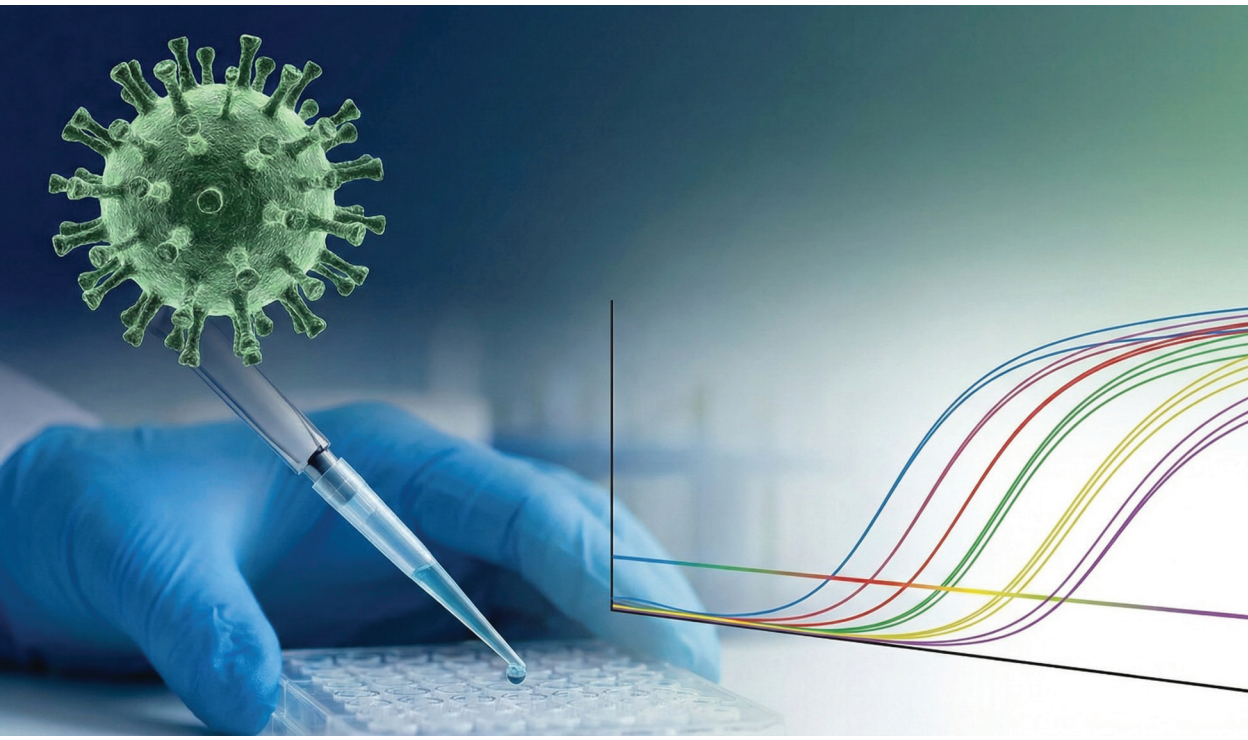
Principios y metodología del análisis molecular de agentes virales de importancia epidemiológica

El caso de COVID-19

JUAN HERIBERTO TORRES JASSO

MIRIAM PARTIDA PÉREZ



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Principios y metodología del análisis molecular de agentes virales de importancia epidemiológica

El caso de COVID-19

Universidad de Guadalajara

Karla Alejandrina Planter Pérez. *Rectora General*

Héctor Raúl Solís Gadea. *Vicerrector Ejecutivo*

Jaime Federico Andrade Villanueva. *Vicerrector Adjunto Académico y de Investigación*

María Guadalupe Cid Escobedo. *Vicerrectora Adjunta Administrativa*

César Antonio Barba Delgadillo. *Secretario General*

Centro Universitario de la Costa

María Esther Avelar Álvarez. *Rectora*

L. Rebeca Mateos Morfín. *Secretaria Académica*

María del Consuelo Delgado González. *Secretaria Administrativa*

Principios y metodología del análisis molecular de agentes virales de importancia epidemiológica

El caso de COVID-19

JUAN HERIBERTO TORRES JASSO

MIRIAM PARTIDA PÉREZ

Universidad de Guadalajara

2026

Para garantizar la calidad, pertinencia académica y científica de esta obra, el manuscrito fue sometido a un riguroso arbitraje por medio de dictaminado a doble ciego, emitido por académicos especialistas en la materia, avalados por el Comité Editorial del Centro Universitario de la Costa de la Universidad de Guadalajara, México.

Primera edición, 2026

D.R. © 2026, Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de la Costa
Av. Universidad 203, delegación Ixtapa
48280, Puerto Vallarta, Jalisco, México

ISBN: 978-607-646-046-7 PDF
https://doi.org/10.32870/9786076460467

Hecho en México / *Made in Mexico*



Este trabajo está autorizado bajo la licencia Creative Commons Atribución-NoComercialSinDerivadas 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND) lo que significa que el texto puede ser compartido y redistribuido, siempre que el crédito sea otorgado al autor, pero no puede ser mezclado, transformado, construir sobre él ni utilizado con propósitos comerciales. Para más detalles consúltese https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

Contenido

Introducción | 6

Objetivos | 9

Metodología | 11

Consideraciones éticas | 13

Bioseguridad | 14

Manejo de derrames accidentales y descontaminación de áreas | 22

Plan de contingencia y respuesta a emergencias biológicas | 25

Diagrama de flujo de trabajo | 27

Procedimientos para toma de muestras clínicas | 30

Procesamiento de muestras de hisopado para extracción de ácido ribonucleico (ARN) | 32

Extracción de ARN | 33

Diagnóstico mediante RT-qPCR | 41

Referencias | 48

Anexos | 55

Introducción

En diciembre de 2019, se identificaron casos nuevos de neumonía viral de origen desconocido en Wuhan, provincia de Hubei en China; denominada posteriormente como "nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV)" por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en enero de 2020. En el mes siguiente, el 2019-nCoV se extendió rápidamente dentro y fuera de la provincia de Hubei e incluso en otros países. Además, el fuerte aumento del número de casos produjo pánico generalizado entre las personas. Debido a que era una enfermedad respiratoria nunca antes experimentada y con una capacidad de infección amplia y rápida, atrajo la atención del mundo, pero sin manual de tratamiento y control (Jin *et al*., 2020).

El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), inicialmente conocido como el nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV), es un agente zoonótico emergente que apareció en diciembre de 2019 y causa la enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19) (Bonilla-Aldana *et al*., 2020a). Este patógeno produce un síndrome que en algunos casos conduce a una afección respiratoria de cuidados críticos, que requiere un manejo especializado en unidades de cuidados intensivos (Zhu *et al*., 2019; Chan *et al*., 2020; Chen *et al*., 2020; Huang *et al*., 2020; Bastola *et al*., 2020). El SARS-CoV-2, taxonómicamente, es actualmente parte de la especie de los coronavirus relacionados con el SARS que pertenecen al subgénero *Sarbecovirus*. Junto con los subgéneros *Embecovirus*, *Hibecovirus*, *Merbecovirus* y *Nobecovirus*, que forman parte del género *Betacoronavirus* (orden *Nidovirales*; suborden *Cornidovirineae*; familia *Coronaviridae*; subfamilia *Coronavirinae*) (Bonilla-Aldana *et al*., 2020a; Millan-Oñate *et al*., 2020; Ksiazek *et al*., 2003, Li *et al*., 2020; Gorbalenya *et al*., 2020).

Otros *Betacoronavirus* antes han causado epidemias en las últimas dos décadas en Asia, como es el caso del SARS en 2002-2003 en China (Ksiazek *et al*., 2003; Drosten *et al*., 2003; Kuiken *et al*., 2003), y más tarde con el Síndrome Respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV) en 2012-2013 en Arabia Saudita (De Wit *et al*., 2016; Al-Tawfiq y Gautret, 2019; Baharoon y Memish, 2019). Como se esperaba, se han identificado varias similitudes y diferencias en la epidemiología, las características clínicas y el tratamiento del SARS, MERS y COVID-19 (Chan *et al*., 2020; Bonilla-Aldana *et al*., 2020b; Al-Tawfiq *et al*., 2014; OMS, 2020a; OMS, 2020b). Estos son virus de ARN de cadena positiva envueltos, que se han aislado de murciélagos y que comparten homología de secuencia con otros virus aislados de humanos, sugiriendo a los murciélagos como huéspedes y reservorios naturales (Millan-Oñate *et al*., 2020; Rodriguez-Morales *et al*., 2020; Plowright *et al*., 2017).

Conforme avanzó la pandemia, el SARS-CoV-2 acumuló mutaciones que dieron origen a diversas variantes clasificadas por la OMS como variantes de preocupación (VOC, por sus siglas en inglés), entre ellas Alpha, Beta, Gamma, Delta y Ómicron. Estas variantes presentaron diferencias en su transmisibilidad, capacidad de evasión inmunológica y comportamiento epidemiológico (OMS, 2022; Harvey *et al*., 2021).

La aparición de nuevas variantes también resaltó la importancia de la vigilancia genómica y de la evaluación continua del desempeño de las pruebas diagnósticas moleculares. Aunque los ensayos de RT-qPCR utilizados durante la pandemia demostraron una elevada sensibilidad y especificidad, las mutaciones localizadas en regiones blanco del genoma viral hicieron necesaria la actualización y validación periódica de algunos protocolos diagnósticos para mantener su desempeño analítico (Harvey *et al*., 2021; Wang *et al*., 2021).

Desde el 30 de enero del 2020, la Secretaría de Salud de México (SSA), publicó material informativo sobre la situación de la pandemia de COVID-19 y sus repercusiones en México. Durante la fase inicial de la emergencia sanitaria, emitió un aviso preventivo de viaje hacia China, particularmente a la provincia de Hubei y diariamente publicaba un re-

porte oficial con datos verificados por diferentes instituciones estatales y federales (SSA, 2020a).

Así mismo, la SSA a través de la Dirección General Epidemiológica (DGE) elaboró el Lineamiento estandarizado para la vigilancia epidemiológica y por laboratorio de enfermedad de COVID-19, en el cual se establecen las definiciones operacionales, procedimientos de manejo de muestras, medidas de prevención y control de riesgos, además del algoritmo diagnóstico ante el riesgo de introducción de este patógeno (SSA, 2020b).

A partir de mayo de 2023, la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó que la COVID-19 ya no constituía una Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional (ESPII); sin embargo, el SARS-CoV-2 continúa siendo un problema de salud pública que requiere vigilancia epidemiológica y genómica para el monitoreo de variantes y la detección oportuna de cambios en su dinámica de transmisión (OMS, 2023; Burki, 2023).

La experiencia adquirida durante la implementación de las actividades diagnósticas para SARS-CoV-2 permitió consolidar procedimientos estandarizados de bioseguridad, procesamiento de muestras y diagnóstico molecular. En este contexto, la presente obra reúne los principios y procedimientos operativos empleados en la Unidad COVID del Laboratorio de Biología Molecular del Centro Universitario de la Costa (CUCosta) de la Universidad de Guadalajara (UdeG), con el proposito de servir como herramienta de consulta y capacitación para el personal involucrado en actividades de diagnóstico molecular y vigilancia epidemiológica.

