

 <p>República de Colombia Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	1 de 23

República de Colombia



Gobernación de Santander

MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL

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

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	2 de 23

ÁREA BIOLOGÍA MOLECULAR

TABLA DE CONTENIDO

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

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	3 de 23

10.3. Controles	12
10.3.1. Reactivos para controles negativos.....	12
10.3.2. Reactivos para la adición de controles positivos	12
11. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	12
11.1. Preparación de la muestra	12
11.1.1. Verificación de datos del paciente de las muestras a procesar.....	12
11.1.2. Muestra de sangre total con EDTA volumen a volumen en clorhidrato de Guanidina 6M.....	13
11.2. Extracción de ADN	13
11.2.1. Método manual: High Pure PCR Template Preparation Kit.....	13
11.3. PCR: amplificación de Trypanosoma cruzi.....	16
11.3.1. Reconstitución de sondas y primers.....	16
11.3.2. Preparación de master mix.....	18
11.4. Montaje PCR	19
12. CONTROL DE CALIDAD ANÁLITICO.....	20
13. ANÁLISIS Y INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	20
14. EMISIÓN Y REPORTE DE RESULTADOS	21
15. DOCUMENTOS DE REFERENCIA	21
16. ANEXOS	22
17. CONTROL DE CAMBIOS	23

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	4 de 23

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana), es una infección provocada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi), la cual es una causa importante de morbilidad y mortalidad en América Latina, generando entre 13.000 y 45.000 muertes de pacientes infectados por año. Si bien la infección se transmite principalmente por vectores hematófagos, otra vía de infección importante es la transmisión congénita de la madre al feto.

El diagnóstico de laboratorio depende del estadio de la enfermedad. Durante la fase aguda, debido a que se presenta en general una alta parasitemia, Los métodos moleculares se están incorporando a la rutina para detección en fase temprana de la enfermedad de Chagas (antes de los 10 meses).

Uno de los métodos moleculares más aceptados para el diagnóstico de rutina en general es la reacción en cadena de la polimerasa y, en particular, la PCR en tiempo real, la cual presenta elevada sensibilidad. El diagnóstico temprano permite tomar decisiones terapéuticas de mayor éxito, ya que se ha demostrado que cuanto más temprano se suministre tratamiento tripanosomicida a un niño infectado, más pronto se logra la seroconversión (actual criterio consenso de curación).

1. OBJETIVO

Establecer la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la identificación de *Tripanozoma cruzi*, a partir de muestras de sangre total.

2. ALCANCE

Este documento se tomará como referencia para realizar PCR en tiempo real para búsqueda de *Tripanozoma cruzi*, a partir de muestras de sangre total con clorhidrato de Guanidina 6M.

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	5 de 23

3. RESPONSABILIDADES

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

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

4. DEFINICIONES

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.

Clorhidrato de guanidina 6M: se usa en el aislamiento de ARN para disociar las nucleoproteínas e inhibir la RNasa. Un potente agente caotrópico útil para la desnaturalización y el posterior replegamiento de proteínas.

Diagnóstico molecular: detección de ADN mediante amplificación y/o cuantificación de blancos de ADN de T.cruzi.

Muestra sanguínea: Prueba que se realiza con una muestra de sangre para medir la cantidad de ciertas sustancias en la sangre o contar tipos diferentes de células sanguíneas.

Primers: son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia del blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia.

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

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	6 de 23

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.

Sangre total: la unidad de sangre total es el producto que resulta de la adición de 63 mL de solución anticoagulante-conservadora a los 450 mL de sangre obtenida de un donante. Su almacenamiento se realiza a 4°C y durante el mismo las plaquetas y los leucocitos dejan de ser funcionantes a los pocos días de la extracción, así como los factores de la coagulación.

Secuenciación del ADN: es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN. La secuencia de ADN constituye la información genética heredable que forman la base de los programas de desarrollo de los seres vivos (de procariontes, de eucariontes en el núcleo celular, y en los plásmidos, en la mitocondria y en cloroplastos de las plantas).

Tripanosomiasis americana: conocida como Enfermedad de Chagas, es una infección humana producida por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido al hombre a través de insectos de la familia Reduviidae. La transmisión vectorial ocurre cuando el insecto pica y defeca dejando sus heces, las cuales contienen tripomastigotes metacíclicos infectivos, contamina una herida o membrana mucosa de ojos, nariz o boca.

