



PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISITENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Página 1 de 28

1. Antecedente

Diagnóstico de laboratorio de la infección por nuevo coronavirus (nCoV)

Los coronavirus son un grupo de virus ARN altamente diversos de la familia Coronaviridae que se dividen en 4 géneros: alfa, beta, gamma y delta, y que causan enfermedades de leves a graves en humanos y animales. Existen coronavirus humanos endémicos como los alfacoronavirus 229E y NL63 y los betacoronavirus OC43 y HKU1 que pueden causar enfermedades de tipo influenza o neumonía en humanos. Sin embargo, dos coronavirus zoonóticos que causan enfermedades graves en humanos han emergido: el coronavirus del Síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) en 2002-2003 y el coronavirus del Síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV).

En enero de 2020, el agente etiológico responsable de un grupo de casos de neumonía grave en Wuhan, China, fue identificado como un nuevo betacoronavirus (2019-nCoV), distinto del SARS-CoV y MERS-CoV. La secuencia genómica completa de este nuevo agente está disponible y se han desarrollado diferentes protocolos de detección, aunque aún no se han validado por completo. Sin embargo, a la luz de la posible introducción de un caso sospechoso relacionado con el 2019-nCoV en la Región de las Américas, la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS / OMS) recomienda a los Estados Miembros garantizar su identificación oportuna, el envío de las muestras a laboratorios Nacionales o de referencia y la implementación del protocolo de detección molecular para 2019-nCoV, según la capacidad del laboratorio.

Hallazgos y datos preliminares, tanto epidemiológicos, de modelización, filogenéticos y clínicos sugieren que el SARS-CoV-2 VOC 202012/01 posee mayor transmisibilidad. Sin embargo, los análisis preliminares hasta la fecha no indican cambios en la gravedad de la enfermedad (medida por la duración de la hospitalización y la tasa de letalidad a los 28 días), o la aparición de reinfección entre los casos positivos a esta variante en comparación con casos por otros linajes de SARS-CoV-2 que circulan en el Reino Unido. Aun sin que se observe mayor gravedad en los casos, preocupa el aumento de transmisibilidad, porque se asocia a un importante impacto de salud pública, debido al aumento de casos en un plazo de tiempo limitado (4).

Hasta la fecha, 60 países de las seis regiones de la OMS han notificado casos importados o transmisión comunitaria de VOC 202012/01, mientras que fuera de Sudáfrica, un total de 23 países, en cuatro de las seis regiones de la OMS, han notificado casos de la variante 501Y.V25. En cuanto a la variante P.1 se ha reportado en 8 países (2-4).

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	Página 2 de 28
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

Según investigaciones preliminares realizado en Manaus, Estado de Amazonas en Brasil ha habido un aumento de la proporción de casos secuenciados para la variante P.1 indicando transmisión local, lo que aumenta la preocupación de reinfección o transmisión acelerada de la enfermedad (3).

Guatemala, ha contribuido a la generación de datos de secuenciación genómica mediante la Red Regional de Vigilancia Genómica de COVID-19, a través del Laboratorio Nacional de Salud del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. En el mes de septiembre se seleccionaron 30 muestras positivas de hisopado nasofaríngeo para COVID-19 de los meses de mayo a agosto del año 2020, las cuales fueron procesadas en el Laboratorio Regional de Secuenciación, Fiocruz-Brasil. De las 30 muestras enviadas, fue posible secuenciar 20 evidenciando que el grupo genético G es la variante genética que se encuentra en el país durante este periodo.

La enfermedad por el coronavirus 2019 (COVID-19) se ha propagado a través de varias fronteras, lo que ha dado lugar a la demanda de medidas de detección y gestión de los casos sospechosos en los puntos de entrada, en particular los puertos, aeropuertos y pasos fronterizos (5).

Además, se deberá tomar en cuenta lo indicado en el Acuerdo Ministerial número 299-2020 donde se indica Aprobar la Alerta Sanitaria Número 02-2020 en la que se limita el ingreso a la República de Guatemala a las personas extranjeras que han estado en los 14 días anteriores a su arribo en el territorio del Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte y Sudáfrica (6).