Objetivos

GENERAL

Describir los principios, metodologías y procedimientos empleados en el análisis molecular de agentes virales de importancia epidemiológica, tomando como referencia la experiencia adquirida durante la implementación de las actividades diagnósticas para detección del virus SARS-CoV-2 Unidad COVID del Laboratorio de Biología Molecular del CUCosta.

PARTICULARES

1. Describir las medidas de bioseguridad aplicables al manejo de muestras biológicas potencialmente infecciosas en laboratorios de diagnóstico molecular.
2. Establecer los procedimientos para la recepción, identificación, transporte, conservación y procesamiento de muestras biológico-infecciosas destinadas al análisis molecular de agentes virales.
3. Describir los procedimientos para la inactivación viral de las muestras biológicas potencialmente infecciosas.
4. Describir la metodología para la extracción y conservación del ARN obtenido de las muestras biológico-infecciosas.
5. Describir los fundamentos y procedimientos para la detección del ARN viral mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR).

6. Establecer criterios de control de calidad para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos mediante técnicas de diagnóstico molecular.
7. Contribuir al fortalecimiento de las capacidades de diagnóstico molecular y respuesta a agentes virales de importancia epidemiológica, tomando como referencia la experiencia generada durante la pandemia de COVID-19.

Metodología

Los procedimientos descritos en esta obra surgen de la experiencia adquirida durante la implementación de las actividades de diagnóstico molecular para la detección de SARS-CoV-2 desarrolladas en la Unidad COVID del Laboratorio de Biología Molecular del CUCosta de la UdeG. Estas actividades se desarrollaron como parte de la respuesta institucional a la emergencia sanitaria provocada por la pandemia de COVID-19 y permitieron consolidar una serie de procedimientos orientados a garantizar la calidad analítica, la bioseguridad y la confiabilidad del diagnóstico molecular.

El contenido integra los procedimientos implementados, durante ese periodo con la revisión y actualización de lineamientos nacionales e internacionales emitidos por organismos especializados, así como con protocolos validados para la detección de material genético viral mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Esta actualización incorpora la evidencia científica disponible con el propósito de mantener la vigencia y aplicabilidad de los procedimientos descritos.

La información se organiza de acuerdo con el flujo de trabajo empleado en el proceso analítico de una muestra biológica, desde su recepción en el laboratorio, su conservación e inactivación viral hasta el procedimiento de análisis molecular desde la extracción del genoma viral hasta su detección mediante la técnica RT-qPCR. Asimismo, se incluyen los principios de bioseguridad, control de calidad y respuesta ante incidentes que contribuyen a la estandarización de las actividades realizadas en laboratorios dedicados al análisis molecular de este tipo de agentes virales con importancia epidemiológica.

Si bien la experiencia presentada surge del trabajo realizado durante la pandemia de COVID-19, los principios y procedimientos aquí descritos trascienden ese contexto y constituyen una referencia para el fortalecimiento de las capacidades de diagnóstico molecular frente a otros agentes virales de importancia para la salud pública.

Consideraciones éticas

Los procedimientos descritos en esta obra se desarrollan en apego a lo establecido en los artículos 3° fracción XVII, 134 fracción XIV, 136 fracción II, 137, 138 y 142 de la Ley General de Salud, así como en los apartados 6.5.1, 6.5.2, 7.1.7, 8.1.2 y 8.1.3 de la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA-2-2012 para la vigilancia epidemiológica (Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, 2026; SSA, 2023). Asimismo, se sustentan en el Reglamento Sanitario Internacional (2005), particularmente en los principios relacionados con la vigilancia epidemiológica, la respuesta ante eventos de importancia para la salud pública y la cooperación internacional (OMS, 2024).

Las actividades de recepción, procesamiento y análisis molecular de muestras biológicas se realizan bajo los principios de protección de la salud pública, bioseguridad, responsabilidad profesional y prevención de riesgos biológicos, con estricto apego a la normatividad nacional e internacional aplicable.

De igual manera, los principios, metodologías y procedimientos descritos en esta obra se alinean con los lineamientos éticos establecidos en la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos, promoviendo el respeto por la dignidad humana, la responsabilidad científica y la protección de las personas involucradas en actividades de investigación, diagnóstico y vigilancia epidemiológica (UNESCO, 2005).

Bioseguridad

Las recomendaciones descritas en este apartado tienen como finalidad establecer las medidas de bioseguridad y biocustodia necesarias para proteger al personal que manipula las muestras biológicas durante los procesos de inactivación viral, extracción de ARN y cuantificación génica mediante RT-qPCR, con el propósito de minimizar el riesgo de contagio y/o dispersión de los agentes patógenos fuera de las áreas de contención.

El laboratorio debe realizar una evaluación local de riesgos que permita identificar los peligros asociados a cada procedimiento y establecer las medidas de control necesarias para garantizar que las actividades diagnósticas se desarrollen en condiciones seguras.

Durante la manipulación y procesamiento de muestras, incluido el material destinado a pruebas serológicas, según sea el caso, el personal debe seguir las Buenas Prácticas y Procedimientos Microbiológicos, así como los protocolos establecidos por cada laboratorio.

Las actividades del laboratorio de diagnóstico molecular no propagativo, incluida la secuenciación y las pruebas de amplificación de material genético de origen viral a partir de muestras biológicas de pacientes con sospecha o diagnóstico confirmado, deben llevarse a cabo aplicando los requisitos básicos de bioseguridad y las medidas de control adicionales que determine la evaluación local de riesgos.

El manejo de material con altas concentraciones de virus viables, como en los ensayos de propagación, aislamiento o neutralización viral, así como el procesamiento de grandes volúmenes de material infeccioso, debe realizarse exclusivamente por personal capacitado siguiendo los procedimientos establecidos para un laboratorio de Bioseguridad nivel 3 (BSL-3).

La recepción, desembalaje y procesamiento de las muestras biológicas destinadas al diagnóstico de agentes virales de importancia epidemiológica, como SARS-CoV-2, deben realizarse en instalaciones que cumplan al menos con los criterios de un laboratorio de Bioseguridad nivel 2 (BSL-2). Pare ello deben cumplirse los siguientes criterios:

1. El personal de laboratorio tiene entrenamiento específico en el manejo de agentes patógenos y está dirigido por profesionistas competentes.
2. El acceso al laboratorio debe estar restringido al personal autorizado mientras se desarrollan las actividades.
3. El personal de laboratorio debe tomar precauciones extremas con el manejo de instrumentos punzocortantes.
4. Los procedimientos en los cuales se generan aerosoles infecciosos o salpicaduras, se deben realizar dentro de cabinas de bioseguridad u otros equipos de contención física apropiados.

Todo el personal que participe en la manipulación de muestras biológicas debe recibir capacitación para la colocación, uso y retiro del Equipo de Protección Personal (EPP).

De acuerdo al protocolo de Bioseguridad y biocustodia para el manejo de pacientes durante la toma de muestras de casos sospechosos de enfermedad por COVID-19 del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (INDRE), la capacitación para la colocación, uso y retiro de EPP debe considerar al menos (INDRE, 2020):

- Vías de entrada de microorganismos al cuerpo
- Tipos de protección personal disponible
- Secuencia de colocación del EPP
- Secuencia de retiro del EPP
- Desecho del EPP contaminado

VÍAS DE ENTRADA DE MICROORGANISMOS AL CUERPO

Los agentes virales de importancia epidemiológica pueden ingresar al organismo a través de diferentes vías, entre las que destacan la respiratoria,

la conjuntival, la digestiva y la percutánea. La principal vía de transmisión depende de las características biológicas de cada agente infeccioso y del mecanismo mediante el cual ocurre la exposición.

En el caso de SARS-CoV-2, la transmisión interhumana se produce a través de diferentes vías que incluyen gotas, contacto directo y contacto indirecto a través de las superficies (Cuadro 1) (Lee y Hsueh, 2020). Estos mecanismos de transmisión se comparten con influenza y otros patógenos respiratorios (SSA, 2020c).

Cuadro 1. Mecanismo de Transmisión (SSA, 2020c)

Vía de transmisión	Mecanismo	Agentes principales que se transmiten
Gotas	Diseminación por gotas de más de 5 µm generadas por la persona fuente (al hablar, toser o estornudar) y que se pone en contacto con la mucosa nasal, oral o conjuntiva de un hospedero susceptible. Las gotas alcanzan hasta un metro de distancia al hablar y cuatro metros al toser o estornudar.	Coronavirus Influenza virus Adenovirus *Bordetella pertussis* *Streptococccus pyogenes* *Neisseria meningitidis*
Vía aérea	Diseminación en aerosoles de menos de 5 µm de diámetro.	Coronavirus Influenza virus *Mycobacterium tuberculosis* Virus del sarampión Virus de la varicela
Contacto	Contacto directo con el paciente o indirecto con superficies contaminadas.	Coronavirus Influenza virus Virus respiratorio sincitial *Staphyloccoccus aureus*

La transmisión por contacto directo o indirecto con superficies contaminadas es posible, aunque se considera una vía menos frecuente, se sabe que los coronavirus humanos en general persisten en superficies inanima-

das como metal, vidrio o plástico hasta por 9 días (Kampf *et al*., 2020; OMS, 2024).

Por lo que es importante resaltar la higiene de manos, el evitar tocar nariz, ojos y boca (para evitar la autoinoculación), así como la adecuada limpieza y desinfección de superficies como pilares fundamentales en el control de infecciones (SSA, 2020c).

En el caso de SARS-CoV-2, se ha descrito que es factible transmitir el virus de personas infectadas que se encuentran con síntomas leves o asintomáticas, sin conocerse hasta el momento la frecuencia de estos casos y su efectividad para la transmisibilidad del virus, convirtiéndose en un elemento que dificulta potencialmente el control de la epidemia. Cualquier persona que esté en contacto cercano (dentro de 1 metro) con alguien que tenga síntomas respiratorios (por ejemplo, estornudos, tos, etc.) está en riesgo de exponerse a gotas respiratorias potencialmente infecciosas (SSA, 2020c).

TIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL DISPONIBLE

A menos que un país decida lo contrario, considerando el conocimiento recién adquirido y las medidas preventivas efectivas descritas anteriormente, el aislamiento viral en muestras clínicas de pacientes sospechosos o confirmados de estar infectados con un coronavirus debe realizarse solo en laboratorios capaces de cumplir con los siguientes requisitos de contención adicionales (OMS, 2020b):

- Un sistema de ventilación controlada manteniendo el flujo de aire direccional hacia la sala de laboratorio.
- El aire de escape de la sala de laboratorio no se recircula a otras áreas dentro del edificio. El aire debe ser filtrado con un filtro de partículas de aire de alta eficiencia (por sus siglas en inglés HEPA), si se reacondiciona y se recircula dentro del laboratorio. Cuando el aire de escape del laboratorio se descarga al exterior, debe dispersarse lejos de los edificios ocupados y las entradas de aire. Este aire debe descargarse a través de filtros HEPA.

- Todas las manipulaciones de materiales infecciosos o potencialmente infecciosos deben realizarse en cabinas de bioseguridad debidamente mantenidas y validadas.
- El personal de laboratorio debe usar equipo de protección, incluidos guantes de nitrilo desechables, batas envolventes, overoles con mangas que cubran completamente los antebrazos, cubre cabeza, cubre zapatos o zapatos exclusivos, protección para los ojos (lentes o careta). La evaluación de riesgos debe informar el uso de protección respiratoria (respirador de partículas con prueba de ajuste, por ejemplo, UE FFP2, N95 con certificación NIOSH de Estados Unidos 6 –o equivalente– o protección superior).
- En el laboratorio debe estar disponible un fregadero exclusivo para el lavado de manos.
- La centrifugación de las muestras debe realizarse con rotores centrífugos sellados o con cubiertas de muestra. Estos rotores o cubiertas deben cargarse y descargarse en una la cabina de bioseguridad.