5. CONDICIONES GENERALES

- El personal encargado del proceso debe estar entrenado en las técnicas de diagnóstico de Biología Molecular, conocer los factores de riesgo biológicos y las condiciones de bioseguridad, conservación y descarte de material biológico.
- Aplicar normas de Bioseguridad durante el procesamiento de las muestras 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.
- La sensibilidad del ensayo depende del buen manejo de las muestras ya que se deben mantener a temperatura ambiente por un tiempo máximo de una semana.

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

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	7 de 23

- 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 de nitrilo, bata de laboratorio y protección para los ojos al manipular especímenes y reactivos. Lavarse bien las manos después de manipular especímenes y reactivos de prueba.
- Evite la contaminación de reactivos al retirar alícuotas de los tubos de reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta desechables esterilizadas y resistentes a aerosoles.
- No agrupar reactivos de diferentes lotes o tubos en el mismo lote.
- No usar después de su fecha de caducidad.
- No reutilizar artículos desechables.
- 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.

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	8 de 23

- Se deben seguir los procedimientos de seguridad de laboratorio al manipular los especímenes (consulte Bioseguridad del laboratorio Departamental de Salud Pública 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) y alcohol al 90%. Los componentes del producto (residuos del producto, embalaje) pueden considerarse como residuos de laboratorio. Desechar los reactivos y desechos no utilizados según las regulaciones federales, estatales y locales aplicables.
- No utilice los reactivos transcurrida la fecha de caducidad. Se debe evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que puede afectar a su rendimiento y producir resultados erróneos.
- No modifique el Procedimiento del ensayo ni utilice reactivos de otros fabricantes ni de otros lotes, a menos que se indique que el reactivo pueda utilizarse. No reduzca el tiempo de incubación recomendado.
- Antes del uso, deje que los reactivos y las muestras alcancen una temperatura entre 18°C y 30°C. Después del uso, vuelva a almacenarlos bajo las condiciones antes indicadas.
- Para almacenar los reactivos y las muestras utilice refrigeradores exclusivos para su almacenamiento.
- Ningún reactivo o elemento que este derramado, dañado, averiado y vencido deberá ser utilizado. Si ocurre cualquier contacto con la piel, lave con abundante agua.
- No exponga los reactivos a la luz intensa ni a vapores de hipoclorito durante el almacenamiento o la incubación.

6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se realiza mediante el ensayo de PCR en tiempo real con sondas Taqman (marcadas con dos fluorocromos) PCR Taqman Multiplex que permite la detección y cuantificación simultánea de ADN satelital de *T. cruzi* y del inserto de *A. thaliana* en el plásmido IAC (22).

Para realizar el diagnóstico por laboratorio de la enfermedad de Chagas se deben tener presente tres componentes fundamentales: el epidemiológico, el clínico y el componente de laboratorio. El epidemiológico que contribuye a orientar el diagnóstico especialmente en zonas endémicas con transmisión activa, el componente clínico útil ante la sospecha de una fase aguda y el componente de

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

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	9 de 23

laboratorio que define o descarta una infección por parte del parásito *Trypanosoma cruzi* mediante pruebas parasitológicas y/o serológicas, o ambas (3,15).

Todos los trabajos publicados señalan la utilidad de los métodos moleculares en la fase aguda de la enfermedad y en los casos descritos y de los métodos inmunológicos en la fase crónica de la enfermedad.

7. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS

Una de las mayores limitaciones de la técnica de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas es su baja sensibilidad en la fase crónica debido a la escasez de parásitos circulantes, ya que estos están confinados a tejidos (Ávila et al. 1993, Wincker et al. 1997).

Sin embargo, es importante resaltar que en la sensibilidad de la PCR influye también el método de extracción de ADN y el volumen de sangre que se emplea para la extracción de ADN (Schijman et al. 2011, Ferrer et al. 2013).

El costo, la necesidad de equipos e infraestructura especializada (Thekiso et al. 2010) y la necesidad de estandarización y evaluación de las diferentes técnicas de PCR (Ferrer et al. 2009, 2013) también son limitaciones para la implementación de las técnicas moleculares en el diagnóstico de rutina de la enfermedad de Chagas. El líder técnico debe cuidar en cada paso del proceso la manipulación de la muestra (desde la extracción hasta la adición de ADN), para evitar contaminación y obtener resultados falsos positivos.

