



UNIVERSIDAD
SURCOLOMBIANA

NIT: 891180084-2

ACREDITADA DE
ALTA CALIDAD

Resolución 11233 / 2018 - MEN

Neiva, 22 junio de 2021

PARA:

CESAR ALBERTO POLANÍA

Secretario de Salud del Huila

DE:

CARLOS FERNANDO NARVÁEZ

Jefe División de Inmunología - USCO

REF: Entrega Tercer Informe Técnico Universidad Surcolombiana del proyecto BPIN: 2020000100145.

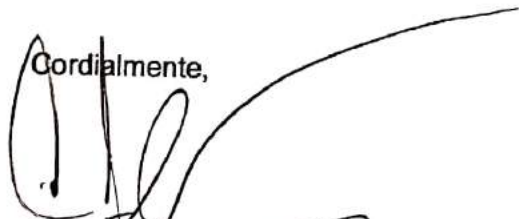
Estimado Dr. Polanía,

Con la presente comunicación, hago entrega del Tercer Informe Técnico realizado por la Universidad Surcolombiana del proyecto colaborativo titulado **"FORTALECIMIENTO DE LAS CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA"**, BPIN 2020000100145, financiado por el SGR. De notar, esta información ya fue enviada electrónicamente. Se hará llegar copia de este documento a la Dra. María Clemencia Rojas del Laboratorio de Salud Pública y a la oficina departamental de regalías. Este informe fue avalado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Surcolombiana (va soporte).

Es altamente recomendable que se unan con los resultados científicos, técnicos y financieros obtenidos por la Secretaría de Salud Departamental del Huila durante este periodo y se haga llegar desde la entidad ejecutora al Ministerio de Ciencia (secretaria_tec_ocad@minciencias.gov.co; contacto@minciencias.gov.co) como ente que ejerce la secretaría técnica de la presente convocatoria. El informe general debe reposar en los registros del Ministerio de Ciencia como un compromiso crítico.

Cualquier soporte o inquietud que pueda ofrecer o resolver, no duden en contactarme.

Cordialmente,


Carlos F. Narváez MD., Ph.D.
Jefe División de Inmunología
Departamento de Pediatría y Básicas
Facultad de Salud
cfnarvaez@usco.edu.co

GOBERNACIÓN DEL HUILA
SECRETARÍA DE SALUD DEPARTAMENTAL
Comunicaciones Oficiales Recibidas

Radicado No. 12591 POR POR
Fecha: Día 23 Mes 06 Año 21
Hora: 2:18
Original: Copia:
Prioridad: Terminó días: _____
Radicado: omo.

Vigilada Mineducación

CONSTRUYAMOS UNIVERSIDAD PARA EL DESARROLLO Y EL BUEN VIVIR

📍 Sede Central / Av. Pastrana Borrero - Cra. 1

☎ PBX: 875 4753

📍 Sede Administrativa / Cra. 5 No. 23 - 40

☎ PBX: 875 3686

🌐 www.usco.edu.co / Neiva - Huila

☎ Línea Gratuita Nacional: 018000 968722





UNIVERSIDAD
SURCOLOMBIANA

NIT: 897180084-2

ACREDITADA DE
ALTA CALIDAD
Resolución 11233 / 2018 - MEN

Neiva, 22 junio de 2021

PARA:

MARÍA CLEMENCIA ROJAS

Coordinadora Laboratorio de Salud Pública

DÉ:

CARLOS FERNANDO NARVÁEZ

Jefe División de Inmunología - USCO

REF: Entrega Tercer Informe Técnico Universidad Surcolombiana del proyecto BPIN: 2020000100145.


Estimada Dra. Rojas,

Con la presente comunicación, hago entrega del Tercer Informe Técnico realizado por la Universidad Surcolombiana del proyecto colaborativo titulado "FORTALECIMIENTO DE LAS CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA", BPIN 2020000100145, financiado por el SGR. De notar, esta información ya fue enviada electrónicamente. Se hará llegar copia de este documento a la Dra. María Clemencia Rojas del Laboratorio de Salud Pública y a la oficina departamental de regalías. Este informe fue avalado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Surcolombiana (va soporte).

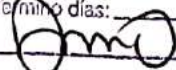
Es altamente recomendable que se unan con los resultados científicos, técnicos y financieros obtenidos por la Secretaría de Salud Departamental del Huila durante este periodo y se haga llegar desde la entidad ejecutora al Ministerio de Ciencia (secretaria_tec_ocad@minciencias.gov.co; contacto@minciencias.gov.co) como ente que ejerce la secretaría técnica de la presente convocatoria. El informe general debe reposar en los registros del Ministerio de Ciencia como un compromiso crítico.

Cualquier soporte o inquietud que pueda ofrecer o resolver, no duden en contactarme.

Cordialmente,


Carlos F. Narváez MD, Ph.D.
Jefe División de Inmunología
Departamento de Pediatría y Básicas
Facultad de Salud
cfnarvaez@usco.edu.co

GOBERNACIÓN DEL HUILA
SECRETARÍA DE SALUD DEPARTAMENTAL
Comunicaciones Oficiales Recibidas

Radicado No. 12590 FOR FOR
Fecha: Día 23 Mes 06 Año 21
Hora: 2:46
Original: Copia:
Prioridad: Término días: _____
Radicado: 

Vigilada Mineducación

CONSTRUYAMOS UNIVERSIDAD PARA EL DESARROLLO Y EL BUEN VIVIR

📍 Sede Central / Av. Pastrana Borrero - Cra. 1

📞 PBX: 875 4753

📍 Sede Administrativa / Cra. 5 No. 23 - 40

📞 PBX: 875 3686

🌐 www.usco.edu.co / Neiva - Huila

📞 Línea Gratuita Nacional: 018000 968722



Escaneado con CamScanner



Carlos Fernando Narvaez Rojas <cfnarvaez@usco.edu.co>

ENTREGA TERCER INFORME TÉCNICO-CIENTÍFICO PROYECTO BPIN2020000100145

1 message

Carlos Fernando Narváez <cfnarvaez@usco.edu.co>

Wed, Jun 23, 2021 at 10:12 AM

To: Maria Clemencia Charry <clemencia_charry@yahoo.es>, MARIA ROJAS GARCIA <clemenciarojasgarcia@gmail.com>, isacu70@hotmail.com, cealpo63@hotmail.com

Cc: secretario.salud@huila.gov.co, vicerrectoria de investigaciones y proyeccion social - usco <viceinvestigaciones@usco.edu.co>

Estimados Señor Secretario, María Clemencia e Isabel,

Con la presente comunicación, hago entrega del Tercer Informe Técnico Trimestral presentado por el Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Universidad Surcolombiana del proyecto "FORTALECIMIENTO DE LAS CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA", BPIN 2020000100145, financiado por el SGR. Este va acompañado de todos los Anexos correspondientes listados a través del texto, como soporte de la información brindada. El informe también se hará llegar a la oficina del SGR Departamental. De notar, este informe ya fue revisado y avalado por la Vicerrectoría de Investigación y Proyección Social de la Universidad Surcolombiana (quien recibe copia de este correo) y reposa en sus archivos.

Este informe también se radicar en físico ante sus despachos.

Es altamente recomendable que se unan con los resultados científicos, técnicos y financieros obtenidos por la Secretaría de Salud Departamental del Huila y se haga llegar desde la entidad ejecutora al Ministerio de Ciencia como ente que ejerce la secretaría técnica de la presente convocatoria (secretaria_tec_ocad@minciencias.gov.co; contacto@minciencias.gov.co). El informe general debe reposar completo en los registros del Ministerio de Ciencia como un compromiso importante de la propuesta.

Cualquier soporte o inquietud que pueda ofrecer o resolver, no duden en contactarme.

Muchas gracias.

Atentamente,

Carlos F. Narváez MD., Ph.D.
Jefe División de Inmunología
Departamento de Pediatría y Básicas
Facultad de Salud
cfnarvaez@usco.edu.co

 **TERCER INFORME TÉCNICO FINAL.pdf**

MEMORANDO No.266

1.2-7-VIPS

Neiva, 17 de junio de 2021

DE: DOLLY ARIAS TORRES
Vicerrectora de Investigación y Proyección Social
Universidad Surcolombiana
Ciudad

PARA: CARLOS FERNANDO NARVAEZ ROJAS
Jefe División de Inmunología
Departamento de Pediatría y Básicas
Facultad Salud
Universidad Surcolombiana

ASUNTO: Visto bueno informe técnico trimestral proyecto Laboratorio.

De manera comedida remito, para los fines pertinentes, visto bueno del tercer informe técnico trimestral correspondiente al Proyecto titulado “FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES INSTALADAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA”.

Cordialmente,



DOLLY ARIAS TORRES
Vicerrectora de Investigación y Proyección Social

TERCER INFORME TÉCNICO TRIMESTRAL PRESENTADO POR LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA DEL PROYECTO FINANCIADO POR EL SISTEMA GENERAL DE REGALÍAS TITULADO “FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA”.

BPIN: 2020000100145

Carlos Fernando Narváz Rojas MD., Ph.D.

Jefe División de Inmunología

Laboratorio de Infección e Inmunidad (I&I Lab)

Facultad de Salud

Universidad Surcolombiana

Mayo de 2021

Neiva – Huila

Colombia

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVO GENERAL	6
2.1. Objetivo específico 1 (OE1)	6
2.2. Objetivo específico 2 (OE2)	6
3. ACTIVIDADES DEL PROYECTO ASOCIADAS CON EL CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS	7
3.1. Gestionar la compra e instalación de equipos	7
3.2. Adquirir insumos de laboratorio	7
3.3. Realizar mantenimiento y calibración de equipos de laboratorio	8
3.4. Adelantar obras de adecuación de espacios	9
3.5. Realizar entrenamiento especializado de talento humano	9
3.6. Detectar SARS-COV-2 por métodos moleculares	10
3.6.1. Validación secundaria de estuche comercial AllPlex™ de Seegene para SARS-COV-2 con especímenes clínicos	11

3.6.2. Aplicación regional de pruebas diagnósticas para COVID-19	14
3.6.2.1. Aplicación de pruebas moleculares a personal médico regional como labor social de la propuesta	17
3.7. Realizar la estandarización y validación local de pruebas moleculares para detectar DENV y ZIKV	17
3.7.1. Extracción automatizada de RNA desde muestras clínicas de plasma/suero de pacientes con infección confirmada por DENV	17
3.7.2. Análisis de la concentración y pureza del RNA aislado Automatizadamente	20
3.7.3. Amplificación serotipo-específica del RNA de muestras clínicas purificado automatizadamente usando el dispositivo KingFisher Flex	22
3.7.4. Cultivo del stock de ZIKV que se usará en la validación de los ensayos moleculares	31
3.7.5. Detección del número absoluto de partículas virales infectantes de ZIKV por ensayo de formación de foco	32
3.7.6. Realización de RT-qPCR para la caracterización del stock viral de ZIKV	35
3.8. Efectuar la estandarización y validación de un inmunoensayo ligado a enzima para detectar anticuerpos IgM e IgG circulantes anti-SARS-CoV-2	38

3.9. Efectuar la estandarización y validación de un inmunoensayo ligado a enzima para detectar anticuerpos IgM e IgG circulantes anti-DENV y anti-ZIKV	41
4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	41
5. CONCLUSIONES REMARCADAS	43
6. REFERENCIAS	44
7. ANEXOS	46

1. INTRODUCCIÓN

La pandemia por SARS-CoV-2 continúa afectando a Colombia con gran fuerza. A la fecha de presentación del actual informe (mayo de 2021), se han reportado 2,934,611 casos de infección confirmada junto con 76,015 casos fatales en el país. El Huila también ha padecido en gran medida los estragos causados por la infección con SARS-CoV-2. Actualmente el Departamento tiene un acumulado de 54,237 casos confirmados con 1,676 casos fatales ([INS. Mayo 5. 2021](#); [Gobernación del Huila. Boletín COVID-19 No. 411](#)).

De forma no del todo esperada, el país se encuentra sufriendo un tercer pico de casos de infección por SARS-CoV-2, que ha resultado ser más letal que los dos anteriores (<https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/Coronavirus.aspx>). Desde diciembre de 2020, en el marco del proyecto colaborativo entre la Gobernación del Huila y la Universidad Surcolombiana titulado “FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA”, BPIN: 2020000100145, la División de Inmunología de la Universidad Surcolombiana ha venido apoyando a la Secretaría de Salud Departamental del Huila (SSDH) en la realización de los ensayos de RT-qPCR para detección de SARS-CoV-2 en población del departamento del Huila. Esto significa la participación activa de la División en el diagnóstico regional de COVID-19, uno de los pilares de la respectiva propuesta de investigación y de la política estatal de lucha contra esta infección viral durante dos de los 3 picos epidémicos que ha soportado a la fecha el país. A fecha de marzo de 2021 el Laboratorio de Infección e Inmunidad (I&I Lab) de la División de Inmunología ha cumplido con el número de ensayos de RT-qPCR propuestos en el proyecto y continúa apoyando a la SSDH en la identificación de casos durante el tercer brote de casos de COVID-19 que se presenta actualmente.

También, se ha avanzado en la validación de métodos moleculares para la detección de Flavivirus de importancia a nivel regional como son el Dengue virus (DENV) y Zika virus (ZIKV). En cuanto a esto, se ha logrado avanzar en la consolidación de los grupos de especímenes biológicos caracterizados necesarios para la validación de dichos métodos, la realización de ensayos de extracción automatizada de RNA desde muestras clínicas y ensayos preliminares de RTqPCR. El principal inconveniente que se ha tenido, es el retraso en la entrega de los reactivos para la realización de las actividades relacionada con estos dos Flavivirus. Sin embargo, como se comentó arriba, se ha logrado avanzar obteniendo resultados preliminares particularmente en la detección de ZIKV como se mostrará en este tercer informe.

La información contenida en el presente reporte proviene de las actividades realizadas por el I&I Lab de la División de Inmunología de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana, como un participante del proyecto en calidad de entidad aliada durante el tercer trimestre (marzo, abril y mayo de 2021).

2. OBJETIVO GENERAL

Mejorar las capacidades en CTel del departamento del Huila para atender problemáticas asociadas con agentes biológicos de alto riesgo para la salud humana.

- 2.1. **Objetivo específico 1 (OE1):** Prestar servicios científicos y tecnológicos para atender problemáticas asociadas con agentes biológicos de alto riesgo para la salud humana en el departamento del Huila.
- 2.2. **Objetivo específico 2 (OE2):** Fortalecer la Infraestructura para el desarrollo de investigación para atender problemáticas asociadas con agentes biológicos de alto riesgo para la salud humana del departamento del Huila.

3. ACTIVIDADES ASOCIADAS AL CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS

Para tener un orden que facilite el entendimiento de los resultados de la propuesta durante el tercer trimestre, se listarán una a una, las actividades y avances tendientes inicialmente el OE2 y posteriormente se listarán las actividades y avances tendientes a lograr el OE1.

ACTIVIDADES ASOCIADAS EL CUMPLIMIENTO DEL OE2

3.1. Gestionar la compra e instalación de equipos

Ya todos los equipos planeados en el proyecto fueron adquiridos según cronograma original y están en plena operatividad cumpliendo con los objetivos del proyecto, fortaleciendo la capacidad investigativa y de apoyo diagnóstico de la red pública departamental. Hay un avance del **100%** en esta actividad. Este avance ya ha sido reportado en informes técnicos anteriores (ver Informe Técnico del segundo trimestre).

3.2. Adquirir insumos para laboratorio

Todos los insumos y reactivos tendientes a detectar SARS-CoV-2 por métodos moleculares fueron adquiridos y con ellos se esta llevando a cabo el apoyo a la Secretaría de Salud Departamental del Huila (SSDH) en la detección de casos de COVID-19 en el Huila, oficialmente desde el mes de diciembre de 2020. Con respecto a los reactivos para análisis de DENV y ZIKV, se han presentado dificultades en su adquisición que han sido informadas a la Universidad por la entidad ejecutora. Esta preocupación ha sido expresada por la Universidad como entidad aliada en las últimas mesas técnicas llevadas a cabo por la coordinación del proyecto. Debido particularmente a este retraso explicado en parte por el cambio en la normatividad y manejo de la plataforma electrónica del Sistema General de Regalías, la mesa

coordinadora evaluó la posibilidad de solicitar una prórroga en tiempo para el proyecto al Ministerio de Ciencia y Tecnología como ente que ejerce la secretaría técnica de la respectiva convocatoria (Se anexa presentación mostrada en la última mesa del comité coordinador de la propuesta, como **Anexo 1**).

Cuando se analiza el monto en el presupuesto del proyecto destinado para la adquisición de insumos y reactivos se puede mencionar que se ha ejecutado un 60% del total del presupuesto destinado a la adquisición de insumos y reactivos, aunque los reactivos destinados a la validación de técnicas moleculares y serológicas para Flavivirus, aún no ha llegado. Sin embargo, teniendo presente la alta responsabilidad de la Universidad en la realización de gran parte de actividades relacionadas con DENV y ZIKV, se ha logrado obtener resultados preliminares, particularmente en la detección molecular de ZIKV, usando reactivos propios, resultados que serán de mucha utilidad cuando se reciban los reactivos para el estudio de estos dos Flavivirus. Estos resultados serán presentados en una sección del presente informe.

3.3. Realizar mantenimiento y calibración de equipos de laboratorio

El mantenimiento de equipos planeados en el proyecto se realizó de forma completa, según cronograma. Todos los equipos están funcionando y en operación cumpliendo las actividades planeadas en la propuesta. Queda por realizar la calibración de los equipos. Esto fue recordado a la entidad ejecutora en la última mesa técnica de la propuesta (**ver Anexo 1**), además el listado de dispositivos para calibración se volvió a reenviar meses atrás (**ver Anexo 2**). Por lo tanto, el avance que se muestra en esta actividad es del 70%. Las particularidades de esta actividad ya fueron reportadas en los informes anteriores.

3.4. Adelantar obras de adecuación de espacios

Las obras de adecuaciones de los dos laboratorios a la fecha de presentación del actual informe no han iniciado. Esto se debe según información suministrada por la entidad ejecutora, a algunos retrasos en la contratación de las adecuaciones debido a cambios operativos y jurídicos que se presentaron particularmente en la plataforma del SGR, el efecto de la pandemia, entre otros. En la última mesa técnica realizada en el mes de mayo-2021 se informó que el contratista ya había sido seleccionado y que ya se había expedido el respectivo certificado de disponibilidad presupuestal. Con esta nueva información la dirección de la División de Inmunología y el I&I Lab esperan contar con el inicio de las obras en junio-2021. También desde la dirección ya se dispuso desde meses atrás toda la logística necesaria para el inicio y avance de las adecuaciones, como lo son liberar los espacios, recoger y ordenar redes eléctricas y de conectividad antigua, entre otras. El espacio que espera el inicio de las obras planeadas seleccionado por la Universidad Surcolombiana desde el inicio de la propuesta, se muestra como **Anexo 3**. Teniendo en cuenta lo mencionado, en esta actividad se muestra un avance del 30%. En la última mesa técnica se dio un mensaje de prioridad máxima a esta actividad.

ACTIVIDADES ASOCIADAS EL CUMPLIMIENTO DEL OE1

3.5. Realizar entrenamiento especializado del talento humano

Las dos profesionales en bacteriología asignadas a I&I Lab vinculadas a la propuesta, recibieron desde el año pasado la capacitación teórico-práctica en diagnóstico de enfermedades virales humanas con énfasis en SARS-CoV-2 (como originalmente planeado). De hecho, desde hace meses atrás las profesionales capacitadas son las

completas responsables de la logística y la parte operativa de la detección y diagnóstico de SARS-CoV-2 a nivel departamental que se brinda desde la Universidad Surcolombiana. Adicionalmente, empezaron a retomar prácticas de Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) para detección de inmunoglobulina G (IgG) humana circulante, inicialmente IgG no antígeno específica (total) y pasarán posteriormente a antígeno-específica una vez se reciban los respectivos insumos (particularmente las proteínas recombinantes de SARS-CoV-2, DENV y ZIKV), proveídos por el proyecto para tal fin. Una presentación de resultados de los ensayos de ELISA para IgG total humana que se realiza semanalmente en el I&I Lab presentado por las profesionales en bacteriología adscritas a la propuesta es mostrada como **Anexo 4**. Como soporte del entrenamiento recibido, los respectivos certificados fueron enviados en el segundo informe técnico trimestral. Se considera por lo tanto que el avance en esta actividad es del 100%.

3.6. Detectar SARS-CoV-2 por métodos moleculares

En el informe técnico anterior (segundo informe trimestral), reportamos que se habían mejorado los sistemas de calidad del I&I Lab, se había obtenido aval por parte de la Secretaría de Salud Departamental del Huila (SSDH) y el Instituto Nacional de Salud (INS) para apoyar el diagnóstico de casos de infección por SARS-CoV-2 en el Huila, actuando como un Laboratorio colaborador de la SSDH. En dicho informe se adjuntaron los registros de los ensayos de verificación de 3 metodologías, una “in house” que corresponde al originalmente llamado protocolo Berlín-Charité ([Corman VM et al. EuroSurveill. 2020](#)), considerado el método más eficiente, sensible y específico para la detección de SARS-CoV-2 y uno de los más usados a nivel mundial, además de la validación interna de 2 ensayos comercialmente disponibles que correspondieron a VIASURE™ (CERTEST, cat: CT-VSNCO212H) y DaanGene™ (Sun Yat-Sen University, cat/lote: 2020058). Todos los informes de verificación fueron enviados y aprobados por la SSDH. Usando los anteriores ensayos a fecha de marzo 9 de 2021 se habían realizado y reportado en el I&I Lab 2,580 ensayos diagnósticos de RT-qPCR realizados

en población del departamento del Huila. Este tema será ampliado en una sección posterior.

3.6.1. Validación secundaria de estuche comercial Allplex™ de Seegene para SARS-COV-2 con especímenes clínicos.

Durante el tercer trimestre de ejecución de la propuesta, se realizó la validación de un cuarto ensayo para la detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR. El ensayo validado fue el ensayo comercial Allplex™ 2019-nCov assay (Seegene, cat: RP10244Y), proveído por la SSDH también por la SSDH (8 estuches comerciales en total, cada uno para 96 test).

Para esto, se probaron 40 especímenes en total previamente caracterizados usando el protocolo Berlín-Charité (20 muestras positivas y 20 muestras negativas), considerado como el estándar de oro ([INS. Pruebas para detección molecular de SARS-CoV-2 por RT-PCR usadas en Colombia. 2020](#)) y siguiendo todas las recomendaciones del INS para la validación secundaria de pruebas moleculares para SARS-CoV-2 ([INS. Protocolo de verificación \(validación secundaria\) para pruebas moleculares de PCR en tiempo real para la detección del SARS-CoV-2](#)), como se ha hecho con los anteriores ensayos validados ya reportados en los dos anteriores informes técnicos. La extracción se realizó usando el dispositivo de extracción automatizada KingFisher™ Flex (ref: 5400610) y la amplificación por RT-qPCR se realizó usando el equipo QuantStudio 5 (ref: A34322. Los dos dispositivos adquiridos desde Thermo Scientific, USA) y siguiendo en las indicaciones del fabricante. La interpretación la realizó en conjunto todo el equipo del I&I Lab. Los resultados finales arrojaron los siguientes resultados mostrados en la Tabla 1:

Tabla 1. Tabla de contingencia de 2x2 que muestra los resultados obtenidos con 40 especímenes de hisopado nasofaríngeo caracterizados por el protocolo Berlín-Charité y el ensayo comercial Allplex™.

		Allplex™ - Seegene I&I Lab			
		Positivo	Negativo	Total	
Berlín-Charité	Positivo	20	0	20	
	Negativo	2	18	20	
I&I Lab		Total	22	18	40

Con los resultados anteriores se calcularon los siguientes valores usando la plataforma digital estadística <http://vassarstats.net/>:

Concordancia: 95%

Sensibilidad: 90.9%

Especificidad: 100%

Valor predictivo positivo: 100%

Valor predictivo negativo: 90%

Validez: 95%

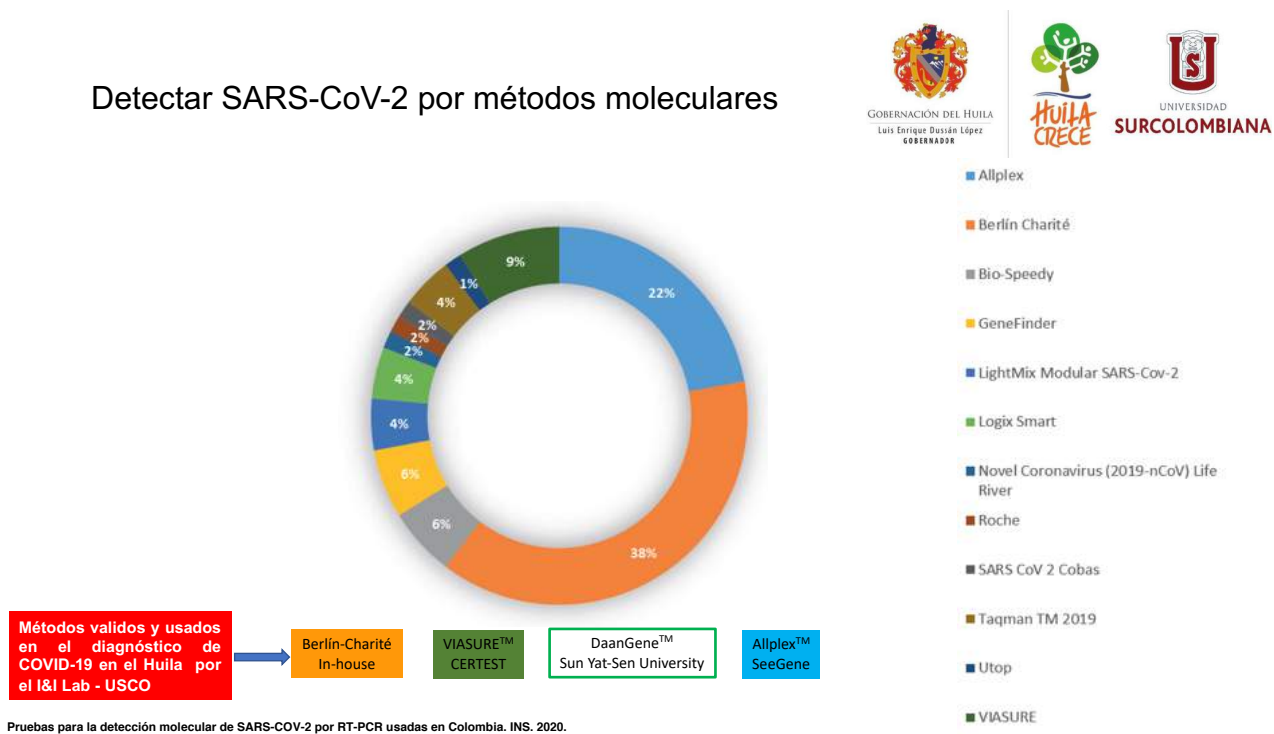
Índice Kappa de Cohen: 0.9 considerado como una muy buena correlación.

