



INSTITUTO  
NACIONAL DE  
SALUD



MINISTERIO DE SALUD  
Y PROTECCIÓN SOCIAL





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

QUÍMICA	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 AKLMPS
	Tipo B	Resistencia a la penetración (En374:2) Tiempo de resistencia $\geq 30$ minutos para al menos 3 sustancias químicas.	ENISO374-1:2016 AKL
	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.

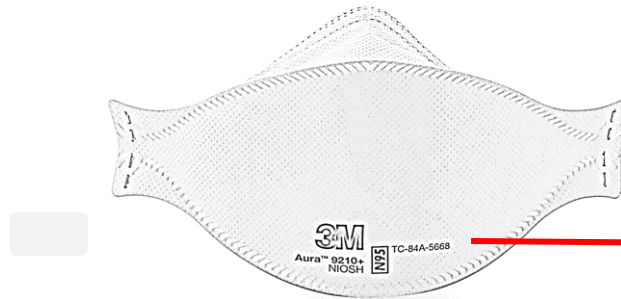


## **ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL**



# ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

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



## 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 // 

### 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 solidas 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.



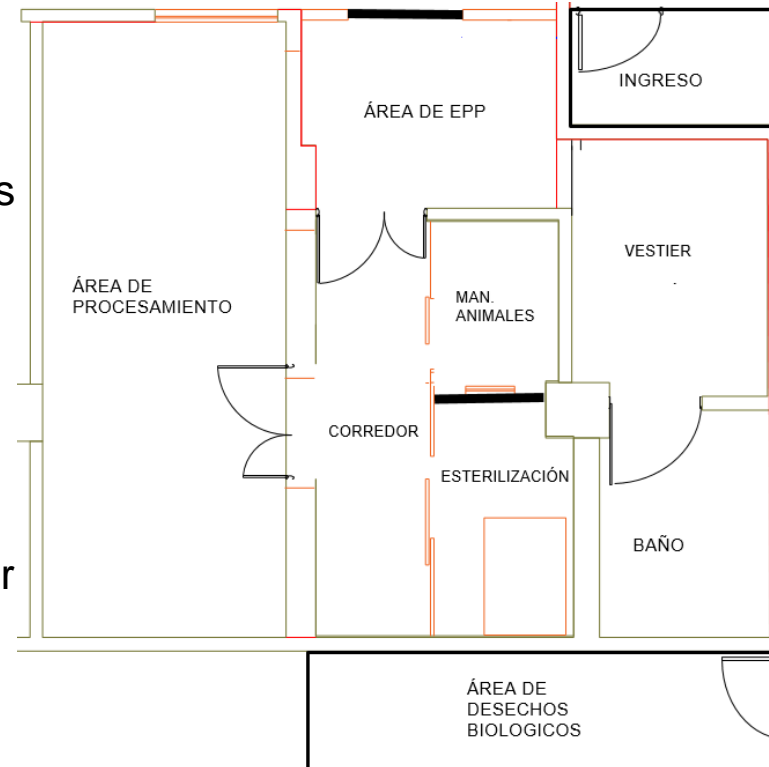
Correcto manejo, transporte y disposición de residuos de riesgo biológico.



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.