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

8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

La detección para ensayos moleculares PCR en tiempo real Multiplex para detección de ADN para *Tripanozoma cruzi* se realiza tomando una muestra de sangre total en EDTA, volumen a volumen en clorhidrato de Guanidina 6M.

Inmediatamente después de la toma de sangre con anticoagulante EDTA (5 mL debe agregársele clorhidrato de guanidina 6M y transportar a temperatura ambiente (12 °C con refrigerantes). Toda muestra debe ser etiquetada con los siguientes datos básicos:

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	10 de 23

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

Se debe diligenciar formato con la siguiente información:

- Edad y sexo.
- Diagnóstico presuntivo.
- Tiempo de evolución de la enfermedad.
- Síntomas.
- Etapa de la enfermedad.
- Tratamiento con antibiótico
- Historia clínica
- Tipo de muestra: sangre total con clorhidrato de guanidina 6M
- Conservación de la muestra: Almacene los tubos a temperatura ambiente máximo por una semana.

9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

- Las muestras de sangre total con guanidina 6M se conservan a temperatura ambiente máximo por una semana.
- Los ADN obtenidos se pueden mantener de 4 °C a 8 °C debidamente rotulados cuando están en procesamiento (máximo quince días).
- Para mantener los eluidos de ADN como “back up” por más de 15 días se deben mantener de -20 a -70 °C debidamente rotulados.
(Seguir las indicaciones del manual de administración de muestras del laboratorio).

10. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA

10.1. Equipos y materiales

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

Tabla 1. Equipos usados para la técnica.

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	11 de 23

Materiales	
Pipetas automáticas de 200 µL y 1000 µL ubicadas en la cabina de flujo laminar para extracción de muestras	Alcohol Trozos de gasa Papel aluminio
Pipetas automáticas de 10 µL, 200 µL y 1000 µL ubicada en la estación de PCR para preparación de mezcla	Puntas con filtro estériles para pipeta de 10 µL, 200 µL y 1000 µL.
Pipeta automática de 0 a 10 µL ubicada en la estación de PCR para adición de ADN	Toallas absorbentes Toallas absorbentes cortadas en cuadros
Agitador tipo vórtex- Cabina de flujo laminar para extracción de muestras	Criocajas Gradillas
Agitador tipo vórtex- Estación de PCR para preparación de mezcla	Marcador de vidrio 3 Sharpie
Baño serológico temperado a 56°C±5, 65°C ±5	Recipiente para descartar puntas y líquidos
Microcentrífuga	Cooler Bolsas rojas pequeñas
Termociclador (Se debe realizar la configuración del ensayo (canales, tiempos, ciclos y temperaturas) siguiendo las instrucciones de acuerdo con el software del fabricante)	Placa óptica de 96 pozos o tiras de 8 pozos (tener en consideración la plataforma de PCR)
Tubos de microcentrífuga cónicos estériles de 1,5 ml.	Tapas para placas o tiras para equipos de PCR en tiempo real (tener en consideración la plataforma de PCR)

Tabla 2. Materiales usados para la técnica.

10.2. Reactivos

10.2.1. Reactivos para extracción de ácidos nucleicos

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

10.2.2. Reactivos para PCR en tiempo real

- PerfeCTa Multiplex qPCR ToughMix
- Diluciones de trabajo de los iniciadores: IAC, primer *T. cruzi*
- Alícuotas de sondas
- Agua estéril grado molecular para PCR

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

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

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	12 de 23

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

10.3. Controles

10.3.1. Reactivos para controles negativos

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

- Control de extracción: se coloca agua grado molecular a un tubo o pozo por cada diez muestras procesadas.
- Control de reactivos: se añade agua grado molecular a un tubo o pozo al final de la preparación de la master mix.
- Control de adición: Dejar un tubo o pozo expuesto por cada diez ADN adicionados, después de cada control negativo de extracción.

10.3.2. Reactivos para la adición de controles positivos

el ADN de los controles positivos es extraído de una muestra con resultado positivo conocido.

11. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

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

11.1. Preparación de la muestra

El objetivo de este procedimiento es minimizar el riesgo de contaminación por manipulación excesiva de las muestras, asegurar que la muestra procesada corresponda al paciente y codificar adecuadamente según consecutivo del área. Por tal motivo se debe realizar de la siguiente forma:

11.1.1. Verificación de datos del paciente de las muestras a procesar

Con el fin de confirmar que las muestras estén bien identificadas y codificarlas adecuadamente es necesario registrar los datos del paciente en el formato "REGISTRO DE DATOS DE PACIENTES PARA VERIFICACIÓN DE MUESTRAS A PROCESAR" y con él realizar la verificación con los rótulos de las muestras,

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	13 de 23

registrar si es concordante o no y las debidas observaciones. En caso de discrepancias que no permitan la plena identificación de la muestra, se debe notificar de inmediato a la institución remitente.

11.1.2. Muestra de sangre total con EDTA volumen a volumen en clorhidrato de Guanidina 6M

- Mezclar fuertemente en un vórtex por cinco segundos.
- Con una pipeta de 1000 µL obtener 800 a 1000 µL de la muestra y dispensarla en un criovial de 2 mL.
- Marcar el criovial con la etiqueta de central de muestras y escribir en la etiqueta el consecutivo de acuerdo con la base de datos.
- Guardar a temperatura ambiente (Máximo 1 semana).

11.2. Extracción de ADN

11.2.1. Método manual: High Pure PCR Template Preparation Kit



A. Preparación de Proteinasa K [3]

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

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

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



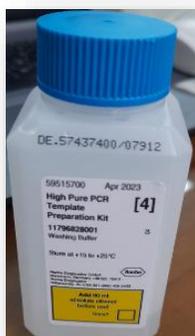
B. Preparación de Buffer de eliminación de inhibidores [4a]

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

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

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	14 de 23



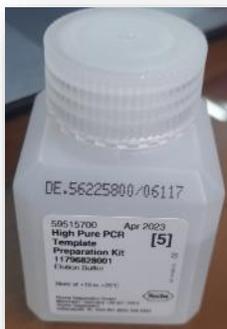
C. Preparación de Buffer de lavado [4]

El kit cuenta con 1 frasco de Buffer de lavado (tapa azul)
 ¿Añadir 80 ml de etanol al frasco de Buffer, una vez reconstituido marque la casilla Done? Que viene en el recuadro amarillo y escriba la fecha.

Procedimiento

Antes de ingresar al área de extracción el analista debe generar la hoja de trabajo en donde se registran los códigos de las muestras a procesar, lo controles de extracción a incluir. Adicionalmente ya en el área debe diligenciar el número de lote del reactivo, fecha de vencimiento y si el procesamiento se hace automatizado, registrar el equipo utilizado y por último la criocaja en donde quedaron archivadas las contramuestras.

Después del registro en la hoja de trabajo se ingresa al área y se siguen las instrucciones listadas a continuación:



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

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	15 de 23



Imagen 1. Thermo-Shaker

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

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

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



Imagen 2. a. Tubos de colección



Imagen 2. b. Tubos con filtro

6. Después centrifugar por 1 min a 8000 rpm

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

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	16 de 23

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

11.3. PCR: amplificación de Trypanosoma cruzi

11.3.1. Reconstitución de sondas y primers

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	17 de 23

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

Custom Service Report			
Service Summary C231 - Primer Synthesis - 250 nmol			
Sample Information			
Oligo Sequence		GC%	
Cruzi 1 (Forward)	ASTCGGCTGATCGTTTCGA	50	
Cruzi 2 (Reverse)	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	47.6	
IAC Fw	ACCGTCATGGAACAGCACGTA	52.4	
IAC Rv	CTCCCGCAACAACCCCTATAAT	43.5	
Deliverables			
Lot Number:	L22506A		
Date of Manufacture:	09/2022		
Storage condition:	-25 °C to -15 °C		
Deliverable Form:	Lyophilized, 250 nmol and 100nmol		
Reconstitution:	Recommend re-suspending the lyophilized oligos using DNase and RNase-free H_2O .		
Purification	Sequence Name	Sequence	Tm °C nmoles
Standard Desalting	Cruzi 1 (Forward)	ASTCGGCTGATCGTTTCGA	56.6 A=167.9 B=153
Standard Desalting	Cruzi 2 (Reverse)	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	56.4 A=153.2 B=167.6
Standard Desalting	IAC Fw	ACCGTCATGGAACAGCACGTA	58.8 109
Standard Desalting	IAC Rv	CTCCCGCAACAACCCCTATAAT	55.3 87.2