La detallada descripción del proceso de validación radicado ante la SSDH junto con su análisis estadístico es mostrada como informe de validación en el formato del sistema de gestión de calidad del I&I Lab en el **Anexo 5**. Estos resultados con el estuche comercial Allplex™ Seegene, están completamente de acuerdo con el informe de verificación del respectivo estuche publicado por el INS ([INS. Informe de Verificación Estuche AllPlex™ 2019-NCOV Assay, Marca Seegene. 2020](#))

Sin embargo, a pesar de haber sido validado, el estuche comercial Allplex™ fue más que escasamente usado por el I&I Lab debido a que 7 de los 8 estuches inicialmente proveídos por los SSDH fueron devueltos, atendiendo la solicitud de la Secretaría de Salud del Huila (SSDH) debido a un retraso en la llegada de reactivos para detección SARS-CoV-2 en el departamento que se presentó en un periodo dentro de este tercer trimestre asociado a las protestas sociales que vive el país.

En resumen, dentro del marco del presente proyecto colaborativo se logró la validación de 4 métodos para la identificación molecular de casos de infección por SARS-CoV-2, 3 de ellos comercialmente disponibles y uno “in house” (**Figura 1**), que fue de hecho el ensayo usado en la mayoría del apoyo diagnóstico que se prestó el I&I Lab a la SSDH durante el periodo del presente informe.

Detectar SARS-CoV-2 por métodos moleculares



Pruebas para la detección molecular de SARS-COV-2 por RT-PCR usadas en Colombia. INS. 2020.

Figura 1. Métodos moleculares para la identificación de SARS-CoV-2 por RT-qPCR validados en el I&I Lab de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana y aprobados por la SSDH. El círculo muestra los métodos moleculares para diagnóstico

Vigilada Mineducación

de COVID-19 más usados en Colombia, cada uno representado por un diferente color, además de la frecuencia relativa con que cada uno de ellos se usa a nivel nacional, según datos del INS. Nótese que los ensayos validados por el I&I Lab están dentro de los ensayos más usados en Colombia y aprobados por el INS. Figura modificada desde: [Pruebas para detección molecular de SARS-CoV-2 por RT-PCR usadas en Colombia. INS. 2020.](#)

3.6.2. Aplicación regional de pruebas diagnósticas para COVID-19.

Todos los ensayos moleculares antes validados fueron usados en el diagnóstico de casos de COVID-19 a nivel regional, en apoyo a la SSDH. Sin embargo, de lejos el más usado fue el protocolo Berlín-Charité. Dentro de esta labor, a fecha 09 de marzo del 2021, el I&I Lab de la Universidad Surcolombiana ha realizado 2,580 ensayos de RT-qPCR para detección de SARS-CoV-2 en población del departamento del Huila y algunos departamentos vecinos ([Laboratorio de Salud Pública del Huila. Boletín Epidemiológico COVID-19. Marzo 09 de 2021](#)), como mostrado en la **Tabla 2**. El Boletín Epidemiológico respectivo completo emitido por la SSDH y la Gobernación del Huila es mostrado como **Anexo 6**.

Tabla 2. Número de muestras analizadas por cada uno de los dos Laboratorios colaboradores.

TABLA 3. Relación de muestras procesadas RT-PCR

	Acumulado	Ultimas 24 Horas
Muestras procesadas en el LSPH	5689	92
Muestras procesadas por el Lab. Infección e Inmunidad U. Surcolombiana - Colaborador	2580	0
Total de muestras procesadas RT-PCR	8269	92

Fuente: Boletín epidemiológico COVID-19. Marzo 09 de 2021. Laboratorio de Salud Pública del Huila. Secretaría de Salud Departamental del Huila. Gobernación del Huila.

Además, para la fecha de cierre del presente tercer informe (mayo 2021), el número de muestras procesadas por los dos Laboratorios aliados en el 2021 es de 11,234. Los resultados anteriores demuestran el cumplimiento de uno de los mayores compromisos de la propuesta conjunta que era el análisis por RT-qPCR para identificación de SARS-CoV-2 de 2,500 muestras por parte del I&I Lab y 7,500 por parte de la SSDH, sólo en el 2021, registradas todas en el sistema nacional de resultados de laboratorio, SISMUESTRAS. Así que reportamos un avance para esta actividad por parte de la Universidad Surcolombiana del **100%**.

Al inicio de la pandemia en el departamento (abril 2020) la capacidad Departamental para el procesamiento de pruebas COVID-19 era de 50 test/día, capacidad que se incrementó a 100 test/día en Junio 2021 (<https://www.huila.gov.co/salud/publicaciones/9581/laboratorio-de-salud-publica-del-huila-duplicara-procesamiento-pruebas-covid-19/>) (Figura 2). En noviembre 2020 con el proyecto en ejecución, el número de ensayos diarios se incrementó a 300 (<https://regioncentralrape.gov.co/huila-noticias-covid-historial/>). El I&I Lab entró en operaciones de apoyo diagnóstico regional de pruebas COVID-19 en diciembre de 2020. A febrero de 2021, la capacidad de análisis diario de muestras COVID-19 de la alianza entre el LSP del Huila y el I&I Lab de la Universidad Surcolombiana es de 600 ensayos diarios reportados ante el Instituto Nacional INS (LPS: 400 y I&I Lab: 200 test/día, **Figura 2**), que corresponde al 60% de la capacidad departamental que es de 1,000 ensayos día, según datos reportados al INS.

Incremento en la capacidad Departamental

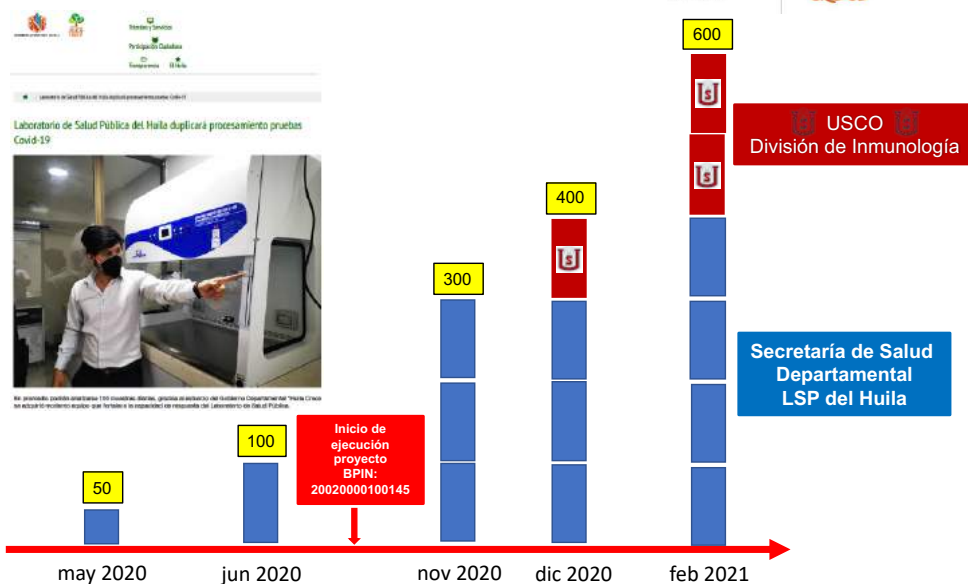


Figura 2. Aumento de la capacidad de procesamiento de muestras para ensayos de RT-qPCR para SARS-CoV-2 en el Departamento del Huila, como producto de la alianza del presente proyecto. Cada caja roja (I&I Lab – USCO) o azul (LSP del Huila) representa un número de 100 test/día.

La **Figura 2** muestra el incremento en el número absoluto en la capacidad para realizar pruebas moleculares para COVID-19 de los miembros de la alianza, a través del tiempo. Como mostrado en el **Figura 2** con la ejecución del proyecto, el departamento del Huila aumentó 6 veces su capacidad de detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR a través de las entidades aliadas en la presente propuesta.

Finalmente, todos estos avances en cuanto al fortalecimiento en infraestructura y tecnología para afrontar la lucha contra el COVID-19 a nivel surcolombiano, fue registrado en una infografía que por petición del INS será posiblemente publicada en la revista Biomédica. Nótese, que información específica del proyecto, como personal,

equipos adquiridos, número de test realizados, aumento de la capacidad departamental, fuentes de financiación y otros, son mostrados en dicho documento (**ver Anexo 7**).

3.6.2.1. Aplicación de pruebas moleculares a personal médico regional como labor social de la propuesta.

Mantener la integridad y asegurar la continuidad en el cumplimiento de las funciones del personal de salud en el Departamento del Huila, particularmente en el Hospital Universitario de Neiva que es la más importante institución de Salud de alta complejidad del Sur colombiano, es una parte crítica de la lucha regional contra la pandemia. Bajo esta idea y como parte de la labor social de la propuesta, en el marco del proyecto se les realizó ensayos de RT-qPCR para detección de SARS-CoV-2 a los 48 Médicos Internos de la promoción 2020-2 de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana quienes iniciarían su periodo de internado rotatorio en el mes de abril de 2021, atendiendo así una urgente necesidad de la institución de vincular nuevo personal con funciones asistenciales. Esta prueba tomada 72h antes del 01 de abril, era un requisito obligatorio exigido por el Hospital Universitario de Neiva para el ingreso al internado. Esta medida benefició particularmente a los Médicos Internos de bajos recursos y a los que vivían fuera de Neiva. Soportes y créditos respectivos que se dieron al proyecto son mostrados como **Anexo 8**.

3.7. Realizar la estandarización y validación local de pruebas moleculares para detectar DENV y ZIKV.

Para la detección inicial de DENV1-4 se tomó como método estándar de oro un ensayo de RT-PCR convencional altamente usado y difundido para el estudio de este virus ([Lanciotti RG et al. J. Clin Microb. 1992](#)). Su funcionamiento y especificidad ha sido extensamente probada y además verificada con ensayos propios mostrados en el informe técnico trimestral anterior. El protocolo de este método que tomamos como

estándar de oro en el presente estudio fue anexado a los procedimientos operativos especiales y codificado en el sistema de gestión de calidad del I&I Lab y de la Universidad (**Anexo 9**). Este protocolo será transferido próximamente al LSP del Huila.

3.7.1. Extracción automatizada de RNA desde muestras clínicas de plasma/suero de pacientes con infección confirmada por DENV.

Para avanzar en la validación de métodos para la identificación de DENV en el Departamento del Huila mientras se espera la entrega de los insumos de biología molecular para la detección de los Flavivirus por RT-qPCR, se iniciaron pruebas que tenían como objetivo analizar la eficiencia del aislamiento automatizado de RNA a partir de muestras de plasma o suero de pacientes agudamente infectados por DENV confirmados. Para esto, se usaron especímenes de plasma/suero obtenidos mediante la colaboración entre el I&I Lab y la SSDH establecida desde tiempo atrás (convenio de cooperación académica USCO-SSDH-dic-2019), y previamente caracterizadas con extracción manual con columnas QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, cat: 52904, Hilden, Alemania), seguido por la RT-PCR convencional descrita anteriormente. Inicialmente, 20 especímenes de plasma/suero (9 negativos y 11 positivos para DENV [DENV-1, n=6; DENV-2, n=5]) fueron analizados usando dos protocolos pregrabados en el equipo de extracción automatizada. Como control, se tomó una mezcla de sobrenadante de cultivo celular de los 4 serotipos de DENV (control positivo), todos ellos producidos en células Vero-76 el I&I Lab, además de sobrenadante de cultivo celular en ausencia del virus (control negativo, Mock) que también fueron analizados iniciando por la extracción automatizada de RNA. **La Tabla 3**, muestra las principales características de los especímenes analizados.

Como mostrado en la **Tabla 3**, no hubo diferencias en género o edad de los especímenes evaluados. Los pacientes sufrían infección por DENV-1 y DENV-2 que han sido dos de los serotipos particularmente responsables de las epidemias emergentes de forma cíclica en el Departamento. Todos fueron incluidos en la fase

aguda de la enfermedad como mostrado por el día de fiebre al momento de la toma de la muestra.

Tabla 3. Especímenes clínicos con previo resultado de RT-PCR para DENV, usados para la evaluación del aislamiento automatizado de RNA.

CARACTERISTICAS				
Código	Género	Edad (años)	Días de fiebre	RT-PCR
SSH 12	Femenino	11	2	DENV-2
SSH 16	Femenino	14	4	DENV-1
SSH 21	Masculino	16	3	DENV-2
SSH 27	Femenino	26	4	DENV-2
SSH 35	Femenino	10		NEG
SSH 38	Femenino	10	2	DENV-2
SSH 42	Masculino	16	3	DENV-2
SSH 44	Femenino	3	2	NEG
SSH 68	Masculino	11	3	DENV-1
SSH 75	Femenino	3	4	NEG
SSH 80	Masculino	78	3	DENV-1
SSH 105	Masculino	7	3	NEG
SSH 107	Masculino	12	3	DENV-1
SSH 112	Masculino	1	2	NEG
SSH 114	Masculino	12	4	DENV-1
SSH 119	Femenino	74	4	NEG
SSH 120	Masculino	7	3	DENV-1
SSH 128	Femenino	5	4	NEG
SSH 130	Masculino	57	1	NEG
SSH 146	Femenino	9	5	DENV-1

Para la extracción automatizada se usó el estuche comercial de extracción MagMax™ Viral/Pathogens (Applied Biosystem, cat: A42352, lote: 2010132), siguiendo las recomendaciones del fabricante ([Appliedbiosystems. For 200 or 400 uL of simple. Abril 30 de 2021](#)) y se usó el dispositivo KingFisher Flex (Thermo Scientific) del I&I Lab adquirido con el proyecto, probando dos protocolos de extracción pregrabados en el dispositivo para un volumen de muestra de 200uL. Los dos protocolos probados fueron el MVP_2Was-200-Flex y el MVP_Flex-200uL. La principal diferencia entre ellos es que en el MVP_2Was-200-Flex se realizan 2 lavados con etanol, mientras que el MVP_Flex-

200uL realiza 3 lavados intermedios con etanol ([Appliedbiosystems. For 200 or 400 uL of simple. Abril 30 de 2021](#)).

3.7.2. Análisis de la concentración y pureza relativa del RNA obtenido automatizadamente.

Tras finalizar la extracción automatizada con los dos protocolos, se quiso determinar inicialmente la integridad del RNA obtenido mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

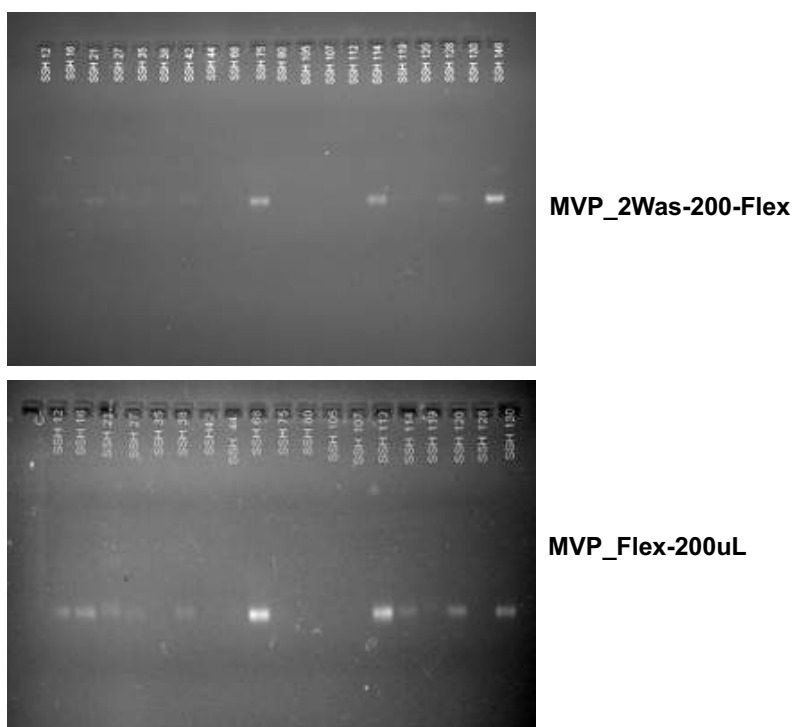


Figura 3. Corrido de electroforesis en gel de agarosa al 2% de las muestras de RNA purificada automatizadamente a partir de plasma/suero en el dispositivo KingFisher Flex usando un protocolo que usa 2 lavados con etanol (MVP_2Was-200-Flex), similar al usado para la purificación de RNA viral de SARS-CoV-2 en hisopados nasofaríngeos (panel superior) o un protocolo que usa 3 lavados con Etanol (MVP_Flex-200uL, fotografía inferior), este último recomendado para extracción desde plasma.

Como mostrado en la **Figura 3**, de los 20 especímenes de plasma previamente caracterizados, bandas de RNA pudieron ser observadas en 10 y 12 especímenes con los protocolos MVP_2Was-200-Flex y MVP_Flex-200 μ L, respectivamente. Adicionalmente, la intensidad de las bandas presentes fue regularmente mayor con el uso del protocolo MVP_Flex-200uL (Figura 3, panel inferior). Un RNA íntegro pudo ser notado en todos los especímenes donde una banda estuvo presente y no se observó fragmentación en escalera o signos de degradación del RNA (**Figura 3**, superior e inferior). Con este ensayo se concluyó que el RNA aislado automatizadamente desde plasma era íntegro.

Posteriormente, la concentración (medida por absorbancia) y pureza relativa (relación λ 260/280nm) de cada RNA total aislado fue evaluada por el uso del NanoDrop™ 2000 (Thermo, cat: ND-2000), disponible en el I&I Lab. Como mostrado en la Figura 4A, las concentraciones de RNA obtenidas con los dos protocolos fueron bajas. La mediana (rango) de la concentración de RNA obtenido por cada protocolo fue de 5.2ng/ μ L (1.8-12.5) para el MVP_2Was-200-Flex y de 7.2ng/ μ L (3-20.6) para el protocolo MVP_Flex-200uL, siendo significativamente mayor para este último (P=0.038, Mann Witney test) (**Figura 4A**).

Cuando la pureza relativa (relación 260/280 nm) fue evaluada, 8/20 y 10/20 muestras, tuvieron una relación igual o mayor a 1.7 (considerado como una pureza aceptable de la muestra de RNA) (<http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>), cuando el protocolo MVP_2Was-200-Flex y MVP_Flex-200uL fueron usados respectivamente, aunque no existió diferencia cuando las medianas de la pureza fueron comparadas (P=0.71, Mann Whitney test, Figura 4B).

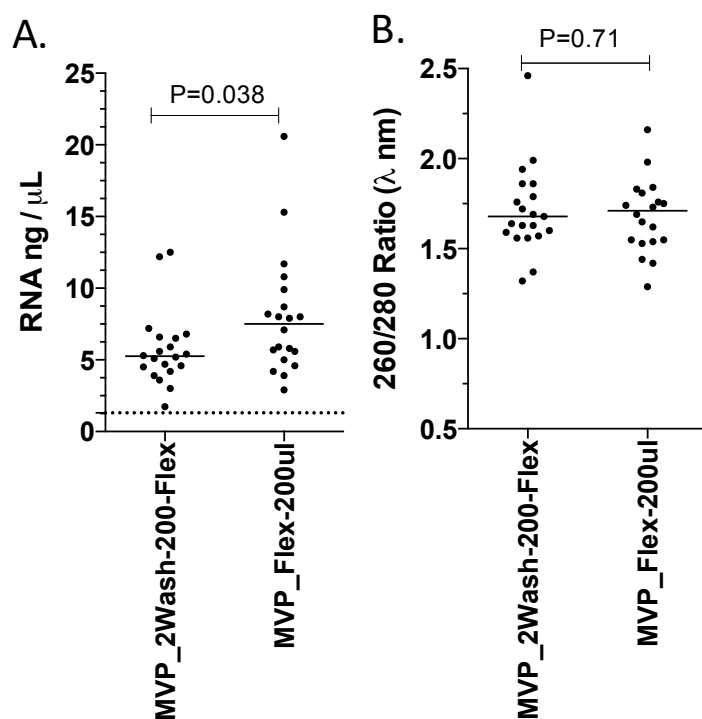


Figura 4. Concentración y pureza relativa del RNA aislado automatizadamente a partir de plasma/suero de pacientes con y sin infección confirmada por DENV (A). Pureza relativa de las muestras analizada por la relación 260/280nm. ng/ μ L: nanogramos/microlitro. 260/280: Relación de la absorbancia máxima obtenida a las longitudes de onda (λ) de 260 y 280nm. El límite de detección del NanoDrop™ 2000= 1.3 ng/ μ L es mostrado como una línea punteada. La P obtenida con el test de Mann Whitney es mostrada para cada caso.

3.7.3. Amplificación DENV serotipo-específica del RNA de muestras clínicas purificado automatizadamente usando el dispositivo KingFisher Flex.

Para corroborar por un tercer método la presencia de RNA total purificado después de la extracción automatizada, se decidió realizar la detección en la expresión del gen RNP (Ribonucleoproteína). La identificación del RNP se utiliza para evaluar la eficiencia de la técnica de extracción y la calidad de muestra a través de la identificación del gen

constitutivo humano RNP. Para lo anterior se utilizan primers y sondas específicas (RP-F AGATTTGGACCTGCGAGCG; RP-R GAGCGGCTGTCTCCACAAGT; Sonda RP-P /HEX/TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG/BHQ1) se prepararon a una concentración de 10 μ M. Luego de la obtención automatizada del RNA desde los especímenes de plasma/suero, se realizó la amplificación con la preparación de una mezcla que contenía 12.5 μ L de buffer de reacción, 4.1 μ L de agua Libre de RNAsa, 0.5 μ L de mezcla de enzimas, 0.4 μ L $MgSO_4$ (todo lo anterior fue proveído dentro del estuche comercial SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR System; Cat N°: 11732-088; Lote: 2223827; Invitrogen Life Technologies. Carlsbad. CA 92008. USA), además de primers forward y revers 1 μ L de cada uno y 0.5 μ L de la sonda específica. De esta mezcla se colocaron 20 μ L en cada pozo de la placa de reacción de PCR de 96 pozos y/o tiras de tubos para PCR de acuerdo con la necesidad del montaje. Posteriormente se adicionaron 5 μ L del RNA purificado obteniendo un volumen final de 25 μ L como establecido en el protocolo. En la placa se incluyeron los siguientes controles: Control Negativo (NTC), control positivo del gen RNP, y Mock (Control Negativo de la extracción). La placa fue amplificada en el termociclador Quant Studio 5 y se realizó la amplificación con el siguiente perfil térmico: 15 min a 50°C, 2 min a 95°C, 15 seg a 94°C y finalmente 30 seg a 58°C, los dos últimos se repiten 45 ciclos.

Como mostrado en la **Figura 5**, presencia de RNA total fue notada en la mayoría de especímenes independientemente del protocolo de extracción utilizado.

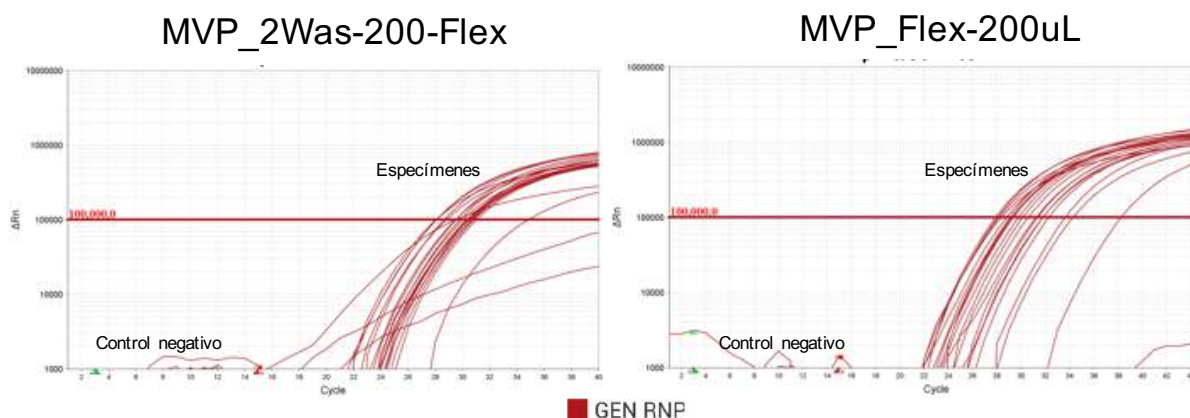


Figura 5. Amplificación por RT-qPCR del gen de la Ribonucleoproteína (RNP) en RNA purificado automatizadamente usando dos protocolos de extracción. El valor de “Threshold” fue previamente establecido en ΔRn 1×10^5 , por la validación previa del protocolo Berlín-Charité, puesto que la amplificación del gen RNP fue usado como marcador de la presencia y calidad del RNA extraído en los experimentos de detección de SARS-CoV-2 en hisopados nasofaríngeos, como puede ser verificado en el informe de validación respectivo presentado como un anexo en el informe técnico del segundo trimestre de ejecución.

A pesar de todos los resultados anteriores, una prueba la funcionalidad del RNA aislado automatizadamente es su utilidad en la detección de DENV a través de la PCR serotipo-específica. Por lo tanto, se decidió realizar la RT-PCR convencional (nuestra prueba estándar de oro) para detección serotipo-específica a partir de RNA aislado automatizadamente. Como mostrado en la Tabla 3, de los 20 especímenes clínicos seleccionados previamente caracterizados, 11 eran positivos para DENV (DENV-1=6 y DENV-2=5) y los restantes 9 eran especímenes negativos.

Después de realizar la RT-PCR de punto final usando el RNA aislado automatizadamente con el protocolo MVP_Flex-200uL, se notó amplificación en 11 de

las 20 muestras analizadas (Figura 6), reportándose 6 infecciones por DENV-1 y 5 por DENV-2 como previamente registrado, por lo tanto, se obtuvo una concordancia perfecta. RT-PCR de punto final para DENV-3 y DENV-4 fue también realizada sin notarse ninguna amplificación (datos no mostrados).

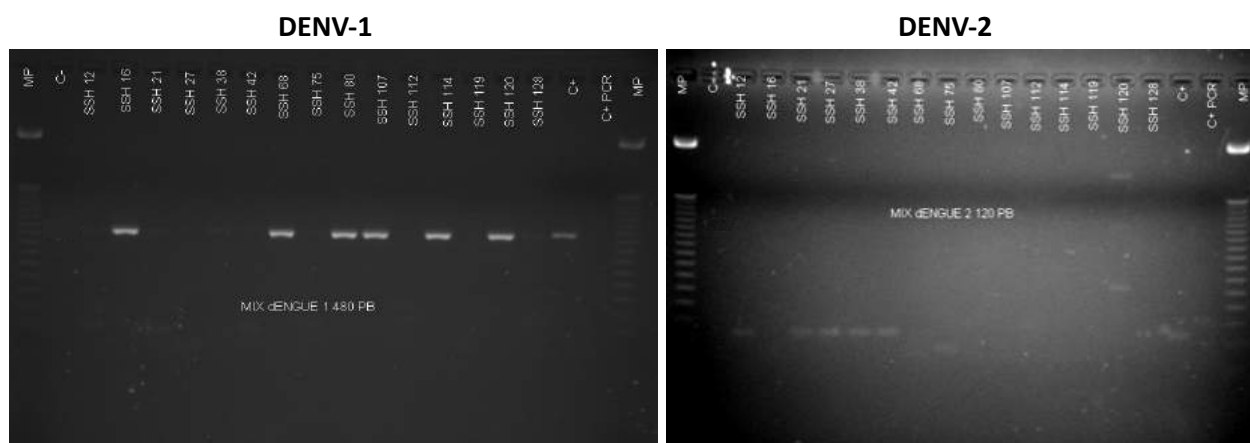


Figura 6. Detección de DENV-1 (panel izquierdo, peso molecular de 482bp) y DENV-2 (panel derecho, peso molecular de 119bp) por RT-PCR de punto final de muestras clínicas de plasma/suero de 11 pacientes con infección por DENV (DENV-1=6 y DENV-2=5) y 9 negativos para infección por DENV. En la figura se muestran 4 muestras negativas, las restantes 5 fueron colocadas en un gel separado no mostrado en la presente imagen. C+: Control positivo que consistió en la mezcla de sobrenadante de células Vero-76 infectadas con cada uno de los 4 serotipos. C-: Mock.