COLOCACIÓN Y RETIRO DE EQUIPO DE PROTECCIÓN (EPP)

SECUENCIA DE COLOCACIÓN DEL EPP (véase Figura 1)

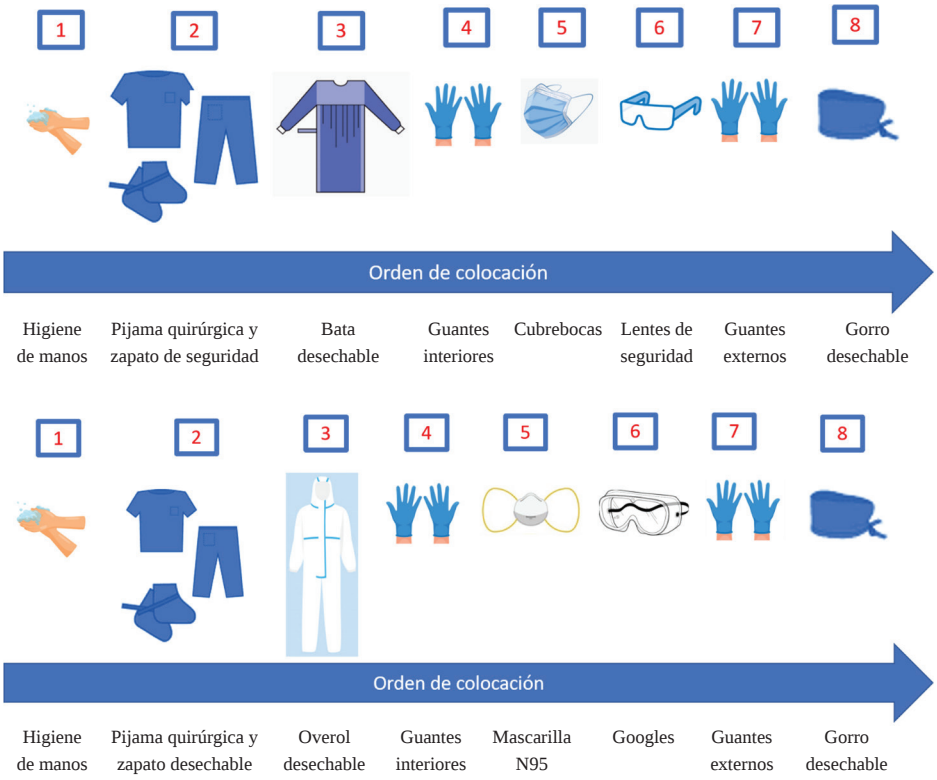
1. Vestir el uniforme quirúrgico y zapato de seguridad cerrado (rígido y antiderrapante; no tenis).
2. Colocación de una bata desechable, que cubra todo el torso y los brazos hasta la muñeca y ajustar por detrás a la altura del cuello y cintura.
3. Colocar el primer par de guantes de nitrilo.
4. Colocación de cubrebocas.

- Asegurar los cordones del cubrebocas en la mitad de la cabeza y en el cuello.
- Acomodar en la cara y por debajo del mentón.
- Verificar su ajuste.

5. Colocar el respirador N95.

- Tomar el respirador con una mano y colocarlo sobre la nariz y boca.

Figura 1. Orden de colocación del Equipo de Protección Personal (EPP)



- Tirar suavemente de la banda elástica superior y colocarla en la mitad de la cabeza por encima de las orejas.
- Tirar la banda elástica inferior y colocarla a la altura del cuello.
- Acomodar el respirador sobre nariz y boca.
- Ajustar la banda metálica flexible en el puente nasal.
- Acomodar en la cara y por debajo del mentón.
- Verificar que el ajuste del respirador evite el ingreso de aire a través de las orillas y que pueda respirar cómodamente.

6. Colocación de lentes de seguridad.

- Verificar que los lentes están en buen estado, sin rayaduras o manchas que dificulten la visión y que las bandas conserven su elasticidad.
- Colocar los lentes sobre la cara y ojos.
- Ajustar las bandas y el puente nasal para evitar caída o que estorben.

- Verificar que no interfiere con el sellado del respirador.
- Es posible que, de acuerdo con una evaluación de riesgo, el usuario requiera reemplazar los lentes de seguridad por una careta.

7. Colocar un segundo par de guantes de nitrilo en cada mano.

- Extender los guantes para que cubran la parte del puño en la bata.
- Colocar la manga de la bata quirúrgica por debajo del guante.
- Adherir el guante al puño de la bata con cinta microporosa.

8. Colocación de gorro quirúrgico.

- Colocar el gorro quirúrgico cubriendo las orejas y la totalidad del cabello; se recomienda colocarla después de haber recogido el cabello.
- Asegurarse que el gorro quirúrgico quede por encima de las bandas elásticas de los lentes de seguridad y respirador o mascarilla.

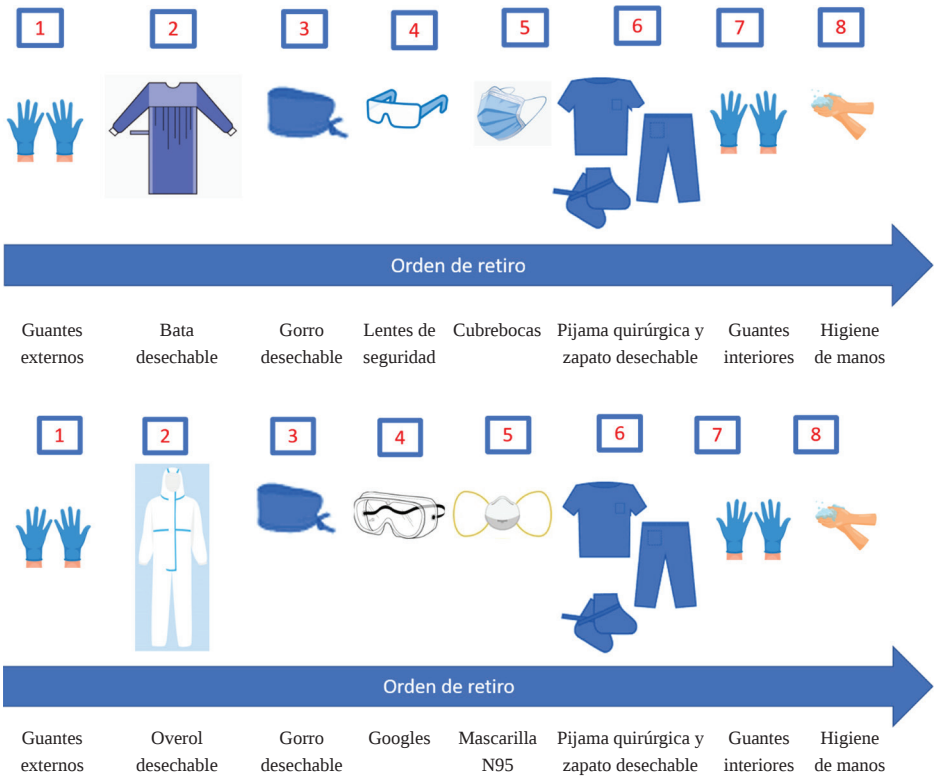
PRECAUCIONES DURANTE EL USO DEL EPP

El personal debe de familiarizarse con el uso del EPP antes de realizar algún procedimiento con las muestras. Asimismo, debe evitar introducir objetos personales al área de trabajo de forma innecesaria (anillos, relojes, pulseras, celular, etc.), el cambio del par de guantes debe realizarse cuantas veces sea necesario, especialmente cuando exista riesgo de contaminación cruzada. El personal no debe abandonar las áreas de trabajo utilizando el EPP ni con el uniforme quirúrgico o la bata del laboratorio a áreas de descanso, salas comunes o espacios externos al área de procesamiento de muestras.

SECUENCIA DE RETIRO DEL EPP (véase Figura 2)

1. Segundo par de guantes de nitrilo
2. Bata desechable
3. Gorro quirúrgico
4. Lentes de seguridad
5. Respirador N95 o cubrebocas
6. Primer par de guantes de nitrilo
7. Lavado de manos

Figura 2. Orden de retiro del Equipo de Protección Personal (EPP)



DESECHO DEL EPP CONTAMINADO

La ropa, los uniformes, las batas de laboratorio o las batas de aislamiento utilizadas como equipo de protección personal (EPP) pueden contaminarse con patógenos potenciales (p. ej., *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), Enterococcus resistentes a vancomicina (VRE) y *Clostridium difficile*). Aunque la ropa contaminada no se ha implicado directamente en la transmisión, existe la posibilidad de que las prendas sucias transfieran agentes infecciosos a pacientes sucesivos.

Todo el EPP contaminado se desecha como residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI). Cuando sea posible esterilice estos residuos dentro de una bolsa de polipapel en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Manejo de derrames accidentales y descontaminación de áreas

Los derrames accidentales de muestras biológicas potencialmente infecciosas representan un riesgo para el personal y pueden favorecer la contaminación de las áreas de trabajo. Ante cualquier incidente, se deberá suspender inmediatamente la actividad en curso y aplicar las medidas de contención y descontaminación correspondientes (OMS, 2020c; INDRE, 2020).

MATERIALES PARA ATENCIÓN DE DERRAMES

1. Equipo de protección personal completo.
2. Material absorbente desechable (toallas absorbentes o papel desechable).
3. Hipoclorito de sodio al 0.5 %.
4. Bolsas para residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI).
5. Pinzas o fórceps para recuperación de material punzocortante.
6. Contenedor rígido para punzocortantes.

DERRAME DENTRO DE UNA CABINA DE BIOSEGURIDAD

1. Mantener la cabina de bioseguridad en funcionamiento durante todo el procedimiento.
2. Colocar cuidadosamente material absorbente sobre el derrame para evitar la dispersión de aerosoles.
3. Aplicar un desinfectante apropiado (por ejemplo, hipoclorito de sodio al 0.1 % o el desinfectante validado por el laboratorio), comenzando desde la periferia del derrame hacia el centro.

4. Dejar actuar el desinfectante durante el tiempo de contacto recomendado por el fabricante o, en ausencia de esta información, durante al menos 30 minutos.
5. Retirar el material absorbente utilizando pinzas y desecharlo en un recipiente para RPBI.
6. Limpiar y desinfectar nuevamente la superficie de trabajo de la cabina.
7. Retirar el equipo de protección personal conforme al procedimiento establecido y realizar higiene de manos.
8. Registrar el incidente (véase Anexo 1) e informar al responsable del laboratorio.

DERRAME FUERA DE LA CABINA DE BIOSEGURIDAD

1. Restringir inmediatamente el acceso al área afectada.
2. Notificar al personal presente sobre el incidente.
3. Esperar al menos 30 minutos antes de iniciar la limpieza para permitir la sedimentación de posibles aerosoles.
4. Colocarse el equipo de protección personal correspondiente.
5. Cubrir el derrame con material absorbente.
6. Aplicar hipoclorito de sodio al 0.5 % desde la periferia hacia el centro del derrame.
7. Mantener un tiempo de contacto mínimo de 30 minutos.
8. Retirar cuidadosamente los residuos y desecharlos como RPBI.
9. Limpiar y desinfectar nuevamente la superficie afectada.
10. Registrar el incidente (véase Anexo 1) e informar al responsable del laboratorio.