Custom Service Report			
Service Summary C135 - Primer Synthesis - 250 nmol (Min Guarantee: 3.0 OD) C137 - Primer Synthesis - 250 nmol (Min Guarantee: 3.0 OD)			
Sample Information			
Oligo Sequence			
Cruzi 3 (Sonda)	FAM-CACACACTGGACACCAA-BHQ1		
ACq (Sonda)	HEX-AGCATCTGTTCTTGAAGGT-BHQ1		
Deliverables			
Lot Number:	L22C21N, L22C21O		
Date of Manufacture:	10/2022		
Storage condition:	-25 °C to -15 °C		
Deliverable Form:	Lyophilized, up to 250nmol. Minimum guaranteed yield is 3.0 OD.		
Reconstitution:	Recommend re-suspending the lyophilized oligos using DNase and RNase-free H_2O .		
Purification	Sequence Name	Sequence	MW g/mol Tm °C nmoles (OD)
HPLC	Cruzi 3(Sonda)	FAM-CACACACTGGACACCAA-BHQ1	6209.3 57.2 57.6 (11.3)
HPLC	ACq (Sonda)	HEX-AGCATCTGTTCTTGAAGGT-BHQ1	7132.5 55.8 102.3 (22.7)

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

Para el primer Cruzi 1 que viene en una concentración 167,9 nmoles se reconstituye así:

$$167,9 \times 10 = 1679 \mu\text{M de agua libre de DNAsas}$$

Se debe agregar 1679 μ m de agua libre de DNAsas

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

Sondas e Iniciadores: Una vez reconstituidos con agua grado biología molecular ó buffer a 100 μ m, es necesario hacer alícuotas de trabajo para mantener la estabilidad de los reactivos. Las alícuotas se realizan de acuerdo a las concentraciones estandarizadas en la PCR y al número de reacciones a utilizar.

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	18 de 23

Para la técnica implementada en el área de biología molecular del LSP, se realizó el cálculo a partir de las soluciones 100X preparadas en el paso anterior. Se preparó una solución 1/10 así:

Se prepararon 50 μL de primers a 10X : se agregó 5 μL del primer y 45 μL de agua grado biología molecular.

Se deben marcar y se dejar dispuestas en criocajas debidamente rotuladas.

11.3.2. Preparación de master mix

1. Se inicia con la limpieza de la cabina de bioseguridad, se limpia con un papel absorbente impregnado con hipoclorito a 5000 ppm, 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
Enzima	10 μL
Gen T.cruzi – Forward 10 uM	1.5 μL
Gen T. cruzi – Reverse 10 uM	1.5 μL
Sonda Cruzi 3 – FAM 10 uM	0.20 μL
IAC– F 10 uM	0.20 μL
IAC – R 10 uM	0.20 μL
IAC – HEX 10 uM	0.20 μL
Agua libre de nucleasas	1.2 μL
Volumen de muestra ADN	5 μL
Volumen final de reacción	20 μL

Tabla 3. 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 .

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

 <p>República de Colombia Departamento de Santander</p>	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	19 de 23

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.

11.4. Montaje 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 frío de la master mix y Sellar los tubos de los strips con tapas ópticas transparentes.

4. Pasar por la exclusiva los tubos ya servidos con la master manteniendo la cadena de frío para el área de adición.

5. Hacer limpieza de la cabina de adición como se indica en el paso 1.

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

7. Se recibe la hoja de trabajo actualizada en el proceso de extracción y se registra el lote y fecha de los reactivos usados.

8. Se añaden 5ul de eludidos de RNA a cada tubo, cuidando cualquier tipo de contaminación y haciéndose de forma rápida siguiendo el orden indicado en la hoja de trabajo.

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

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

PASOS CICLAJE	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Denaturación inicial	95°C	10 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 seg	45
Anillaje/ Extensión	58°C	60 seg	

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

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	20 de 23

Tabla 4: Perfil térmico

12. 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 (ver manual de aseguramiento de la calidad del área).