Por otro lado, la RT-PCR de punto final usando los RNA extraídos automatizadamente con el protocolo MVP_2Was-200-Flex, mostró amplificación en 6 de los 11 especímenes positivos (4 DENV-1 y 2 DENV-2, datos no mostrados).

Los anteriores resultados soportan la conclusión que los protocolos preestablecidos en el dispositivo de extracción automatizada KingFisher Flex funcionan en el aislamiento

de RNA a partir de plasma/suero de personas infectadas naturalmente con DENV. La aplicación del aislamiento automatizado en conjunto con la RT-qPCR serotipo-específica para DENV posterior en especímenes clínicos es un avance importante a nivel regional que trae la presente propuesta. Una vez recibidos los reactivos para realizar la RT-qPCR por parte de la Universidad, se empezará a estandarizar y evaluar su eficiencia en especímenes clínicos a los que se les ha extraído el RNA de forma automatizada.

La prueba final de la utilidad del aislamiento automatizado de RNA a partir de muestras clínicas de plasma/suero es que haya amplificación viral adecuada usando la técnica que será usada a lo largo del proyecto que es la RT-qPCR serotipo-específica para DENV. Debido a esto, a los 20 especímenes clínicos previamente caracterizados y cuyo RNA fue aislados automatizadamente usando 2 protocolos de extracción (Figuras 3, 4 y 5), también se les realizó un ensayo de RT-qPCR que evalúa cada uno de los serotipos en pozos separados (no multiplex), disponible en el I&I Lab. Esto se realizó con el objetivo de avanzar en la obtención de los resultados y el cumplimiento de los compromisos por parte de la Universidad. Usando algunos reactivos propios para los experimentos preliminares mostrados a continuación y siguiendo un protocolo transferido a la División de Inmunología a través de una colaboración con I. Bosch del Instituto Tecnológico de Massachusetts, se realizó la amplificación por RT-qPCR serotipo-específica de los RNA de plasma/suero aislados automatizadamente. Para esto, 200 µl de plasma se colocaron en el equipo de extracción automatizada KingFisher Flex y se aplicaron los dos protocolos de extracción mencionados arriba. Cinco µl del RNA aislado se aplicaron en la mezcla de identificación del kit de SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Systems (Cat N°: 11732-088; Lote: 2223827; Invitrogen Life Technologies. Carlsbad. CA 92008. USA), que contenía a su vez buffer de reacción, la mezcla de las enzimas y el sulfato de magnesio. Posteriormente se adicionaron los primers y sondas específicas para DENV-1 o DENV-2. El volumen final de reacción fue de 25 µl. La amplificación se llevó a cabo en el

termociclador Quant Studio 5 con el siguiente perfil térmico: 50°C por 20 minutos, seguido de 95°C por 2 minutos y 40 ciclos de: 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto. Como controles, se usó la mezcla de sobrenadante de células Vero-76 infectadas con cada uno de los serotipos de DENV (control positivo) o sobrenadante de células no infectadas (Mock). Como es mostrado en la **Figura 7**, los controles positivos y los Mock funcionaron dentro de lo esperado. Sin embargo, en los experimentos iniciales que se realizaron con un número de repetición de 45 ciclos en la RT-qPCR, un alto ruido de fondo fue observado en los últimos ciclos del ensayo, particularmente para DENV-2 (**Figura 7**, paneles de la izquierda). Cuando el número de ciclos fue ajustado a 40, el ruido de fondo desapareció. Este ajuste fue realizado desde la segunda ronda de experimentos que tuvo como objetivo amplificar por RT-qPCR DENV a partir del RNA purificado automatizadamente siguiendo el protocolo MVP_2Was-200-Flex (**Figura 7**, paneles de la derecha).

De los 20 especímenes clínicos analizados por RT-qPCR serotipo-específica para DENV usando los dos protocolos de extracción automatizada, la mayoría de los casos con infección confirmada fueron identificados independientemente del protocolo usado, aunque con significativas ventajas del protocolo MVP_2Was-200-Flex sobre el MVP_Flex-200uL, como mostrado en la **Figura 7**.

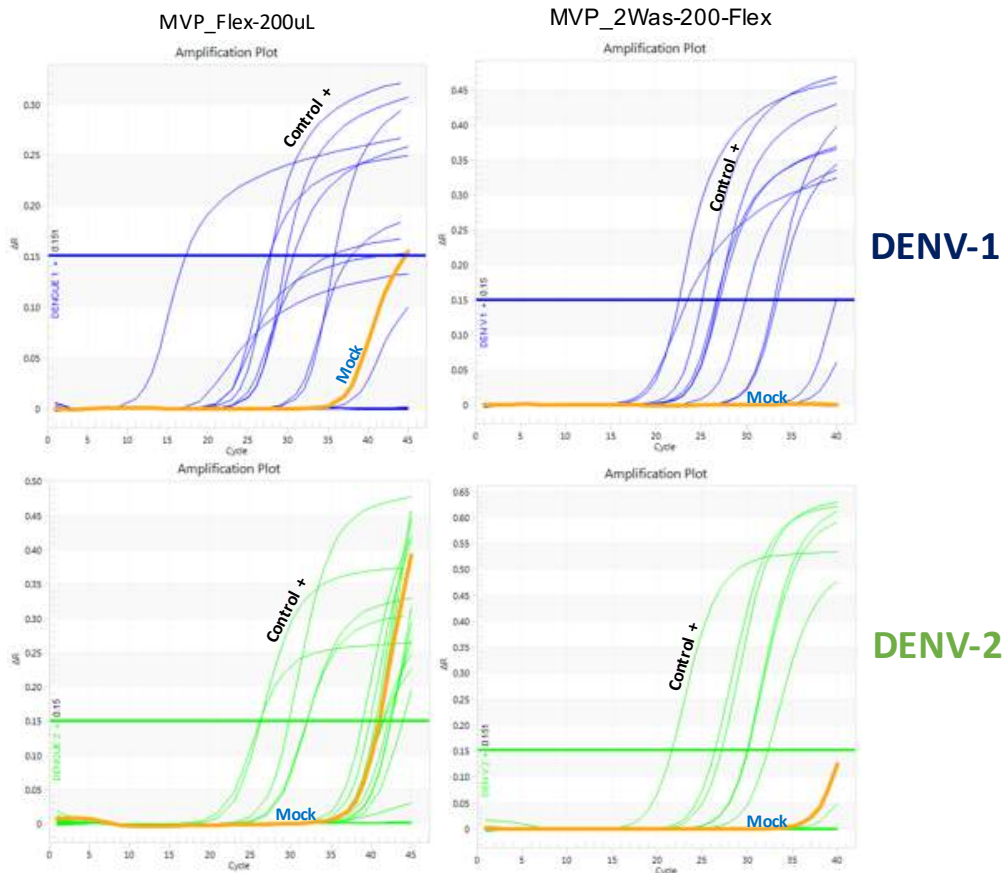


Figura 7. Curvas de amplificación de DENV-1 (paneles superiores, en azul) y DENV-2 (paneles inferiores, en verde), en RNA purificado automatizademente desde plasma de pacientes infectados naturalmente usando el protocolo MVP_Flex-200uL (izquierda) y el MVP_2Was-200-Flex (derecha). Realizado se muestra la curva generada por los respectivos Mock de cada condición. Hay un importante ruido de fondo al final de los ciclos de amplificación de las muestras clínicas aisladas con el protocolo MVP_Flex-200uL, debido a que el número de ciclos que se programaron en los experimentos iniciales fue de 45. Este ruido de fondo disminuyó significativamente cuando el número de ciclos corridos del ensayo se ajustó a 40 (paneles DENV-1 y DENV-2 de la derecha). El valor tomado como positivo correspondió a una muestra con un Ct ≤ 38 .

La **Tabla 4** resume los resultados de los ensayos de RT-qPCR para DENV obtenidos con los dos protocolos de aislamiento automatizado en comparación con el estándar de oro que es la RT-PCR convencional anidada (**Figura 6**).

Tabla 4. Resumen de los resultados de detección en muestras clínicas de DENV-1 y DENV-2 a partir de RNA purificado automatizadamente usando dos protocolos de extracción.

CÓDIGO	EXTRACCIÓN MANUAL QIAGEN	EXTRACCIÓN AUTOMATIZADA KINGFISHER FLEX		RESULTADO
		MVP_Flex-200uL	MVP_2Was-200-Flex	
	RT-PCR	RT-qPCR		
SSH 12	DENV-2	DENV-2	DENV-2	CONCORDANTE
SSH 16	DENV-1	DENV-1	DENV-1	CONCORDANTE
SSH 21	DENV-2	DENV-2	DENV-2	CONCORDANTE
SSH 27	DENV-2	DENV-2	DENV-2	CONCORDANTE
SSH 35	NEG	NEG	NEG	CONCORDANTE
SSH 38	DENV-2	NEG	DENV-2	NO CONCORDANTE
SSH 42	DENV-2	DENV-2	DENV-2	CONCORDANTE
SSH 44	NEG	NEG	NEG	CONCORDANTE
SSH 68	DENV-1	DENV-1	DENV-1	CONCORDANTE
SSH 75	NEG	DENV-1	DENV-1	NO CONCORDANTE
SSH 80	DENV-1	NEG	DENV-1	NO CONCORDANTE
SSH 105	NEG	NEG	NEG	CONCORDANTE
SSH 107	DENV-1	DENV-1	DENV-1	CONCORDANTE
SSH 112	NEG	NEG	NEG	CONCORDANTE
SSH 114	DENV-1	DENV-1	DENV-1	CONCORDANTE
SSH 119	NEG	NEG	NEG	CONCORDANTE
SSH 120	DENV-1	DENV-1	DENV-1	CONCORDANTE
SSH 128	NEG	NEG	NEG	CONCORDANTE
SSH 130	NEG	NEG	NEG	CONCORDANTE
SSH 146	DENV-1	DENV-1	DENV-1	CONCORDANTE
CONTROL +	DENV-1 y DENV-2	DENV-1 y DENV-2	DENV-1 y DENV-2	CONCORDANTE
MOCK	NEG	NEG	NEG	CONCORDANTE

De los 20 especímenes clínicos caracterizados analizados, 17 fueron concordantes entre los 3 métodos (incluyendo la RT-PCR convencional). En 2 casos (SSH 38 y SSH 80), el protocolo de extracción automatizada MVP_2Was-200-Flex, pero no el MVP_Flex-200uL, fue concordante con el resultado mostrado por el RT-PCR convencional. En el restante caso, la RT-qPCR de los dos protocolos de extracción automatizada fueron concordantes entre sí, pero no con el estándar de oro (**Tabla 4**).

Aunque sabemos que número de especímenes clínicos estudiado no es aún el ideal, un análisis de tabla de contingencia de 2x2 muy preliminar de los datos obtenidos mostró para los dos métodos de aislamiento cuando se aplicaba la RT-qPCR para DENV una igual especificidad para la detección del virus (88%), aunque una mayor sensibilidad para el protocolo de detección MVP_2Was-200-Flex sobre el MVP_Flex-200uL (100% Vs 84%, respectivamente) (**Figura 8**).

A.

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	1	11	12
Test Negative	8	2	10
Totals	9	13	22

Calculate Reset

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.590909	0.3668	0.785236
Sensitivity	0.846154	0.536625	0.972893
Specificity	0.888889	0.506703	0.994172
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.545455	0.32674	0.749293
Negative	0.454545	0.250707	0.67326

B.

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	1	13	14
Test Negative	8	0	8
Totals	9	13	22

Calculate Reset

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.590909	0.3668	0.785236
Sensitivity	1	0.716557	1
Specificity	0.888889	0.506703	0.994172
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.636364	0.408252	0.819725
Negative	0.363636	0.180275	0.591748

Figura 8. Análisis de contingencia de 2x2, cálculo de la sensibilidad y especificidad de la detección por RT-qPCR de DENV-1 y DENV-2 comparando los dos protocolos de

aislamiento automatizado. A. MVP_Flex-200uL. B. MVP_2Was-200-Flex. Análisis realizado usando la dirección de análisis estadístico en línea <http://vassarstats.net/>.

En resumen, nuestros resultados preliminares muestran que la extracción automatizada de RNA a partir de plasma/suero de especímenes clínicos de pacientes con infección confirmada por DENV usando los equipos adquiridos con la propuesta es útil para la identificación de DENV por RT-qPCR. Este resultado es significativo teniendo en cuenta que uno de los objetivos investigativos de la propuesta es identificar DENV de manera serotipo-específica en una importante cantidad de pacientes del sur colombiano. Estos resultados serán extendidos cuando se reciban los insumos requeridos.

3.7.4. Cultivo del stock viral de ZIKV que se usará en la validación de ensayos moleculares.

Uno de los elementos más importantes en la estandarización y validación de un ensayo de RT-qPCR, es contar con la cantidad suficiente del agente blanco de la detección, en este caso contar con importantes cantidades de ZIKV. Debido a esto, se inició la producción en cultivo del ZIKV para soportar los experimentos de las dos instituciones aliadas. Para esto, células Vero-76 (ATCC® ref: CRL-1587™) pertenecientes al I&I Lab fueron cultivadas en frascos de cultivo T-75 en DMEM alto en glucosa (Thermo Gigo™, cat: 11965118) suplementado con suero fetal bovino al 5% (Thermo Gibco™, cat: 16000-044), penicilina (100 U/mL), Estreptomicina (100 µg/mL) y L-glutamina (2mM) (los últimos 3 obtenidos desde Thermo Gibco™), siguiendo todas las recomendaciones de la American Type Culture Collection (ATCC, en inglés) (<https://www.atcc.org/products/crl-1587>). Cuando las células tuvieron un 80% de confluencia fueron lavadas e infectadas con ZIKV (linaje asiático, cepa Puerto Rico, amablemente proveída por I. Bosch), MOI: 0.1 durante 1 hora. Posterior a la absorción, las células fueron cultivadas con medio completo, pero con una concentración de suero fetal bovino del 2% (Himmelsbach K and Hildt E. W. *Journal of Virology*. 2018). Como

control negativo (Mock), células Vero-76 fueron tratadas con sobrenadante de células no infectadas tratadas de forma semejante a las células infectadas. Tras 4 días de infección, un significativo efecto citolítico fue observado en las células infectadas, pero no en las células control. Posteriormente, los frascos fueron congelados a -70°C y descongelados en una oportunidad para lisar el remanente cuerpo celular y permitir mayor liberación de partículas virales. Los sobrenadantes fueron colectados en tubos estériles y centrifugados a 10,000rpm por 10min para eliminar los detritos celulares. Finalmente, los sobrenadantes aclarados de células infectadas y no infectadas fueron colectados en eppendorf en un volumen de 0.5mL y mantenidos a -70°C hasta su uso. En la producción de los stock virales desde células infectadas y no infectadas se usaron las incubadoras obtenidas a través del proyecto, demostrando así otro fortalecimiento en las capacidades investigativas regionales específicamente con el avance en las capacidades para realizar cultivo de líneas celulares.

3.7.5. Detección del número de partículas virales infectantes de ZIKV por ensayo de formación de foco.

Para caracterizar los stock virales producidos, se realizó un ensayo de formación de foco para cuantificar el número absoluto de partículas virales infectantes en nuestros sobrenadantes. Brevemente, se cultivaron células Vero-76 en placa de 96 pozos con medio completo (DMEM 5% FBS + 1% Penicilina, Estreptomina y Glutamina 1X, estéril) a 37°C y 5% de CO_2 hasta una confluencia de crecimiento en monocapa de 80%. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 1X estéril e infectadas con ZIKV-PR en diluciones seriadas en base 10. Se cultivaron por 24h a 37°C y 5% de CO_2 . Después se fijaron y permeabilizaron por 30 min con metanol absoluto a mantenido -70°C , a un volumen de $150\mu\text{L}$ por pozo. Se retiró el metanol y se lavó dos veces con PBS 1X $150\mu\text{L}$ /pozo. Se agregó el anticuerpo monoclonal primario Mab 644 (amablemente donado por Irene Bosch, MIT, USA), que reconoce específicamente a la proteína NS1 de ZIKV, a una concentración de $1\mu\text{g}/\text{mL}$ diluido en PBS-BSA 1% filtrado a $0.22\mu\text{m}$, a un volumen de $100\mu\text{L}$ por pozo y se incubó a temperatura ambiente por

1h. Al finalizar el tiempo de incubación, se retiró el anticuerpo primario y se lavó dos veces con PBS 1X 150µL por pozo. Se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra acoplado a biotina (KPL, cat No:5260-0048. Seracare, Milford, MA 01757, USA) diluido 1/2,000 en PBS-BSA 1% 100µL por pozo y se incubó a temperatura ambiente por 1h. Luego se retiró el anticuerpo y lavó en dos oportunidades con PBS 1X 150µL/pozo. Se añadió 100µL por pozo de estreptavidina- peroxidasa (KPL, cat No: 5270-0029, Seracare, Milford, MA 01757, USA) 1/1,000 diluida en PBS-BSA 1%, se incubó a temperatura ambiente. A los 30 minutos se lavó dos veces con PBS 1X 150µL por pozo. El revelado se realizó con el cromógeno 3-amino9-etilcarbazol (AEC kit, ref: SK-4200, Vector Laboratories) preparado según indicaciones del fabricante, agregándose 100 µL/pozo, se detuvo la reacción a los 20 minutos con agua destilada previo retiro y envasado del AEC. Para su interpretación, se realizó el conteo usando microscopio invertido de luz para determinar título viral, que se confirmó por el conteo realizado por dos observadores independientes experimentados, promediándose los resultados. El sistema contaba con control negativo, pozos puestos en contacto con Mock. Cada dilución se realizó por triplicado.

Como mostrado en la **Figura 9**, unidades formadoras de foco (FFU, en inglés) fueron observadas en los sobrenadantes provenientes de células infectadas, pero no en el Mock. El título de la producción viral de ZIKV fue calculado en 1.2×10^6 FFU/mL.

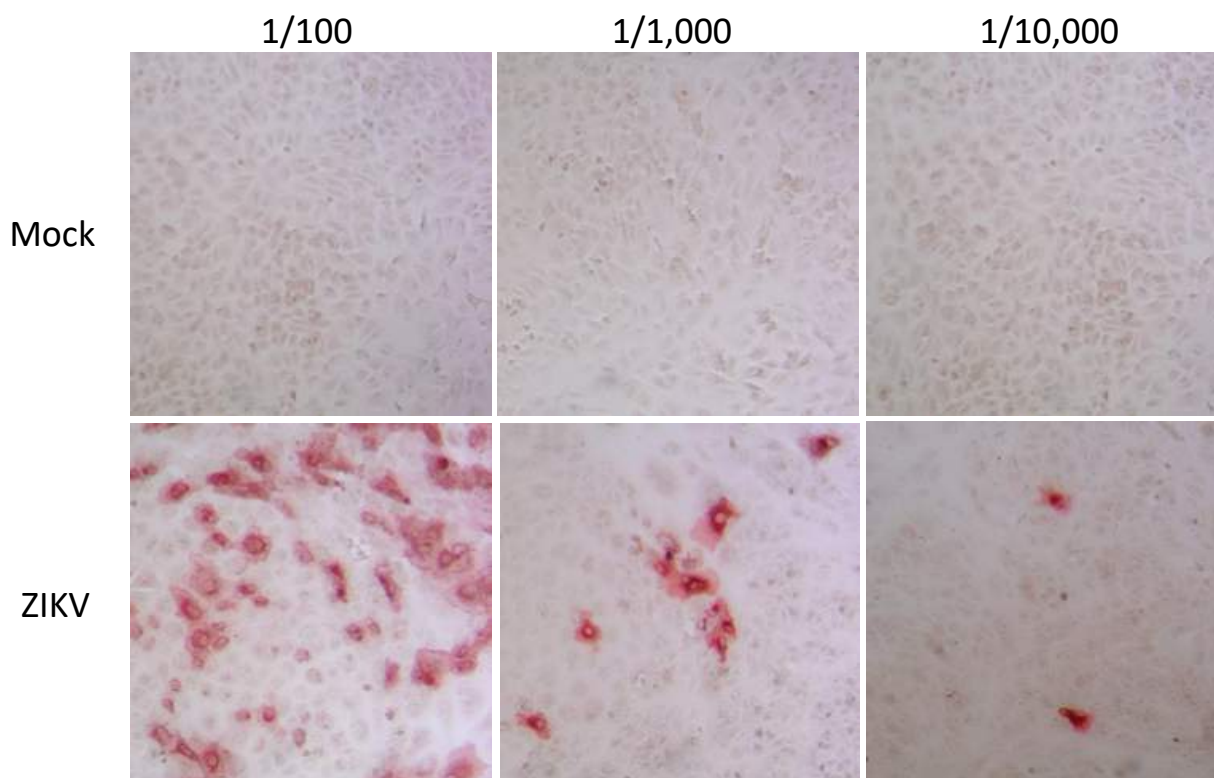


Figura 9. Ensayo de formación de foco (FFU) realizado sobre la producción de ZIKV a usar como control positivo en los ensayos de detección de Flavivirus por métodos moleculares. Mock: Células tratadas con sobrenadante en ausencia de ZIKV. Panel inferior muestra células Vero-76 tratadas con sobrenadante de células infectadas. La detección de NS1 de ZIKV a nivel intracelular, se realizó usando un anticuerpo monoclonal que reconoce a dicha proteína no estructural, previa fijación y permeabilización. Posterior a la aplicación del anticuerpo primario se aplicó un anticuerpo anti-ratón hecho en cabra marcado con biotina. Posteriormente, se aplicó la estreptavidina-peroxidasa para ser finalmente revelado con Aminoetilcarbazol. Microfotografía de microscopía óptica convencional visualizada a un aumento de 10X.

3.7.6. Realización de RT-qPCR para la caracterización del stock viral de ZIKV

Posteriormente, la producción en cultivo de ZIKV fue caracterizada por RT-qPCR. Para esto, usando algunos reactivos propios, se siguió un protocolo ampliamente usado para la detección de ZIKV en especímenes clínicos ([Lanciotti RS et al. 2008. Emerg Infect Dis](#)), como mencionado en el documento técnico original de la propuesta. Brevemente, RNA de diluciones seriadas Log₁₀ de sobrenadante de células Vero-76 infectadas con ZIKV o con Mock fueron extraídos usando columnas de Qiagen (QIAamp Viral RNA minikit, Qiagen, cat:52906), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, 2.5 µL del RNA purificado fue aplicado a 6.25 µL de la mezcla de reacción, 0.25 µL de la mezcla de enzimas y 0.2 µL de sulfato de magnesio, todo lo anterior proveído por el estuche comercial SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR System. Se adicionó, además, sonda (1µl), primer forward y reverse específicos para ZIKV (2µl), siguiendo el reporte original. El volumen final de reacción fue de 12.5 µL. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Eco™ System Illumina con el siguiente perfil térmico: Retro transcripción: 50°C por 15 minutos, seguido de la activación de la Taq: 95°C por 3 minutos y 45 ciclos de: Desnaturalización: 95°C por 15 segundos, hibridación: 56°C por 20 segundos y extensión: 72°C por 15 segundos. Debido a la baja viremia que ha sido reportada en pacientes con infección por ZIKV, en el futuro se considerará como positivo un espécimen con un Ct <40 ([Waggoner JJ et al. Clin Infect Dis. 2016](#)).

Como mostrado en la **Tabla 5** y **Figura 10**, RNA de ZIKV fue específicamente detectado en el sobrenadante de las células infectadas, pero no en el sobrenadante de las células no infectadas. Además, un claro efecto dosis-respuesta fue notado a lo largo de las diluciones usadas.

Tabla 5. Dilución, número absoluto de partículas virales infectantes y Ct encontrados en los ensayos de RTqPCR en el sobrenadante de ZIKV producido en cultivo celular.

Dilución	FFU/mL	C _t promedio
1	12,000	23.4
0.1	1,200	27.2
0.01	120	30.7
0.001	12	34.3
0.0001	1.2	39.6

Como muestra la **Tabla 5**, 5 diluciones seriadas en base 10 fueron realizadas por triplicado. El promedio del Ct obtenido en cada una de ellas, muestra un rango que va de 23.4 en la dilución más concentrada hasta 39.6 en la más diluida, soportando una relación dosis – efecto en el experimento.

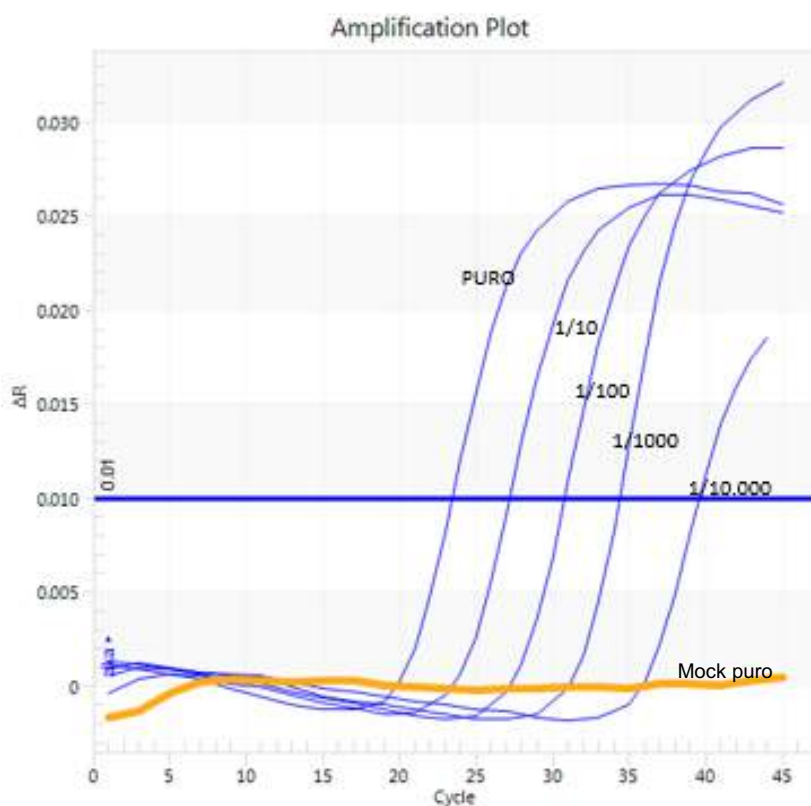


Figura 10. Amplificación de ZIKV en sobrenadante de cultivo celular por RT-qPCR. RNA de sobrenadante de células Vero-76 infectadas con ZIKV o Mock fueron extraídos

usando el QIAamp Viral RNA mini kit. Retrotranscripción y amplificación fue realizada en un paso usando la Superscript™ III Platinum™ one-step qRT-PCR kit (Invitrogen, cat: 11732020) y analizado en un termociclador en tiempo real Eco™ System – Illumina. La dilución respectiva de virus es mostrada en cada curva. Resultado de uno de los triplicados es presentado.