RUPTURA DE TUBOS O RECIPIENTES CON MUESTRAS BIOLÓGICAS

En caso de ruptura de tubos o recipientes que contengan muestras potencialmente infecciosas, los fragmentos de vidrio o plástico no deberán recogerse directamente con las manos. Se utilizarán pinzas o fórceps y el

material será depositado en un contenedor para residuos punzocortantes. Posteriormente se realizará el procedimiento de descontaminación correspondiente al área afectada (OMS, 2020c; INDRE, 2020).

DESCONTAMINACIÓN RUTINARIA DE SUPERFICIES

Al finalizar cada jornada de trabajo, las superficies de contacto frecuente, cabinas de bioseguridad, mesas de trabajo y equipos deberán limpiarse y desinfectarse utilizando los desinfectantes autorizados por el laboratorio, siguiendo los tiempos de contacto recomendados por el fabricante.

RECEPCIÓN DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO

Las muestras procesadas en la Unidad COVID del Laboratorio de Biología Molecular del CUCosta, se reciben únicamente en el área asignada para la Recepción de muestras en donde son registradas en el formato establecido (véase Anexo 1). Posteriormente, las muestras ingresan directamente al área de Manejo de Agentes Infecciosos donde se realiza la inactivación viral; esto con la finalidad de disminuir el riesgo de contaminación de otras áreas que no se han destinado al análisis de diagnóstico molecular.

Las muestras deben venir etiquetadas con los siguientes datos con nombre o clave del paciente, género, lugar de residencia, edad, fecha de toma de la muestra, procedencia de la muestra.

DESEMBALAJE DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO

Una vez ingresadas al área de Manejo de Agentes Infecciosos, el triple embalaje es ingresado a una Cabina de Seguridad Biológica clase II tipo A2 marca Labconco, modelo Purifier Logic+.

Plan de contingencia y respuesta a emergencias biológicas

ACCIDENTES CON MATERIAL PUNZOCORTANTE POTENCIALMENTE CONTAMINADO

Los accidentes ocasionados por agujas, lancetas, vidrio roto u otros objetos punzocortantes contaminados con material biológico representan un riesgo potencial para la salud del personal. Ante cualquier incidente de este tipo, se deberá actuar de manera inmediata siguiendo el procedimiento descrito a continuación (OMS, 2020c; INDRE, 2020).

PROCEDIMIENTO DE RESPUESTA INMEDIATA

1. Suspender inmediatamente la actividad que se esté realizando.
2. Retirar los guantes y el equipo de protección personal que pudiera estar contaminado.
3. Permitir el sangrado espontáneo de la herida sin ejercer presión excesiva.
4. Lavar la zona afectada con abundante agua y jabón durante varios minutos.
5. No utilizar sustancias irritantes, corrosivas o procedimientos que puedan incrementar el daño tisular.
6. Notificar de inmediato el incidente al responsable del laboratorio.
7. Registrar el accidente en el formato institucional correspondiente (véase Anexo 1).
8. Acudir al servicio médico institucional para la valoración clínica y el seguimiento ocupacional correspondiente.

9. Dar seguimiento a las indicaciones emitidas por el personal de salud ocupacional.

EXPOSICIÓN POR SALPICADURAS

En caso de exposición de mucosas o piel lesionada a material biológico potencialmente infeccioso:

1. Lavar inmediatamente la zona afectada con abundante agua.
2. En caso de exposición ocular, irrigar con agua o solución salina durante varios minutos.
3. Notificar el incidente al responsable del laboratorio.
4. Solicitar valoración médica inmediata.

RUPTURA DE RECIPIENTES CON MATERIAL BIOLÓGICO

En caso de ruptura de tubos, recipientes o contenedores con muestras biológicas potencialmente infecciosas, se deberá aplicar el procedimiento de manejo de derrames y descontaminación de áreas descrito en esta guía.

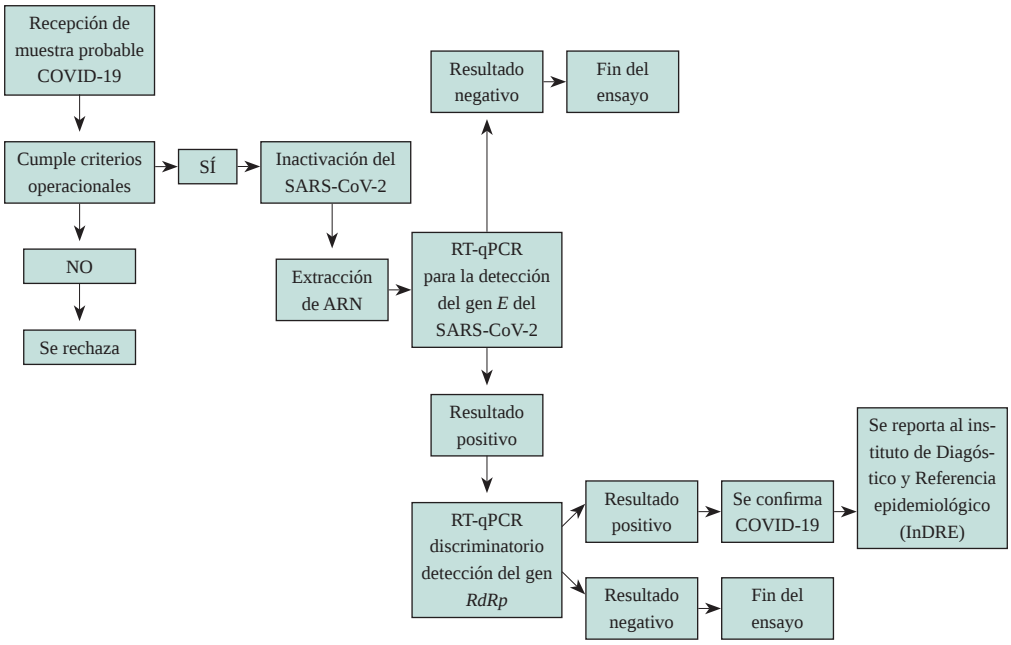
NOTIFICACIÓN DEL INCIDENTE

Todo accidente deberá documentarse mediante un reporte escrito que incluya:

1. Fecha y hora del incidente
2. Tipo de accidente
3. Material involucrado
4. Actividad que se realizaba al momento del evento
5. Personal involucrado
6. Medidas correctivas implementadas

La documentación y análisis de los incidentes permiten identificar áreas de mejora y fortalecer las medidas de bioseguridad del laboratorio.

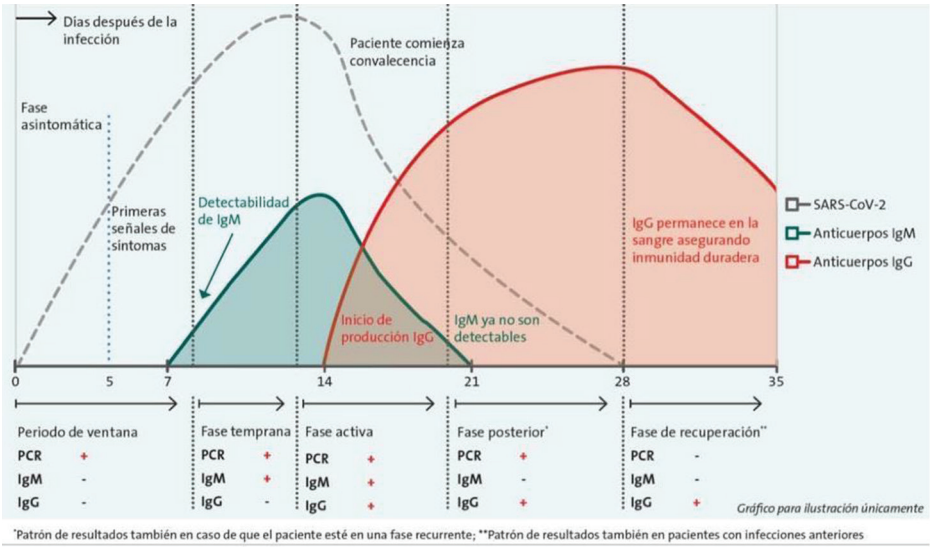
Diagrama de flujo de trabajo



La etapa de progresión de la enfermedad de COVID-19 determina qué método de detección es más efectivo (véase Figura 3).

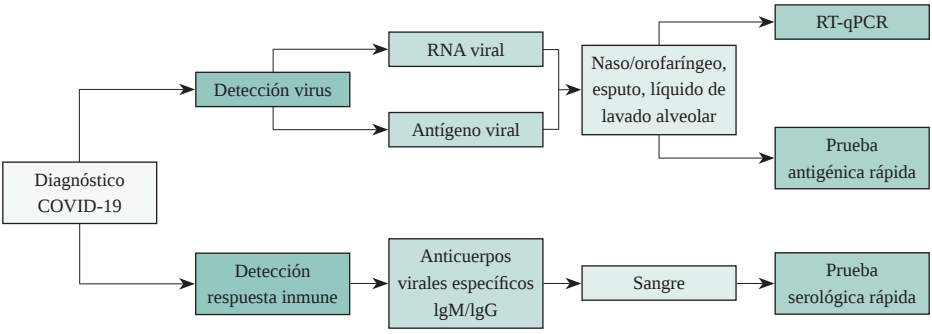
Los métodos de laboratorio para diagnosticar COVID-19 siguen dos vías: la detección del coronavirus en sí y la detección de la respuesta inmune adaptativa del cuerpo al virus. Como la enfermedad ataca principalmente a los pulmones, las muestras tomadas del tracto respiratorio superior pueden ser de baja calidad y podrían dar lugar a falsos negativos al ser analizados con la técnica de RT-qPCR (Figura 4) (Biopanda, 2020).

Figura 3. Método de Detección recomendado de acuerdo al avance de la COVID-19



Fuente: Analizalab (2020).

Figura 4. Pruebas diagnósticas de laboratorio



Fuente: Modificado de Biopanda (2020).

Cuadro 2. Capacidad diagnóstica de la Unidad COVID del Laboratorio de Biología Molecular del CUCosta de la UdeG

Técnica	Equipos	Capacidad instalada diaria
RT-qPCR	BlackStar 96 Genes2Life QuantStudio 5	120 muestras

Cuadro 3. Descripción y condiciones específicas por tipo de muestra

Tipo de muestra	Material	Temperatura de transporte	Almacenamiento	Comentarios
Exudado faríngeo y nasofaríngeo	Medio de transporte viral. Hisopos de dacrón o rayón con mango de plástico (exudado faríngeo). Hisopos de dacrón o rayón con mango flexible (exudado nasofaríngeo).	2 a 8 °C	≤ 5 días: 2 a 8 °C > 5 días: -70 °C	El exudado faríngeo y nasofaríngeo se debe colocar en el mismo tubo para incrementar la carga viral.
Lavado bronquial	Contenedor estéril con medio viral	2 a 8 °C	≤ 48 horas: 2 a 8 °C > 48 horas: 2 a 8 °C	Puede haber dilución del patógeno, pero aun así vale la pena tomarla. Se requiere como mínimo 2 mL (1 mL de lavado bronquioalveolar más 1 mL de medio de transporte).
Aspirado traqueal, aspirado nasofaríngeo o lavado nasal	Contenedor estéril con medio viral	2 a 8 °C	≤ 48 horas: 2 a 8 °C > 48 horas: 2 a 8 °C	Se requiere como mínimo 2 mL (1 mL de lavado bronquioalveolar más 1 mL de medio de transporte).
Biopsia de pulmón	Contenedor estéril con medio viral	2 a 8 °C	≤ 5 días: 2 a 8 °C > 5 días: -70 °C	2 cm^3 de la parte visiblemente más afectada.