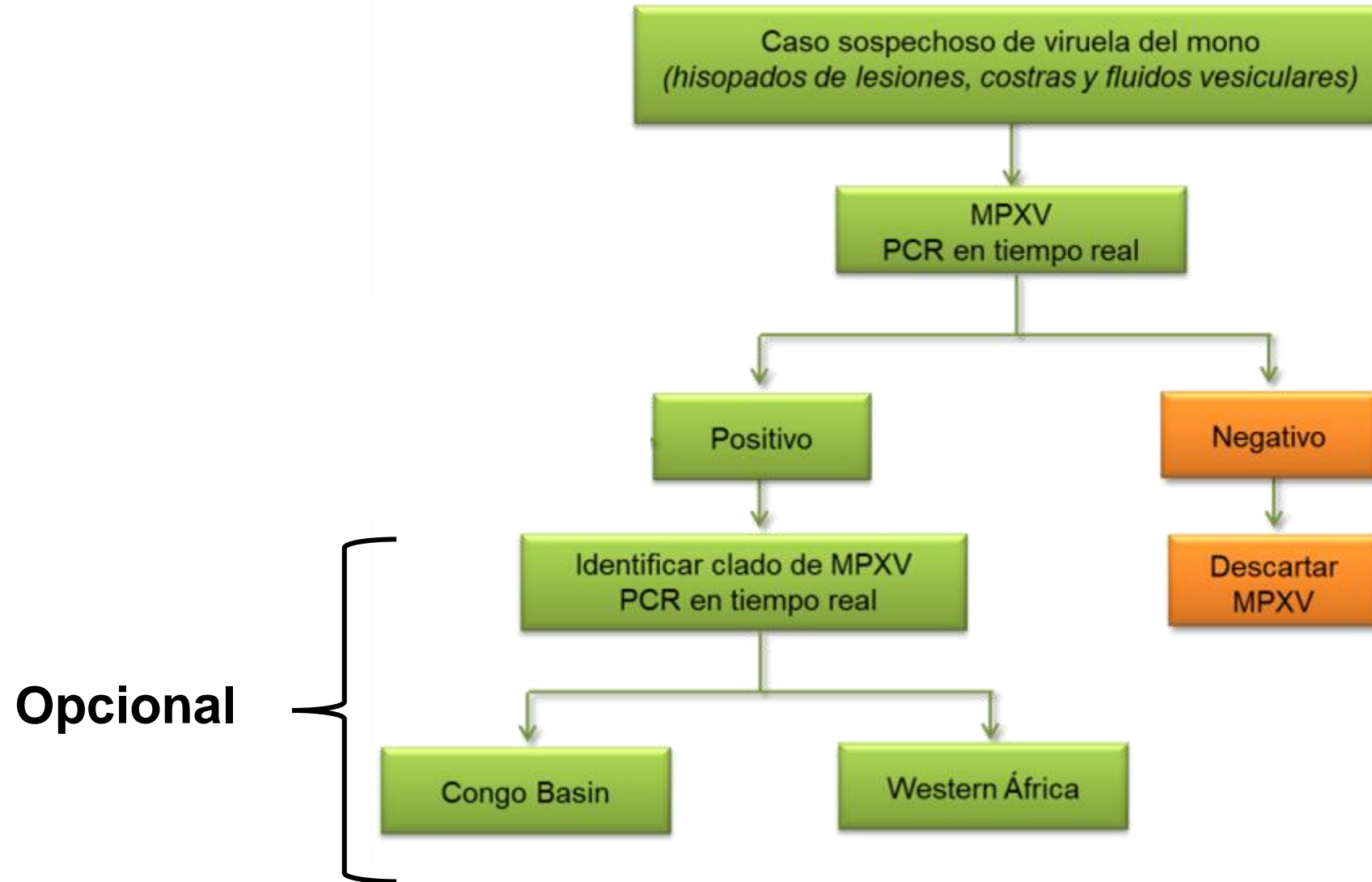
Inventario actualizado (continuamente) del material biológico para evitar pérdida, daño o sustracción accidental o intencionada.



Compromiso con los compañeros de trabajo, la comunidad y el medio ambiente.



# ALGORITMO DE DETECCIÓN MOLECULAR



# 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.

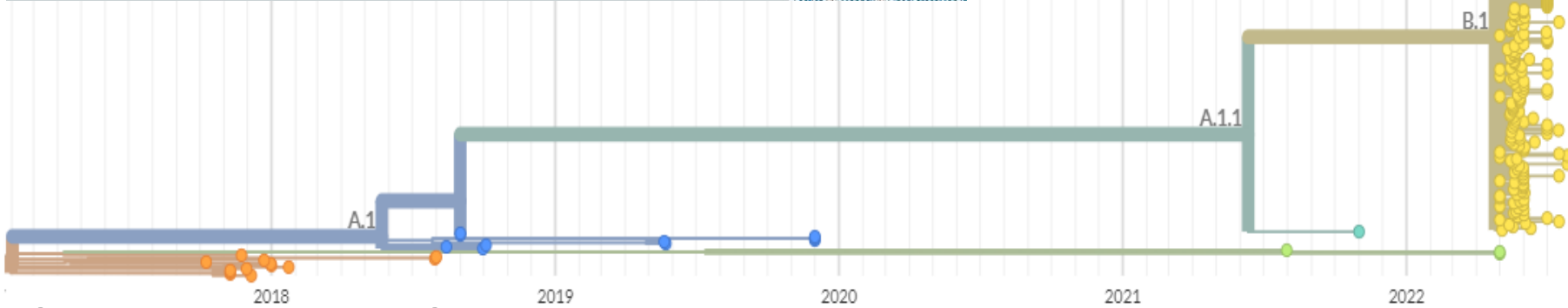
**Objetivo:** Identificar los riesgos y plantear acciones a implementar para disminuir dicho riesgo.