Finalmente, para tener una idea cuantitativa de la capacidad de detección del ensayo para detección de ZIKV en nuestras manos, se creó una curva estándar basado en el Ct que era producido en cada una de las diluciones usadas que su vez tenía un número conocido de partículas virales infectantes de ZIKV a evaluado a través del ensayo de FFA.

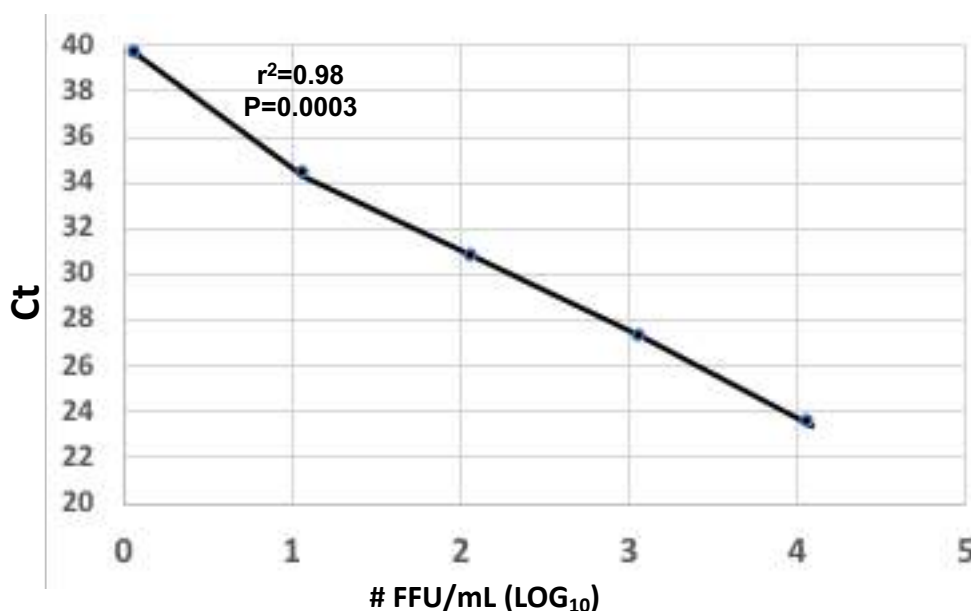


Figura 11. Curva obtenida al graficar el número de unidades formadoras de foco por mililitro (FFU/mL) del ZIKV producido y titulado por el mismo ensayo y el Ct de la RT-qPCR para cada una de las respectivas diluciones del sobrenadante viral. Cada una de las diluciones se realizó por triplicado y el promedio de Ct es mostrado. Un valor es considerado positivo si Ct es <40 ciclos. El valor del coeficiente de determinación es mostrado junto con la P de Pearson (<http://vassarstats.net/>).

Una muy fuerte relación entre el Ct y la cantidad de partículas virales infectantes contenidas en cada dilución del sobrenadante viral fue encontrada (**Figura 11**). En dos experimentos realizado por triplicado, 5 de las 6 diluciones en total que contenían un estimado de 1.2 FFU/mL (mínima dilución evaluada) reportaron un Ct <40, considerándose este valor por lo tanto un indicador relativo del límite de detección del ensayo expresado en términos de FFU/mL.

En resumen, mediante cultivo celular se obtuvo una producción de ZIKV y Mock que fue caracterizada virológicamente. El stock mostró un título viral de 1.2×10^6 FFU/mL, título que esta dentro de lo usualmente reportado para una producción en líneas celulares susceptibles a la infección con ZIKV ([Rosales Ramírez R et al. J. Virol. 2019](#)). Como esperado, en el Mock, no se encontró evidencia de presencia viral cuando el ensayo de FFU o la RT-qPCR fue realizada. Los anteriores datos soportan la calidad del stock de ZIKV producido que será usado por los dos laboratorios para la validación de la detección molecular de este Flavivirus. Próximamente, se hará entrega al Laboratorio de Salud Pública del Huila 20 viales cada uno con 500 μ L de este stock viral.

3.8. Efectuar la estandarización y validación de un inmunoensayo ligado a enzima para detectar anticuerpos IgM e IgG circulantes anti-SARS-CoV-2

Como se ha comentado a lo largo del presente tercer informe, los insumos para la realización de los ELISA para detección de inmunoglobulinas específicas para SARS-CoV-2 circulantes (en especial las proteínas virales recombinantes) no han sido recibidos por la Universidad. Sin embargo, para el logro de este objetivo se ha avanzado en el establecimiento del grupo de pacientes caracterizados con infección por SARS-COV-2 con prueba de Inmunoensayo ligado a fluorescencia (ELFA) comercial IgM (VIDAS SARS-CoV-2 IgM, ref: 423833-01, Biomérieux) e IgG (VIDAS SARS-CoV-2

IgG, ref: 423834-01, Biomérieux) en plasma reportados como positivo, además de antecedente de síntomas respiratorios y/o ensayo de RT-qPCR positivo para SARS-CoV-2 dentro del anterior mes de tomada la muestra de sangre. Una más amplia explicación de los ensayos de ELFA fue realizada en el informe técnico anterior.

Los datos generales de los 98 pacientes confirmados seropositivos (IgM+, IgG+ - SARS-CoV-2) y 112 confirmados seronegativos (IgM-, IgG-) por ELFA, son mostrados en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Características de los pacientes seropositivos y seronegativos para inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2.

Variable	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2	P
	IgM-, IgG- (n=112)	IgM+, IgG+ (n=98)	
Género, F/M.	63/49	54/44	0.15 ^a
Edad, años, media (rango).	45 (7-74)	41 (5-76)	0.28 ^b
IgM RFV*, media (rango).	0.25 (0.14-0.7)	3.2 (1.1-47)	<0.0001 ^b
IgG RFV*, media (rango).	0.04 (0.01-0.7)	16.3 (2.2-43.5)	<0.0001 ^b

*RFV: Relative Fluorescence Value. Corresponde al valor que resulta de restar la fluorescencia emitida por el ruido de fondo, de la señal emitida por cada espécimen evaluado, mostrando la cantidad relativa de la inmunoglobulina respectiva. Un RFV >1 es tomado como positivo para la presencia de la inmunoglobulina analizada.

- a. P evaluada por el test exacto de Fisher.
- b. P evaluada por el test de Mann-Whitney.

No hubo diferencias significativas en el género o la edad entre los pacientes seropositivos y seronegativos para los isotipos IgM e IgG SARS-CoV-2 (**Tabla 6**). Como esperado, hubo una diferencia significativa en la cantidad relativa de IgM e IgG SARS-

CoV-2 circulantes evaluada a través del ELFA (**Tabla 6**), resultado que soporta la apropiada clasificación realizada en los pacientes.

Adicionalmente, para también cumplir este objetivo se logró incluir mediante colaboraciones con el Hospital Universitario de Neiva y el Hospital Departamental de Garzón, un grupo de pacientes hospitalizados con COVID-19 diagnosticados por RT-qPCR con diversos grados de severidad y días de evolución de la infección viral. La **Tabla 7** muestra las características relevantes de estos pacientes hospitalarios que serán incluidos en el presente estudio para evaluar las inmunoglobulinas SARS-CoV-2 específicas circulantes.

Tabla 7. Pacientes hospitalarios con diversos grados de severidad, con diagnóstico de COVID-19 confirmado por pruebas moleculares.

Variable	SARS-CoV-2 RT-qPCR+		P
	≤ 10 días (n=30)	11-30 días (n=15)	
Género, F/M.	12/18	6/9	0.6 ^a
Edad, años, media (rango).	53 (25-85)	54 (19-91)	0.38 ^b
Dímero D, ug/mL, Media (rango)	893 (269-8272)	481 (22-4526)	0.18 ^b
Ferritina, ug/L, Media (rango).	1,096 (242-4,445)	1,515 (82-5,631)	0.45 ^b
LDH, UI/L, Media (rango)	413 (198-2,103)	381 (154-920)	0.93 ^b

a. P evaluada por el test exacto de Fisher.

b. P evaluada por el test de Mann-Whitney

Como mostrado en la Tabla 7, se han incluido en total 45 pacientes hospitalarios con infección confirmadas por SARS-CoV-2. Cuando los pacientes fueron separados según el día de enfermedad al momento de toma de la muestra, no existió diferencia en marcadores de severidad como el Dímero D, la Ferritina o la Deshidrogenasa Láctica

entre los pacientes con ≤ 10 días en comparación con los pacientes con un rango de días de enfermedad de 11-30 ($P \geq 0.18$, Mann-Whitney test, **Tabla 7**). Este resultado se debe probablemente a que pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos no fueron incluidos.

3.9. Efectuar la estandarización y validación de un inmunoensayo ligado a enzima para detectar anticuerpos IgG e IgM circulantes anti-DENV y anti-ZIKV.

Como se comentó anteriormente, debido al retraso en la llegada de los insumos para los ensayos de ELISA para detección de inmunoglobulinas DENV y ZIKV específicas, esta actividad ha sufrido también retraso. Este hecho fue tratado en la mesa técnica del mes de mayo 2021. La entidad ejecutora quedó de revisar el tema y agilizar su adquisición. A pesar de esto, la División de Inmunología de la Universidad ha creado un plan de consolidación de destrezas para la realización del inmunoensayo ligado a enzima para detectar inmunoglobulinas isotipo-específico. Por lo tanto, el personal formado vinculado al proyecto, ha mantenido destrezas en la realización de este tipo de experimentos. Prueba de ello es la realización periódica de ELISA para detección de IgG total humana (un ensayo comparable al que es propuesto para la detección de inmunoglobulina virus-específicas descrito en el documento técnico del proyecto). Como soporte de esto, se adjunta reunión de resultados semanal presentado por las profesionales en bacteriología adscritas a la propuesta, donde se muestra que parte de sus actividades correspondieron a la detección de IgG humana por ELISA (**ver Anexo 4**). Adicional a esto, ya se cuenta con las muestras previamente caracterizadas que serán usadas en la validación de los ensayos (ver informe técnico trimestral #2).

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS OBTENIDOS

El tercer trimestre de ejecución de la propuesta mostró avances importantes en varias de las actividades planeadas. Una meta claramente lograda durante este periodo, fue el

de alcanzar e incluso sobrepasar el número de pruebas de RT-qPCR para COVID-19 originalmente propuesto en el proyecto. Se contempló la realización por parte de la Universidad de 2,500 ensayos de RT-qPCR para SARS-CoV-2 en población del departamento y a fecha de marzo de 2021 ya se había reportado 2,580 ensayos (**ver Anexo 6**), a través del sistema nacional de reporte de resultados de laboratorio (SISMUESTRAS) y se continúa con esta actividad de soporte diagnóstico al Laboratorio de Salud Pública del Huila. Durante el presente informe se demostró la capacidad del I&I Lab de aislar automatizadamente RNA de DENV a partir de plasma/suero, usando los dispositivos adquiridos con la propuesta. Este avance es fundamental puesto que el aislamiento automatizado sólo se había realizado en el marco de la prestación del apoyo diagnóstico para COVID-19 en el Departamento y por lo tanto, realizado sólo a especímenes de hisopado naso u orofaríngeo mantenidos en medio comercial de transporte viral. El aislamiento automatizado de RNA de DENV y en general de Flavivirus desde plasma/suero de muestras clínicas soporta el incremento en la capacidad técnica y tecnológica para el análisis de altos volúmenes de pacientes sospechosos de la infección viral adquirida por el departamento del Huila a través de la propuesta y esto facilita enormemente el cumplimiento de una de las actividades de la propuesta que es la caracterización serotipo-específica de muestras clínicas de la región surcolombiana obtenidas durante los últimos años dentro del patrón de emergencia y re-emergencia del dengue en el departamento. Además, como soportado por los datos presentados en el actual tercer informe, la Universidad con el objetivo de no favorecer el retraso de las actividades bajo su responsabilidad y usando algunos insumos propios ha logrado avanzar en la detección de ZIKV por RT-qPCR, presentando resultados iniciales de la detección del respectivo Flavivirus usando el ensayo de RT-qPCR propuesto en el documento técnico original del proyecto.

Por parte de la Universidad esta todo listo para desarrollar la parte de ensayos serológicos (capacidad técnica, equipos, protocolos, personal formado, especímenes caracterizados) y se esta a la espera de recibir los insumos desde la entidad ejecutora

para tal fin. Teniendo en cuenta este último punto, se consideró desde la mesa técnica de la propuesta solicitar una ampliación en tiempo del proyecto.

5. CONCLUSIONES REMARCADAS

Durante la ejecución del proyecto en su tercer trimestre, se apoyó a la SSDH en el diagnóstico de SARS-CoV-2 a nivel regional. De hecho, a la fecha de entrega del presente informe (mayo 2021), el I&I Lab ha superado el número de ensayos de RT-qPCR para SARS-CoV-2 que se había originalmente comprometida a realizar durante el proyecto y continúa participando activamente en el diagnóstico regional de COVID-19 durante este tercer pico de contagios que afecta a todo el país.

Con respecto a los ensayos moleculares para Flavivirus, la Universidad no ha recibido aún los reactivos necesarios para avanzar en este punto. Sin embargo, se ha logrado avanzar, sobre todo en la detección de ZIKV por RT-qPCR usando algunos pocos reactivos propios obteniendo resultados preliminares como se muestra en el presente informe y mientras se espera la entrega de los reactivos para DENV y ZIKV por parte de la entidad ejecutora.

Debido a que la estandarización y validación de estos métodos moleculares y serológicos ha tenido importante retraso con respecto al cronograma originalmente propuesto, en el último comité técnico del proyecto se aprobó por unanimidad solicitar una prórroga en tiempo para la presente propuesta.

6. REFERENCIAS

Instituto Nacional de Salud. COVID-19 en Colombia. Mayo 5 de 2021.

<https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/Coronavirus.aspx>

Gobernación del Huila. Boletín COVID-19 en el Huila No. 411. 2021.

<https://twitter.com/HuilaGob/status/1390149137291689987/photo/1>

Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DG, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MP, Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3):2000045.

Instituto Nacional de Salud. Pruebas para detección molecular de SARS-CoV-2 por RT-PCR usadas en Colombia. 2020

Instituto Nacional de Salud. Protocolo de verificación (validación secundaria) para pruebas moleculares de PCR en tiempo real para la detección del SARS-CoV-2. 2020

Laboratorio de Salud Pública del Huila. Secretaría de Salud Departamental del Huila. Gobernación del Huila. Boletín Epidemiológico COVID-19. Marzo 09 de 2021.
<http://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/Informe%20verificacion-allplex-seegen.pdf>

Instituto Nacional de Salud, Grupo de Virología - DRPS. Informe de Verificación Estuche AllIPlex™ 2019-NCOV Assay Marca Seegene. 2020.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992 Mar;30(3):545-51.

Appliedbiosystems. For 200 or 400 uL of sample. For use with MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit or MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit. April 30 of 2021. Publication number: MAN0019332.

Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). www.bancoadn.org. Octubre de 2020.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis. 2008 Aug;14(8):1232-9.

Himmelsbach K and Hildt E. Identification of various cell culture models for the study of Zika virus. World Journal of Virology. 2018. February 12; 7(1):10-20.

Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, Sahoo MK, Nuñez A, Balmaseda A, Harris E, Pinsky BA. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. Clin Infect Dis. 2016 Dec 15;63(12):1584-1590

Rosales Ramirez R, Ludert JE. The Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Is Secreted from Mosquito Cells in Association with the Intracellular Cholesterol Transporter Chaperone Caveolin Complex. J Virol. 2019 Feb 5;93(4):e01985-18.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Presentación realizada en la mesa técnica de mayo 2021. Asuntos tratados: extensión de tiempo del proyecto, curso de principio de biología molecular para secretarías municipales, estrategias agilización de adquisición de reactivos, adecuaciones y varios.



GOBERNACIÓN DEL HUILA
Luis Enrique Dussán López
GOBERNADOR



HUILA
CRECE



UNIVERSIDAD
SURCOLOMBIANA

FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES INSTALADAS DE
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y
LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER
PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS
DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL
DEPARTAMENTO DEL HUILA

[BPIN 2020000100145](#)

Carlos F. Narváez MD., Ph.D.
Jefe División de Inmunología
Universidad Surcolombiana
Neiva – Mayo del 2021

Productos pendientes

1. Instalaciones adecuadas para investigación (**2**).
2. Pruebas moleculares para DENV y ZIKV validadas. (SONDAS-PRIMERS-**ENZIMAS**)
3. IgM e IgG para DENV, ZIKV y SARS-CoV-2 “in-house” validadas. (**PROTEÍNAS RECOMBINANTES**)
4. Un artículo científico conjunto (**en preparación**).
5. Curso Departamental de Biología molecular para virus emergentes y reemergentes (**Julio**).
6. Calibración de equipos (**Pendiente**).
7. Mecanismo de entrega de los equipos (**Donación? Convenio?**)

Tabla 8. Casos notificados de dengue por entidad territorial de procedencia y clasificación en Colombia, semanas epidemiológicas 01 a 16 de 2021

Entidad territorial	Dengue		Dengue grave		Total	
	n	%	n	%	n	%
Cali	2327	21,5	27	16,3	2354	21,4
Valle del Cauca	955	8,8	8	4,8	963	8,8
Cartagena	644	5,9	16	9,6	660	6,0
Putumayo	596	5,5	3	1,8	599	5,4
Tolima	511	4,7	1	0,6	512	4,7
Huila	496	4,6	10	6,0	506	4,6
Norte de Santander	406	3,7	10	6,0	416	3,8
Antioquia	402	3,7	5	3,0	407	3,7
Meta	396	3,7	2	1,2	398	3,6
Cundinamarca	381	3,5	1	0,6	382	3,5
Barranquilla	354	3,3	8	4,8	362	3,3
Cesar	343	3,2	17	10,2	360	3,3
Santander	285	2,6	4	2,4	289	2,6
Atlántico	266	2,5	6	3,6	272	2,5
Bolívar	254	2,3	7	4,2	261	2,4
Magdalena	200	1,8	9	5,4	209	1,9
Sucre	194	1,8	4	2,4	198	1,8
Córdoba	191	1,8	2	1,2	193	1,8
Caquetá	181	1,7	3	1,8	184	1,7
Cauca	173	1,6	1	0,6	174	1,6
Casanare	152	1,4	0	0,0	152	1,4
Nariño	146	1,3	5	3,0	151	1,4
Santa Marta	143	1,3	5	3,0	148	1,3
Chocó	142	1,3	1	0,6	143	1,3
Boyacá	120	1,1	0	0,0	120	1,1
Amazonas	96	0,9	0	0,0	96	0,9
Buenaventura	87	0,8	1	0,6	88	0,8
Quindío	68	0,6	2	1,2	70	0,6
Caldas	67	0,6	0	0,0	67	0,6
Arauca	67	0,6	0	0,0	67	0,6
Risaralda	62	0,6	1	0,6	63	0,6
La Guajira	33	0,3	4	2,4	37	0,3
Archipiélago de San Andrés	29	0,3	0	0,0	29	0,3
Exterior	26	0,2	2	1,2	28	0,3
Guaviare	17	0,2	0	0,0	17	0,2
Vichada	11	0,1	0	0,0	11	0,1
Guainía	7	0,1	1	0,6	8	0,1
Vaupés	1	0,0	0	0	1	0,0
Total	10 829	100	166	100	10 995	100

Productos pendientes

1. Instalaciones adecuadas para investigación (**2**).
2. Pruebas moleculares para DENV y ZIKV validadas. (SONDAS-PRIMERS-**ENZIMAS**)
3. IgM e IgG para DENV, ZIKV y SARS-CoV-2 “in-house” validadas. (**PROTEÍNAS RECOMBINANTES**)
4. Un artículo científico conjunto (**en preparación**).
5. Curso Departamental de Biología molecular para virus emergentes y reemergentes (**Julio**).
6. Calibración de equipos (**Pendiente**).
7. Mecanismo de entrega de los equipos (**Donación? Convenio?**)

FACTORES ASOCIADOS A LA SEVERIDAD POR LA INFECCIÓN DEL VIRUS DENGUE EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA

Luis F. Oliveros^{1*}, María Clemencia Rojas², Camilo Eduardo Rivera³ Carlos F. Narváez⁴.

1. Candidato a Magister en Epidemiología, Facultad de salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia
2. Profesional de apoyo, Grupo de ETV, Secretaría de salud departamental, Neiva, Huila, Colombia
3. Coordinador del Laboratorio de Salud Pública, Secretaría de salud departamental, Neiva, Huila, Colombia
4. Programa de Medicina, Facultad de salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia

Introducción

Durante el año 2019 el principal problema de salud pública en Colombia ha sido la enfermedad causada por el virus Dengue (DENV) y el Huila no ha sido ajeno a ello, dado que es la región que más casos de Dengue grave aporta al país, con cerca del 25% de ellos. Este hecho nos coloca por lo tanto, en un mayor riesgo de mortalidad con respecto a otras zonas del país. El objetivo de esta propuesta fue determinar los factores asociados a la severidad por la infección del DENV en el departamento del Huila.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo de tipo corte transversal analítico, cuya población esta constituida por los pacientes notificados en el primer semestre de 2019 al Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SIVIGILA) con los eventos de códigos 210 y 220 correspondientes a Dengue y Dengue grave, con procedencia del departamento del Huila y que fueron confirmados por laboratorio mediante pruebas de Igm por ELISA, NS1, Aislamiento viral y/o PCR, según protocolo de vigilancia epidemiológica del INS. Las variables estudiadas fueron Edad, Sexo, Población Especial, Área de residencia, Sistema de seguridad social, Estrato, Signos o síntomas, Serotipo y Dengue Grave. El análisis estadístico se realizó con medidas de tendencia central, de dispersión, frecuencias y proporciones. Luego para las variables categóricas se utilizó la prueba exacta de Fisher si no cumplían con los supuestos de Chi2 y para las variables continuas se utilizó la prueba de Mann Whitney dado que tampoco se cumplieron los supuestos para utilizar T de Student. Posteriormente se hizo una regresión logística no condicionada, la cual construyó su modelo utilizando la aproximación backward.

Resultados

Durante el primer semestre de 2019 se notificaron en el departamento del Huila 5,657 casos, aplicando los criterios de inclusión y exclusión, la población final a estudio fue de 3,574 casos, conformado por 3,432 casos de Dengue y 142 casos de Dengue grave.

Tabla No. 1. Descripción de características sociodemográficas y clínicas de Dengue y Dengue Grave

Variable	Dengue (n = 3,432)	Dengue grave (n = 142)	Valor de p
Edad			0.000**
Media	13	8.1	
Rango	1-80	1-59	
Sexo			0.492**
Femenino	1,772 (51.6)	78 (54.9)	
Masculino	1,660 (48.3)	64 (45.1)	
Área de residencia			0.491**
Rural	309 (9.0)	18 (12.7)	
Urbana	3,083 (89.2)	124 (87.3)	
Seguridad social			0.245**
Contributivo	1,513 (44.1)	61 (42.9)	
Subsidio	1,981 (57.3)	73 (51.4)	
No asegurado	138 (4.0)	8 (5.6)	
Población especial			0.000**
SI	28 (0.8)	2 (1.4)	
No	5,365 (154.2)	140 (98.5)	
Signos de alarma			0.000**
Dolor Abdominal	809 (23.6)	112 (79.0)	
Vómito	870 (25.3)	89 (62.6)	
Caida de Plaquetas <100,000	810 (23.6)	71 (50.0)**	
Diarrea	531 (15.5)	64 (45.1)**	
Sorromección o irritabilidad	185 (5.3)	36 (25.3)**	
Hemorragias importantes en mucosas	183 (5.3)	18 (12.6)**	
Hepatomegalia	135 (3.9)	61 (42.9)**	
Aumento del hematocrito	62 (1.8)	22 (15.5)**	
Hipotermia	79 (2.3)	32 (22.5)**	
Acumulación de líquidos	26 (0.7)	28 (19.7)**	
Hipotermia	12 (0.3)	3 (2.1)**	
Signos de gravedad			0.000**
Edificación severa de plasma	0	6 (4.2)	
Hemorragia con compromiso hemodinámico	0	6 (4.2)	
Shock por Dengue	0	1 (0.7)	
Dañó grave de órganos	0	2 (1.4)	
Serotipo			0.000**
DENV 1	8 (0.2)	0	
DENV 2	8 (0.2)	1 (0.7)	

* Prueba estadística de Mann Whitney
** Prueba estadística de Fisher
Fuente: Orjuela y Ill Lab. Facultad de salud, Universidad Surcolombiana

Conclusiones

Basados en los hallazgos de este estudio, la edad menor a 5 años, la edad entre los 5 y 15 años, el dolor abdominal, la diarrea, la hepatomegalia, el aumento del hematocrito, la caída de plaquetas < 100,000 y la acumulación de líquidos, ajustado por variables confusoras, constituyen algunos de los factores asociados al desarrollo de severidad por la infección del DENV. Este estudio, pese a muchos de sus fortalezas, también posee limitaciones debido a que la información de los casos se recolectó de fuentes indirectas e incluye solo información registrada en las fichas epidemiológicas e información de la tipificación del DENV administrada por el laboratorio ISI de la Universidad Surcolombiana y el INS. Por ende, se requieren más estudios que evalúen extensamente factores asociados. Este estudio fue financiado por la secretaría de salud del Huila y la Universidad Surcolombiana.

