará a cabo con el Instituto Nacional de Salud, según lineamiento nacional.

14. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

#	E	IC	RESULTADO DEL ENSAYO
1	≤38	≤35	COVID-19 Positivo
1	≤38	I.D*	COVID-19 Positivo
2	> 38	≤35	Negativo
3	I.D	I.D*	Inválido (volver a realizar la prueba)

* I.D: Indeterminado

Tabla 7. Valores e interpretación resultados

15. PRUEBA RÁPIDA DETECCIÓN CUALITATIVA DE ANTÍGENO SARS-CoV2

15.1 Condiciones para la toma de muestra

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	25 de 35

Según el lineamiento para el uso de pruebas moleculares RT-PCR y pruebas de antígeno y serológicas para SARS-CoV-2(covid-19) en Colombia. La prueba de detección de antígenos es una prueba diagnóstica alternativa para la infección por SARS-CoV2 (COVID-19). Se realiza en persona con síntomas de menos de 11 días, atendida en ámbito de urgencias u hospitalización, donde por las condiciones territoriales no se tenga la capacidad para realizar pruebas moleculares RT-PCR. De la misma manera en los servicios ambulatorios o domiciliarios a personas sintomáticas y grupos de riesgo priorizados también al contacto asintomático no conviviente con el caso confirmado, dentro de un estudio de cerco epidemiológico y personas que vivan en zonas rurales dispersas.

- Muestra: Hisopado nasofaríngeo.
- La Identificación de las muestras deben incluir nombres y apellidos completos, documento y fecha de la toma.

15.2 Fundamento del método de ensayo

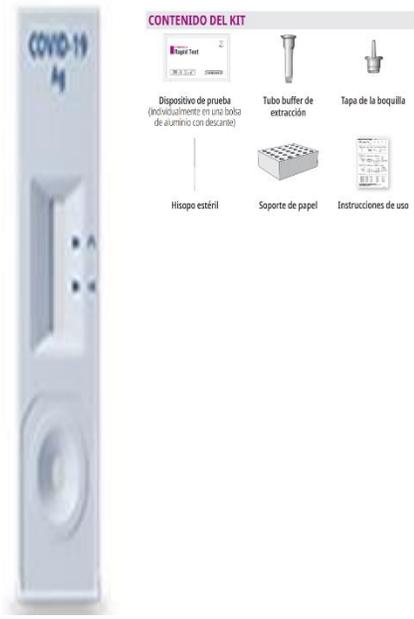
La prueba STANDARD Q COVID-19 Ag tiene dos líneas precubiertas en la superficie de la membrana de nitrocelulosa: la línea control “C” y la línea de prueba “T”. Tanto la línea control como la línea de prueba son invisibles antes de la aplicación de las muestras. La región de la línea de prueba está cubierta con anticuerpo anti-COVID-19 monoclonal de ratón y la región de la línea control está cubierta anticuerpo anti-pollo IgY monoclonal de ratón. El anticuerpo antiCOVID-19 monoclonal de ratón conjugado con partículas de color se utiliza como detector del antígeno COVID-19 en el dispositivo. Durante la prueba, el antígeno COVID-19 en la muestra interactúa con el anticuerpo anti-COVID-19 monoclonal conjugado con partículas de color para generar el complejo de partícula de color antígeno-anticuerpo. Este complejo migra a través de la membrana por acción capilar hasta la línea de prueba, donde es capturado por el anticuerpo anti-COVID-19 monoclonal de ratón. Si en la muestra se detecta la presencia de antígenos COVID-19, una línea de prueba de color será visible en la ventana de resultado. La intensidad de la línea de prueba de color variará en función de la cantidad de antígeno COVID-19 presente en la muestra. Si en la muestra no se detecta la presencia de antígenos COVID-19, entonces no aparecerá color en la línea de prueba. La línea control se utiliza como control procedimental y aparecerá siempre que el procedimiento de prueba sea desarrollado adecuadamente y los reactivos de la prueba se encuentren operativos. Las pruebas serológicas rápidas de inmunocromatografía se usan a partir del día 11 de síntomas.

15.3 Control de calidad analítico

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTO DE SANTANDER</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	26 de 35

La bolsa de aluminio tiene un “saquito” de desecante en el interior. Con este se verifica el estado del dispositivo de prueba. De igual manera La línea control “C” se utiliza como control procedimental y aparecerá siempre que el procedimiento de prueba sea desarrollado adecuadamente y los reactivos de la prueba se encuentren operativos.