2. Objetivos

- Brindar los lineamientos generales para la toma de muestra, conservación, transporte y diagnóstico del SARS-Cov-2 en los laboratorios descentralizados bajo la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo Real, en atención a pacientes que cumplen con la definición de caso y se tipifica como "sospechoso inusitado".
- Brindar los lineamientos de bioseguridad para la toma de muestras de casos tipificados como "sospechosos inusitados" que presuntivamente contengan el virus del SARS-CoV-2 o cualquier otro virus proveniente de un paciente tipificado como caso sospechoso.
- Contribuir a la generación de datos de las variantes genómicas del virus SARS-CoV-2 para establecer patrones de dispersión y evolución.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	Página 3 de 28
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

3. Alcance

Aplicación a nivel nacional, en las dependencias dentro y fuera del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, encargadas del diagnóstico molecular del virus SARS-CoV-2.

4. Descripción del Procedimiento

4.1 Toma de muestras y envío adecuado

- Las muestras deben ser tomadas por personal capacitado y teniendo en cuenta todas las instrucciones de bioseguridad, incluido el uso de los equipos de protección personal adecuado para virus respiratorios.
- Las muestras recomendadas son las del tracto respiratorio inferior, incluidos el esputo, el lavado broncoalveolar y el aspirado traqueal (cuando sea posible según los criterios médicos). Sin embargo, cuando la toma de una muestra del tracto respiratorio inferior no es posible, las muestras del tracto respiratorio superior también son útiles. **En general, se recomienda la toma de hisopados nasofaríngeo y orofaríngeo combinados** (los hisopos deben colocarse y transportarse en un mismo tubo con medio de transporte viral). Aunque no se recomienda el muestreo de contactos asintomáticos de forma rutinaria, si se considera necesario de acuerdo con las guías nacionales, se deben considerar la toma muestras de las vías respiratorias superiores para este tipo de muestreo.

4.2 Manipulación Y Preparación de la Muestra

Seguir lineamientos especificados en el Manual de normas y procedimientos para la toma de muestras y su envío al Laboratorio Nacional de Salud, lo pueden encontrar de forma digital en la página del Laboratorio Nacional de Salud, descargas, UCREVE.

4.3 Precauciones de Seguridad

Toda muestra biológica de origen humano obtenida y contenida en un medio de transporte viral (MTV) u otra medio enviado al Laboratorio Nacional de Salud para su análisis, debe ser considerada como material potencialmente infeccioso.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	Página 4 de 28
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

4.4 Reactivos y Suministros

Reactivos:

- Alcohol
- Medio de Transporte Viral

Suministros

- Bata manga Larga, limpia
- Guantes látex
- Mascarilla tipo N 95
- hisopos de poliéster o rayón por muestra
- Depresores de lengua (bajalengua)
- Hielera
- Gradilla
- Ice packs o baterías
- Algodón
- Marcador permanente
- lapicero
- Ficha epidemiológica
- Libro de ingreso al laboratorio (en el caso de las Unidades Centinela)
- Dos hisopos de poliéster o dacrón por muestra

4.5 Toma de Muestra en los servicios

- El personal asignado (personal de Control de Infecciones o laboratorio clínico) tomará la muestra debiendo equiparse con los insumos de Bioseguridad como: mascarilla, guantes, protección ocular y bata.
- En caso de derrames usar suficiente alcohol o cloro al 0.5%, limpiar la superficie con algodón yendo de afuera hacia adentro.
- Verificar que se cuenta con todos los materiales arriba listados antes de preceder a tomar la muestra, la envoltura de los hisopos debe estar integra a fin de preservar la esterilidad de los mismos; al tomar la muestra se debe mantener la cadena de frío, es decir, se debe preparar la hielera con las baterías y allí se debe depositar la gradilla para la toma de muestra.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Página 5 de 28

- Anotar en el libro de ingreso de laboratorio los datos del paciente.
- ROTULAR el envase de la muestra con los datos solicitados (nombre del paciente, número de formulario de vigilancia, fecha y hora de la toma).

4.6 Bioseguridad en Toma de muestra

La higiene apropiada de las manos y el uso adecuado del equipo de protección personal (EPP) son dos de los principios básicos del control de infecciones. Las mascarillas están diseñadas con fines específicos y el uso incorrecto de las mismas puede aumentar el riesgo de transmisión en vez de reducirlo.