Procedimientos para toma de muestras clínicas

El éxito del diagnóstico virológico depende principalmente de la calidad de la muestra, así como de las condiciones de su transporte y almacenamiento antes de ser procesada en el laboratorio.

Todas las muestras deben ser colocadas en tubos con medio de transporte viral perfectamente cerrado y etiquetado. El personal capacitado realizará el triple embalaje de las muestras, se asegurarán de colocarlas de forma individual en una gradilla dentro de una hielera rígida, la cual contendrá refrigerantes para mantener la muestra entre 2 a 8 °C y deberán ser enviadas en menos de 24 horas al Laboratorio de Biología Molecular-Unidad COVID. Toda muestra deberá estar etiquetada con el nombre y apellido del paciente e ir acompañada del estudio epidemiológico de caso sospechoso de COVID-19.

CONSERVACIÓN Y CADENA DE FRÍO DE LAS MUESTRAS

La integridad del material genético viral depende del mantenimiento adecuado de la cadena de frío desde la toma de muestra hasta su procesamiento en el laboratorio. Todas las muestras deberán transportarse entre 2 y 8 °C utilizando contenedores apropiados y refrigerantes suficientes para mantener la temperatura durante todo el trayecto. Cualquier interrupción de la cadena de frío debe registrarse y considerarse durante la interpretación de los resultados, debido al posible deterioro del ARN viral y la consecuente disminución de la sensibilidad diagnóstica (OMS, 2020c; INDRE, 2020).

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE MUESTRAS

- Que cumpla con la definición operacional de caso sospechoso de COVID-19.
- Que incluya estudio epidemiológico de caso sospechoso de COVID-19 correctamente llenado y validado.
- Muestra en medio de trasporte viral (color rojo).
- Muestra tomada con hisopo de rayón o dacrón.

CRITERIOS DE RECHAZO DE MUESTRAS

- Que no cumpla con la definición operacional de caso sospechoso de COVID-19.
- Que no incluya estudio epidemiológico de caso sospechoso de COVID-19.
- Muestra en medio de trasporte viral virado (amarillo o rosa).
- Muestra tomada con hisopo de algodón y punta de madera.
- Muestra con temperatura mayor a 8 °C.

La calidad de la muestra constituye uno de los factores más importantes para la confiabilidad del diagnóstico molecular. El cumplimiento de los criterios de toma, transporte, conservación y aceptación de muestras permite minimizar errores preanalíticos que podrían afectar la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas (OMS, 2020d; Tang *et al*., 2020).

Procesamiento de muestras de hisopado para extracción de ácido ribonucleico (ARN)

Las muestras de hisopado recolectadas de pacientes para pruebas de diagnóstico molecular con frecuencia contienen material mucoide o mucopurulento que hace que la muestra sea demasiado viscosa para un procesamiento eficiente posteriormente realizar para la extracción de ácidos nucleicos. En esta área se contará con una hoja de control para llevar el registro de observaciones encontradas en la manipulación de las muestras (véase Anexo 2).

MATERIALES

- Solución salina tamponada con fosfato estéril 0.01 M (PBS), pH 7.2
- Micropipetas.
- Punta de pipeta con barreras de aerosol.
- Tubo de microcentrífuga de 1.5 mL o 2.0 mL estéril.
- Tubo de tapón de rosca estéril de 10 mL o 15 mL (polipropileno).

PRECAUCIONES

La manipulación y procesamiento de la muestra debe realizarse de acuerdo con pautas de seguridad biológica dictadas en el Protocolo de Bioseguridad y Biocustodia para el manejo de pacientes durante la toma de muestras de casos sospechosos de enfermedad por COVID-19 (INDRE, 2020).

La muestra debe ser manipulada con cuidado para evitar la contaminación cruzada, incluyendo el cambio de guantes entre muestras. Todas las muestras deben mantenerse frías durante el procesamiento.

Extracción de ARN

OBJETIVO

Establecer el método de obtención de ARN viral de muestras clínicas para la detección de virus mediante la técnica RT-qPCR utilizando el kit de extracción manual de ácidos nucleicos QIAamp VIRAL RNA. En esta área se debe contar con una hoja de control para registrar el método empleado y las observaciones que surjan dirante el proceso (véanse Anexos 3 y 4).

CAMPO DE APLICACIÓN

Esta técnica está dirigida al personal del área de biología molecular responsable del diagnóstico de agentes virales de importancia para la salud pública, particularmente aquellos con alta transmisibilidad, potencial de brote o riesgo de generar enfermedad grave.

FUNDAMENTO

KIT DE EXTRACCIÓN QIAamp VIRAL RNA MINI KIT®

El kit de extracción de ARN viral QIAamp proporciona una forma rápida y fácil de purificar ARN viral para un uso confiable en tecnologías de amplificación. El ARN viral se puede purificar del plasma (tratado con anticoagulantes distintos de la heparina), suero y otros fluidos corporales libres de células. Las muestras pueden ser frescas o congeladas, pero si están congeladas, no deben descongelarse más de una vez. El proceso de congelación y descongelación continuo de muestras de plasma conduce a una reducción

de los títulos virales, lo cual debe evitarse para una sensibilidad óptima. Los crioprecipitados se acumulan cuando las muestras se someten a ciclos repetidos de congelación-descongelación. Esto puede conducir a la obstrucción de la membrana QIAamp cuando se utiliza el protocolo de vacío.

El kit es de uso general y se puede emplear para aislar el ARN viral de una amplia variedad de virus, pero no se puede garantizar el rendimiento de cada virus.

El kit combina las propiedades de unión selectiva de una membrana de sílice con la velocidad de una microcentrífuga o vacío. La muestra se lisa en condiciones altamente desnaturalizantes para inactivar las Ribonucleasas (RNasas) y asegurar el aislamiento del ARN viral intacto. El ARN se une a una membrana de sílice y los contaminantes se eliminan eficientemente en dos pasos utilizando dos tampones de lavado diferentes. El ARN de alta calidad se eluye en un tampón especial libre de RNasas, listo para su uso directo o almacenamiento seguro. El ARN purificado está libre de proteínas, nucleasas y otros contaminantes e inhibidores. La membrana garantiza una recuperación extremadamente alta de ARN puro e intacto en solo 20 minutos sin el uso de extracción con fenol/cloroformo o precipitación con alcohol.

VERIFICACIÓN DE REACTIVOS Y CONTROL DE CADENA DE FRÍO

Con el fin de garantizar la integridad de los reactivos y la confiabilidad de los resultados, todos los materiales utilizados para la extracción de ARN deberán almacenarse y manipularse de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se deberá verificar periódicamente la temperatura de refrigeradores, congeladores y ultracongeladores destinados al almacenamiento de reactivos y muestras biológicas (OMS, 2020c; QIAGEN, 2020).

Antes de cada procedimiento, el personal responsable deberá comprobar:

1. La fecha de caducidad de los reactivos.
2. La integridad física de los envases y empaques.
3. La ausencia de contaminación visible o deterioro de los reactivos.

4. El cumplimiento de las condiciones de almacenamiento recomendadas por el fabricante.
5. El registro de temperatura de los equipos de conservación.

Los reactivos que presenten evidencia de deterioro, contaminación, almacenamiento inadecuado o fecha de caducidad vencida no deberán utilizarse en procedimientos diagnósticos.

La interrupción de la cadena de frío puede afectar la estabilidad de enzimas, sondas, iniciadores y controles utilizados en los procedimientos moleculares, comprometiendo el desempeño analítico y la confiabilidad de los resultados obtenidos.

EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS

EQUIPOS E INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN

- Gabinete de Bioseguridad tipo II
- Centrifuga
- Refrigerador de -2 a -8 °C

MATERIAL

- Tubos polipropileno estériles de 1.8 mL (en frasco)
- Guantes desechables de nitrilo
- Micropipetas de volumen variable con capacidad de 100 a 1000 µL
- Micropipetas de volumen variable con capacidad de 1 a 200 µL
- Ultramicrocentrífuga con revoluciones hasta 20,000 g
- Vórtex
- Gasas estériles (en frasco)
- Tubos cónicos de 50 mL
- Gradillas para tubos polipropileno (2)
- Puntas para pipeta de 100 a 1000 µL con filtro estériles
- Puntas para pipeta de 1 a 200 µL con filtro estériles
- Vaso de precipitados estéril de 1000 mL (para desechos)

REACTIVOS

- Kit de extracción de ARN viral QIAGEN (tubo colector, Columnas, Buffer concentrado AW-1, Buffer concentrado AW-2, Buffer de lisis AVL, Acarreador, Buffer de elusión).
- Etanol absoluto (100 %) grado biología molecular.
- Etanol al 70 % para desinfectar (atomizador).

CONDICIONES AMBIENTALES

- Gabinete de Bioseguridad nivel II

OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

MUESTRA PARA VIRUS RESPIRATORIOS

Pueden ser muestras respiratorias, incluyendo lavado bronquioalveolar, aspirado traqueal, esputo, aspirados o lavados nasofaríngeos y orofaríngeos, hisopos nasofaríngeos/orofaríngeos. En los casos Enfermedad Tipo Influenza (ETI) y Enfermedad Respiratoria Aguda Grave (IRAG), se toma muestra de exudado faríngeo o nasofaríngeo. Estas muestras se toman solamente dentro de los tres primeros 3 días (72 horas) de iniciados los síntomas.

Si el paciente está intubado, en los primeros cinco días después de iniciados los síntomas se tomará lavado bronquioalveolar, no menos de 2 mL. En caso de defunción en la que se haya dictaminado como causa la neumonía aguda, se deben de recuperar muestras de pulmón, aproximadamente 2 cm del parénquima pulmonar visiblemente afectado, aún después de las 72 horas de iniciados los síntomas. Estos especímenes pueden ser biopsia de tejido fresco, el cual se pone en el medio de transporte viral.

MUESTRA SEROLÓGICA Y/O PLASMA

La extracción de ARN de a partir de muestras de suero, plasma u otros fluidos requiere una inactivación inmediata de ARNasas y la desnaturalización

de proteínas para garantizar su estabilidad; cualquier otra muestra diferente deberá ser evaluada, así como su ensayo de extracción específico.

PROCEDIMIENTO (véase Figura 5)

1. Pipetear 560 µL de Buffer de lisis viral (avl) preparado que contiene arn transportador en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

   Nota: Si el volumen de la muestra es superior a 140 µL, aumentar la cantidad de Buffer AVL-portador de ARN proporcionalmente (por ejemplo, una muestra de 280 µL requerirá 1120 µL de Buffer AVL-portador de ARN) y usar un tubo más grande.
2. Agregar 140 µL de plasma, suero, orina, sobrenadante de cultivo celular o fluido corporal libre de células al Buffer AVL transportador de ARN en el tubo de microcentrífuga. Mezclar por vórtice de pulso durante 15 s.

