



INSTITUTO
NACIONAL DE
SALUD



MINISTERIO DE SALUD
Y PROTECCIÓN SOCIAL





INSTITUTO
NACIONAL DE
SALUD

RECOMENDACIONES DE OPERACIÓN: DETECCIÓN DE VIRUS DE LA VIRUELA SIMICA

Dirección de Redes en Salud Pública

Laboratorio Nacional de Referencia

Grupo de Virología

María Fernanda Carreño / Hernán Darío Castiblanco

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD



Condiciones de infraestructura.



Uso de los elementos de protección personal.



Buenas y seguras prácticas de laboratorio (Flujos de trabajo).



Procedimientos estándar para limpieza y desinfección (áreas, equipos y EPP*).



ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- **Norma EN ISO 374:2016:Guantes de protección contra sustancias químicas y microorganismos**

BIOLÓGICA	ENISO374-5:2016	ENISO374-5:2016
		VIRUS
	Bacterias y hongos	Bacterias, hongos y virus Test ISO 16604:2004 (Método B) Reglamento EPI (UE) 2016/425

Tipo de guantes	Exigencia	Marcado
Tipo A	Resistencia a la penetración (En374:2) Tiempo de resistencia \geq 30 minutos para al menos 6 sustancias químicas.	ENISO374-1:2016
Tipo B	Resistencia a la penetración (En374:2) Tiempo de resistencia \geq 30 minutos para al menos 3 sustancias químicas.	ENISO374-1:2016
Tipo C	Resistencia a la penetración (En374:2) Tiempo de resistencia \geq 10 minutos para al menos 1 sustancia química.	ENISO374-1:2016

Tomado y adaptado de: <https://www.mapa-pro.es/normas/norma-en-374-quimica>

- **Protección respiratoria**

- ✓ Uso de respiradores del alta eficiencia para partículas N95, N100, FFP2 O FFP3.
- ✓ Idealmente sin válvula.
- ✓ Norma EN 143:2021 o NIOSH-CDC.



Uso de filtros para partículas

- ✓ Los respiradores deben ajustar al tamaño de la cara de la persona. Seleccionar las tallas y las pruebas de ajuste son ideales.

Tomado: EN 143:2021 Dispositivos de protección respiratoria. Filtros de partículas. Requisitos, pruebas, marcado.



ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL



ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- ¿Como verificar si los respiradores N95 están aprobados por la NIOSH / CDC?



CDC Centers for Disease Control and Prevention
CDC 24/7: Saving Lives. Protecting People.™

The National Personal Protective Technology Laboratory (NPPTL)

Certified Equipment List

Search

General Cautions and
Limitations

Definitions of Terms

Prior Manufacturers Names

NPPTL Homepage

A to Z Index

For Respirator Users

For Respirator Manufacturers

Protective Clothing and
Ensembles

Protective Technology

Program at NIOSH

Respirator Trusted-Source
Information

Approved Particulate
Filtering Facepiece
Respirators

[Certified Equipment List](#) > [Search](#)

Promoting productive workplaces
through safety and health research **NIOSH**®

TC (Approval) Number

Quick Searches

Advanced Search

Instructions and Tips

Maximum number of records returned in a set:

50

For a specific respirator or respirators, enter the NIOSH TC approval number(s) separated with semi-colon; Each class of respirator must be entered separately. Format with approval code (13F, 13G, 14G, 19C, 21C, 23C or 84A), followed by a dash and the 3 or 4 numbers following.

TC-00-0000



Order the results by:

Approval Number

Manufacturer Name

[View Results](#) [Reset](#)



ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Norma EN 14126:2004/AC:2006 Ropa protectora: Requisitos de desempeño y métodos de prueba para ropa de protección contra agentes biológicos.