Uso del equipo de protección Personal (EPP)

- El EPP recomendado incluye: gafas de seguridad correctamente ajustadas, guantes desechables, mascarilla de respiración certificada por el NIOSH (por ej., el modelo N95, es de un solo uso) y de ser necesario un overol resistente a los líquidos y desechable.
- Todo el EPP debería utilizarse según las regulaciones de la OSHA incluidas en 29 CFR 1910 Subparte I (equipo de protección personal).
- Evitar tocarse los ojos, la boca y la nariz después de haber tocado cualquier material contaminado con el EPP puesto.
- No comer, beber, fumar ni usar el baño con el EPP puesto.
- Quitarse el EPP de forma segura (ver enlace)
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7918:2012-videos-sample-collection&Itemid=40295&lang=en

Toma de muestra

- Sentar al paciente en una silla
- Se le pide al paciente que incline su cabeza hacia atrás
- Colocar la cabeza del paciente en un ángulo aproximado de 70 grados. **(figura 1)**
- Introducir el hisopo de poliéster o dacrón estéril flexible con suavidad a través de la fosa nasal hasta la nasofaringe.

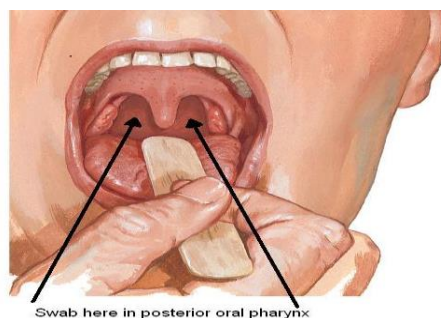
PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISITENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Página 6 de 28

- Con el hisopo sobre la nasofaringe rotarlo 3 veces, esto facilita a que las células se queden ancladas en la cabeza del hisopo
- Inmediatamente colocar el hisopo en el medio de transporte viral, sobreponer la tapa del MTV
- Con un depresor de lengua, hacer presión sobre la lengua hacia abajo, a fin de dejar descubierta la orofaringe.
- Introducir un segundo hisopo hasta la orofarínge (**figura 2**) y raspar suavemente la misma, se debe tener cuidado de no topar en ningún momento la garganta o la lengua
- Inmediatamente colocar el segundo hisopo dentro del medio de transporte viral y cerrar adecuadamente.

Figura 1



Figura 2



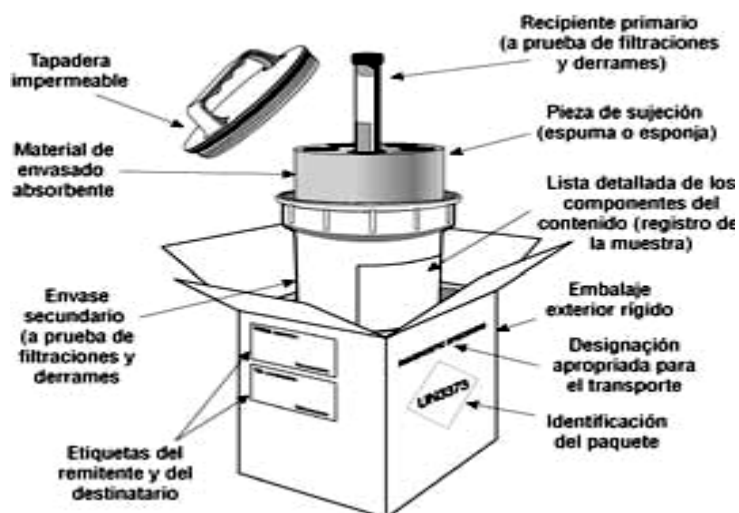
- Una vez tomada la muestra y colocada en la hielera se debe transportar hacia una refrigeradora donde se almacene de 4°C-8°C, como primer paso.
- Se debe verificar que la información de la ficha epidemiológica y la muestra coincidan, el envío al laboratorio Nacional de Salud debe ser dentro de las 24-72 horas de la toma. Si no se pueden enviar muestras dentro de este período, se recomienda congelarlas a -70 °C (o menos) hasta que se envíen (asegurando que se mantenga la cadena de frío en todo momento).



PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISITENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	Página 7 de 28
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

4.7 Embalaje para el Envío al Laboratorio Nacional de Salud/NIC cuando se considere pertinente

Considerar colocar suficientes paquetes de hielo o baterías; al ingreso al LNS/NIC la temperatura se mide como control de calidad, colocar suficiente papel adsorbente: ver figura para mejor comprensión.