   Nota: Para garantizar una lisis eficiente, es esencial que la muestra se mezcle completamente con Buffer AVL para obtener una solución homogénea. También se pueden usar muestras congeladas que solo se hayan descongelado una vez.
3. Incubar a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 10 min.

   Nota: La lisis de partículas virales se completa después de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente. Los tiempos de incubación más largos no tienen efecto sobre el rendimiento ni la calidad del ARN purificado.
4. Centrifugar brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
5. Agregar 560 µL de etanol (96-100 %) a la muestra y mezcle por vórtice de pulso durante 15 s. Después de mezclar, centrifugar brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.

   Nota: Usar solo etanol, ya que otros alcoholes pueden reducir el rendimiento y la pureza del ARN. No usar alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias, como metanol o metiletilcetona. Si el volumen de la muestra es superior a 140 µL, aumentar la cantidad de etanol proporcionalmente (por ejemplo, una muestra de 280 µL reque-

rirá 1120 µL de etanol). Para asegurar una unión eficiente, es esencial que la muestra se mezcle completamente con el etanol para producir una solución homogénea.

6. Aplicar cuidadosamente 630 µL de la solución del paso 5 a la columna QIAamp Mini (en un tubo de recolección de 2 mL) sin humedecer el borde. Cerrar la tapa y centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Colocar la columna QIAamp Mini en un tubo de recolección limpio de 2 mL y desechar el tubo que contiene el filtrado.

   Nota: Cerrar cada columna de centrifugado para evitar la contaminación cruzada durante la centrifugación.

   Nota: La centrifugación se realiza a 6000 x g (8000 rpm) para limitar el ruido de la microcentrífuga. La centrifugación a toda velocidad no afectará el rendimiento o la pureza del ARN viral. Si la solución no ha pasado completamente a través de la membrana, centrifugar nuevamente a una velocidad más alta hasta que toda la solución haya pasado.

7. Abrir con cuidado la columna QIAamp Mini y repetir el paso 6. Si el volumen de la muestra fue superior a 140 µL, repetir este paso hasta que todo el lisado se haya cargado en la columna de centrifugado.

8. Abrir con cuidado la columna QIAamp Mini y agregar 500 µL de Buffer de lavado (AW1). Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Colocar la columna QIAamp Mini en un tubo de recolección limpio de 2 mL (incluido) y desechar el tubo que contiene el filtrado.

   Nota: No es necesario aumentar el volumen de Buffer AW1 incluso si el volumen de muestra original era mayor de 140 µL.

9. Abrir con cuidado la columna QIAamp Mini y agregue 500 µL de Buffer de lavado (AW2). Cierre la tapa y centrifugue a toda velocidad (20,000 x g; 14,000 rpm) durante 3 min. Continúe directamente con el paso 11, o para eliminar la posible transferencia de Buffer AW2, realice el paso 10 y luego continúe con el paso 11.

   Nota: el Buffer residual AW2 en el eluato puede causar problemas en las aplicaciones posteriores. Algunos rotores de centrífuga pueden

vibrar con la desaceleración, lo que da como resultado un flujo continuo que contiene Buffer AW2 y entra en contacto con la columna QIAamp Mini.

Quitar la columna QIAamp Mini y el tubo de recolección del rotor también puede hacer que el flujo entre en contacto con la columna QIAamp Mini. En estos casos, se debe realizar el paso opcional 10.

Recomendación: coloque la columna QIAamp Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 mL (no incluido) y deseche el tubo de recolección viejo con el filtrado. Centrifugar a toda velocidad durante 1 min.

10. Colocar la columna QIAamp Mini en un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 mL (no incluido).

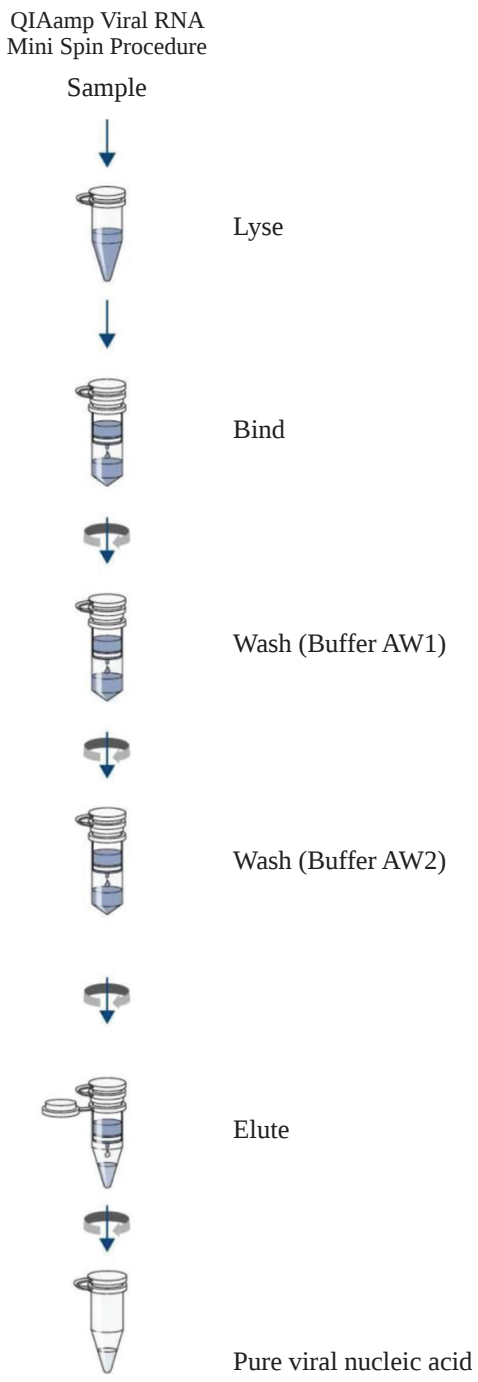
    Desechar el tubo de recolección anterior que contiene el filtrado. Abrir con cuidado la columna QIAamp Mini y agregar 60 µL del Buffer de elución (AVE). Cerrar la tapa e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.

11. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Una sola elución con 60 µL de tampón AVE es suficiente para eluir al menos el 90 % del ARN viral de la columna QIAamp Mini. Realizar una doble elución con 2 x 40 µL de Buffer AVE aumentará el rendimiento hasta en un 10 %. La elución con volúmenes de menos de 30 µL conducirá a rendimientos reducidos y no aumentará la concentración final de ARN en el eluato.

    El ARN viral es estable hasta por un año cuando se almacena entre -30 °C a -15 °C.

    La obtención de ARN viral íntegro y libre de contaminantes es un requisito indispensable para garantizar la eficiencia de las etapas posteriores de amplificación molecular. La correcta ejecución de los procedimientos de extracción y conservación del ARN contribuye a mejorar la calidad analítica y la confiabilidad de los resultados diagnósticos (QIAGEN, 2020; Tang *et al*., 2020).

Figura 5. Procedimiento de extracción empleando el kit de extracción QIAamp Viral RNA Mini kit®



Diagnóstico mediante RT-qPCR

OBJETIVO

Establecer el procedimiento para la detección del material genético viral mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa Cuantitativa en Tiempo Real por sus siglas en inglés RT-qPCR. En esta área se contará con una hoja de control para registrar qué muestras fueron incluidas en cada corrida y que posiciones de pocillos en las placas corresponde a cada muestra, así como, el registro de las observaciones derivadas del procedimiento realizado (véase Anexo 5).

CAMPO DE APLICACIÓN

Esta técnica está dirigida al personal del área de biología molecular participante en el diagnóstico de virus con potencial pandémico.

FUNDAMENTO

La reacción en cadena de la polimerasa es conocida como PCR por sus siglas en inglés. Consiste en la amplificación de regiones específicas de ADN mediante ciclos de temperatura y una enzima polimerasa para obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, amplificándolo para propósitos de diagnóstico e investigación. En los procesos de PCR se requiere la utilización de polimerasas termostables, como la Taq DNA polimerasa, debido a que es necesario aplicar altas temperaturas para desnaturalizar la molécula de ADN. La RT-qPCR es una variante de la PCR,

utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Para ello emplea un molde de ADN complementario (ADNc) generado a partir del ARN viral mediante la acción de una transcriptasa reversa, así como iniciadores específicos, desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), una solución amortiguadora apropiada y una ADN polimerasa termoestable responsable de la amplificación de la secuencia blanco. A dicha mezcla se le adiciona una sonda marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que contenga sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos en cada ciclo.

VERIFICACIÓN PREVIA AL ENSAYO

Antes de preparar cada corrida de RT-qPCR se deberá verificar que los reactivos empleados se encuentren dentro de su periodo de vigencia, hayan sido conservados bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas por el fabricante y no presenten signos de deterioro. Asimismo, deberá confirmarse el adecuado funcionamiento del termociclador y de los equipos de refrigeración utilizados para la conservación de reactivos y controles (Bustin *et al*., 2009; Tang *et al*., 2020).

CONTROLES DE CALIDAD DE LA RT-qPCR

Con el fin de garantizar la validez de los resultados obtenidos mediante RT-qPCR, cada corrida deberá incluir controles de calidad que permitan verificar el correcto funcionamiento de los reactivos, la ausencia de contaminación y el adecuado desempeño del proceso analítico (Bustin *et al*., 2009; Tang *et al*., 2020).

CONTROL POSITIVO

Consiste en una muestra que contiene material genético viral previamente caracterizado. Su función es verificar que los reactivos, el programa de

amplificación y las condiciones generales de la reacción permiten la detección adecuada de la secuencia blanco.

CONTROL NEGATIVO DE AMPLIFICACIÓN

Consiste en agua libre de nucleasas o un reactivo sin material genético. Su función es detectar contaminación cruzada durante la preparación de la mezcla de reacción o contaminación de reactivos.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO DE CORRIDAS DE RT-qPCR

Una corrida de RT-qPCR será considerada válida únicamente cuando los controles de calidad presenten el comportamiento esperado. Los criterios para la interpretación de los controles positivo y negativo, así como las acciones correctivas correspondientes, se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Interpretación de los controles de calidad de la RT-qPCR

Resultado del control	Interpretación	Acción
Control positivo amplifica adecuadamente.	Corrida válida.	Continuar con la interpretación de resultados.
Control positivo no amplifica.	Posible degradación de reactivos, error de preparación o falla del equipo.	Repetir la corrida completa.
Control negativo no amplifica.	Corrida válida.	Continuar con la interpretación de resultados.
Control negativo amplifica.	Contaminación cruzada o contaminación de reactivos.	Invalidar la corrida y repetir el ensayo.

Los resultados de las muestras clínicas únicamente deberán interpretarse cuando los controles de calidad cumplan los criterios de aceptación establecidos.