Tabla No. 2. Análisis bivariado de los posibles factores asociados a la severidad por la infección del DENV

Variables Clínicas	Dengue (n = 3,432)	Dengue grave (n = 142)	OR	IC 95%	OR*	IC 95%
Edad						
Menor de 5 años	794 (23.1)	46 (32.3)	3.82	1.79 - 8.10	7.00	3.87 - 13.07
De 5 a 15 años	1,782 (51.3)	80 (56.4)	3.07	1.47 - 6.26	3.79	1.94 - 8.04
De 16 a 30 años	509 (14.8)	8 (5.6)	Referencia			
De 31 a 60 años	276 (8.0)	8 (5.6)	1.20	0.58 - 2.50	1.47	0.41 - 5.38
Mayor de 60 años	83 (2.4)	0	No estimado			
Sexo						
Femenino	1,772 (51.6)	78 (54.9)	Referencia			
Masculino	1,660 (48.3)	64 (45.1)	0.87	0.82 - 1.22	0.81	0.53 - 1.23
Área de residencia						
Urbana	3,083 (89.2)	124 (87.3)	0.82	0.90 - 1.27	1.51	0.79 - 2.85
Rural	309 (9.0)	18 (12.7)	Referencia			
Seguridad social						
Contributivo	1,513 (44.1)	61 (42.9)	Referencia			
Subsidio	1,981 (57.3)	73 (51.4)	0.79	0.98 - 1.12	0.66	0.42 - 1.04
No asegurado	138 (4.0)	8 (5.6)	1.24	0.98 - 2.00	1.39	0.43 - 3.29
Población especial						
SI	28 (0.8)	2 (1.4)	1.24	0.29 - 5.19	2.44	0.37 - 15.90
No	3,482 (100.0)	140 (98.5)	Referencia			
Signos de alarma						
Dolor Abdominal	809 (23.6)	112 (79.0)	9.28	6.39 - 14.20	3.19	1.88 - 5.33
Vómito	870 (25.3)	89 (62.6)	4.94	3.49 - 7.00	1.87	1.04 - 2.99
Caida de Plaquetas <100,000	810 (23.6)	71 (50.0)**	11.29	7.94 - 16.55	8.02	3.81 - 16.52
Diarrea	531 (15.5)	64 (45.1)**	4.48	3.18 - 6.13	2.29	1.28 - 3.91
Sorromección o irritabilidad	185 (5.3)	36 (25.3)**	5.96	3.97 - 9.04	1.42	0.77 - 2.62
Hemorragias importantes en mucosas	183 (5.3)	18 (12.6)**	2.57	1.53 - 4.31	1.00	0.48 - 2.07
Hepatomegalia	135 (3.9)	61 (42.9)**	15.82	11.09 - 23.03	5.17	3.21 - 8.31
Aumento del hematocrito	62 (1.8)	22 (15.5)**	10.50	6.78 - 16.47	3.16	1.65 - 6.07
Hipotermia	79 (2.3)	32 (22.5)**	8.96	5.67 - 14.24	2.99	1.21 - 6.95
Acumulación de líquidos	26 (0.7)	28 (19.7)**	47.86	28.01 - 81.37	17.69	8.59 - 36.4
Hipotermia	12 (0.3)	3 (2.1)**	6.15	1.71 - 22.04	0.02	0.00 - 0.17

* Odds Ratio ajustado por las variables Edad, Sexo, Área de residencia, Seguridad social, Población especial, Dolor abdominal, Vómito, Caída de plaquetas, Diarrea, Sorromección, Hemorragias importantes en mucosas, Hepatomegalia, Aumento del hematocrito, Hipotermia, Acumulación de líquidos e Hipotermia
Fuente: Orjuela y Ill Lab.

Tabla No. 3. Análisis multivariado de factores asociados a la severidad por la infección del DENV ajustado por variables confusoras

Variable	OR	IC 95%	Valor de P
Edad menor a 5 años	3.40	2.34 - 14.17	0.003
Edad entre los 5 y 15 años	3.42	1.82 - 7.75	0.003
Dolor abdominal	4.48	3.12 - 7.24	0.003
Diarrea	3.72	1.76 - 4.18	0.003
Hepatomegalia	4.94	3.11 - 7.75	0.003
Aumento del hematocrito	3.42	1.33 - 4.82	0.008
Caida de plaquetas <100,000	5.73	3.48 - 8.91	0.003
Acumulación de líquidos	11.98	8.14 - 23.37	0.003

Referencias

1. Villar LA, Rojas DP, Brando-Lombana S, Sarti E. Epidemiological trends of dengue disease in Colombia (2000-2011): a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Mar; 19(5):e0003495. doi: 10.1371/journal.pntd.0003495. PMID: 25730245; PMCID: PMC4366108.
2. Organización Mundial de la Salud. Dengue: Datos, mapas y estadísticas. [Internet]. 2019. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5274&Itemid=4073&lang=es
3. Jiménez-Silva CL, Carriño M, Ortiz-Baez AS, Rey LA, Villalona-Arenas CJ, Ocazionez RE. Evolutionary history and spatio-temporal dynamics of dengue virus serotypes in an endemic region of Colombia. *PLoS One*. 2018 Aug; 29(15):e0203000. doi: 10.1371/journal.pone.0203000. PMID: 30157270; PMCID: PMC6116016.
4. Rojas Palacios JH, Abate A, Martínez Romero NJ, Concha-Eastman AI. AfroColombian ethnicity, a paradoxical protective factor against Dengue. *Colomb Med (Cali)*. 2016 Sep; 20(47):133-141. PMID: 27821832; PMCID: PMC5091271.
5. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de vigilancia en salud pública. Dengue. 2017. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-sistema/informacion/temas/5-01P01T00C010.pdf>

1 Clinical and laboratory factors associated to dengue infection severity in a hyperendemic region in southern Colombia

5 Luis F. Oliveros¹, María Clemencia Rojas¹, Camilo Eduardo Rivera¹ and Carlos F. Narváez²

11 1 Secretaría de Salud Departamental del Huila, Neiva, Huila, Colombia.

13 2 División de Inmunología, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.

21 Corresponding author: Carlos F. Narváez MD., Ph.D. División de Inmunología, Universidad Surcolombiana. Calle 9 #14-04. Neiva, Huila Colombia. Phone: 57 (8) 8718310 ext: 3144.

24 cfnarvaez@usco.edu.co

27 Running title: Dengue virus infection in southern Colombia

30 Key words: Dengue virus; Huila; Neiva; Severity.

Productos pendientes

1. Instalaciones adecuadas para investigación (**2**).
2. Pruebas moleculares para DENV y ZIKV validadas. (SONDAS-PRIMERS-**ENZIMAS**)
3. IgM e IgG para DENV, ZIKV y SARS-CoV-2 “in-house” validadas. (**PROTEÍNAS RECOMBINANTES**)
4. Un artículo científico conjunto (**en preparación**).
5. Curso Departamental de Biología molecular para virus emergentes y reemergentes (**Julio**).
6. Calibración de equipos (**Pendiente**).
7. Mecanismo de entrega de los equipos (**Donación? Convenio?**)



Curso teórico-practico de biología molecular para virus emergentes y reemergentes

División de Inmunología – Universidad Surcolombiana y Laboratorio de Salud Pública – Secretaría de Salud Departamental del Huila

2021

objetivo

- Brindar conocimientos básicos sobre el uso de biología molecular en enfermedades virales de importancia regional a todas las Secretaría de Salud municipales del Huila.



GOBERNACIÓN DEL HUILA
Luis Enrique Dussán López
GOBERNADOR



HUILA
CRECE



UNIVERSIDAD
SURCOLOMBIANA



Metodología



- Duración: 16 horas de manera presencial.
- 8 horas teóricas y 8 horas prácticas.
- Las sesiones se realizarán en la División de Inmunología de la Universidad Surcolombiana y en el LDSP del Huila.

- Fecha: Julio de 2021.

CONTENIDO TEÓRICO

8: 00 am -12 pm



- DIA 1

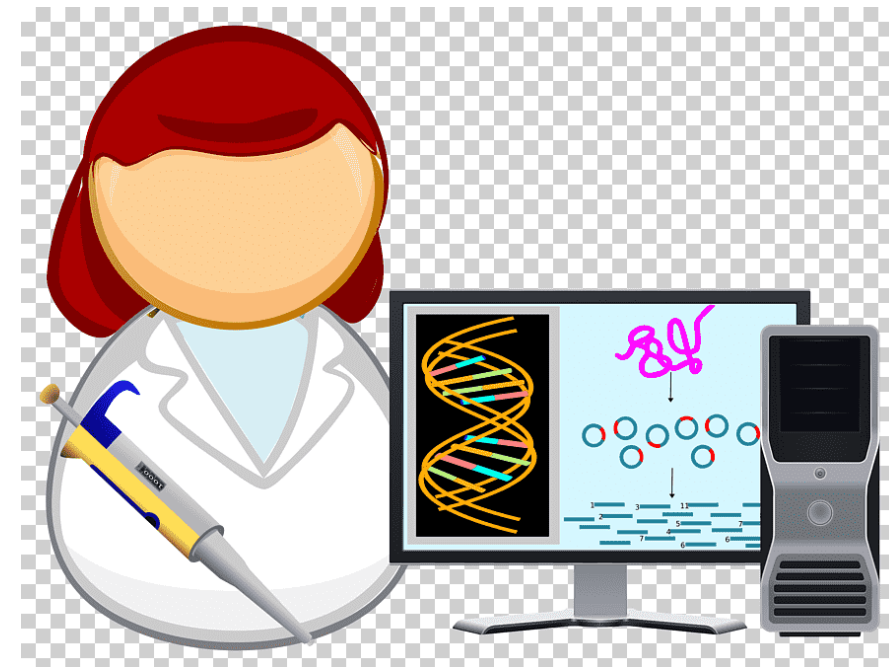
Introducción a la biología molecular.

Enfermedades infecciosas de interés público :
Dengue y SARS-CoV-2.

DIA 2.

Extracción de RNA y RT-qPCR DENV

Extracción de RNA y RT-qPCR SARS-CoV-2



Productos pendientes

1. Instalaciones adecuadas para investigación (**2**).
2. Pruebas moleculares para DENV y ZIKV validadas. (SONDAS-PRIMERS-**ENZIMAS**)
3. IgM e IgG para DENV, ZIKV y SARS-CoV-2 “in-house” validadas. (**PROTEÍNAS RECOMBINANTES**)
4. Un artículo científico conjunto (**en preparación**).
5. Curso Departamental de Biología molecular para virus emergentes y reemergentes (**Julio**).
6. Calibración de equipos (Pendiente).
7. **Mecanismo de entrega de los equipos a la USCO (Donación? Convenio?)**

ANEXO 2

Listado de equipos que recibirán servicio de calibración



Carlos Fernando Narvaez Rojas <cfnarvaez@usco.edu.co>

Fwd: Pipetas para mantenimiento/calibración

1 message

Carlos Fernando Narváez <cfnarvaez@usco.edu.co>
To: Tatiana Sanmiguel <t.sanmiguel766@gmail.com>

Fri, Feb 26, 2021 at 2:13 PM

Hola Tatiana, recordando nuestra última mesa técnica, acá va el listado de equipos que requieren calibración. Son principalmente pipetas. A todas ellas se les hizo el mantenimiento.

Estar atento,

Gracias,

Carlos.

----- Forwarded message -----

From: **Carlos Fernando Narváez** <cfnarvaez@usco.edu.co>
Date: Fri, Jul 31, 2020 at 10:06 AM
Subject: Pipetas para mantenimiento/calibración
To: Tatiana Sanmiguel <t.sanmiguel766@gmail.com>

Hola Tatiana,

Este es el listado de pipetas del Lab de I&I para mantenimiento y calibración:

- Pipeta monocal 0.2-2uL Finnpiette F2 Thermo
- Pipeta monocal 2-20uL Finnpiette F2 Thermo
- Pipeta monocal 20-200uL Finnpiette F2 Thermo
- Pipeta monocal 100-1000uL Finnpiette F2 Thermo
- Pipeta multocal 30-300uL (8 puntas) Finnpiette F2 Thermo
- Pipeta multocal 30-300uL (12 puntas) Finnpiette F2 Thermo
- Pipeta multocal 20-200 (12 puntas) Costar.
- Pipeta monocal 0.5-10uL Bioht. (TRES UNIDADES)
- Pipeta monocal 20-200uL Bioht.
- Pipeta monocal 0.5-10uL Bioht.
- Pipeta monocal 5-20uL Bioht. (DOS UNIDADES)
- Pipeta monocal 10-100uL Bioht.
- Pipeta multocal 20-200 (8 puntas) Brand.
- Pipeta multocal 5-50 (8 puntas) Brand.
- Pipeteador eléctrico Thermo S1.

Gracias,

Carlos F. Narváez

ANEXO 3

Imágenes de las locaciones de la Universidad en proceso de recibir las adecuaciones

Anexo 2.

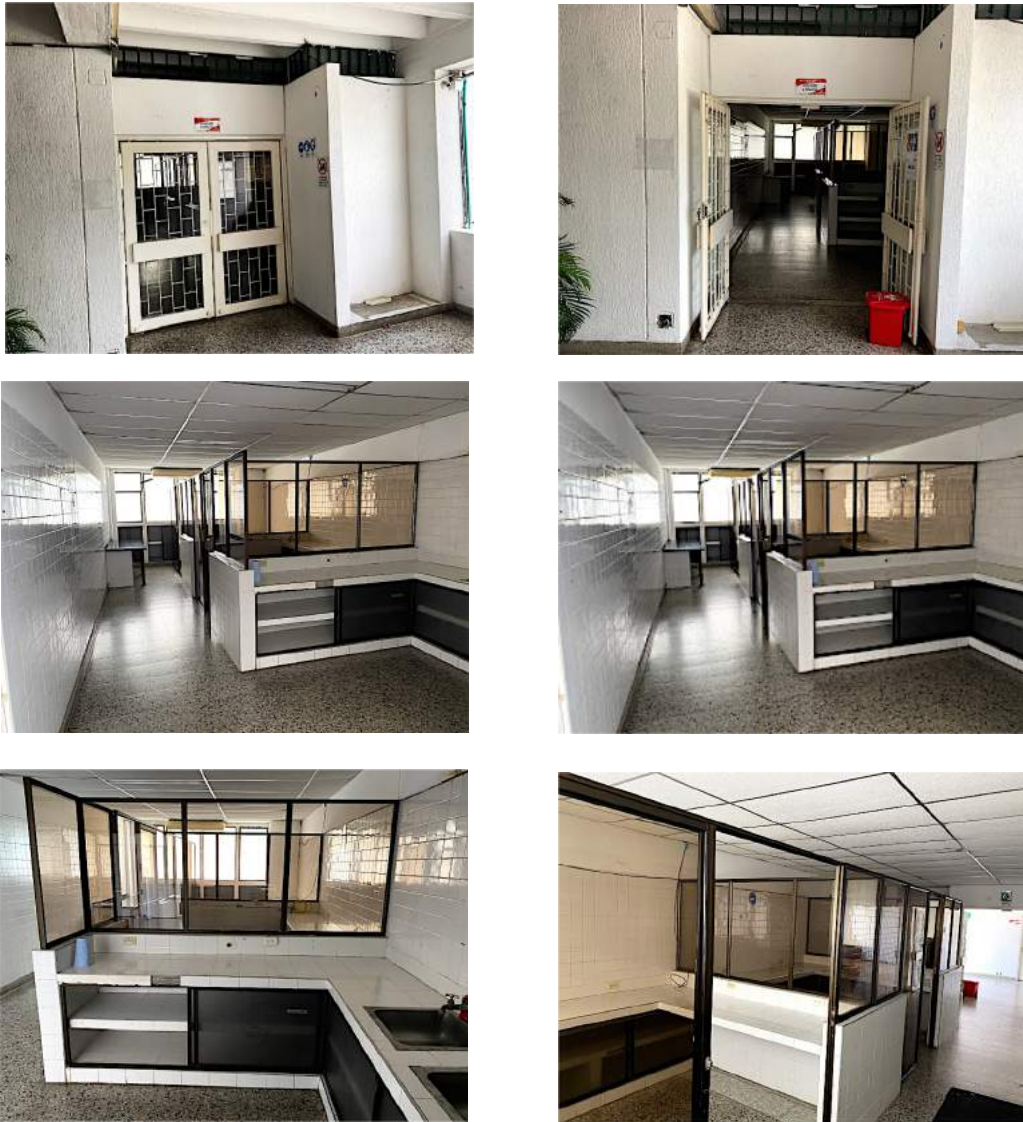


Figura 1. Espacio de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana que recibirá las adecuaciones. Ampliación del Laboratorio de Infección e Inmunidad (I&I Lab). Ubicación: Segundo piso Facultad de Salud – USCO, calle 9#14-02, Neiva, Huila, Colombia.

ANEXO 4

Presentación de resultados de las profesionales en bacteriología adscritas a la propuesta que demuestra que mantienen e incrementan sus capacidades en la realización de Inmunoensayo ligado a enzima

INFORME SEMANAL

SANDRA LILIANA DELGADO MARTÍNEZ

Facultad de Medicina, laboratorio I&I

Fecha 27-05-2021

- Se continúa con las prácticas en el Montaje de ELISA para la detección de IgG Total bajo la supervisión de Paula Losada.
- Se realiza análisis de las lecturas en el Nanodrop de las diferentes extracciones realizadas para Dengue hasta el momento

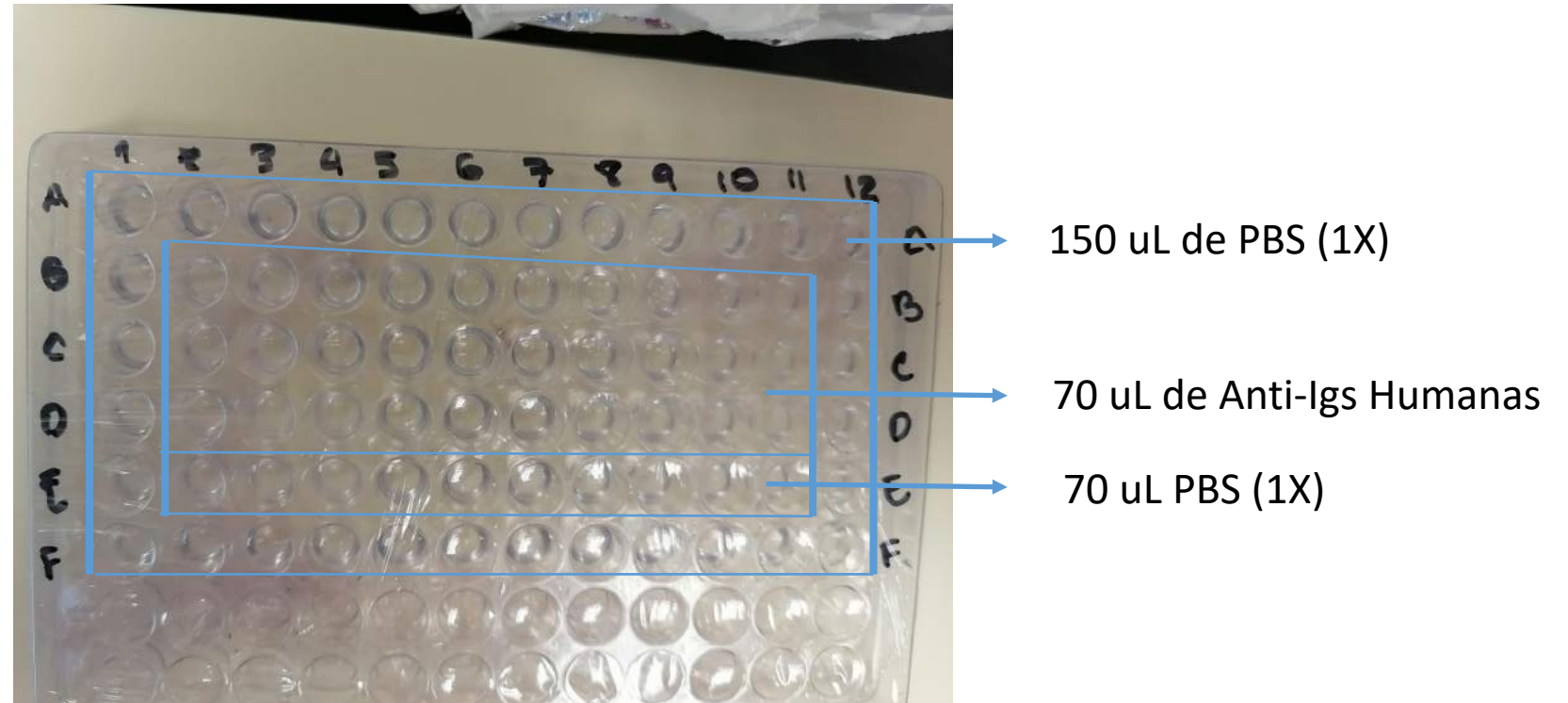
ELISA TIPO SANDWISH PARA DETECCIÓN DE IgG Total

Familiarizarse con la técnica y reactivos que se utilizan para la detección de IgG Total y garantizar la confiabilidad de los resultados

- ✓ Pipeta monocanales de 1000, 200, 10 μ L
- ✓ Buffer salino fosfato (PBS) estéril (Cell Gro, Cat: 20-031-CV)
- ✓ Tween 20-10% (ACROS, Cat. 23336-2500)
- ✓ Leche descremada en polvo (Slight, Colanta, Lote 7)
- ✓ Anticuerpo anti-Igs Humanas Polivalente (Sigma Aldrich, **Cat**)
- ✓ Anticuerpos Anti-IgA, Anti-IgG y/o Anti-IgM Biotinilados (KPL, Cat. 16-10-01, 16-10-02, 16-10-03)
- ✓ Estreptavidina-Peroxidasa (KPL, **Cat**)
- ✓ Tetrametilbenzidina (TMB, KPL, Lote 100610)
- ✓ Ácido Sulfúrico 2M (MERCK, Cat K38346532)
- ✓ Placa de ELISA de 96 pozos de alta afinidad (NUNC, **Cat**)
- ✓ Tubos Falcon de poliestireno 15 ml (BD, Cat: 352099)
- ✓ Tubos eppendorf 1.5 ml
- ✓ Recipiente para solución de lavado
- ✓ Lector de ELISA ELx 800 (BIO-TEK Instruments)

Se realiza un ELISA tipo Sandwich "in house" supervisada

Cubrir los pozos con Anti-Igs Humanas Polivalente diluido en PBS 1X (1/2000); agregar 70 uL/pozo e incubar toda la noche a 4°C. Se cubren los bordes con 150 uL de PBS 1X.



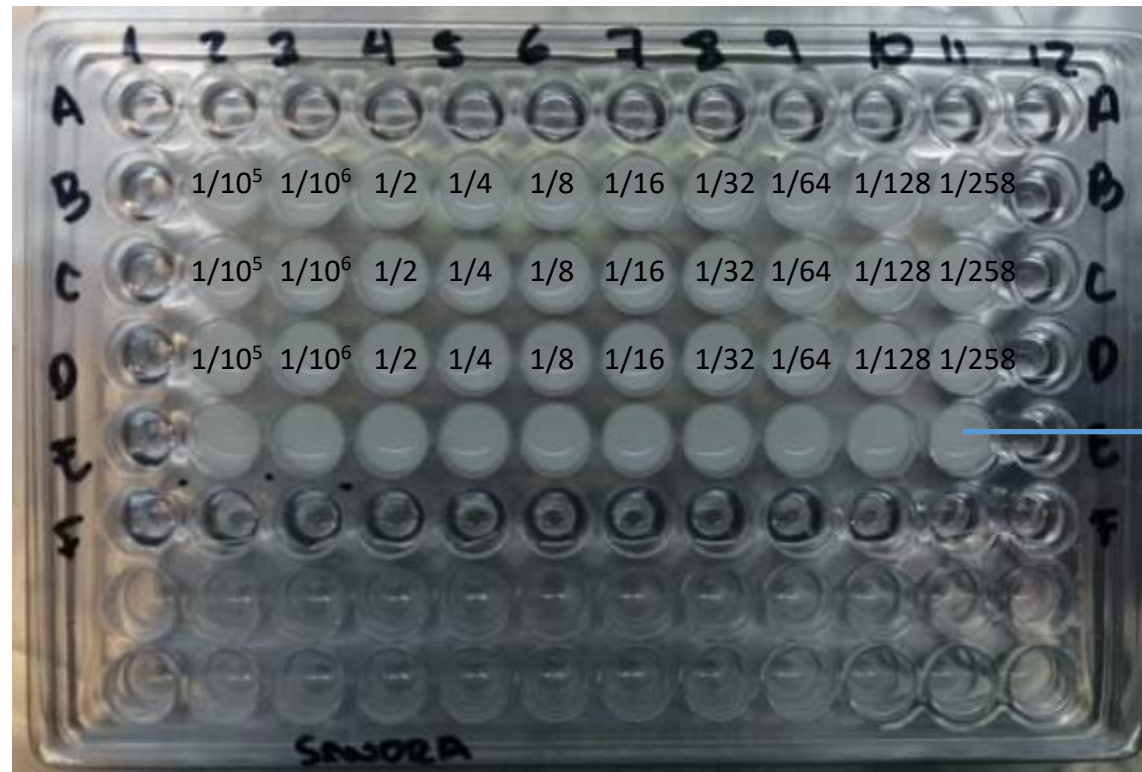
Agregar 150 uL de blotto 5% y 150 uL de PBS 1X en los bordes de la placa e incubar por 1 hora a 37°C.



150 uL Blotto 5%

150 uL PBS (1X)

Agregar muestras y control (Blotto 2,5%), 70 uL/pozo según mapa. Incubar por 2 horas a 37°C.



Blotto 2,5%

Agregar los anticuerpo secundarios (Anti-IgG, Anti-IgA y/o Anti-IgM biotinilados, según la inmunoglobulina total a detectar) diluïdos 1/1000 en blotto 2,5%, 70 uL/pozo y 150 uL de PBS 1X en los bordes de la placa. Incubar por 1 hora a 37°C.



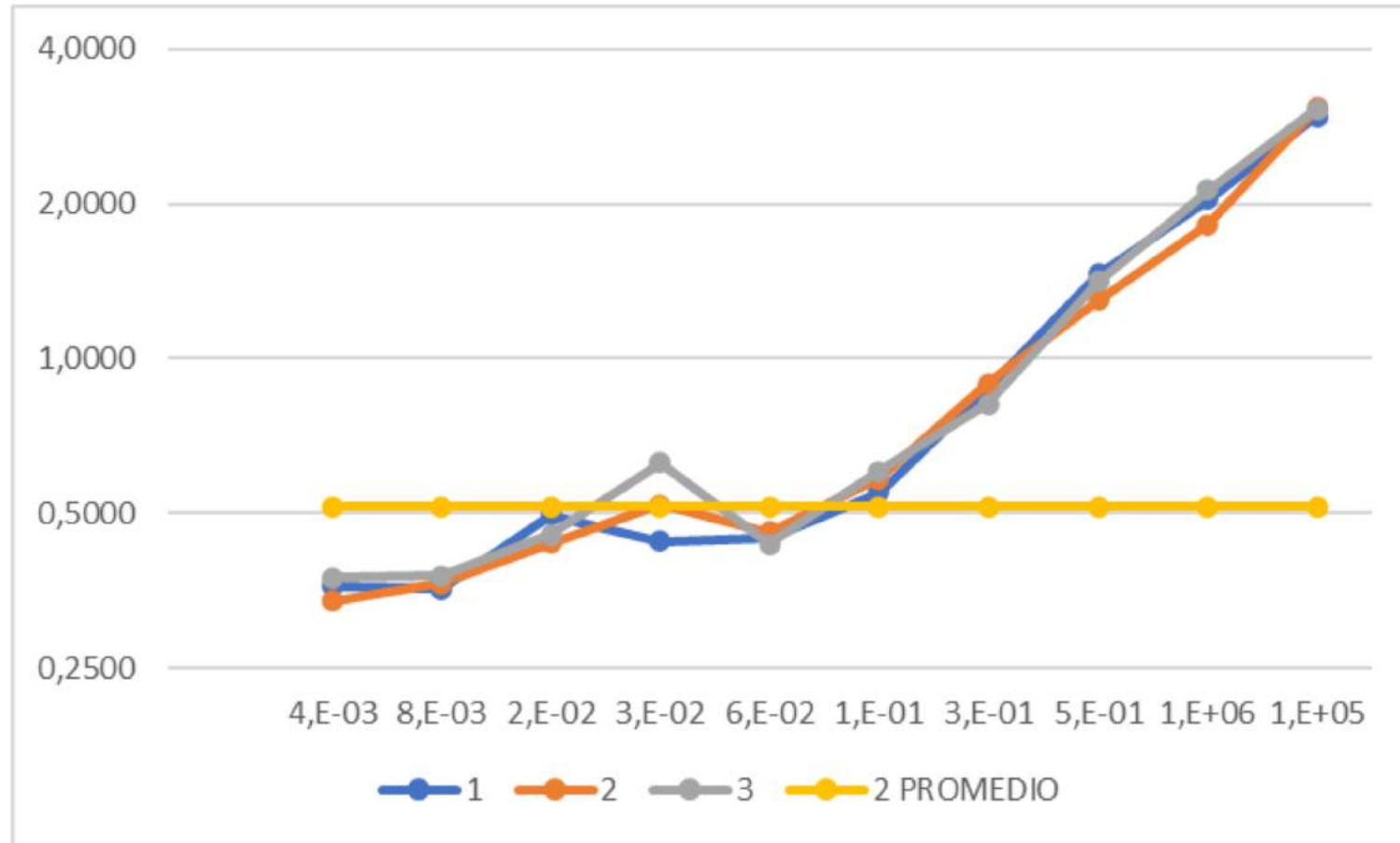
Agregar estreptavidina-peroxidasa diluida en blotto 2,5% (1/1000), 70 uL/pozo y 150 uL de PBS 1X en los bordes de la placa. Incubar por 1 hora a 37°C.