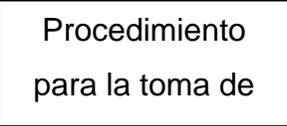
Técnica	Inmunoensayo cromatográfico de flujo Lateral.
Fabricante	SD BIOSENSOR INC.
Presentación	<p>1 prueba por bolsa, Kit para 25 pruebas.</p> 

15.4 Descripción del procedimiento

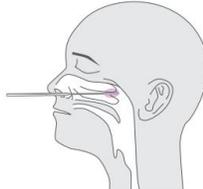
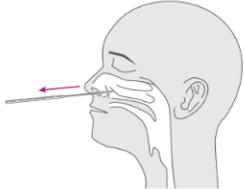
15.4.1. Fase Preanalítica

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

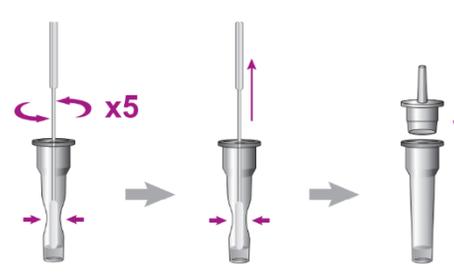
 República de Colombia Gobernación de Santander	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	27 de 35

No.	DIAGRAMA	DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS APLICABLES
1		Inicio del Proceso	Profesionales del área.	No aplica
2		Diligenciamiento de ficha de notificación y formato control de envío y recepción de muestras para análisis SARS-CoV-2 (COVID-19).	Profesionales del área.	Ficha de documentación impresa del SIVIGILA. https://www.ins.gov.co/ Formato control de envío y recepción de muestras para análisis SARS-CoV -2 (COVID-19).
3		Una vez diligenciada la ficha de notificación y el formato, se procede a tomar la muestra del paciente: <ol style="list-style-type: none"> El personal responsable de la toma de la muestra debe usar todos los elementos de protección personal para la realización de la toma de muestra de Hisopado Nasofaríngeo. Indicar al paciente que se siente en una posición cómoda en ángulo de 45° Insertar un Hisopo estéril en la fosa nasal del paciente hasta alcanzar la superficie posterior de la nasofaringe. 	Profesionales del área.	No aplica.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> <p>Procedimiento para la toma de</p> </div>	 <ol style="list-style-type: none"> 4. Empujar el hisopo hasta encontrar resistencia a la altura de la concha nasal mediante una rotación suave. 5. Recolecte la muestra desde la superficie posterior de la nasofaringe girando suavemente.  <ol style="list-style-type: none"> 6. Retire el Hisopo de la cavidad nasal  <p>cuidadosamente.</p> <ol style="list-style-type: none"> 7. Inserte el hisopo impregnado con la muestra en el buffer de extracción debidamente rotulado con nombre, cédula y fecha de toma de la muestra. 8. Mezcla utilizando el hisopo al menos cinco veces. 	<p>Profesionales del área.</p>	<p>No aplica.</p>
--	--	--	--------------------------------	-------------------

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

		<p>9. Retire el hisopo presionando simultáneamente los costados del tubo buffer para extraer el líquido impregnado en el hisopo.</p> <p>10. Asegurar la tapa de la boquilla en el tubo.</p>  <p>11. Ubicar las muestras en la gradilla del kit.</p> <p>12. Descartar todo el material contaminado (guantes, gorro, tapabocas N95 y bata desechable).</p> <p>Nota: la muestra debe ser procesada tan pronto como se realice la recolección.</p>		
4	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> <p>Conservación de las muestras de hisopado</p> </div>	<p>Refrigerar la muestra obtenida del paciente y transportarla al laboratorio. Tener en cuenta que es estable máximo a 1 hora a temperatura ambiente y hasta máximo 4 horas a temperatura de refrigeración de 2°C-8°C antes de realizar el procesamiento.</p>	<p>Profesionales del área.</p>	<p>No Aplica</p>

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	30 de 35

--	--	--	--

15.4.2. Fase analítica y post-analítica

No.	DIAGRAMA	DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS APLICABLES
1	Identificación de las muestras	Al llegar al laboratorio se debe marcar cada cassette de manera que quede debidamente rotulado.	Profesionales del área.	No aplica
2	Procedimiento	<ol style="list-style-type: none"> Leer atentamente las instrucciones especificadas en el presente procedimiento para usar la prueba Verificar la fecha de caducidad en el reverso de la bolsa de aluminio. No utilizar el kit si la fecha de caducidad ha sido sobrepasada. Abrir la bolsa de aluminio y verificar el estado del dispositivo de prueba y del saco de desecante en el interior. Usar todos los elementos de <div style="text-align: center;">  <p><Bolsa de aluminio> <Dispositivo de prueba> <Desecante></p> </div> <p>protección personal: Bata desechable, Traje Tyvek, Gafas de protección ocular, Gorro, Guantes y Tapabocas N95.</p>	Profesionales del área.	No aplica.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	31 de 35

No.	DIAGRAMA	DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS APLICABLES
		<p>de muestra del dispositivo de prueba.</p> <p>6. Leer el resultado de la prueba en 15-30 minutos. Para reportar una prueba negativa se debe esperar 30 minutos.</p> 		
3	Interpretación	<p>1. Una marca de color aparecerá en la sección superior de la ventana de resultado para mostrar que la prueba funciona adecuadamente. Esta marca es la línea de control de Calidad(C).</p> <p>2. Una marca de color aparecerá en la sección inferior de la ventana de resultado. Esta marca es la línea de antígeno COVID-19 (T).</p> <p>Luego de analizada la muestra, se deben interpretar los resultados de la siguiente manera:</p> <ul style="list-style-type: none"> Positivo: Aparecen dos bandas tanto en el área de control de calidad como en el área de prueba o Test. Si la línea control es tenue 		No Aplica