EQUIPOS E INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN

- Centrifuga para placas
- Microcentrifuga para tubos Polipropileno
- Cabina de flujo laminar con lámpara de Luz UV
- Micropipetas de 1000 µL, 100µL, 10 µL
- Vortex
- Refrigerador (2-8 °C)
- Congelador (-4 a -21 °C)
- Ultracongelador (-4 a -86 °C)
- Termociclador BlackStar 96 Genes2life

MATERIAL

- Placas de 96 pozos Fast
- Mica autoadherible para placa
- Puntas estériles libres de RNasas, con filtro de 10 µL
- Puntas estériles libres de RNasas, con filtro de 200 µL
- Puntas estériles libres de RNasas, con filtro de 1000 µL
- Bloque de enfriamiento
- Sanitas
- RNAsa Away
- Alcohol
- Guantes de nitrilo
- Batas desechables
- Caretas desechables
- Gradillas para tubos Polipropileno
- Marcadores indelebles de punta fina
- Formato para registro de muestras
- Pipetas
- Bolsas de polipropileno
- Contenedores para puntas de desechables

PROTOCOLO DE TRABAJO

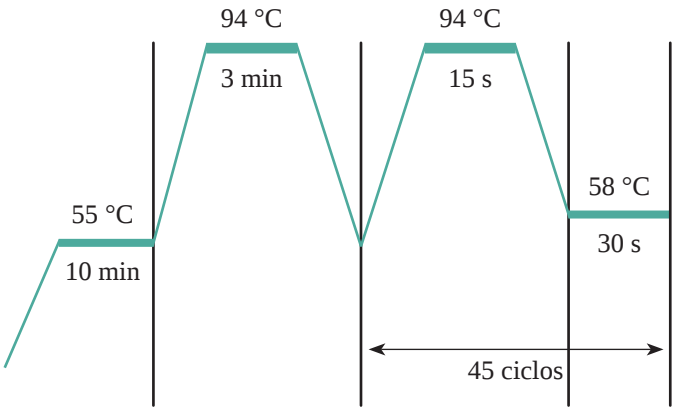
1. Realizar los cálculos correspondientes al número de reacciones a preparar tomando como referencia el siguiente Cuadro 5:

Cuadro 5. Componentes de reacción de RT-qPCR

Componente	Volumen 1 rxn
Primer mix	2 µL
Enzima	0.5 µL
Buffer	12.5 µL
RNA	5 µL
Agua libre de nucleasas	Ajustar a volumen final
Volumen de reacción	25 µL

2. Una vez preparado la mezcla de reacción (Master Mix), dispensar el volumen correspondiente y agregar RNA.
3. Asegurarse de incluir control negativo en cada ensayo, agregando el agua necesaria para compensar el volumen de reacción.
4. Una vez preparadas las reacciones programar el siguiente protocolo de termociclado (Figura 6):

Figura 6. Programa de RT-qPCR



Las sondas de la mezcla de inciadores (Primer Mix) se encuentran marcadas con FAM (Verde). La toma de datos de fluorescencia se realiza en el paso de 58 °C.

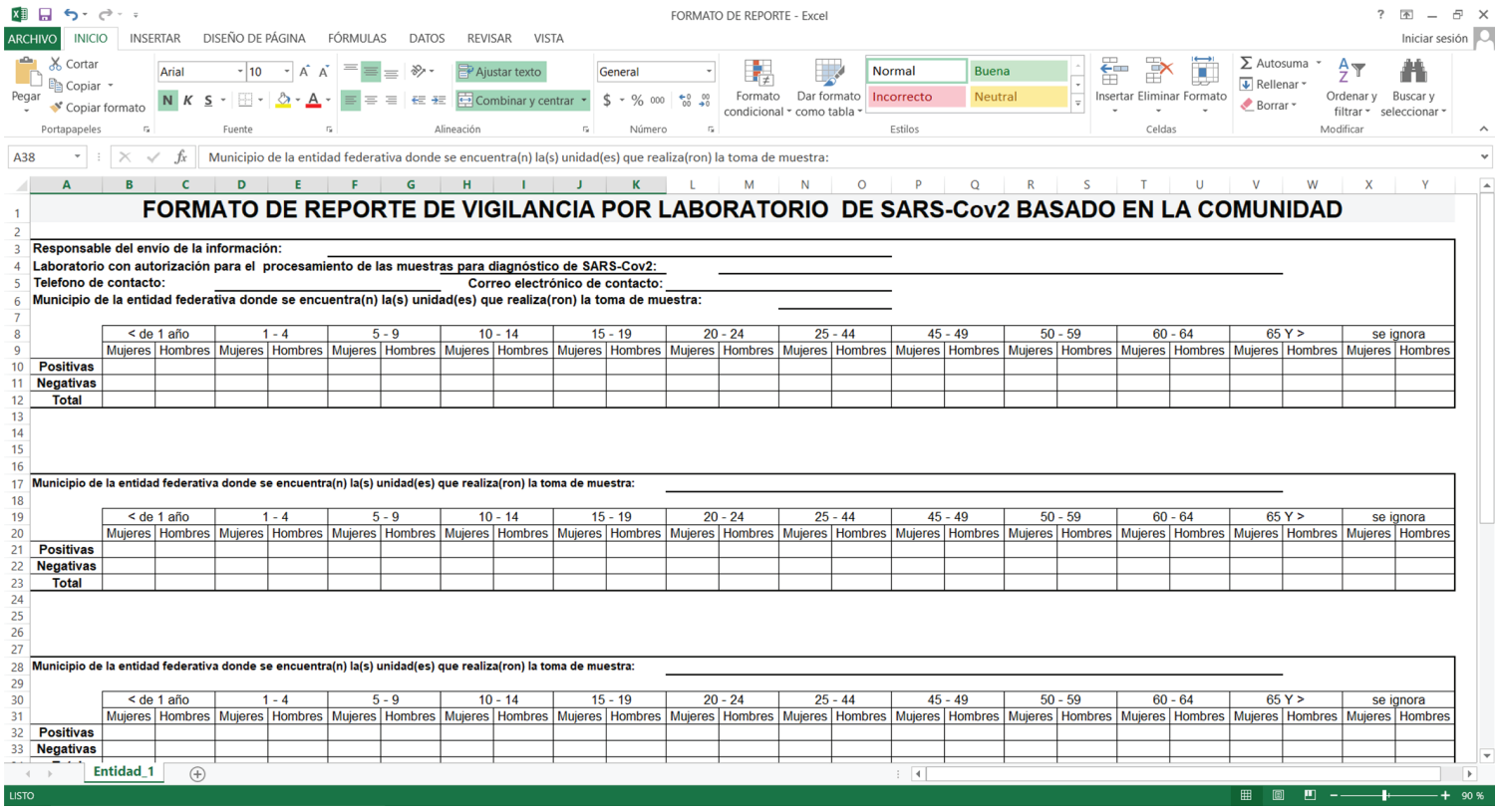
INTERPRETACIÓN Y RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS

La RT-qPCR constituye una de las herramientas más sensibles y específicas para la detección de virus con genoma de ARN. Durante la pandemia de COVID-19 se consolidó como el método de referencia para la identificación de SARS-CoV-2 y en la actualidad continúa siendo ampliamente utilizada para el diagnóstico de diversos virus de importancia médica, ya que permite identificar secuencias específicas del ARN viral presentes en muestras biológicas de pacientes con sospecha de infección (Corman *et al*., 2020; Tang *et al*., 2020). La confiabilidad de los resultados depende de la adecuada ejecución de todas las etapas del proceso diagnóstico, incluyendo la toma de muestra, conservación y transporte, la extracción del ARN viral y la correcta preparación de las reacciones de amplificación (Tang *et al*., 2020).

La obtención de resultados válidos requiere el cumplimiento de las medidas de bioseguridad, la utilización adecuada de controles de calidad y el apego a los procedimientos estandarizados descritos en esta guía. La estandarización de estas metodologías permite mejorar la reproducibilidad de los resultados entre laboratorios y fortalecer las actividades de vigilancia epidemiológica y respuesta ante emergencias sanitarias causadas por agentes virales emergentes (OMS, 2020c).

Importante: En caso de que los resultados obtenidos sean positivos o sospechosos de positivos, es obligación notificar al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) https://www.gob.mx/salud (Figura 7).

Figura 7. Formato de reporte de resultados



FORMATO DE REPORTE - Excel

ARCHIVO | INICIO | INSERTAR | DISEÑO DE PÁGINA | FÓRMULAS | DATOS | REVISAR | VISTA

A38: Municipio de la entidad federativa donde se encuentra(n) la(s) unidad(es) que realiza(ron) la toma de muestra:

FORMATO DE REPORTE DE VIGILANCIA POR LABORATORIO DE SARS-Cov2 BASADO EN LA COMUNIDAD

Responsable del envio de la información: _____

Laboratorio con autorización para el procesamiento de las muestras para diagnóstico de SARS-Cov2: _____

Telefono de contacto: _____ **Correo electrónico de contacto:** _____

Municipio de la entidad federativa donde se encuentra(n) la(s) unidad(es) que realiza(ron) la toma de muestra: _____

	< de 1 año		1 - 4		5 - 9		10 - 14		15 - 19		20 - 24		25 - 44		45 - 49		50 - 59		60 - 64		65 Y >		se ignora	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
Positivas																								
Negativas																								
Total																								

Municipio de la entidad federativa donde se encuentra(n) la(s) unidad(es) que realiza(ron) la toma de muestra: _____

	< de 1 año		1 - 4		5 - 9		10 - 14		15 - 19		20 - 24		25 - 44		45 - 49		50 - 59		60 - 64		65 Y >		se ignora	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
Positivas																								
Negativas																								
Total																								

Municipio de la entidad federativa donde se encuentra(n) la(s) unidad(es) que realiza(ron) la toma de muestra: _____

	< de 1 año		1 - 4		5 - 9		10 - 14		15 - 19		20 - 24		25 - 44		45 - 49		50 - 59		60 - 64		65 Y >		se ignora	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
Positivas																								
Negativas																								

Entidad_1

LISTO

Referencias

Al-Tawfiq, J. A. y Gautret, P. (2019). Asymptomatic Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infection: extent and implications for infection control: a systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *27*, 27-32. https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.12.003

Al-Tawfiq, J. A., Zumla, A. y Memish, Z. A. (2014). Travel implications of emerging coronaviruses: SARS and MERS-CoV. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *12*(5), 422-8. https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2014.06.007

Analizalab. El valor del diagnóstico integral. (2020). Detección de la COVID-19. https://analizalab.com/es/deteccion-de-la-covid-19/

Baharoon, S. y Memish, Z. A. (2019). MERS-CoV as an emerging respiratory illness: a review of prevention methods. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *32*, 101520. https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.101520

Bastola, A., Sah, R., Rodriguez-Morales, A. J., Lal, B. K., Jha, R., Ojha, H. C. *et al*. (2020). The first 2019 novel coronavirus case in Nepal. *The Lancet Infectious Disease*, *20*, 279-80. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30067-0

Biopanda Reagents UK. (2020). COVID-19 IgM/IgG Rapid Test. https://biopanda.co.uk/php/products/rapid/infectious_diseases/covid19.php

Bonilla-Aldana, D. K., Dhama, K., y Rodriguez-Morales, A. J. (2020a) Revisiting the one health approach in the context of COVID-19: a look into the ecology of this emerging disease. *Advances in Animal Ve-*

terinary Sciences, *8*(3), 234-237. http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.3.234.237

Bonilla-Aldana, D. K., Villamil-Gómez, W. E., Rabaan, A. A., y Rodriguez-Morales, A. J. (2020b). Una nueva zoonosis viral de preocupación global: COVID-19, enfermedad por coronavirus 2019. *Iatreia*, *33*(2), 107-110. DOI 10.17533/udea.iatreia.85

Burki, T. (2023). WHO ends the COVID-19 public health emergency. *The Lancet Respiratory Medicine*, *11*(7), 588. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(23)00217-5

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M. *et al*. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611-622. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797

Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. (2026). Ley General de Salud [Última reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de enero de 2026]. Secretaría de Servicios Parlamentarios. https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lgs.htm

Chan, JF.-W., Yuan, S., Kok, K.-H., To, KK.-W., Chu, H., Yang. J. *et al*. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*, *395*(10223), 514-523. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9

Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y. *et al*. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*, *395*(10233), 507-513. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W. *et al*. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, *25*(3), 2000045. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

De Wit, E., Van Doremalen, N., Falzarano, D., y Munster, V. J. (2016). SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature*

Reviews. Microbiology, *14*(8), 523-534. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81

Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., Van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S. *et al*. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, *348*(20), 1967-1976. https://doi.org/10.1056/nejmoa030747

European Centre for Disease prevention and Control (ECDC). (2020). Outbreak of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19): increased transmission globally-fifth update. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-outbreak-novel-coronavirus-disease-2019-increase-transmission-globally-COVID-19.pdf

Gorbalenya, A. E., Bker, S. C., Baric, R. S., De Groot, R. J., Drosten, C. *et al*. (2020). The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*, *5*, 536-544. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z

Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B., Gupta, R. K., Thomson, E. C., Harrison, E. M. *et al*. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(7), 409-424. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0

Holshue, M. L., DeBolt, C., Lindquist, S., Lofy, K. H., Wiesman, J., Bruce, H. *et al*. (2020). First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *New England Journal of Medicine*, *382*(10), 929-936. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191

Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y. *et al*. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, *395*(10223), 497-506. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). (2020). Protocolo de Bioseguridad y biocustodia para el manejo de pacientes durante la toma de muestras de casos probables por enfermedad por 2019 nCoV, del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos «Dr. Manuel Martínez Báez». Secretaría de Salud. Primera edición. https://

cvoed.imss.gob.mx/wp-content/uploads/2020/02/Protocolo-de-Bioseguridad-y-Biocustodia-2019-nCOV_InDRE_30_01_2020-1.pdf-1.pdf

Jin, Y. H., Cai, L., Cheng, Z. S., Cheng, H., Deng, T., Fan, Y. P., Fang, C. *et al*. (2020). A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). *Military Medical Research*, *7*(1), 4. https://doi.org/10.1186/s40779-020-0233-6

Kampf, G., Todt, D., Pfaender, S., y Steinmann, E. (2020). Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection*, *104*(3), 246-51. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022

Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S. *et al*. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, *348*(20), 1953-1966. https://doi.org/10.1056/nejmoa030781

Kuiken, T., Fouchier, R. A., Schutten, M., Rimmelzwaan, G. F., Van Amerongen, G., Van Riel, D. *et al*. (2003). Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet*, *362*(9380), 263-270. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13967-0

Lee, P. I. y Hsueh, P. R. (2020). Emerging threats from zoonotic coronaviruses-from SARS and MERS to 2019-nCoV. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *53*(3), 365-367. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.02.001

Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y. *et al*. (2020). Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *New England Journal of Medicine*, *382*(13), 1199-1207. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316

Millan-Oñate, J., Rodríguez-Morales, A. J., Camacho-Moreno, G., Mendoza-Ramírez, H., Rodríguez-Sabogal, I. A., y Álvarez-Moreno, C. (2020). A new emerging zoonotic virus of concern: the 2019 novel Coronavirus (COVID-19). *Infectio*, *24*(3), 187-192. https://doi.org/10.22354/in.v24i3.848

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020a). *Novel coronavirus (2019-nCoV)*. Situation report-10. 30 January 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200130-sitrep-10-ncov.pdf?sfvrsn=d0b2e480_2.2020

— (2020b). *Pneumonia of unknown cause-China*. https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unkown-cause-china/en/.2020

— (2020c). *Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV)*. Interim guidance. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847_2

— (2020d). *Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases*. Interim guidance. https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/dc1b43a8-ede1-4078-9d11-309094332be8/content

— (2022). *Tracking SARS-CoV-2*. Variants. https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants

— (2023) *Declaración de la 15.ª reunión del Comité de Emergencias del RSI*. https://www.who.int/europe/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic

— (2024). *Reglamento Sanitario Internacional (2005)*. (3.ª ed., enmendado en 2014 y 2022). Organización Mundial de la Salud. https://apps.who.int/gb/bd/pdf_files/IHR_2022-sp.pdf

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). (2005). Declaración universal sobre bioética y derechos humanos. https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000146180_spa

Phan, L. T., Nguyen, T. V., Luong, Q. C., Nguyen, T. V., Nguyen, H. T., Le, H. Q. et al. (2020). Importation and human-to-human transmission of a novel coronavirus in Vietnam. *New England Journal of Medicine*, *382*(9), 872-874. https://doi.org/10.1056/NEJMc2001272

Plowright, R. K., Parrish, C. R., McCallum, H., Hudson, P. J., Ko, A. I., Graham, A. L. *et al*. (2017). Pathways to zoonotic spillover. *Nature Reviews. Microbiology*, *15*(8), 502-510. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.45

QIAGEN. (2020). QIAamp Viral RNA Mini Handbook. https://www.qiagen.com/en-US/resources/download/KitHandbook/hb-0354-007-hb-qa-viral-rna-mini-0720-ww

Rodriguez-Morales, A. J., Bonilla-Aldana, D. K., Balbin-Ramon, G. J., Rabaan, A. A., Sah, R., Paniz-Mondolfi, A., Pagliano, P., y Esposito, S. (2020). History is repeating itself: a probable zoonotic spillover as a cause of the 2019 novel Coronavirus epidemic. *Le Infezioni in Medicina*, *28*(1), 3-5.

Secretaría de Salud. (2020a). *Nuevo coronavirus 2019 nCoV. Comunicado técnico diario*. https://www.gob.mx/salud/documentos/informe-tecnico-diario-covid19-2022

— (2020b). *Lineamiento estandarizado para la vigilancia epidemiológica y por laboratorio de enfermedad de COVID-19*. http://cvoed.imss.gob.mx/wp-content/uploads/2020/01/LinVigEpiLab_COVID19.pdf.pdf.pdf

— (2020c). *Proceso de Prevención de Infecciones para las personas con COVID-19 (enfermedad por SARS-CoV-2), contactos y personal de la salud*. http://cvoed.imss.gob.mx/proceso-de-prevencion-de-infecciones-para-las-personas-con-covid-19/

— (2023). *Lineamiento estandarizado para la vigilancia epidemiológica y por laboratorio de enfermedad de respiratoria viral*. https://www.gob.mx/salud/documentos/lineamiento-estandarizado-para-la-vigilancia-epidemiologica-y-por-laboratorio-de-la enfermedad-respiratoria-viral

Silverstein, W. K., Stroud, L., Cleghorn, G. E., y Leis, J. A. (2020) First imported case of 2019 novel coronavirus in Canada, presenting as mild pneumonia. *The Lancet*, *395*(10225), 734. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30370-6

Tang, Y. W., Schmitz, J. E., Persing, D. H., y Stratton, C. W. (2020). Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(6), e00512-20. https://doi.org/10.1128/JCM.00512-20

Wang, R., Chen, J., Gao, K., y Wei, G. W. (2021). Analysis of SARS-CoV-2 mutations in the United States suggests presence of four substrains and novel variants. *Communications Biology*, 4, 228. https://doi.org/10.1038/s42003-021-01754-6

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B.,Song, J. *et al*. (2019). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, *382*(8), 727-733. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017.2020

Anexos

ANEXO 1

Formato de reporte de accidentes e incidentes de bioseguridad

DATOS GENERALES	
Fecha del incidente:	Hora del incidente:
Área de trabajo:	
Nombre del personal involucrado:	
Puesto o función:	

TIPO DE INCIDENTE

- ☐ Accidente con material punzocortante
- ☐ Salpicadura en piel íntegra
- ☐ Salpicadura en mucosas (ojos, nariz o boca)
- ☐ Derrame de material biológico
- ☐ Ruptura de tubos o recipientes
- ☐ Exposición a aerosoles
- ☐ Otro (especifique): _____

_____

DESCRIPCIÓN DEL INCIDENTE

MATERIAL BIOLÓGICO INVOLUCRADO

- ☐ Muestra respiratoria
- ☐ Sangre
- ☐ Suero o plasma
- ☐ ARN extraído
- ☐ Cultivo biológico
- ☐ Otro: _____

ACCIONES INMEDIATAS REALIZADAS

- ☐ Lavado de la zona afectada
- ☐ Descontaminación del área
- ☐ Cambio de equipo de protección personal
- ☐ Notificación al responsable del laboratorio
- ☐ Atención médica
- ☐ Otra: _____

PERSONAL NOTIFICADO

Nombre: _____

Cargo: _____

Hora de notificación: _____

SEGUIMIENTO Y MEDIDAS CORRECTIVAS

FIRMAS		
Personal involucrado: _____	Responsable del laboratorio: _____	Fecha de cierre del incidente: _____

ANEXO 2

Laboratorio de Biología Molecular, Unidad COVID

Hoja de Control de Recepción de Muestras

Fecha: Turno: Responsable de recepción:

Nombre o Clave	Hora	Procedencia	Observaciones

ANEXO 3

Laboratorio de Biología Molecular, Unidad COVID

Hoja de Control de Inactivación

Fecha:_____ Hora:_____ Responsable:_____

Identificación de muestra	Método	Observaciones

ANEXO 4

Laboratorio de Biología Molecular, Unidad COVID

Hoja de Control de Extracción de ARN

Fecha:_____ Hora:_____ Responsable:_____

Identificación de muestra	Método / Kit	Observaciones

ANEXO 5

Laboratorio de Biología Molecular, Unidad COVID

Hoja de Control de Amplificación RT-qPCR

Fecha:_____ Hora:_____ Número de Placa:_____ Agente Detectado:_____

Responsable:_____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
I												
J												
K												
L												
M												
N												
Ñ												
O												
P												
Q												
R												

Principios y metodología del análisis molecular de agentes virales de importancia epidemiológica. El caso de COVID-19
se terminó de editar en agosto de 2026
en el Centro Universitario de la Costa
Av. Universidad 203, delegación Ixtapa,
48280, Puerto Vallarta, Jalisco, México.
http://www.cuc.udg.mx/?q=e-libro

La edición consta de 1 ejemplar.

Cuidado de la edición: Laura Biurcos Hernández

Principios y metodología del análisis molecular de agentes virales de importancia epidemiológica. El caso de COVID-19 presenta un abordaje integral del trabajo en un Laboratorio de Biología Molecular aplicado al diagnóstico del SARS-CoV-2. La obra expone los fundamentos metodológicos que sustentan cada etapa del proceso analítico, desde la bioseguridad y el manejo ético de muestras clínicas, hasta la extracción de ARN y la detección molecular mediante RT-qPCR.

El contenido se desarrolla a partir de evidencia científica actualizada y de la experiencia operativa en el contexto de la pandemia, integrando criterios técnicos, normativos y de control de calidad que garantizan la confiabilidad del diagnóstico molecular. Asimismo, se incluyen diagramas de flujo, esquemas de trabajo y formatos de control que permiten comprender la lógica del proceso analítico sin perder de vista su fundamento científico.

Dirigida a estudiantes, profesionales y personal del área de la salud y las ciencias biológicas, esta obra constituye un referente metodológico para la comprensión del análisis molecular de enfermedades infecciosas emergentes, con un enfoque formativo y de interés permanente para la práctica y la enseñanza de la biología molecular aplicada.

Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de la Costa