TIPO	NORMA	PROTECCIÓN
TIPO 3-B	UNE-EN-14605	Traje cuerpo completo. Herméticos a líquidos presurizados, en forma de chorro.
TIPO 4-B	UNE-EN-14605	Traje cuerpo completo. Hermético líquidos presurizados
TIPO 5-B	UNE-EN ISO 13982-1	Traje cuerpo completo. Conexiones herméticas frente a partículas sólidas suspendidas en el aire.
TIPO 6-B	UNE-EN 13034	Traje cuerpo completo. Ofrecen una protección limitada frente a salpicaduras de productos químicos líquidos.



CONSIDERACIONES DE BIOCONTENCIÓN



Uso de barreras físicas y mecánicas.



Correcto manejo, transporte y disposición de residuos de riesgo biológico.



Todos los residuos generados son considerados de riesgo biológico.



Disminución de riesgo mediante inactivación por calor o química.

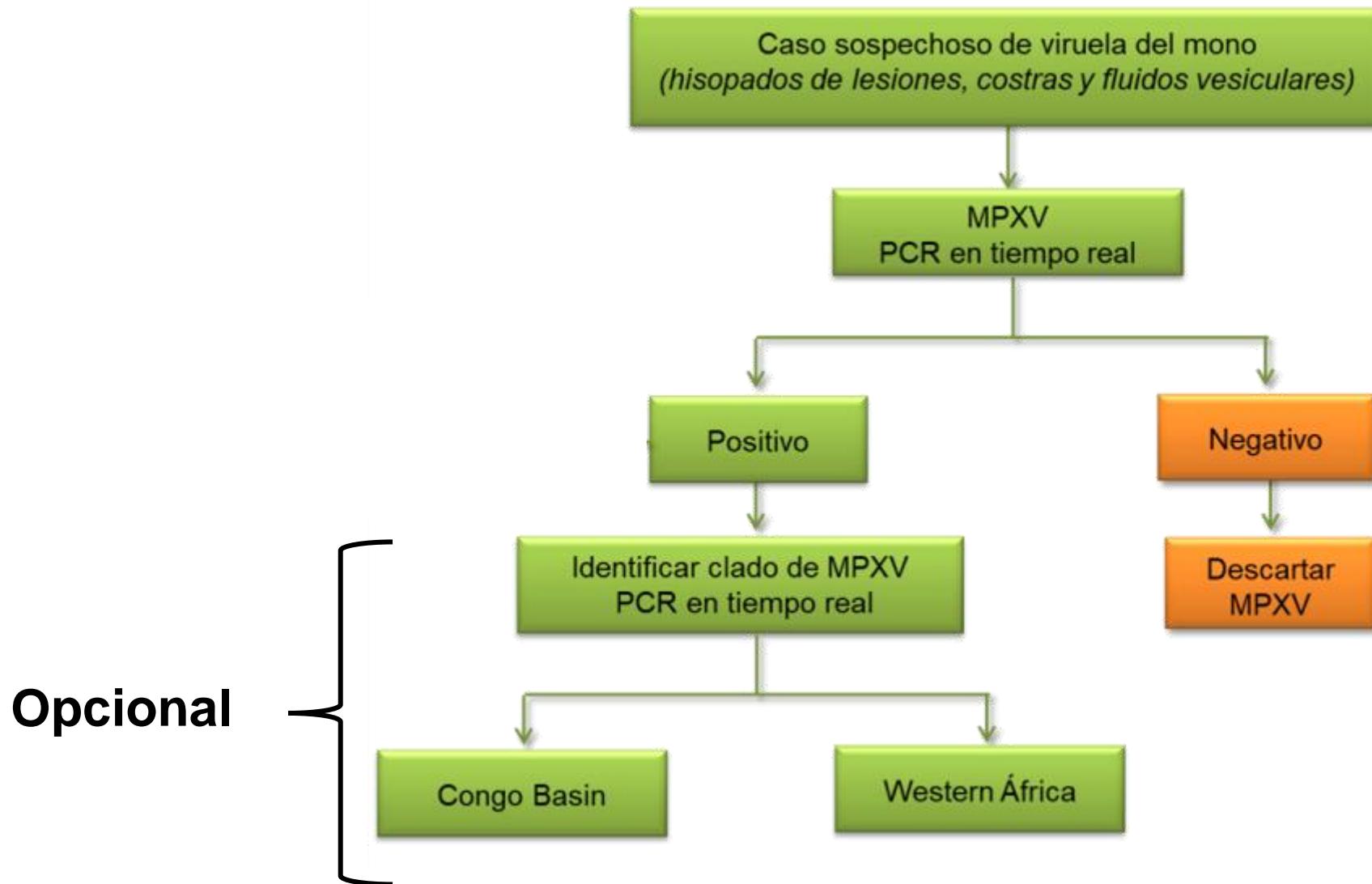


CONSIDERACIONES DE BIOCUSTODIA

-  Acceso restringido al personal no autorizado.
-  Almacenamiento seguro y controlado del material biológico.