13. ANÁLISIS Y INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

	Resultado (Ct)	Interpretación	Posible problema	Acción
Control positivo	Dentro del intervalo de +	Control aprobado	Ninguno	Validar la prueba
Control positivo	Fuera del intervalo de +	Control no aprobado	Denaturación /pipeteo	Usar nuevos controles y dos muestras positivas conocidas para verificar el Ct
Control positivo	NA	Control no aprobado	No se agregó el control/ se denaturó/pipeteo	Usar nuevos controles y dos muestras positivas conocidas para verificar el Ct
Control de adición	NA	Negativo	Ninguno	Validar la prueba
Control de extracción	NA	Negativo	Ninguno	Validar la prueba
Control de reactivos	NA	Negativo	Ninguno	Validar la prueba
Control de adición	Entre 1 a 39	Positivo	Contaminación	Repetir el montaje desde PCR de las muestras positivas

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	21 de 23

Control de extracción	Entre 1 a 39	Positivo	Contaminación	Repetir desde la extracción las muestras positivas
Control de reactivos	Entre 1 a 39	Positivo	Contaminación	Realizar nueva mezcla maestra

Tabla 5. Límite inferior de detección de controles positivos para validación de controles

En la interpretación de los resultados se debe tener en cuenta los criterios de validación de los controles positivos y negativos (reactivos, extracción y de reactivos) de acuerdo con la tabla 5 de este documento. Después de validar el montaje se debe registrar los Ct en el formato de datos primarios y hacer la correlación de acuerdo con los criterios expresados en la siguiente interpretación:

#	T.cruzi	IAC	RESULTADO DEL ENSAYO
1	≤39	≤38	Positivo
2	≤39	I.D*	Positivo
3	> 39	≤38	Negativo ó reprocesar de acuerdo a la correlación clínica y análisis de la curva de amplificación
4	I.D	I.D*	Inválido (volver a realizar la prueba)

Tabla 6. Valores e interpretación resultados

ID*: Indeterminado

14. EMISIÓN Y REPORTE DE RESULTADOS

El Laboratorio Departamental de Salud pública emitirá un resultado individual cargado por el analista y verificado por el responsable técnico, combinando los datos del paciente desde la base de datos con el formato MI-GS-RG-476 “INFORME DE RESULTADO DE ENSAYO” LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA-SANTANDER. Ciñéndose a las indicaciones del manual de aseguramiento de la calidad en el área de biología molecular.

15. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

1. Telleria J, Tibayreng M. American Trypanosomiasis Chagas disease. One Hundred Years of Research [Internet]. First Edit. Elsevier. USA; 2010. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24369927>

2. Bern C, Longo DL. Chagas' Disease. N Engl J Med [Internet]. 2015;373(5):456–66. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1410150>

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

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	22 de 23

3. Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Second. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA;

4. Bortolotti S. “Diseño y puesta a punto de un ensayo comercial de PCR para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas” 861119000 / 02 p. 9/20 presentado en el marco del curso internacional de Biología molecular y celular de tripanosomátidos bajo la iniciativa de la Universidad de las Naciones Unidas (UNU) mediante el Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe (BIOLAC), realizado en Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas de Rosario (UNR). 21-25 de noviembre de 2016. - Bortolotti S. “Desarrollo de Método de Diagnóstico Molecular de Infección por Trypanosoma cruzi: Validación para detección neonatal de Chagas congénito”. En el marco de capacitación continua anual a profesionales de la salud de Hospitales y Bancos de Sangre como parte de adjudicación en la Licitación Pública 2011LN-000005-1142 Contrato 581373 de la Caja Costarricense de Seguro Social Costa Rica CCSS. San Jose, Costa Rica. 04 de marzo de 2016.

5. Alarcón de Noya B., Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R., Mauriello L, Zavala-Jaspe R., Suarez JA, Abate T., Naranjo L. Paiva M., Rivas L., Castro J., Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O. 2010. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. J. Infect. Dis. 201(9): 1308-1315.

16. ANEXOS

- Formato: HOJA DE TRABAJO TRYPANOSOMA CRUZI.
- Formato: MI-GS-RG-476 “INFORME DE RESULTADO DE ENSAYO” LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA-SANTANDER.
- Formato: “CONFIRMACIÓN DE DATOS EN EL RÓTULO DE MUESTRAS A PROCESAR”

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

	MANUAL PARA DETECCIÓN DE TRYPANOSOMA POR PCR EN TIEMPO REAL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-63
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	26/04/2023
		PÁGINA	23 de 23

17. CONTROL DE CAMBIOS

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

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