#5

Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0510	0,0490	0,0430	0,0387	0,0376	0,0388	0,0404	0,0407	0,0389	0,0460	0,0432	0,0760
B	0,0474	2,9611	2,0398	1,4619	0,8749	0,5481	0,4480	0,4416	0,4954	0,3554	0,3606	0,0445
C	0,0467	3,0764	1,8209	1,2984	0,8950	0,5825	0,4593	0,5185	0,4366	0,3649	0,3367	0,0458
D	0,0678	3,0687	2,1315	1,4141	0,8146	0,6031	0,4362	0,6261	0,4541	0,3781	0,3749	0,0452
E	0,0670	0,1624	0,1784	0,1782	0,1693	0,2134	0,1995	0,4044	0,4289	0,3092	0,3328	0,0470
F	0,0967	0,1043	0,0475	0,0530	0,0475	0,0735	0,0450	0,0435	0,0464	0,0468	0,0461	0,0496

1	2	3	PROMEDIO	10%	RANGO	
2,9611	3,0764	3,0687	3,035	0,304	2,732	3,339
2,0398	1,8209	2,1315	1,997	0,200	1,798	2,197
1,4619	1,2984	1,4141	1,391	0,139	1,252	1,531
0,8749	0,8950	0,8146	0,862	0,086	0,775	0,948
0,5481	0,5825	0,6031	0,578	0,058	0,520	0,636
0,4480	0,4593	0,4362	0,448	0,045	0,403	0,493
0,4416	0,5185	0,6261	0,529	0,053	0,476	0,582
0,4954	0,4366	0,4541	0,462	0,046	0,416	0,508
0,3554	0,3649	0,3781	0,366	0,037	0,330	0,403
0,3606	0,3367	0,3749	0,357	0,036	0,322	0,393



- Se observa una mejor repetitividad.
- Aún siguen los problemas con los lavados. Posiblemente hay una contaminación cuando se descarta el Coating.

- Se deben seguir realizando practicas de lavado y revelado hasta lograr un revelado aceptable.
- Continuar el pipeteo con las pipetas electrónicas.

D MUESTRAS	SEROTIPIFICACIÓN PCR CONVENCIONAL		CT DE PCR EN TIEMPO REAL EAE		ANÁLISIS	CT DE PCR EN TIEMPO REAL EC		ANALISIS
	DENGUE 1	DENGUE 2	DENGUE 1	DENGUE 2		DENGUE 1	DENGUE 2	
SSH12		POSITIVO		26,26	CONCUERDA		26,3	CONCUERDA
SSH16	POSITIVO		27,6		CONCUERDA	25,1		CONCUERDA
SSH21		POSITIVO		29,8	CONCUERDA		30	CONCUERDA
SSH27		POSITIVO		32	CONCUERDA		29,9	CONCUERDA
SSH35	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA
SSH38		POSITIVO			FALSO NEGATIVO		27,1	CONCUERDA
SSH42		POSITIVO		31,9	CONCUERDA		32,3	CONCUERDA
SSH44	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA
SSH68	POSITIVO		30,68		CONCUERDA	22,5		CONCUERDA
SSH75	NEGATIVO	NEGATIVO	35,8		FALSO POSITIVO	33,1		NO CONCUERDA
SSH80	POSITIVO				FALSO NEGATIVO	26,7		CONCUERDA
SSH105	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA
SSH107	POSITIVO		29,8		CONCUERDA	29,8		CONCUERDA
SSH112	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA
SSH114	POSITIVO		34,9		CONCUERDA	27		CONCUERDA
SSH119	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA
SSH120	POSITIVO		27,8		CONCUERDA	26,8		CONCUERDA
SSH128	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA
SSH130	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCUERDA
SSH146	NEGATIVO	NEGATIVO	37,8		FALSO POSITIVO	33,3		NO CONCUERDA

RTq-PCR Extracción de Alta Eficiencia

Los resultados mostrados en la Tabla permiten por lo tanto construir la siguiente tabla de contingencia de 2x2:

A partir de la Tabla 1 y de la tabla de contingencia se calcularon los siguientes valores:

Concordancia: 80% (20/16)

Sensibilidad: 84%

Especificidad 81%

Valor predictivo positivo: 85%

Valor predictivo negativo: 81%

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	2	11	13
Test Negative	9	2	11
Totals	11	13	24

Sensitivity	0.846154
Specificity	0.818182

For any particular positive test result, t

True Positive (Positive Predictive Value)	0.846154
False Positive	0.153846

For any particular negative test result,

True Negative (Negative Predictive Value)	0.818182
False Negative	0.181818

RTq-PCR Extracción de Alta Eficiencia

Los resultados mostrados en la Tabla permiten por lo tanto construir la siguiente tabla de contingencia de 2x2:
A partir de la Tabla 1 y de la tabla de contingencia se calcularon los siguientes valores:

Concordancia: 90% (20/18)

Sensibilidad: 100%

Especificidad 81%

Valor predictivo positivo: 85%

Valor predictivo negativo: 100%

Sensitivity	1
Specificity	0.818182

For any particular positive test result, t

True Positive (Positive Predictive Value)	0.846154
False Positive	0.153846

For any particular negative test result,

True Negative (Negative Predictive Value)	1
False Negative	0

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	2	11	13
Test Negative	9	0	9
Totals	11	11	22

INFORME SEMANAL

SARA LUCIA ANGEL

LABORATORIO DE INMUNIDAD E INFECCION

27 de Mayo 2021

Realizar Elisas para detección de inmunoglobulinas
totales humanas

- Pipeta monocanales de 1000, 200, 10 uL y multicanales de 50 y 200 uL (BRAND)
- Buffer salino fosfato (PBS) estéril (Cell Gro, Cat: 20-031-CV)
- Tween 20 10% (ACROS, Cat. 23336-2500)
- Leche descremada en polvo (Slight, Colanta, Lote 7)
- Anticuerpo anti-Igs Humanas Polivalente (Sigma Aldrich, Cat)
- Anticuerpos Anti-IgA, Anti-IgG y/o Anti-IgM Biotinilados (KPL, Cat. 16-10-01, 16-10-02, 16-10-03)
- Estreptavidina-Peroxidasa (KPL, Cat)
- Tetrametilbenzidina (TMB, KPL, Lote 100610)
- Ácido Sulfúrico 2M (MERCK, Cat K38346532)
- Placa de ELISA de 96 pozos de alta afinidad (NUNC, Cat)
- Tubos Falcon de poliestireno 15 ml (BD, Cat: 352099)
- Tubos eppendorf 1.5 ml
- Recipiente para solución de lavado
- Lector de ELISA ELx 800 (BIO-TEK Instruments)

TITLE: *Elsa AC IgG totales*
DATE: *09/02/2021*
PATIENTS CODE: *N/A*
RESEARCHER: *Sara Lucia Angel*

I&I LAB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	1x PBS	1x PBS	—	—	—	1x PBS	—	—	—	—	—	1x PBS
B.		1/10 ⁵ Coating	1/10 ⁶ Coating	1/2 x 10 ⁶ Coating	1/4 x 10 ⁶ Coating	1/8 x 10 ⁶ Coating	1/16 x 10 ⁶ Coating	1/32 x 10 ⁶ Coating	1/64 x 10 ⁶ Coating	1/128 x 10 ⁶ Coating	1/256 x 10 ⁶ Coating	
C.		"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	
D.		"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	
E.	1x PBS	20 ul 1x PBS	—	—	—	70 ul 1x PBS	—	—	—	—	—	70 ul 1x PBS
F.	1x PBS	PBS	—	—	—	1x PBS	—	—	—	—	—	1x PBS
G.												
H.												

CONCLUSION:

1. Cubrir los pozos con Anti-Igs Humanas Polivalente diluido en PBS 1X (1/2000); agregar 70 uL/pozo e incubar toda la noche a 4°C. Se cubren los bordes con 150 uL de PBS 1X.

Dilución: 1 \longrightarrow 2000 uL
X \longrightarrow 2,310 uL

$$\frac{1 \times 2,310}{2000} \quad 1,15 \text{ uL de Anti Igs humanas} + 2310 \text{ uL de PBS 1X}$$

- Se procedió a depositar 70 uL de solución de la solución polivalente de Igs humana diluida 1/2000 en los 30 pozos internos y se cubrió los bordes con 150 ul de PBS 1X.
- Se cubrió la placa con papel vinipel y papel aluminio y se procedió a incubar en la nevera a 4 °C por 14 horas,

2. Descarto solución a la placa.
3. Se agrego 150 uL de blotto al 5% a los pozos de reacción y 150 ul de PBS 1X en los bordes de la placa.

Blotto 5% 2,5 Gr de leche + 50 uL de PBS 1X + 500 uL de tween 20 al 10%.



Incubar a 1 hora a 37°C

4. Descartar la solución
5. Agrego 70 uL de las muestra diluidas en blotto 2,5% en los pozos según el mapa.



Incubar 2 horas a 37°C

6. Descartar la solución.
7. Lavar 3 veces manualmente con solución de lavado.

PBS 1X + tween 20 al 0.1 %

8. Agregar la sln de Acs secundarios IgG biotinilados diluidos 1/1000 en blotto 2,5 %

Dilución: 1 1000 uL
 X 3000 uL

$$\frac{1 \times 3000}{1000} \quad 3.0 \text{ uL de Acs biotinilados IgG} + 2997 \text{ uL de blotto } 2.5 \%$$

Adicionar 150 uL de PBS 1X en los bordes.



Incubar por 1 hora a 37° C

Descartar solución y lavar 3 veces con solución de lavado

9. Agregar la sln estreptovidina- peroxidasa diluidos 1/1000 en blotto 2,5 %

Dilución:	1	1000 uL
	X	3000 uL

$1 \times \frac{3000}{1000}$ 3.0 uL de estreptovidina- peroxidasa + 2997 uL de blotto 2.5 %

Adicionar 150 uL de PBS 1X en los bordes.



Incubar por 1 hora a 37° C

Descartar solución y lavar 3 veces con solución de lavado

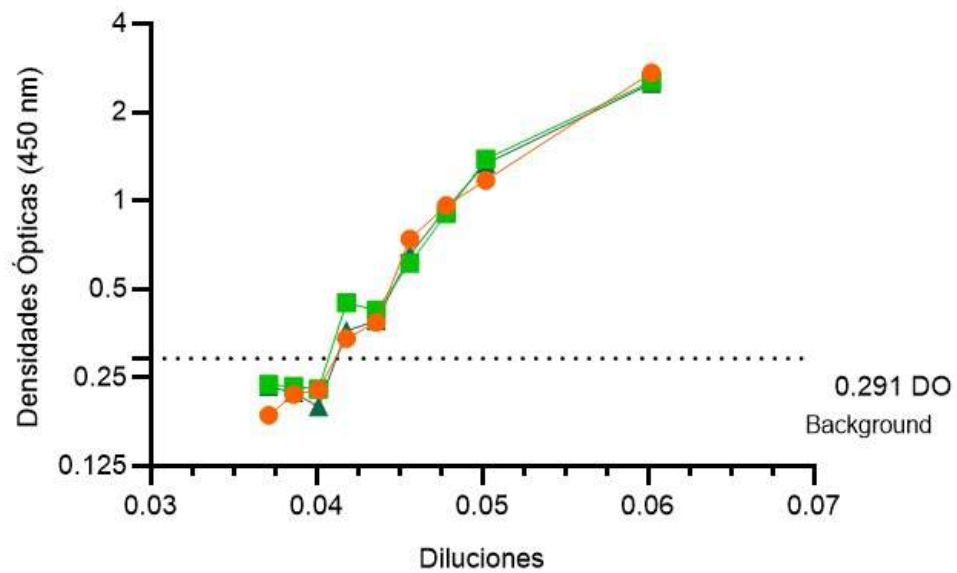
10. Agregar 70 uL de TMB a cada pozo: solución A y solución B en partes iguales

11. Detener con 17.5 uL de ácido sulfúrico 2M

volumen final 50 ml 5.4 uL de ácido sulfúrico puro + 44.6 mL de agua destilada.

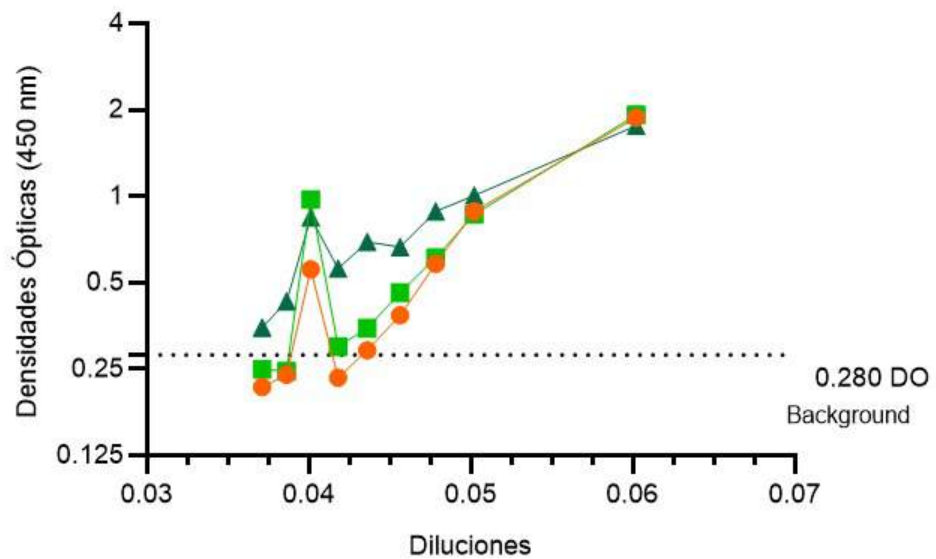
12. Leer la placa en lector de Elisa a 450 nm

Measurement results												
25-05-2021 Sara A.skax												
25/05/2021 1:52:37 p. m.												
Absorbance 1												
Wavelength: 450 nm												
Plate 1												
Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0373	0,0400	0,0685	0,0458	0,0506	0,0498	0,0443	0,0519	0,0520	0,0453	0,0510	0,0762
B	0,0431	2,7267	1,1727	0,9633	0,7410	0,3863	0,3397	0,2277	0,2192	0,1864	0,3101	0,0777
C	0,0422	2,5424	1,3886	0,9040	0,6124	0,4249	0,4504	0,2289	0,2333	0,2367	0,3540	0,0454
D	0,1455	2,5112	1,3363	0,9466	0,6548	0,3906	0,3614	0,1990	0,2227	0,2334	0,2096	0,0469
E	0,0500	0,1503	0,1698	1,1511	0,5460	0,1358	0,1823	0,1630	0,2324	0,1659	0,3445	0,0503
F	0,0460	0,0495	0,0501	0,0587	0,0486	0,0467	0,0454	0,0501	0,0508	0,0489	0,0480	0,0487
G	0,0501	0,0518	0,0614	0,0529	0,0487	0,0667	0,0506	0,0431	0,0563	0,0502	0,0558	0,0531
H	0,0488	0,0497	0,0504	0,0636	0,0516	0,0647	0,0454	0,0441	0,0576	0,0542	0,0698	0,0573



	25/05/2021							
	1	2	3	4	PROMEDIO	10%	RANGO	
2	2,726	2,542	2,5112	0,1503	3,54	0,354	3,186	3,894
3	1,1727	1,3886	1,3363	0,1698	1,58	0,158	1,422	1,738
4	0,9633	0,904	0,9466	1,1511	1,404	0,14	1,264	1,544
5	0,741	0,6124	0,6548	0,546	0,63	0,063	0,567	0,693
6	0,3863	0,4249	0,3906	0,1358	0,466	0,047	0,419	0,512
7	0,3397	0,4504	0,3614	0,1823	0,359	0,036	0,323	0,395
8	0,2277	0,2289	0,199	0,163	0,247	0,025	0,223	0,272
9	0,2192	0,2333	0,2227	0,2324	0,22	0,022	0,198	0,242
10	0,1864	0,2367	0,2334	0,1659	0,187	0,019	0,169	0,206
11	0,3101	0,354	0,2096	0,3445	0,189	0,019	0,17	0,207

Measurement results												
SARA A 26-04-21.skax												
26/05/2021 3:09:07 p. m.												
Absorbance 1												
Wavelength: 450 nm												
Plate 1												
Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0461	0,0474	0,0423	0,0448	0,0479	0,0450	0,0455	0,0444	0,0680	0,0513	0,0718	0,0493
B	0,1709	1,8803	0,8867	0,5827	0,3847	0,2911	0,2333	0,5579	0,2394	0,2166	0,2376	0,0622
C	0,0511	1,9240	0,8638	0,6115	0,4613	0,3469	0,2992	0,9750	0,2464	0,2494	0,2820	0,0978
D	0,0644	1,7638	1,0076	0,8876	0,6663	0,6936	0,5605	0,8443	0,4312	0,3485	0,3205	0,0950
E	0,0489	0,4339	0,7459	0,4156	0,5784	0,6319	0,6059	0,5092	1,5692	0,7360	0,4137	0,1491
F	0,0499	0,0517	0,0500	0,0518	0,0441	0,0476	0,0487	0,0493	0,0514	0,0487	0,0634	0,0867
G	0,1302	0,0634	0,0530	0,0689	0,0591	0,0588	0,0612	0,0631	0,0816	0,0699	0,0638	0,0722
H	0,0610	0,0638	0,0624	0,0587	0,0585	0,0641	0,0564	0,0559	0,0584	0,0577	0,0580	0,0521



	26/05/2021								
	1	2	3	4	PROMEDI O	10%	RANGO		
2	1,8803	1,924	1,7638	0,4339	3,666	0,367	3,299	4,032	
3	0,8867	0,8638	1,0076	0,7459	2,012	0,201	1,811	2,213	
4	0,5827	0,6115	0,8876	0,4156	1,399	0,14	1,259	1,539	
5	0,3847	0,4613	0,6663	0,5784	1,036	0,104	0,932	1,139	
6	0,2911	0,3469	0,6936	0,6319	0,619	0,062	0,557	0,681	
7	0,2333	0,2992	0,5605	0,6059	0,473	0,047	0,426	0,52	
8	0,5579	0,975	0,8443	0,5092	0,333	0,033	0,3	0,366	
9	0,2394	0,2464	0,4312	1,5692	0,292	0,029	0,262	0,321	
10	0,2166	0,2494	0,3485	0,736	0,28	0,028	0,252	0,308	
11	0,2376	0,282	0,3205	0,4137	0,291	0,029	0,262	0,32	

- ❖ se observa mal lavado en los pozos control.
- ❖ En Hubo una posible contaminación de los pozos al momento de lavar la placa. Esto pudo suceder al momento de voltear la placa para descartar la solución de lavado o al momento de secar.

1. Volver a cubrir la placa de elisas con con Anti-Igs Humanas Polivalente diluido en PBS 1X (1/2000) y agregar 70 uL/pozo y los bordes con 150 uL de PBS 1X. Dejar incubando toda la noche.
2. Culminar satisfactoriamente los 2 ensayos de elisas que me faltan para la meta.

ANEXO 5

Informe de validación del estuche comercial Allplex™
Seegen, presentado a la Secretaría de Salud
Departamental del Huila en el formato de gestión de calidad
de la Universidad.



Carlos Fernando Narvaez Rojas <cfnarvaez@usco.edu.co>

Allplex SeeGene

1 message

Carlos Fernando Narváez <cfnarvaez@usco.edu.co>

Wed, Apr 21, 2021 at 7:35 PM

To: Maria Clemencia Charry <clemencia_charry@yahoo.es>, lilivallejopolanco@hotmail.com, Leidy Johanna Alvarez Diaz <leidyal0726@gmail.com>, lorena.plazas@gmail.com

Hola a todas, espero se encuentren bien.

Adjunto el informe de verificación interna del estuche comercial Allplex - SeeGene. Esperamos apoyarlas de nuevo desde el lunes.

Espero comentarios/sugerencias.

Saludos,

Carlos F. Narváez MD., Ph.D.
Jefe División de Inmunología
Departamento de Pediatría y Básicas
Programa de Medicina
Universidad Surcolombiana



VALIDACIÓN ALLPLEX SEEGENE.pdf

1695K



INFORME GENERAL

NOMBRE DEL LABORATORIO:	LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD (I&I LAB) – DIVISIÓN DE INMUNOLOGÍA - FACULTAD DE SALUD – UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA.
FECHA:	15 DE ABRIL DE 2021
NOMBRE DEL INFORME:	CUARTO INFORME DE VALIDACIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS DE HISOPADO NASOFARÍNGEO DE PACIENTES SARS-CoV-2: KIT ALLPLEX™ 2019-NCOV (CASA COMERCIAL SEEGENE)
PRESENTADO POR:	EQUIPO DE TRABAJO DE SARS-CoV-2, UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA – FACULTAD DE SALUD – LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD.
CARGO:	BACTERIÓLOGOS, MÉDICOS Y JEFE DIVISIÓN DE INMUNOLOGÍA
OBJETIVO DEL INFORME:	FAMILIALIZARCE CON LA METODOLOGÍA DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL PROTOCOLO ALLPLEX™ 2019-NCOV PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SARS-CoV-2 REPRODUCIENDO LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR LAS TÉCNICAS VALIDADAS ANTERIORMENTE EN OTROS LABORATORIOS.

1. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS

VERIFICACIÓN TÉCNICA RT-qPCR SARS-CoV-2 USANDO EL ESTUCHE COMERCIAL ALLPLAX™ DE LA CASA COMERCIAL SEEGENE

Selección de muestras:

Se seleccionaron 20 muestras POSITIVAS y 20 muestras NEGATIVAS (40 en total), que habían sido previamente caracterizadas en el I&I Lab por las técnicas ya validadas como el protocolo Berlín-Charité.

Estas muestras se encontraban almacenadas desde el momento posterior a su análisis a -70°C hasta la fecha. Una vez seleccionadas, se llevaron a la zona de contención y desembalaje adecuada provisionalmente por la Universidad Surcolombiana en su Facultad de Salud, se revisaron una a una las muestras para verificar que tuvieran el volumen necesario para su análisis bajo las condiciones de bioseguridad recomendadas por el Ministerio de Salud y el Instituto Nacional de Salud. Para mayor claridad se muestran los códigos internos de los especímenes seleccionados en la siguiente tabla:

Tabla1. Especímenes seleccionados previamente caracterizados por las técnicas validadas en el I&I Lab.

IS2009 NEGATIVO	IS2086 POSITIVO	IS2156 NEGATIVO	IS2257 NEGATIVO
IS2010 NEGATIVO	IS2091 POSITIVO	IS2170 POSITIVO	IS2263 POSITIVO
IS2011 NEGATIVO	IS2092 POSITIVO	IS2174 NEGATIVO	IS2265 POSITIVO
IS2014 POSITIVO	IS2093 POSITIVO	IS2178 NEGATIVO	IS2267 POSITIVO
IS2039 NEGATIVO	IS2119 POSITIVO	IS2186 NEGATIVO	IS2270 NEGATIVO
IS2055 NEGATIVO	IS2121 NEGATIVO	IS2187 NEGATIVO	IS2273 NEGATIVO
IS2060 NEGATIVO	IS2123 POSITIVO	IS2237 POSITIVO	IS2844 NEGATIVO
IS2075 POSITIVO	IS2125 POSITIVO	IS2242 NEGATIVO	IS2280 NEGATIVO
IS2080 NEGATIVO	IS2127 POSITIVO	IS2248 POSITIVO	IS2737 POSITIVO
IS2084 POSITIVO	IS2139 POSITIVO	IS2252 NEGATIVO	IS2831 POSITIVO



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

2 de 9

Extracción de RNA desde las muestras clínicas: Técnica de perlas magnéticas automatizadas:

Se adiciona 200 µL de cada una de las muestras en la gradilla de extracción asignadas del dispositivo KingFisher Flex, se inactivaron con proteinasa K y se le añade 10µL de RP-V-IC. La mezcla "binding" y la dilución del Etanol se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante siguiendo del protocolo como se observa en la Tabla 2, calculándose el volumen necesario de reactivos para un análisis total de 42 muestras (sumando los dos controles del ensayo).

Imagen 1. Mapa de trabajo del proceso de extracción de RNA.

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA LABORATORIO DE INFECCION E INMUNIDAD												
HOJA DE TRABAJO DE EXTRACCIÓN RNA												
CÓDIGO	MI-INV-LAB-FO-36	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2020	PÁGINA	1 DE 1					
TÉCNICA: PERLAS MAGNÉTICAS MANUAL				BEADS		LOTE: 00959671		F.V: 2021-08-31				
NOMBRE DE LA PRUEBA: MAGMAX				ELUTION		LOTE: 2009094		F.V: 2021-09-07				
RESPONSABLE: ADRIANETH CASTAÑEDA				FECHA DE REALIZACIÓN: 15-04-2021								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		IS2060	IS2119	IS2174	IS2257	IS22737						
B		IS2075	IS2121	IS2178	IS2263	IS2831						
C	IS2009	IS2080	IS2123	IS2186	IS2265	IS2850						
D	IS2010	IS2084	IS2125	IS2187	IS2267							
E	IS2011	IS2086	IS2127	IS2237	IS2270							
F	IS2014	IS2091	IS2139	IS2242	IS2273							
G	IS2039	IS2092	IS2156	IS2248	IS2844							
H	IS2055	IS2093	IS2170	IS2252	IS2280							

Vigilada Mineducación
La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

Luego de preparar el binding buffer se adicionó a la placa con las muestras, 275 µL/pozo de mezcla Binding. En un segundo plato se adicionaron a cada pozo teniendo en cuenta la cantidad de muestras analizadas, 500 µL de solución de lavado (Wash buffer), en un tercer plato 500 µL de etanol al 80% y en un cuarto plato se adicionó 50 µL de buffer de elución. Los cálculos para la preparación de Binding y el Etanol al 80% se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Cálculos de los volúmenes de reactivos usados para el aislamiento del RNA.