# 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



# 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/jviomet](http://www.elsevier.com/locate/jviomet)



Short communication

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

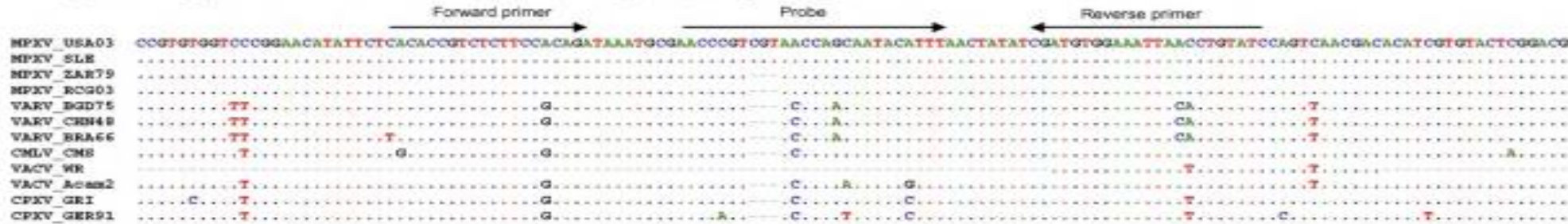
Yu Li\*, Hui Zhao, Kimberly Wilkins, Christine Hughes, Inger K. Damon

*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*

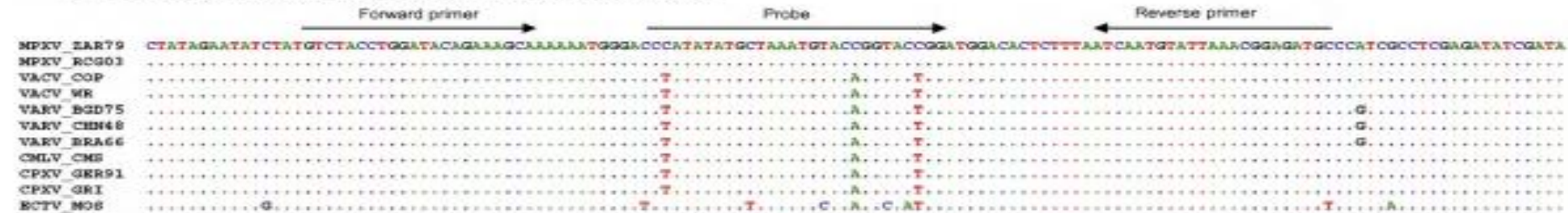




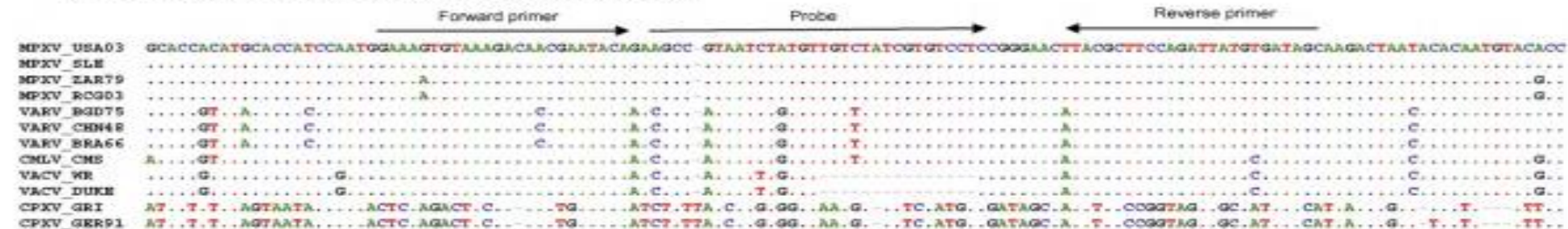
(A) Monkeypox virus West Africa Specific (G2R\_WA) assay design