-  Inventario actualizado (continuamente) del material biológico para evitar perdida, daño o sustracción accidental o intencionada.
-  Compromiso con los compañeros de trabajo, la comunidad y el medio ambiente.



ALGORITMO DE DETECCIÓN MOLECULAR



Fuente: Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus de la viruela del mono 23 mayo 2022-



IMPLEMENTACIÓN DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Evaluación del riesgo en bioseguridad debe ser un proceso constante y sistematizado que permita conocer las probabilidades de incidentes o accidentes de riesgo biológico en su laboratorio.

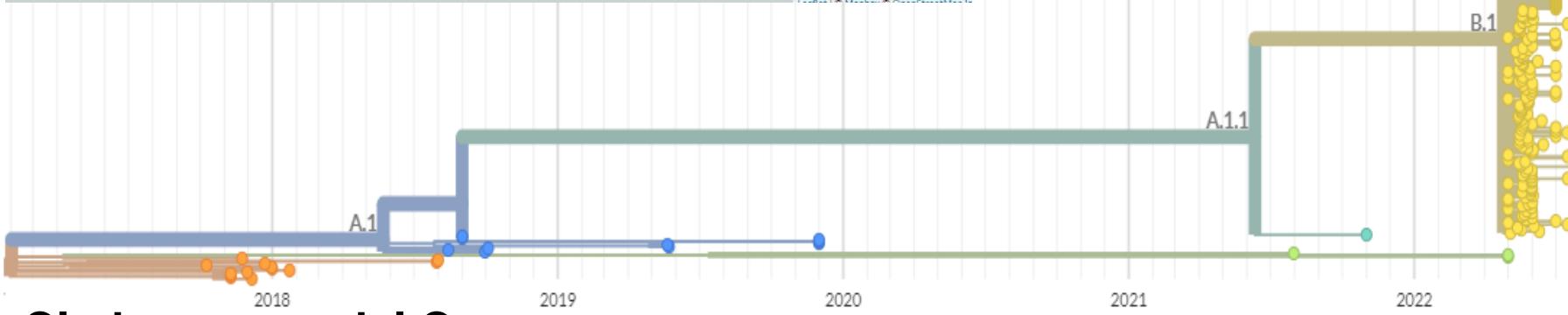
Objetivo: Identificar los riesgos y plantear acciones a implementar para disminuir dicho riesgo.



IMPLEMENTACIÓN DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

La implementación de las recomendaciones expuestas en esta presentación están ligadas a la evaluación de riesgo realizada en su laboratorio y las políticas relacionadas con el tema de su institución.