44 muestras	
Etanol al 80%:	17,6 mL de Etanol Absoluto + 4,4 mL de H ₂ O libre de RNAsa

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

3 de 9

Mezcla binding buffer: Para una muestra: 265 μ L
+ 10 μ L

11,660 μ L Binding + 440 μ L Beads

La placa fue procesada automatizadamente en el KingFisher Flex, obteniéndose un volumen final de elución de 50 μ L de cada una de las muestras.

Amplificación por RT-qPCR

Se realiza amplificación usando el estuche comercial Allplex™ 2019-nCoV Assay, Lote: RP4520HC9, con fecha de vencimiento del 26 de abril de 2021, que viene provisto de: 2019-nCoV MOM, RNase-free wáter, 5X Real-time one-step buffer y Real time one-step Enzyme que fueron mezclados por el equipo del Lab I&I como se recomienda en el inserto del estuche comercial. A continuación, se muestra la mezcla de las dos soluciones por muestra:

ALLPLEX 2019-nCoV Assay

44

Componentes	Vol μ L/1Rx	Vol μ L/total montaje
RNase-free wáter	5	220
2019-nCoV MOM	5	220
5X Real-time one-step buffer	5	220
Real-time one-step Enzyme	2	88

Se usaron 42 pozos de la placa de RT-qPCR, correspondiente a: 1 control negativo y 1 Control Positivo que vienen en el Kit. Se realiza el cálculo del Mix para 44 muestras como se observa en la Imagen 2:

Imagen 2. Hoja de Trabajo Amplificación RT-qPCR



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO INFECCIÓN E INMUNIDAD



INFORME GENERAL

CÓDIGO MI-INV-LAB-FO-29 VERSIÓN 1 VIGENCIA 2020 Página 4 de 9



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD



HOJA DE TRABAJO RT-PCR

CÓDIGO MI-INV-LAB-FO-37 VERSIÓN 1 VIGENCIA 2020 PÁGINA 1 DE 1

RT-PCR SARS CoV-2

Nombre de la Analista: Piedad P.	Inicio de Procesamiento:		
Kit: 2019 n-CoV Assay Lote No.: RP45201	Hora:	Temperatura:	Humedad:
Fecha de vencimiento: 26 DE ABRIL DE 2021	Terminación del Procesamiento:		
Fecha de Realización del Ensayo: 15-04-2021	Hora:	Temperatura:	Humedad:

Gen E

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-P05	152868	152119	152174	152257	152797						
B	C-NEG	152875	152121	152178	152263	152891						
C	152893	152888	152123	152186	152265	152858						
D	152818	152884	152125	152187	152267							
E	152841	152886	152127	152237	152278							
F	152814	152891	152133	152242	152279							
G	152899	152892	152156	152248	152844							
H	152855	152899	152178	152252	152288							

OBSERVACIONES:

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia e impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

En cada uno de los pozos se agregó 17 µL del Mix. Luego de esto, se tomó directamente la muestra de la placa de elución en donde se encuentra el RNA aislado y se aplicaron en cada pozo que contenía los 17 µL del mix de RT-qPCR, 8 µL de RNA purificado de cada uno de los pacientes (para un volumen total de 25µL) o del control negativo y del control positivo (estos dos últimos suministrados por el Kit Allplex™ 2019-nCoV Assay) llegando a un volumen final de 25 µL/pozo. Se sellaron y se colocaron en el equipo QuantStudio5 para realizar RT-PCR en tiempo real. El termociclador fue programado según las indicaciones del inserto del kit Comercial como se observa en la Imagen 3.

Imagen 3. Condiciones del Ciclo

Step	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	50°C	20 min
2	1	95°C	15 min
3	45	94°C	15 sec
4*		58°C	30 sec
5	GOTO Step 3, 44 more times		

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia e impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

5 de 9

Lectura e interpretación de resultados

Los resultados fueron exportados directamente a nuestra nube de datos de Thermo Fisher y desde allí, todo el grupo de trabajo realizó la interpretación de cada una de las muestras.

Los criterios que se tuvieron en cuenta para determinar el resultado POSITIVO o NEGATIVO fueron las indicadas por el inserto del estuche comercial Allplex™ 2019-nCoV Assay. Según recomendaciones para la interpretación de los resultados obtenidos con este estuche comercial, una muestra se considera POSITIVA, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control Interno muestra o no una gráfica de amplificación (ya que en ocasiones la detección del control interno no es necesaria porque la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última), además de la amplificación de los tres genes virales detectados por el estuche.

Una muestra se considera NEGATIVA, si no se detecta curva de amplificación por encima del threshold y el control interno[VIC] si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno. Debido a que el estuche proporcional una opción múltiplex para la detección de 3 marcadores virales simultáneamente (gen RdRp [ROX], gen N [Cy5], gen E [FAM]), cada uno detectado con fluorocromos diferentes, los valores de threshold de deltaRn que se tomaron para el análisis basados en los valores obtenidos al comparar las muestras conocidas positivas y negativas fueron:

ROX: 10,000

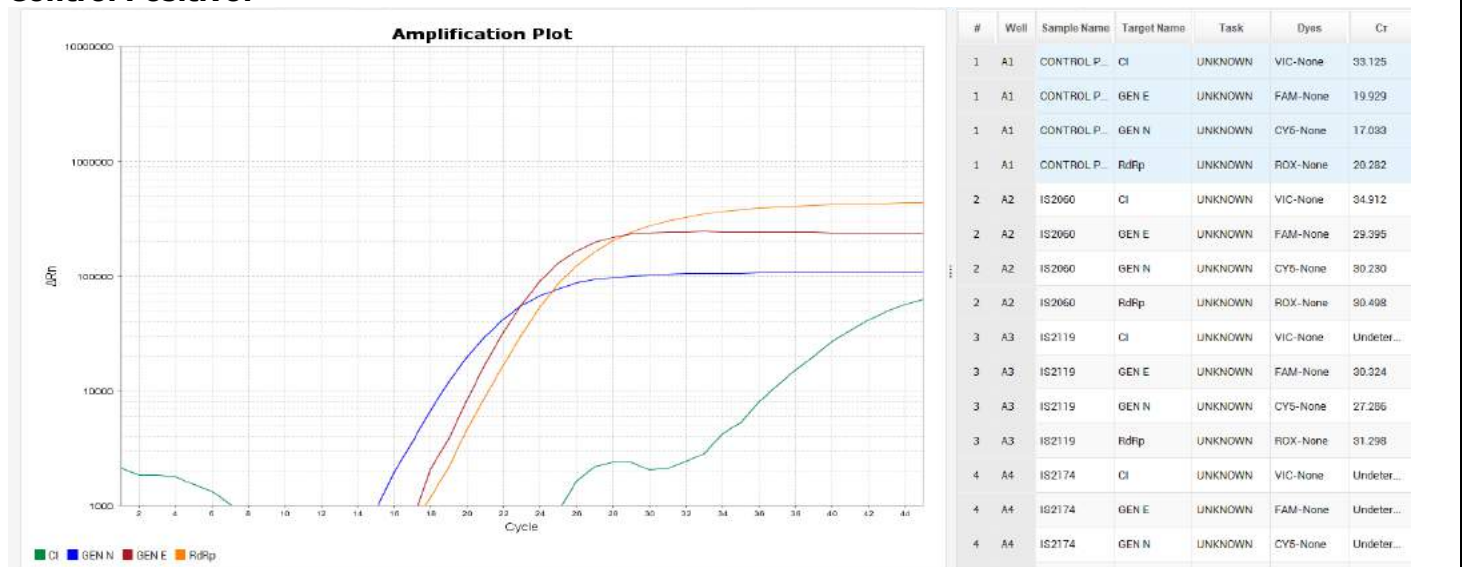
CY5: 50,000

FAM: 25,000

VIC: 300 (Control interno)

Con estos criterios se procede al análisis de cada uno de los resultados, acá mostraremos los controles C-POS, C-NEG, los cuales son los que le dan validez a la corrida actual

Control Positivo:



Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

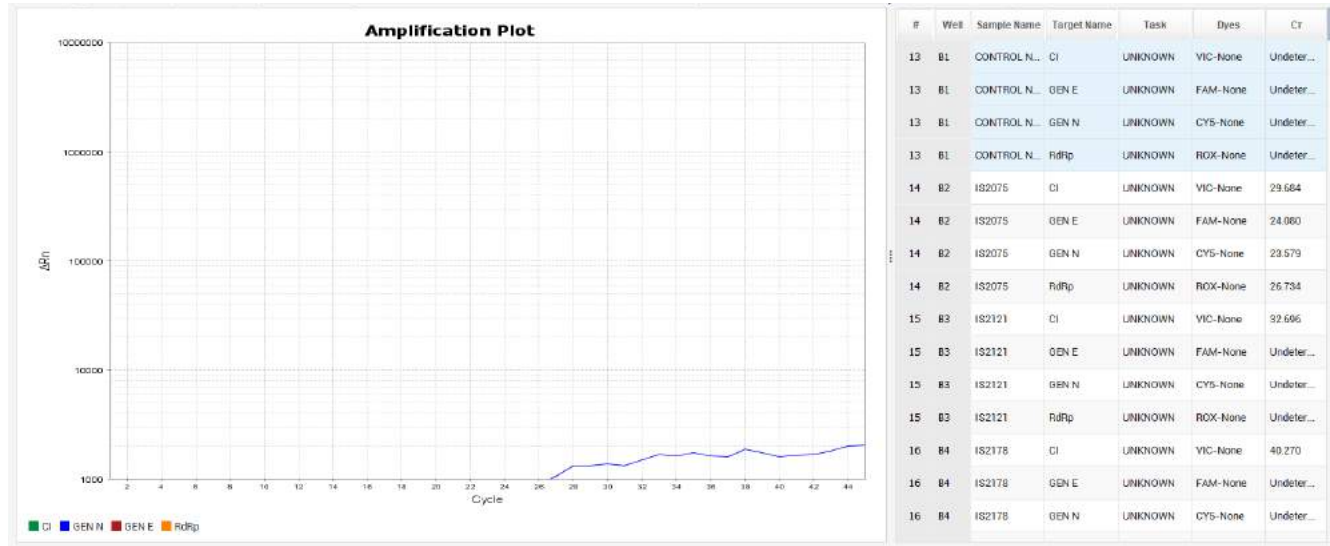
2020

Página

6 de 9

Se observa que los genes targets N, E, RdRP y el CI tienen un valor de Ct menor de 40 y se encuentran por encima del threshold, lo que valida el resultado como POSITIVO

Control Negativo:



En este resultado se puede observar que ninguno de los cuatro genes GEN N, el Gen E y el gen RdRP no superan el threshold como se esperaba, validándolo como resultado NEGATIVO. Fluorescencia emitida por el control interno tampoco fue detectadas en esta condición. Debe ser reportado que en sólo una pequeña fracción de los pozos analizados se encontró señal proveniente del control interno, así que hubo una falla en ese marcador a la que no se le encontró explicación. Es de notar, que este ensayo fue diseñado y validado originalmente por la casa comercial usando otros dispositivos de tiempo real diferentes al disponible en el I&I Lab. Sin embargo, las muestras previamente caracterizadas como positivas tuvieron señal de expresión de los 3 genes virales evaluados por el estuche comercial y en 18 de las 20 muestras previamente caracterizadas como negativas, no se encontró expresión de ningún gen viral. Estos hallazgos serán tratados en la sección de resultados.

Teniendo los controles del experimento, se reporta como **interpretable**.

Se inicia el análisis de los resultados de los pacientes cuyos resultados fueron los siguientes:

Tabla 3. Comparación de resultados generados en el laboratorio con los diferentes métodos que están validados

BERLÍN-CHARITÉ I&I LAB	RESULTADOS ALLPLEX				INTERPRETACIÓN	ANÁLISIS
	GEN E	GEN N	GEN RdRP			

Vigilada Mineducación



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

7 de 9

IS2009	NEGATIVO	IS2009	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2010	NEGATIVO	IS2010	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NO CONCORDANTE
IS2011	NEGATIVO	IS2011	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2014	POSITIVO	IS2014	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2039	NEGATIVO	IS2039	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2055	NEGATIVO	IS2055	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2060	NEGATIVO	IS2060	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NO CONCORDANTE
IS2075	POSITIVO	IS2075	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2080	NEGATIVO	IS2080	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2084	POSITIVO	IS2084	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2086	POSITIVO	IS2086	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2091	POSITIVO	IS2091	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2092	POSITIVO	IS2092	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2093	POSITIVO	IS2093	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2119	POSITIVO	IS2119	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2121	NEGATIVO	IS2121	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2123	POSITIVO	IS2123	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2125	POSITIVO	IS2125	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2127	POSITIVO	IS2127	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2139	POSITIVO	IS2139	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2156	NEGATIVO	IS2156	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2170	POSITIVO	IS2170	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2174	NEGATIVO	IS2174	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2178	NEGATIVO	IS2178	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2186	NEGATIVO	IS2186	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2187	NEGATIVO	IS2187	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2237	POSITIVO	IS2237	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2242	NEGATIVO	IS2242	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2248	POSITIVO	IS2248	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2252	NEGATIVO	IS2252	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2257	NEGATIVO	IS2257	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2263	POSITIVO	IS2263	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2265	POSITIVO	IS2265	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2267	POSITIVO	IS2267	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2270	NEGATIVO	IS2270	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2273	NEGATIVO	IS2273	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2844	NEGATIVO	IS2844	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE
IS2280	NEGATIVO	IS2280	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	CONCORDANTE

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

8 de 9

IS2737	POSITIVO	IS2737	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE
IS2831	POSITIVO	IS2831	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	CONCORDANTE

Los resultados mostrados en la Tabla 3, permiten por lo tanto construir la siguiente tabla de contingencia de 2x2:

Berlín-Charité		Allplex Seegen		Total
		Positivo	Negativo	
	Positivo	20	0	20
	Negativo	2	18	20
	Total	22	18	40

A partir de la Tabla 1 y de la tabla de contingencia se calcularon los siguientes valores:

Concordancia: 95% (38/40)

Sensibilidad: 100%

Especificidad 90%

Valor predictivo positivo: 90%

Valor predictivo negativo: 100%

Validez: 95%

Índice Kappa de Cohen: 0.9 Muy buena correlación.

Con esta cuarta validación se espera incorporar la técnica a nuestros protocolos para iniciar análisis de muestras de la región como apoyo al Laboratorio de Salud Pública Departamental, tan pronto como posible.

Nombre: Carlos F. Narváez
Jefe División de Inmunología
cfnarvaez@usco.edu.co
Facultad de Salud – Universidad Surcolombiana

Nombre: Adrianeth Castañeda Quevedo
Bacterióloga Lab. I&I
adrianeth.castaneda@usco.edu.co
Facultad de Salud – Universidad Surcolombiana



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO INFECCIÓN E INMUNIDAD**

INFORME GENERAL



CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

9 de 9

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

- Probabilities
- Distributions
- Frequency Data
- Proportions
- Ordinal Data
- Correlation & Regression
- t-Tests & Procedures
- ANOVA
- ANCOVA
- Miscellanea
- HOME

Values entered:

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	0	20	20
Test Negative	18	2	20
Totals	18	22	40

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.55	0.38659	0.703969
Sensitivity	0.909091	0.693756	0.984096
Specificity	1	0.781244	1

For any particular test result, the probability that it will be:

Positive	0.5	0.340633	0.659367
Negative	0.5	0.340633	0.659367

For any particular positive test result, the probability that it is:

True Positive	1	0.799547	1
False Positive	0	0	0.200453

For any particular negative test result, the probability that it is:

True Negative	0.9	0.668723	0.982487
False Negative	0.1	0.017513	0.331277

likelihood Ratios:

[C] = conventional

[W] = weighted by prevalence

Positive [C]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [C]	0.090909	0.024251	0.340789
Positive [W]	Infinity	NaN	Infinity
Negative [W]	0.111111	0.029514	0.418301

ANEXO 6

Boletín epidemiológico COVID-19 del 09 de marzo 2021 emitido por la Secretaría de Salud Departamental y la Gobernación del Huila que soporta el cumplimiento de meta del I&I Lab de la Universidad Surcolombiana en cuento a número de test realizados en población del Huila.



Secretaría de Salud
Departamental

BOLETIN EPIDEMIOLOGICO Covid-19

LABORATORIO DE SALUD PUBLICA DEL HUILA

Marzo 09 del 2021

TABLA 1. Relación de muestras

	Acumulado	Ultimas 24 Horas
Muestras tomadas en el LSPH	1757	26
Muestras recibidas de la red de laboratorios	6561	84
Total de muestras	8318	110

TABLA 2. Relación de muestras procesadas Antígeno

	Acumulado	Ultimas 24 Horas
Pruebas de Antígeno procesadas en el LSPH	391	1

TABLA 3. Relación de muestras procesadas RT-PCR

	Acumulado	Ultimas 24 Horas
Muestras procesadas en el LSPH	5689	92
Muestras procesadas por el Lab. Infección e Inmunidad U. Surcolombiana - Colaborador	2580	0
Total de muestras procesadas RT-PCR	8269	92

TABLA 4. Muestras procesadas RT-PCR con sospecha Covid-19

	NEGATIVO	INDETERMINADO	POSITIVO	EN PROCESO
Muestras procesadas en el LSPH	82	0	10	67
Muestras procesadas por el Lab. Infección e Inmunidad U. Surcolombiana - Colaborador	0	0	0	0
Total de muestras procesadas RT-PCR	82	0	10	67

TABLA 5. Muestras procesadas prueba Antígeno

	NEGATIVO	POSITIVO
Muestras procesadas en el LSPH en las ultimas 24 Horas	1	0
Muestras procesadas en el LSPH acumulado	287	104
Total de muestras procesadas prueba Antígeno	288	104

110 muestras fueron ingresadas en el Laboratorio de Salud Pública del Huila en las últimas 24 Horas dentro de las cuales se tomaron 26 en el LSPH. Se procesaron 92 RT-PCR en el LSPH, incluyendo 49 muestras que iniciaron proceso el día 2021-03-08.

En las ultimas 24 horas se proceso 1 prueba de Antígeno en el LSPH en pacientes sintomáticos.

Fueron identificados 10 nuevos casos para Covid-19 en las ultimas 24 horas en el LSPH.

ANEXO 7

Infografía con información de las actividades del proyecto y sus beneficios e impacto brindado a nivel regional. Esta infografía fue enviada al INS para posible publicación, siguiendo su solicitud. Los respectivos créditos a la fuente de financiación fueron registrados.

Antes de la colaboración con la Secretaría de Salud Departamental del Huila

PERSONAL - INFRAESTRUCTURA

TOTAL
4

Coordinador MD. Ph.D.
Bacterióloga
Técnico de laboratorio
Médica rural



Citometría de flujo



PCR-tiempo real



PCR-convenc.



Luminex

El I&I Lab contaba con infraestructura para estudios de Inmunología celular de enfermedades infecciosas aunque con baja disponibilidad y experiencia en métodos basados en biología molecular.

Momento del cambio

Colaboración



Consecución
de fondos

AVAL INS



26 diciembre 2020

INICIO DEL DIAGNÓSTICO

28 diciembre 2020

I&I Lab
USCO

Estado actual

PERSONAL - INFRAESTRUCTURA NUEVA - CAPACIDAD OPERATIVA ACTUAL

TOTAL
10

Coordinador MD. Ph.D.
Bacterióloga M.Sc. (4)
Técnico de laboratorio (2)
Médica rural en investigación
Médica interna - Inmunología
Asistente administrativa



Lector de microplacas
multimodo automatizado



Termociclador en
tiempo real



División de Inmunología - USCO



Extracción automatizada
de RNA/DNA



Incubadoras con CO₂



Cabina de bioseguridad II B2



Ultracongelación

Capacidad de análisis inicial:
30 muestras/día

Capacidad máxima:
220 muestras/día

2,850 especímenes
analizados ene-abril
2021

Fuentes de financiación

Red diagnóstica COVID-19

ANEXO 8

Ensayos de RT-qPCR para SARS-CoV-2 realizados a Médicos Internos como requerimiento de ingreso al Hospital Universitario de Neiva, abril 2021. Apoyo a personal de salud asistencial del departamento.

2-1-04-DECANATURA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD **MEMORANDO No. 0091**

Neiva, 2 de marzo de 2021

PARA: Dr. CARLOS FERNANDO NARVÁEZ ROJAS
Coordinador
Laboratorio de Infección e Inmunidad

DE: JULIO CÉSAR QUINTERO VIEDA
Decano


ASUNTO: Solicitud

Cordial saludo:

Teniendo en cuenta que el próximo 01 de abril de 2021 ingresan a realizar su año de Internado Rotatorio 56 estudiantes del Programa de Medicina de la Universidad Surcolombiana, y atendiendo a los requisitos que para su ingreso ha determinado el Hospital Universitario "Hernando Moncaleano Perdomo"; de manera respetuosa me permito solicitarle se estudie la posibilidad de que el Laboratorio de Infección e Inmunidad en el marco del convenio que se está desarrollando con la Secretaría de Salud Departamental, realice prueba PCR para SARS-CoV2 a los estudiantes en mención previo al ingreso a sus prácticas.

Agradezco su gestión y pronta respuesta.

Atentamente,


JULIO CÉSAR QUINTERO VIEDA
Decano

Proyectó: Diana M. Quintero



Realización de análisis de RT-qPCR SARS-CoV-2 a los nuevos Médicos Internos por parte de la División de Inmunología

1 message

Carlos Fernando Narváez <cfnarvaez@usco.edu.co>

Thu, Mar 18, 2021 at 4:53 PM

To: facultad ciencias de la salud usco <facsalud@usco.edu.co>

Cc: julio cesar quintero vieda <juliocesar.quintero@usco.edu.co>, programa de medicina fcs - usco usco <medicina@usco.edu.co>

Hola Decano,

Como la única sección de la Universidad avalada por la Secretaría de Salud Departamental y el Instituto Nacional de Salud para realizar ensayos moleculares de COVID-19 (como División aliada de la Secretaría de Salud Del Huila), la División de Inmunología dentro de su responsabilidad social apoyar la realización de los ensayos de RT-qPCR para detección de SARS-CoV-2 a los nuevos Médicos Internos, cubriendo los costos que esto implica. La fecha que se propone para esto es el **viernes 26 de marzo**. Esta fecha se debe a que la siguiente semana corresponde al receso de semana santa y tanto personal de planta como varios miembros adicionales de la División, no estarán disponibles por sucesos como la terminación de su contrato, así que durante esa semana no contará con el personal necesario.

El plan es el siguiente:

1. Toma de hisopados nasofaríngeos: viernes 26 de marzo 6:00am a 9:00am. Se dividirán a los estudiantes en 3 grupos citados a diferente hora para evitar aglomeraciones.
2. La toma de la secreción nasofaríngeo se hará en la zona de contención de la División (antiguo Biotrio).
3. Cada estudiante deberá llegar con la ficha epidemiológica impresa y diligenciada. Antes de la toma del especmen, cada estudiante deberá entregarla a un miembro asignado del equipo (la ficha epidemiológica en formato PDF la adjunto en este mensaje para su difusión).
4. Los resultados impresos los podrán reclamar con la señorita Sara Bolívar, quien es Médica Interna especial en Inmunología y hace parte de la misma promoción.

Cualquier inquietud, no dude en contactarme,

Cordialmente,

Carlos F. Narváez MD., Ph.D.


Jefe División de Inmunología

Programa de Medicina

Facultad de Salud

2 attachments

 **COVID19 INTERNOS.pdf**
271K

 **346_IRA_virus_nuevo_2020.pdf**
460K



NIT: **RESULTADOS ENSAYO DE RT-qPCR PARA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2**
MÉDICOS INTERNOS – UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

□ 26 marzo 2021

Nº	Cédula	Apellido	Nombre	Protocolo	Resultado
1	1075288441	ALVAREZ ZAMBRANO	LUIS ERNESTO	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
2	1075318213	BAUTISTA CRUZ	ANA MARIA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
3	1075284672	BAZURTO ROA	RAUL EMILIO	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
4	1075294114	BERMUDEZ PINZON	JUAN FERNANDO	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
5	1152470313	BOLIVAR MARIN	SARA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
6	1075300502	BONELL SERRATO	JUAN PABLO	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
7	1075264590	BURITICA PUENTES	WILSON	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
8	1075315395	CABRERA GONZALEZ	MIGUEL ANGEL	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
9	1075299653	CABRERA LAISECA	PAULA ANDREA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
10	1075311106	CABRERA VARGAS	STEFANY	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
11	1117541711	CADENA LONDOÑO	WILLIAM ENRIQUE	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
12	1075296952	CALDERON SILVA	LAURA CAMILA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
13	1075310924	CASTRO TRUJILLO	JUAN SEBASTIAN	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
14	1003815594	CEDEÑO CARDENAS	DANIELA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
15	1083869593	DIAZ ROSALES	YURANY ANDREA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
16	1080296417	DURAN MEDINA	JULIAN ANDRES	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
17	1075319088	DUSSAN ARAUJO	CAROL LIZZETH	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
18	1075307698	ECHAVEZ RUBIANO	EDUARDO YESID	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
19	1075317468	FERNANDEZ CAMACHO	LAURA LUCIA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
20	1083898948	GARCIA SANCHEZ	JOHAN SEBASTIAN	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo





NT-891180004-2

21	1110588366	GONZALEZ AVILES	JULIAN CAMILO	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
22	1075280030	GUTIERREZ GONZALEZ	JUAN CAMILO	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
23	1075307330	GUTIERREZ VARGAS	MARIA CAMILA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
24	1075299816	IZQUIERDO CORDOBA	DAVID CAMILO	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
25	1075293640	LOZANO RODRIGUEZ	JUAN FELIPE	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
26	1083899899	MUÑOZ MUÑOZ	DIEGO FERNANDO	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
27	1075312829	NOCUA ROLDAN	KAROL TATIANA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
28	1082779661	ORDOÑEZ MONCAYO	BELCY LORENA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
29	1075305169	ORTIZ CAVIEDES	JULIAN DAVID	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
30	1079184511	ORTIZ GUARACA	ASTRID JULIETH	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
31	1075294378	OSPINA CORREDOR	LEONARDO	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
32	1075316824	PALACIOS CALDERON	NICOLAS	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
33	1082778414	PEÑA LOPEZ	YADIRA LUCIA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
34	1075301964	PLAZA YAGUE	GLORIA ANGELICA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
35	1075317888	PUCCINY CORTES	JOSE RICARDO	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
36	1075298669	QUIROGA MEDINA	KAREN DANIELA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
37	1003811645	RAMIREZ LOPEZ	MARIA FERNANDA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
38	1075319519	RODRIGUEZ BERMEO	ROSA VALENTINA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
39	1075224638	ROMERO RAMIREZ	FEDERICO ANDRES	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
40	1077872945	RUIZ SUAREZ	MARIA JULIANA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
41	1075316699	SEDANO VIDARTE	MARIA ANGELICA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
42	1075315651	SENDOYA VARGAS	JESUS DAVID	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
43	1075306807	TOVAR PUELLO	NICOLAS	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo

CONSTRUYAMOS UNIVERSIDAD PARA EL DESARROLLO Y EL BUEN VIVIR

📍 Sede Central / Av. Pastrana Borrero - Cra. 1

📍 Sede Administrativa / Cra. 5 No. 23 - 40

🌐 www.usco.edu.co/ Neiva - Huila

☎ PBX: 875 4753

☎ PBX: 875 3686

☎ Línea Gratuita Nacional: 018000 968722





44	1075305081	TRUJILLO CAICEDO	ANDERSON	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
45	1075297184	URUEÑA SABOGAL	ENGIE ESTEFANIA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
46	1075296951	VARGAS CALDERON	MARIA DANIELA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
47	1083872954	JAIME MENESES	DANIEL EDUARDO	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo
48	1075271963	MEDINA CAMPIÑO	VIVIANA MARIA	RT-PCR Charité- Berlín	Negativo

Ensayos realizados en el Laboratorio de Infección e Inmunidad (I&I Lab) de la División de Inmunología – Programa de Medicina – Universidad Surcolombiana, en el marco del proyecto de Investigación financiado por el Sistema General de Regalías código BPIN 2020000100145 de alianza entre la Gobernación del Huila y la Universidad Surcolombiana. El I&I Lab es un Laboratorio colaborador de la Secretaría de Salud Departamental del Huila, avalado por el Insituto Nacional de Salud (INS). Los anteriores resultados fueron registrados en el sistema de registro Nacional de pacientes y resultados SISMUESTRAS (dentro de las primeras 12h de tomados los especímenes) y enviados a cada uno de los Médicos Internos oportunamente.