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



(C). Monkeypox virus generic (G2R\_G) assay design



# INICIADORES Y SONDAS

**Tabla 3:** Iniciadores y sondas

Detección	Nombre	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Fuente o referencia
<b>Genérica</b>	MPXV_G2RG_Forward	GGAAAATGTAAAGACAACGAATACAG	Li et al., 2010
	MPXV_G2RG_Reverse	GCTATCACATAATCTGGAAGCGTA	
	MPXV_G2RG_sonda	FAM-AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTCC-BHQ1	
<b>Clado de África Occidental</b>	MPXV_G2RWA_Forward	CACACCGTCTCTTCCACAGA	
	MPXV_G2RWA_Reverse	GATACAGGTTAATTTCCACATCG	
	MPXV_G2RWA_Sonda	FAM-AACCCGTCGTAACCAGCAATACATTT-BHQ1	
<b>Clado de la cuenca del Congo</b>	MPXV_C3L_Forward	TGTCTACCTGGATACAGAAAGCAA	
	MPXV_C3L_Reverse	GGCATCTCCGTTTAATACATTGAT	
	MPXV_C3L_Sonda	FAM-CCCATATATGCTAAATGTACCGGTACCGGA-BHQ1	
<b>RNasa P*</b>	<u>RNase P F</u>	AGATTTGGACCTGCGAGCG	Emery et-al 2004 <u>Emerg. Infect. Dis.</u> 10:311-31
	<u>RNase P R</u>	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	
	Sonda <u>RNase P</u>	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

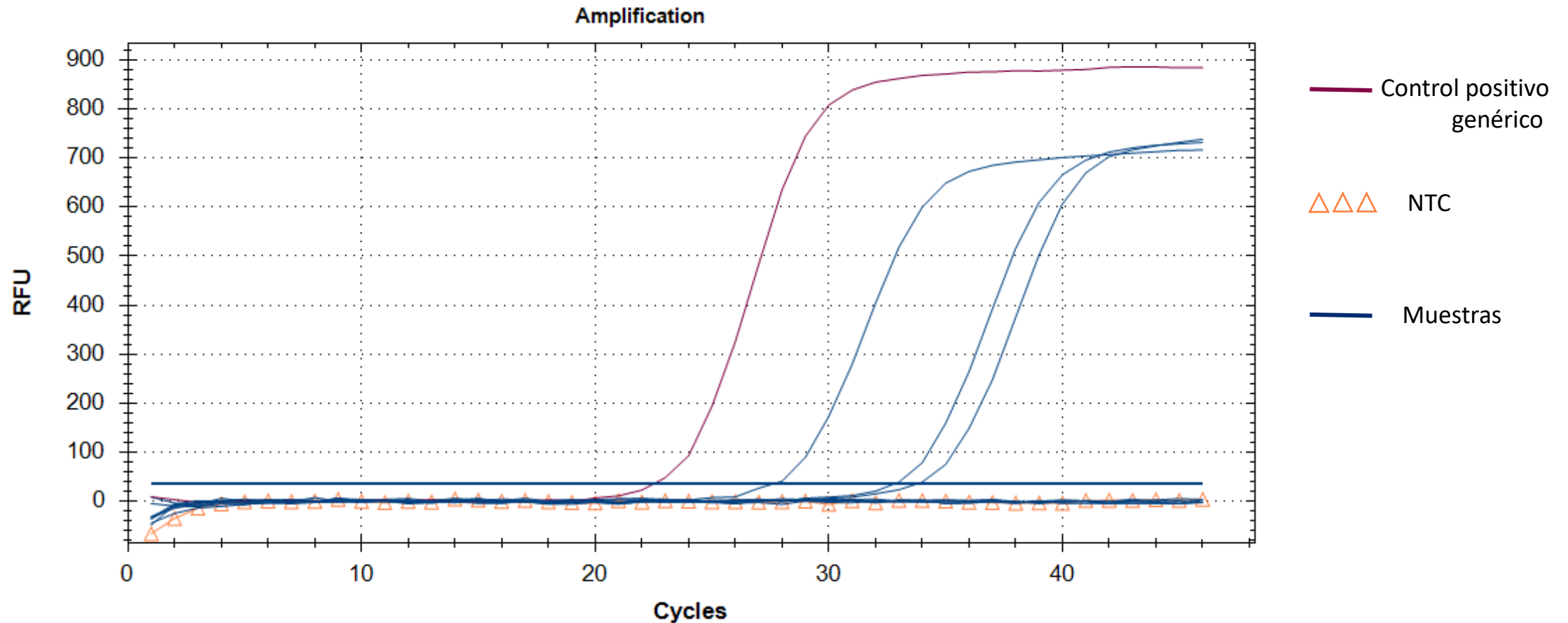
**Tabla 8.** Perfil térmico para la amplificación de la reacción genérica y clado África occidental (este puede variar de acuerdo a las condiciones de la enzima que esté disponible en el laboratorio, ajustar a las especificaciones del fabricante)

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:

- 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:

- 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:

- 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

Reactivo	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





*Investiga*



*Coordina*



*Vigila*



*Observa*



*Produce*



*Capacita*