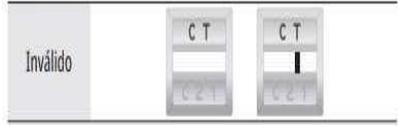
Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	32 de 35

No.	DIAGRAMA	DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS APLICABLES
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;">Interpretación</div>	<p>o la línea de prueba no es uniforme, la prueba debe ser considerada correcta y el resultado de prueba debe ser interpretado como un resultado positivo.</p> <p><i>La presencia de cualquier línea, sin importar si ésta es intensa o tenue, indica que el resultado debe considerarse positivo.</i></p> <p>Nota: Los resultados positivos deben ser considerados en conjunto con el historial clínico y demás información a disposición del</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>personal médico.</p>	Profesionales del área.	No Aplica

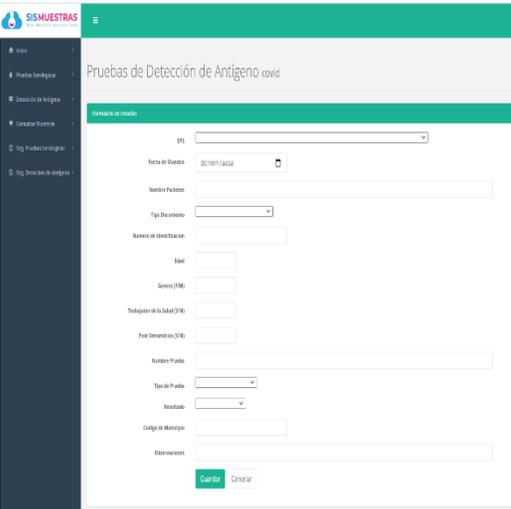
Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	33 de 35

No.	DIAGRAMA	DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS APLICABLES
		<ul style="list-style-type: none"> Negativo: Solo aparece una banda en el área de control de calidad (C), pero ninguna banda en el área de prueba.   <ul style="list-style-type: none"> Invalido: Ninguna Banda en la línea de control de calidad es considerado como un resultado Inválido. 	Profesionales del área.	

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	34 de 35

No.	DIAGRAMA	DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS APLICABLES
4	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;">Reporte de resultados</div>	<p>Luego de obtener el resultado, se debe realizar el reporte en la plataforma DELFIN por paciente y SIS MUESTRAS de manera individual o por carga masiva.</p> 	Profesionales del área.	No Aplica

16. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Lineamientos para el uso de pruebas moleculares RT-PCR y pruebas de antígeno y serológicas para SARS-CoV-2 (covid-19) en Colombia, Gallegos S, Madera G, Cardenas M, Hincapie C, Álvarez V, Quiroga M, Fuentes S y Segura C. Versión 07 Ministerio de Salud, 2020.

Validación secundaria y verificación del desempeño de la prueba “STANDARDTM Q COVID-19 Ag Test Biosensor”. Reyes M y Zabaleta G. Instituto Nacional de Salud, 2020.

STANDARDTM Q COVID-19 Ag. SD Biosensor. Ref Q-NCOV-01G.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-13
		VERSIÓN	2
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	35 de 35

17. ANEXOS

- Formato: MI-GS-RG-502 HOJA DE TRABAJO SARS - COV2.
- Formato: MI-GS-RG-476 "INFORME DE RESULTADO DE ENSAYO" LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA-SANTANDER.

18. CONTROL DE CAMBIOS

VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	12/05/2021	Emisión inicial del documento	Alba Rocío Orduz Amézquita Líder Grupo LDSP German Eduardo Marín Cárdenas Director de Salud Integral Diego Sánchez Báez Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad César Ernesto Sánchez Aranda Director de Planeación y Mejoramiento en Salud	Javier Alonso Villamizar Suarez Secretario de Salud de Santander
1	04/08/2022	Actualización de la metodología	Alba Rocío Orduz Amézquita Líder Grupo LDSP German Eduardo Marín Cárdenas Director de Salud Integral Diego Sánchez Báez Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad César Ernesto Sánchez Aranda Director de Planeación y Mejoramiento en Salud	Javier Alonso Villamizar Suarez Secretario de Salud de Santander
2	26/04/2023	<ul style="list-style-type: none"> • Actualización del nombre • Actualización de reconstitución de sondas y primers • Creación de tabla de contenido • Creación de anexos • Eliminación de objetivos específicos 	Alba Rocío Orduz Amézquita Líder Grupo LDSP German Eduardo Marín Cárdenas Director de Salud Integral Diego Sánchez Báez Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad César Ernesto Sánchez Aranda Director de Planeación y Mejoramiento en Salud	Javier Alonso Villamizar Suarez Secretario de Salud de Santander

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Julieth Larrota Velasco Luz Maira Wintaco	Mayte Gisella González	Lenith Granados
1	Yenny Paola Mayorga Ayleen Priscilla Delgado	Mayte Gisella González	Lenith Granados
2	Yury Katherine Quintero	Yury Katherine Quintero	Alejandra Galvis Vargas