Clado cuenca del Congo

- Mayor severidad
- Restringido a la región de origen geográfico

Clado África occidental
Actualmente circula

Fuente: <https://nextstrain.org>



Las directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus de la viruela del mono OPS/OMS



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet



Short communication

Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA

Yu Li*, Hui Zhao, Kimberly Wilkins, Christine Hughes, Inger K. Damon

Poxvirus and Rabies Branch, Division of High-Consequence Pathogens and Pathology (Proposed), National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (Proposed), Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, United States



(A) Monkeypox virus West Africa Specific (G2R_WA) assay design

	Forward primer	Probe	Reverse primer
MPXV_USA03	CCGGTGTGGTCCCGGAAACNTATTCCTCACACCGCTCTCTTCCACAGATAAATGCGAAACCGTGTAAACGACATACATTAACTATATCGATGTGGAAATTAAACCTGTATCCAGTCACCGAACACATCGTGTACTCGGAG		
MPXV_SLE			
MPXV_ZAR79			
MPXV_RCG03			
VARV_BGD75	TT	G...C...A...	CA...T...
VARV_CHN48	TT	G...C...A...	CA...T...
VARV_BRA66	TT...T	G...C...A...	CA...T...
CMLV_CMS	T	G...	C...
VACV_WR			
VACV_Duke2	T	G...C...A...G...	T...
CPXV_GRI	C...T...	G...C...C...	T...
CPXV_GER91	T...	G...C...T...C...	T...C...

(B) Monkeypox virus Congo Basin (C3L) assay design

	Forward primer	Probe	Reverse primer
MPXV_ZAR79	CTATAGAAATCTATGTCTACCTGGATACAGAAGCGAAATGGGACCCATATATGCTAAATGTTACCGGTACCGGAAGAACCTCTTTATATCAATGTATTAAACGGGAGTGGCCATCGCCTCGAGATAATGATA		
MPXV_RCG03			
VACV_COP			
VACV_WR			
VARV_BGD75	T	A...T...	
VARV_CHN48	T	A...T...	
VARV_BRA66	T	A...T...	
CMLV_CMS	T	A...T...	
CPXV_GER91	T	A...T...	
CPXV_GRI	T	A...T...	
ECTV_M06	G...T...T...C...A...C...AT		T...A...

(C) Monkeypox virus generic (G2R_G) assay design

	Forward primer	Probe	Reverse primer
MPXV_USA03	GCACCACTGCACCATCCAACTGGAAAGTGTTAGAGACAGGAAATACAGAAGCC	GTAATCTATGTTGTCTATCGTGTGCTCCGGAACTTAAAGCTTCCAGATTATGTGATAGCAAGACTAAATACACAAATGTACACCC	
MPXV_SLE			
MPXV_ZAR79			
MPXV_RCG03			
VARV_BGD75	GT...A...C...	C...A...C...A...G...T...	A...
VARV_CHN48	GT...A...C...	C...A...C...A...G...T...	A...
VARV_BRA66	GT...A...C...	C...A...C...A...G...T...	A...
CMLV_CMS	A...GT...	A...C...A...G...T...	A...
VACV_WR	G...	A...C...A...T...G...	A...
VACV_Duke	AT...G...	A...C...A...T...G...	A...
CPXV_GRI	AT...T...T...AGTATA...	ACTCAGACTC...	TG...ATCTTTA...G...GG...AA...G...TC...ATG...GATAGC...A...T...CGGGTAG...GC...AT...CAT...A...G...T...T...
CPXV_GER91	AT...T...T...AGTATA...	ACTCAGACTC...	TG...ATCTTTA...G...GG...AA...G...TC...ATG...GATAGC...A...T...CGGGTAG...GC...AT...CAT...A...G...T...T...