Cordialmente,


CARLOS FERNANDO NARVÁEZ MD., Ph.D.
Jefe División de Inmunología
Programa de Medicina
Universidad Surcolombiana
Teléfono: 57-8-8718310 Ext: 3144
cfnarvaez@usco.edu.co

Rodrigo Trujillo
05-Abr-2021
Hs 11:53 am

Vigilada Mineducación



ANEXO 9

Protocolo de la RT-PCR convencional de serotipificación de DENV1-4. Este documento fue presentado y registrado en el sistema de calidad de la Universidad Surcolombiana.



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



1. OBJETIVO

Describir la metodología que el Laboratorio de Infección e Inmunidad empleará para la extracción del RNA viral a partir de Plasma para realizar la amplificación por RT-PCR CONVENCIONAL para la detección del virus para DENGUE Virus.

2. ALCANCE

Este procedimiento aplica a todas las muestras que ingresen para DENGUE al Laboratorio de Infección e Inmunidad, para la detección o tipificación del Virus. Inicia desde la recepción, conservación, extracción de RNA y finaliza con la tipificación y lectura de los serotipos por electroforesis.

3. LÍDER DEL PROCEDIMIENTO:

Está a cargo de bacteriólogos (a) capacitados para el procesamiento de detección y tipificación de DENGUE.

4. REFERENCIAS NORMATIVAS Y DOCUMENTALES

No Aplica

LANCIOTTI

5. DEFINICIONES

- **DENGUE:** El dengue es una enfermedad viral aguda, endémica, causada por un arbovirus de la familia Flaviviridae y transmitida por la picadura de hembras de mosquitos del género Aedes, principalmente el aegypti. El virus posee cuatro serotipos (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4), los cuales



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO PARA IDENTIFICACIÓN
DE DENGUE



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR-13

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

PÁGINA

2 de 21

están circulando simultáneamente en nuestro país. Los serotipos no desencadenan inmunidad cruzada, lo cual significa que una persona puede infectarse y enfermar hasta cuatro veces.

- **RT:** Es el proceso mediante el cual el RNA se convierte en cDNA por acción de la enzima Retotranscriptasa
- **PCR ANIDADA:** Es una variable de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y especificidad de la detección.
- **Cebador y/o iniciador:** secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el método PCR se emplea un par de cebadores para hibridar con el ADN de la muestra y definir la región del ADN que será amplificada. También se les conoce como oligonucleótidos. (Institute, 2019).
- **Extracción de material genético:** Se le llama extracción al método por el cual se obtiene el ADN o RNA a partir de material biológico (Hisopado, aspirados, cepillado bucal, saliva, sangre o cualquier tejido) utilizando técnicas físicas y químicas. Consiste en la separación y purificación del ADN o RNA con el fin de poder estudiarlo, analizarlo o manipularlo. (Rojas, 2017).

6. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD

Nº	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1.	Preparación de Materiales, Equipos y Reactivos	Se preparan equipos, materiales y reactivos para iniciar el procedimiento de extracción y amplificación. EXTRACCION DE RNA VIRAL <ul style="list-style-type: none"> • EQUIPOS <ul style="list-style-type: none"> ✓ Cabina de flujo laminar ✓ Centrifuga ✓ vortex 	Auxiliar de Laboratorio	Ninguno

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO PARA IDENTIFICACIÓN
DE DENGUE



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



PÁGINA

3 de 21

CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR-13

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

✓ kit de micropipetas

• **MATERIALES**

- ✓ Tubos eppendorf estériles de 1.5 ml
- ✓ Puntas de 10 µl, 200 µl y 1000 µl
- ✓ Marcador permanente
- ✓ Guantes
- ✓ Bata

• **REACTIVOS**

- ✓ Kit de Extracción
- ✓ Etanol 99%

PREPARACION DE CARRIER

Adicionar 310 µg de carrirer a los 31 ml de buffer AVL.

Alicuotar 560 µl de AVL + Carrier en eppendorf de 1.5 ml y guardar a -20°C hasta su uso.

Adicionar etanol absoluto en la cantidad indicada al buffer AW1 y AW2

TRANSCRIPCION REVERSA DENGUE

• **EQUIPOS**

- ✓ Cabina de flujo laminar
- ✓ termociclador

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO PARA IDENTIFICACIÓN
DE DENGUE



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



PÁGINA

4 de 21

CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR-13

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

- ✓ Serófuga
- ✓ vortex
- ✓ kit de micropipetas

• **MATERIALES**

- ✓ Tubos eppendorf estériles de 600 µl y 200 µl
- ✓ Puntas de 1000 µl, 200 µl, 10 µl con filtro
- ✓ Gradilla
- ✓ Escacha
- ✓ Bloque enfriador
- ✓ Marcador permanente
- ✓ Guantes
- ✓ Bata

• **REACTIVOS**

- ✓ Buffer 5x RT
- ✓ dNTPs (d ATP, d CTP, dGTP, dTTP) a una concentración de 10 mM
- ✓ MgCl₂ 25 mM
- ✓ RNAsin (40u/ µl) Promega
- ✓ Transcriptasa reversa AMV Promega
- ✓ DTT
- ✓ Agua Nucleasas Free
- ✓ Go taq polimerasa

PRIMERS

- ✓ Primer reverso D2 (1 µg/ µl)

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



- ✓ 5'-TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC 3'
- ✓ Primer D1 (1 µg/ µl)
- ✓ 5' TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G 3'
- ✓ TS1: 5'-CGT CTC AGT TGA TCC GGG GG 3'
- ✓ TS2: 5'-CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG 3'
- ✓ TS3: 5'-TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C 3'
- ✓ Ts4: 5'-CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A 3'

PREPARACION DE dNTPs

- ✓ Los 4 vienen todos a una concentración de 100mM, si mezclamos partes iguales de cada uno de ellos quedan a una concentración de 25 mM. Ósea, en eppendorf de 600 ul adicionar:
- ✓ 100 µl de d ATP 100 mM+100 µl de d CTP 100mM +100 µl de GTP 100mM + 10 µl de dTTP 100 mM = 400 µl de dNTPs 25 mM
- ✓ Para RT necesitamos dNTPs 10 mM así que tomamos 80 µl de dNTPs 25 mM y le adicionamos 120 ul de agua nucleasas free.
- ✓ Alicuotamos de 50 µl por balita.
- ✓ Para R1 y R2 necesitamos dNTPs 2.5 mM así que tomamos 50 ul de dNTPs 25 mM y le adicionamos 450 ul de agua nucleasas free.
- ✓ Alicuotamos en balitas con 110 ul cada una.



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



PREPARACION DE D1+D2

Mezclar volúmenes iguales de D1 + D2 cada uno a una concentración de 1 µg/µl

PREPARACION DE D1+TSx

Mezclar volúmenes iguales de D1 + cada uno de los primers específicos, cada uno a una concentración de 1 µg/µl

ELECTROFORESIS

- **EQUIPOS**

- ✓ Balanza
- ✓ Plancha electromagnética
- ✓ Pipeta exclusiva para el bromuro de etidio
- ✓ Cámara de electroforesis

- **MATERIALES Y REACTIVOS**

- ✓ Frascos termo-resistentes de 250 ml, 500 ml y 2000 ml
- ✓ Buffer TBE
- ✓ Agarosa
- ✓ Bromuro de etidio
- ✓ Agua destilada esmeril
- ✓ Marcador de peso 100pb

PREPARACION DE BUFFER TBE 0.5X



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



- ✓ A 500 ml agua destilada estéril adicionar 4.25 g de TBE
- ✓ A 1000 ml agua destilada estéril adicionar 8.5 g de TBE
- ✓ A 2000 ml de agua destilada estéril, adicionar 17 g de TBE
- ✓ Mezclar en la plancha electromagnética

PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA 2%

- ✓ Para el molde de 40 pozos:
- ✓ 150 ml buffer TBE 0.5 X más 3 g de agarosa
- ✓ Llevar a ebullición en la plancha electro magnética
- ✓ Agregar 5.0 µl de bromuro de etidio
- ✓ Echar al molde
- ✓ Dejar enfriar 1 hora

PREPARACION DEL MARCADOR DE PESO PROMEGA 50pb

- ✓ 2.0 µl Buffer 6X
- ✓ 2.0 µl Lader
- ✓ 8.0 µl Agua destilada

- ✓ Para 6 posos: 16µl de buffer 6X + 16µl de Ladder + 48 µl agua

- ✓ Hacer mapa de del gel y sembrar 10 µl de muestra C-
C+ y control de PCR en su respectivo pozo



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD**

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO PARA IDENTIFICACIÓN
DE DENGUE**



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR-13

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

PÁGINA

8 de 21

		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Correr por 2 hora a 110 voltios 		
2.	INTERFERENCIAS	<ul style="list-style-type: none"> • La técnica RT-PCR es muy sensible y podría mostrar amplificación ante cualquier contacto con agente contaminante, debido a la presencia de nucleasa fluorogénica 5', se deben tomar precauciones especiales para evitar amplificaciones de falsos positivos. • La calidad de la muestra clínica es de gran importancia para la prueba, por tal motivo debe conservar en cadena de frio. • Los analistas deben estar entrenados y familiarizados con los procedimientos de recolección de muestras y la interpretación de los resultados previo a la realización de la prueba. 	Bacteriólogo	Ninguno
3.	CONDICIONES DE LA MUESTRA	<p>El traslado de las muestras biológicas al Laboratorio de Infección e Inmunidad, debe efectuarse de acuerdo con las normas de transporte de muestras biológicas de la IATA. centrifuge y alicuote las muestras en eppendorf de 1.5 ml previamente marcados con el código (en la tapa), el nombre del paciente y la fecha de toma de muestra (en el cuerpo del tubo) y almacene las muestras a -70° C hasta su uso.</p> <p>Una vez realizada la extracción de la muestra sea por técnica manual o automatizada, deberá evitarse el</p>	Bacteriólogo	MI-INV-LAB-FO-39 Criterios de Rechazo de muestras

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD**

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO PARA IDENTIFICACIÓN
DE DENGUE**



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

CÓDIGO**MI-INV-LAB-PR-13****VERSIÓN****1****VIGENCIA****2020****PÁGINA****9 de 21**

		congelamiento y descongelamiento repetidos de los extractos con el fin de prevenir la pérdida de infectividad. Los ácidos nucleicos RNA se deben conservar a $-70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.		
CONTROLES MATERIAL REFERENCIA	Y DE	<p>Cada vez que se realiza el montaje de la técnica de RT-PCR se deben utilizar los controles de:</p> <ul style="list-style-type: none"> • MOCK (Control de extracción o Control Negativo): no debe mostrar amplificación • Control positivo (mix de los cuatro sobrenadante de los serotipos de Dengue): Debe mostrar amplificación 	Bacteriólogo	Ninguno

6.2 ENSAYO

Nº	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1.	Recomendaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Todos los materiales deben ser libres de RNAsas y DNAsas y por lo tanto deben manipularse bajo condiciones estrictas de esterilidad para evitar su contaminación. • Mantener separadas las áreas de preparación de reactivos y mezclas de reacción del área de extracción de ácidos nucleicos. • Mantener separados los equipos (como pipetas y microcentrífuga) y los materiales (como tubos para microcentrífuga y puntas de pipeta) para la preparación de las mezclas de los reactivos y el manejo de los ácidos nucleicos extraídos. 		

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD**

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO PARA IDENTIFICACIÓN
DE DENGUE**



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

CÓDIGO**MI-INV-LAB-PR-13****VERSIÓN****1****VIGENCIA****2020****PÁGINA****10 de 21**

		<ul style="list-style-type: none"> Utilizar una bata de laboratorio limpia o bata desechable antifluído y guantes desechables nuevos y sin talco, cuando prepare los reactivos y las mezclas. Mantenga los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos. Conservar el flujo de trabajo el cual va desde el área limpia al área sucia, no deben devolverse porque esto generará contaminaciones. Mantener todos los reactivos en una gradilla fría o con hielo durante la preparación de las pruebas. Las perlas magnéticas se les debe realizar Vortex hasta que no se visualice sedimento Dar vórtex a todos los primers. Dar un spin brevemente (1 o 2 segundos) a los primers. luego colocar en un congelador (-20 °C) lo primers. Realice la descongelación de los componentes para preparación para su mezcla Maestra. 		
2.	Alistamiento de las muestras	<ul style="list-style-type: none"> Las muestras luego de ser recolectadas en tubo EDTA, deben ser centrifugadas durante 10 minutos a 200g y luego separar el plasma y congelar a -70°C Las muestras se deben descongelar inicialmente a 20 minutos en refrigeración y luego 30 minutos a temperatura ambiente. Previo a su procesamiento, la muestra debe ser centrifugada nuevamente por 10 minutos a 10000 rpm Las muestras almacenadas se deben registrar en MI-INV-LAB-FO-91 SEROTECA DENGUE 	Bacteriólogo	MI-INV-LAB-FO-91 SEROTECA DENGUE
3.	Extracción de RNA a partir de un estuche comercial	Para Evitar la degradación del RNA, es necesario trabajar en un ambiente limpio y libre de RNAsas; se debe usar material nuevo y los reactivos se deben preparar en agua Libre de RNAsa.	Bacteriólogo	MI-INV-LAB-FO-36 HOJA DE TRABAJO EXTRACCIÓN

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



Las RNAsas exógenas están presentes en manos, piel, cabello y mesones, por lo tanto, se deben usar guantes y bata, limpiar exhaustivamente los mesones, recogerse el cabello o usar gorro y no permitir que los materiales y muestras tengan contacto con alguna superficie.

Las técnicas de extracción pueden variar dependiendo del estuche de la casa comercial que se utilice, se deben seguir paso a paso las recomendaciones del fabricante. Actualmente se pueden emplear estuches los cuales son recomendados por la CDC para llevar a cabo dicha técnica:

• **EXTRACCION DE RNA VIRAL QIAGEN:**

- ✓ Marcar cada columna y tubo eppendorf de 1.5 ml con su número
- ✓ En eppendorf de 1.5 ml:
 - 560 µl de AVL + Carrier
- ✓ Adicionar 140 µl de Mx, C- (suero de paciente sano) y C+ (20 µl mix de sobrenadante de cultivos virales)
- ✓ Vortex 15 segundos
- ✓ Dejar a temperatura ambiente 10 minutos
- ✓ Adicionar 560 µl de etanol 99%
- ✓ Vortex 15 segundos
- ✓ Adicionar cuidadosamente 630 µl a la columna correspondiente
- ✓ Centrifugar 6000 g por 1 minuto
- ✓ Cambiar de tubo
- ✓ Adicionar los restantes 630 µl a la columna y Centrifugar a 6000 g por 1 minuto
- ✓ Cambiar de tubo
- ✓ Adicionar a las columnas
 - 500 µl de buffer AW1
- ✓ Centrifugar a 6000 g por 1 minuto



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD**

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO PARA IDENTIFICACIÓN
DE DENGUE**



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

CÓDIGO**MI-INV-LAB-PR-13****VERSIÓN****1****VIGENCIA****2020****PÁGINA****12 de 21**

- ✓ Cambiar de tubo
- ✓ Adicionar a las columnas
 - 500 µl de buffer AW2
- ✓ Centrifugar a 20000 g por 3 minutos
- ✓ Colocar la columna en tubo de eppendorf de 1.5 ml previamente marcado
- ✓ Adicionar 50 µl de agua ultrapura estéril a la columna
- ✓ Dejar a temperatura ambiente por 5 minutos
- ✓ Centrifugar a 6000 g por 1 minuto
- ✓ Pasar nuevamente el filtrado por la columna y Centrifugar a 6000 g por 1 minuto.

El RNA es estable 1 año de -20°C a -70°C

**PROCEDIMIENTO
PARA LA RETRO-
TRASNCIPTASA**

EN EL CUARTO BLANCO

- ✓ En tubos de 0.2 ml colocar 1 µl de D2
- ✓ Preparación del mix de RT (eppendorf de 0.2 ml)

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOL. PARA 1 RX
Buffer	5x	4 µl
dNTPs	10mM	1 µl
RNA sin	40 u/µl	0.25µl
DTT		0.5 µl
AMV	10 u/ µl	1 µl

Bacteriólogo

MI-INV-LAB-
FO-37 HOJA
DE TRABAJO
RT-qPCR

5

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



Nota: sacar del congelador la enzima **únicamente** en el momento de adicionarla al mix y mantener en escarcha

EN CUARTO GRIS

- ✓ Adicionar 10 µl de RNA.
- ✓ spin down
- ✓ Llevar a 72°C por 5 minutos

(Termociclador: menu A: dengue, programa alineamiento)

Nota: colocar los tubos en el termociclador cuando este tenga la temperatura requerida (72°C)

Inmediatamente hayan pasado los 5 minutos colocar en escarcha 5 minutos más.

CUARTO GRIS

- ✓ Adicionar 6. µl del mix a cada tubo D2 + RNA
- ✓ llevar a 42°C por 1 hora + 95°C por 5 minutos
- ✓ (Termociclador: Menu:A Dengue, Programa RT)
- ✓ Se obtiene 17 µl de Cdna. Guardar a -20°C
- ✓ A los 17 µl del cDNA obtenido adicionar 68 µl de agua nucleasas free para obtener cDNA (1:5) guardar a -20°C



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



PCR ANIDADADO PARA DENGUE ROUND 1

CUARTO BLANCO

Preparar el mix

- ✓ Mix R1 (eppendorf de 0.6 ml)
- ✓ Dar vortex a todos los reactivos antes de utilizarlos (menos a la enzima).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOL. 1 RX
Agua free		15 µl
Buffer	5x	5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 µl
D1 + D2	1µg/µl	0.5 µl
Taq pol	5u/µl	0.25µl

- ✓ Reacciones: (C-, Mx, C+, PCR)
- ✓ Mantener El escarcha la Taq Pol hasta el momento de adicionar la al mix.
- ✓ Repartir 22.5 µl del mix en eppendorf de 0.2 ml marcados y



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



EN CUARTO GRIS

- ✓ Adicionar: cDNA (1:5) 2.5 µl

PERFIL TÉRMICO

Temperatura	tiempo	Numero de ciclos	
95°C	1 min	1	Desnaturalización inicial
94 °C	45 seg	30	desnaturalización
56 °C	45 seg		Alineamiento
72 °C	1 min		Extensión
72 °C	7 min	1	Extensión final
4 °C	For ever		

- ✓ De esta PCR se espera obtener un fragmento de 511 bp
- ✓ Si no se hace el R2 en seguida de guarda el producto a -20°C o 4°C
- ✓ En eppendorf de 0.2 ml adicionar 99 µl de agua free + 1 µl de producto de R1 (vortex) para obtener R1 (1:100)



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD**

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO PARA IDENTIFICACIÓN
DE DENGUE**



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

CÓDIGO**MI-INV-LAB-PR-13****VERSIÓN****1****VIGENCIA****2020****PÁGINA****17 de 21****PERFIL TÉRMICO**

Temperatura	tiempo	Numero de ciclos	
95°C	1 min.	1	Desnaturalización inicial
94 °C	45 seg.	40	desnaturalización
60 °C	45 seg.		Alineamiento
72 °C	1 min.		Extensión
72 °C	7 min.	1	Extensión final
4 °C	For ever		

- ✓ Al final de este PCR se espera obtener:
- D1 482 bp
 - D2 119 bp
 - D3 290 bp
 - D4 392 bp

8**Montaje en el Termociclador****PROGRAMACION DEL TERMOCICLADOR**

- ✓ Verificar que el equipo se encuentre conectado a la toma corriente

Bacteriólogo

MI-INV-LAB-FO-37 HOJA DE TRABAJO RT-qPCR

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD**

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO PARA IDENTIFICACIÓN
DE DENGUE**



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

CÓDIGO**MI-INV-LAB-PR-13****VERSIÓN****1****VIGENCIA****2020****PÁGINA****18 de 21**

- ✓ Encender el equipo del botón que se encuentra en la parte trasera derecha.
- ✓ Esperar a que se inicie aproximadamente 3 minutos.
- ✓ Tocar la opción Brows/new methods
- ✓ En el listado de los métodos buscar con la flecha hacia abajo el perfil térmico que se va a correr (Alineamiento, RT_Dengue, Den R1, PCR ÚNICAMENTE), según lo que se vaya a correr en el momento
- ✓ Tocar el perfil térmico deseado el cual se pondrá de un color azul
- ✓ Tocar Start Run
- ✓ Aparece una pantalla con los parámetros de corrido y tocar Start Run Now
- ✓ Esperar a que corra el Perfil térmico

ELECTROFORESIS

Para realizar la toma de las fotos del gel de PCR convencional, nos remitimos al equipo Gel Doc™ XR+ de BIO RAD y seguimos los siguientes pasos:

- ✓ Prenda el PC y el fotodocumentador en la parte inferior izquierda
- ✓ Dar click sobre el icono Quantity One en el PC
- ✓ Vamos a FILE y dar click en GEL DOC XR
- ✓ Abrir la parte inferior del quipo y colocar el gel en el transiluminador de luz UV
- ✓ Dar click en Epi White, verificar que el gel haya quedado en la posición correcta, de no quedar bien puesto abrir la Puerta superior del equipo y moverlo para dejarlo en la posición adecuada, volver a cerrar la tapa
- ✓ Dar click en Trans UV y click en Auto Expose, esperar a que las bandas aparezcan y dar click en Freeze, si el gel esta derecho y se observan bien las bandas y se ve interpretable se da click en Save
- ✓ Buscar la carpeta donde va a quedar guardado y colocar a la fecha que aparece el nombre de la prueba que se va a analizar, dar click en guardar
- ✓ Para marcar el gel abrir la imagen, dar click en la pestaña ABC, se abren las herramientas de texto se da click de nuevo en ABC de la barra de herramientas

Bacteriólogo

No Aplica

Vigilada Mineducación



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD**

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO PARA IDENTIFICACIÓN
DE DENGUE**



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

CÓDIGO**MI-INV-LAB-PR-13****VERSIÓN****1****VIGENCIA****2020****PÁGINA****19 de 21**

- ✓ Se da click sobre la imagen, y empezar identificar cada pozo con lo que se corrió en cada uno, elegir el tamaño de la letra, color y la dirección al texto
- ✓ Una vez escrita la identificación se da ok y se ubica en cada una de las posiciones del gel.
- ✓ Una vez marcado todos los pozos y el gel se da click en FILE luego EXPORT TO JPEG IMAGE
- ✓ En el cuadro desplegado colocar QUALITY 100%, dar click en EXPORT y guardar en la misma carpeta donde se guardó el primer archivo
- ✓ al cerrar la imagen se abre un cuadro de dialogo donde pregunta que, si se desea guardar los cambios hechos a la imagen, dar click en SAVE
- ✓ Una vez terminado de tomar las fotos, sacar el gel y depositarlo en bolsa roja
- ✓ Limpiar el transiluminador de luz UV, con una toalla desechable
- ✓ Cierre el programa
- ✓ Apague el equipo

NOTA: en el escritorio del PC está el manual de funcionamiento del equipo

Interpretación de Resultados

El peso correspondiente a cada uno de los serotipos con los primers referenciados por Lanciotti son los que se indican en la siguiente tabla:

Primer	Sequence	Genome position ^a	Size, in bp, of amplified DNA product (primers) ^b
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGGCGGAGAAACCG-3'	134-161	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-3'	616-644	511
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	568-586	482 (D1 and TS1)
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	232-252	119 (D1 and TS2)
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421	290 (D1 and TS3)
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	506-527	392 (D1 and TS4)

Bacteriólogo

MI-INV-LAB-FO-91
SEROTECA
DENGUE

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



6. OBSERVACIONES

- El ARN debe mantenerse siempre en frío y debe evitarse congelar y descongelar repetidamente.
- Utilizar equipos, cubículos y cabinas de bioseguridad exclusivos para todos los procedimientos preparativos de una PCR (pre-PCR). Los análisis y procesos de manipulación de ácidos nucleicos, amplificación y análisis posteriores (post-PCR) deben ser realizados en cubículos separados usando elementos y equipos exclusivos para estos trabajos. No compartir ningún equipo ni elemento (incluyendo guantes, batas, marcadores) entre los procedimientos pre-PCR y post-PCR.
- Se recomienda tener áreas o espacios separados, cada uno con sus batas, equipos y elementos, así: área de pre-PCR o preparación de reactivos; área de manipulación de ARN de muestras; área de manipulación de controles positivos (esta última es ideal pero no obligatoria); área de amplificación.
- Usar guantes a lo largo de todos los experimentos para prevenir la contaminación con ribonucleasas (ARNasas) que están presentes en las manos.
- Contar con un juego de micropipetas dedicado exclusivamente al trabajo con ARN.
- Usar puntas con filtro y tubos sean libres de ARNasas.
- Usar químicos y reactivos libres de ARNasas.
- Para reducir la contaminación con ARNasas se debe limpiar las gradillas, las micropipetas y las superficies de trabajo (mesones y/o cabina de PCR) con una solución de eliminación de estas enzimas (por ejemplo RNAZap) o con hipoclorito de sodio al 0.5% antes y después de su uso.
- Para reducir la contaminación con ácidos nucleicos se recomienda el uso de luz ultravioleta durante 15 minutos en las cabinas donde trabaje.

7. DOCUMENTOS REFERENCIADOS:

- Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. ROBERT S. LANCIOTTI, CHARLES H. CALISHER, DUANE J. GUBLER, GWONG-JEN CHANG, AND A. VANCE VORNDAM.1992.
- Insertos de los Kit comerciales de QIAGEN.

8. CONTROL DE CAMBIOS

VERSION

DOCUMENTO Y FECHA DE APROBACIÓN

DESCRIPCIÓN DE CAMBIOS

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO PARA IDENTIFICACIÓN
DE DENGUE



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



CÓDIGO	MI-INV-LAB-PR-13	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2020	PÁGINA	21 de 21
1						Creación de Documento	

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
SANDRA LILIANA DELGADO MARTINEZ Bacterióloga Líder de Calidad VoBo: CARLOS FERNANDO NARVAEZ Coordinador Laboratorio de Infección e Inmunidad	Profesional de Apoyo SGC	MAYRA ALEJANDRA BERMEO BALAGUERA Coordinador SGC

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.