INICIADORES Y SONDAS

Tabla 3: Iniciadores y sondas

Detección	Nombre	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Fuente o referencia
Genérica	MPXV_G2RG_Forward	GGAAAATGTAAGACAAACGAATACAG	Li et al., 2010
	MPXV_G2RG_Reverse	GCTATCACATAATCTGGAAGCGTA	
	MPXV_G2RG_sonda	FAM-AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTCC-BHQ1	
Clado de África Occidental	MPXV_G2RWA_Forward	CACACCGTCTCTCACAGA	Li et al., 2010
	MPXV_G2RWA_Reverse	GATACAGGTTAATTCCACATCG	
	MPXV_G2RWA_Sonda	FAM-AACCCGTCGTAACCAGCAATACATT-BHQ1	
Clado de la cuenca del Congo	MPXV_C3L_Forward	TGTCTACCTGGATACAGAAAGCAA	Emery et al 2004 Emerg. Infect. Dis. 10:311-31
	MPXV_C3L_Reverse	GGCATCTCCGTTAACATTGAT	
	MPXV_C3L_Sonda	FAM-CCCATATATGCTAAATGTACCGGTACCGGA-BHQ1	
RNasa P*	RNAse P F	AGATTGGACCTGCGAGCG	Emery et al 2004 Emerg. Infect. Dis. 10:311-31
	RNAse P R	GAGCGGCTGTCTCCACAAAGT	
	Sonda RNAsa P	FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1	

* El control interno de la reacción sugerido, el laboratorio puede emplear el control interno implementado en el LSP

Importante:

Seleccionar método de extracción de ácidos nucleicos adecuado para detección del virus y control interno de reacción



CONTROLES REFERENCIA

Tabla 4. Controles de referencia

Detección	Tipo de control utilizado	Fuente
Genérica	Producto sintético	
Clado de África Occidental	Producto sintético	Instituto de biología molecular de Paraná (IBMP)
Clado de la cuenca del Congo	Producto sintético	
	NTC (no template control)	Control de reactivos (no contiene DNA)
	NC	Muestra realmente negativa para MPXV



PROGRAMACIÓN TERMOCICLADOR

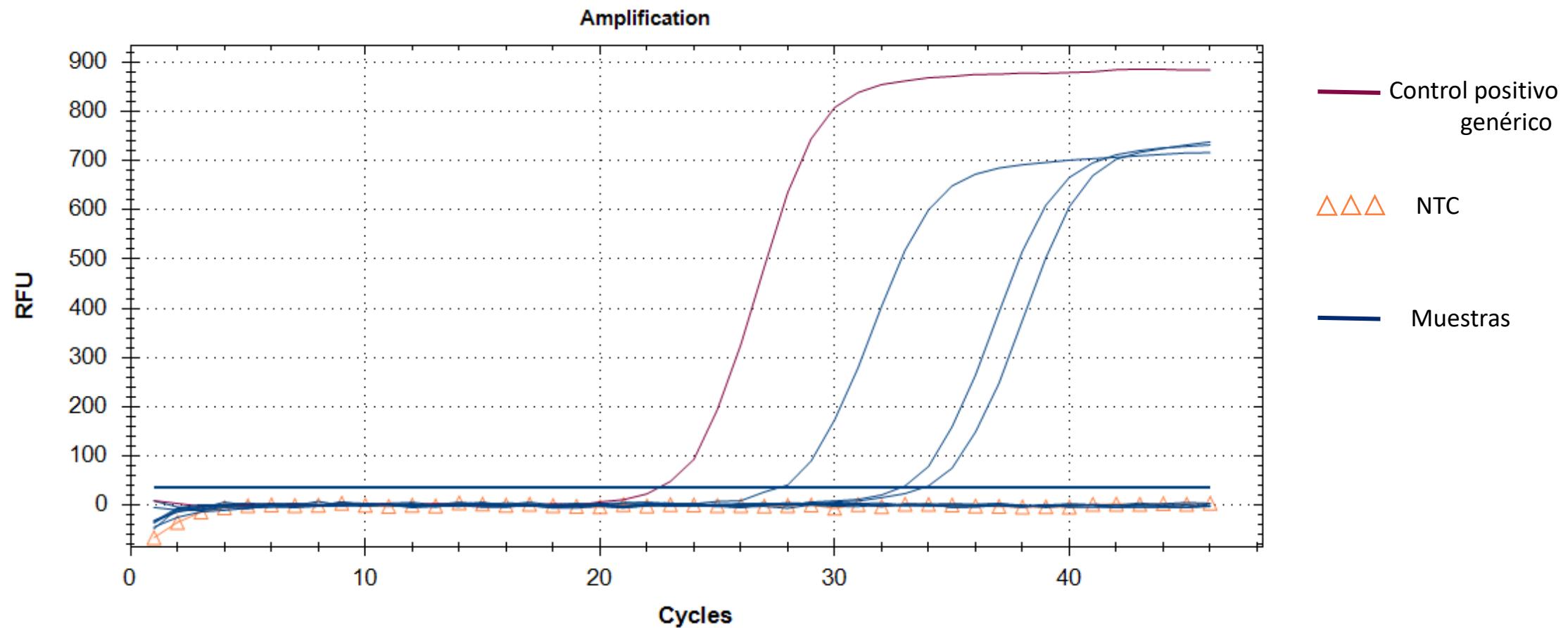
Tabla 8. Perfil térmico para la amplificación de la reacción genérica y clado África occidental (este puede variar de acuerdo a las condiciones de la enzima que esté disponible en el laboratorio, ajustar a las especificaciones del fabricante)

Reacción	Variables	Etapa 1		Etapa 2	
		Paso 1	Paso 2		
Genérica y Clado de la cuenca del Congo	Tiempo	30 seg	15 seg	40 seg	
	Temperatura	95 °C	95 °C	60 °C*	
	Ciclos	1		40	
Clado de África Occidental	Tiempo	30 seg	15 seg	40 seg	
	Temperatura	95 °C	95 °C	62 °C*	
	Ciclos	1		40	

*Paso donde se indica al equipo que haga la lectura



AMPLIFICACIÓN DE REACCIÓN GENÉRICA PARA EL MONKEYPOX



CT esperado en los controles positivos: 25-30



INTERPRETACIÓN

- | | |
|------------------|--|
| POSITIVO: | <ul style="list-style-type: none">La reacción genera una curva de crecimiento sigmoideo de fluorescencia en vista lineal con un CT >10 y < 40.La amplificación en la reacción genérica y del clado África occidental debe ser concordante. Si esto no sucede se debe repetir el ensayo. |
| NEGATIVO: | <ul style="list-style-type: none">La reacción no genera una curva de crecimiento sigmoideo de fluorescencia en “vista lineal” y tampoco se observan las fases correspondientes en “vista logarítmica”. |
| INVALIDO: | <ul style="list-style-type: none">Cuando no hay amplificación del gen de RNasa P ni del gen la fracción del genoma blanco que corresponda a cada virus |



CONSIDERACIONES GENERALES, SE DEBE TENER EN CUENTA

- Un resultado **negativo no excluye la infección** con el virus que se está investigando en la muestra, y no deben ser el único criterio para definir si existe infección.
- En la **interpretación** de los resultados se debe tener en cuenta **aspectos epidemiológicos y clínicos del paciente**.
- Todos los **resultados** deben ser **interpretados por un profesional** y **con acompañamiento** de otro si lo considera necesario.
- La recolección, el almacenamiento y el transporte adecuados de las muestras son esenciales para obtener resultados fiables.



CONDICIONES REACCIÓN

Importante:

- Estas condiciones fueron adaptadas a la enzima Tib molbiol
- Cada LSP debe ajustar los requerimientos tanto de mezcla y ciclaje de acuerdo a la enzima disponible

Reactivos	1 reacción (μl)
Agua	3,95
Primer F (10 μM)	0,4
Primer R (10 μM)	0,4
Sonda (10 μM)	0,25
Mix-enzima	10
ADN	5
Volumen final	20



INNS

Investiga



Coordina



Vigila



Observa



Produce



Capacita