Transporte de muestras/nivel nacional

Generalidades

- No envolver ni colocar los frascos con las fichas epidemiológicas, éstas deben estar en forma separada.
- Todo personal de salud que manipule muestras biológicas, SIEMPRE DEBE USAR GUANTES.
- El llenado de los frascos debe ser realizado con precaución para evitar el derrame por sus costados.
- Los frascos deberán ser transportados en cajas de seguridad tapadas y en posición vertical.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	Página 8 de 28
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

- EL TRANSPORTE Y TRANSFERENCIA EFICIENTE DE MUESTRAS PARA CONFIRMACIÓN, REQUIERE UNA BUENA COORDINACIÓN ENTRE REMITENTE (servicio de salud que envía la muestra), EL TRANSPORTADOR (piloto, empresa contratada para el servicio) Y EL DESTINATARIO (en este caso, LNS).

Funciones del Remitente (QUIEN ENVÍA LA MUESTRA):

- Identificar las muestras en el cuerpo del recipiente (nunca en la tapa) escribiendo con tinta indeleble y letra legible los nombres y apellidos completos, edad y otros datos necesarios según los requerimientos del destinatario.
- La ficha epidemiológica debe estar completamente llena y con letra legible. Asegurarse de entregarla al que transportará la muestra.
- Asegurarse que los frascos tengan su tapón bien ajustado.
- Las muestras deben ser remitidas en un recipiente impermeable hermético, dentro de otro mayor debe utilizar refrigerantes, utilizando bolsas plásticas selladas e hielera en buenas condiciones para evitar derrames de líquido, conservando la cadena de frío, no debe ir la muestra sospechosa de
- Verificar la concordancia de los datos de la ficha y datos en la muestra.
- Introducir los frascos, tubos o viales en bolsitas plásticas limpias.
- Colocarlos en una gradilla u otro recipiente que asegure la posición vertical
- Una vez colocados dentro de este recipiente, colocar la gradilla/recipiente en posición vertical dentro de una hielera, apoyándola en duroport y papel absorbente.
- Introducir los paquetes fríos o baterías congeladas para mantener la temperatura de 2 a 8°C.
- Cerrar la hielera manteniéndola en posición vertical para evitar algún derrame.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Página 9 de 28

- Adjuntar a las muestras y fichas, un set con los siguientes insumos: Material absorbente (papel mayordomo, algodón), cloro al 5%, contenedor para desechos a prueba de fugas líquidas, guantes resistentes desechables, bolsas plásticas.
- Capacitar al personal que transporta las muestras en el tema de bioseguridad, cuando amerite.

Funciones del transportador (PILOTO O EMPRESA CONTRATADA PARA EL SERVICIO):

- Verificar la concordancia del número de muestras y fichas que le entregan.
- Guardar la documentación correspondiente.
- Transportar la hielera con especial cuidado de no voltearla.
- Asegurarse que el **vehículo del transporte** contenga un set con los siguientes insumos:
- Material absorbente (papel mayordomo, algodón)
- Cloro al 5%
- Un contenedor par desechos a prueba de fugas líquidas
- Guantes resistentes desechables
- Bolsas plásticas.

Funciones del Destinatario (LNS/NIC):

- Recibir las muestras.
- Verificar que cumpla con las condiciones y requisitos de envío.
- Verificar que la ficha epidemiológica esté completamente llena.
- Asignar el código de laboratorio correspondiente.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Página 10 de 28

- Dar aviso e ingresar la muestra al laboratorio para su análisis.

Manejo de Derrames

En caso de derrames:

- Colocarse el equipo de protección personal: guantes, bata, mascarilla, entre otros.
- Colocar papel absorbente sobre el derrame.
- Verter solución de cloro sobre el papel absorbente.
- Dejar actuar por 10 minutos.
- Proceder a retirar derrame y colocarla en la bolsa para descarte. Tener cuidado de no cortarse.
- Limpiar la superficie con detergente y luego aplicar cloro.

4.8 Transporte de muestras/nivel Internacional

El envío de muestras sospechosas a laboratorios de referencia o centros colaboradores fuera del país y por vía aérea debe cumplir con todas las normas internacionales (IATA) para Sustancias Biológicas de Categoría B; esta función es del Laboratorio Nacional de Salud/NIC hacia laboratorios internacionales para diagnóstico confirmatorio en el caso de tener la prueba implementada; o diagnóstico inicial si no se cuenta con la prueba disponible en el LNS/NIC.

4.9 Pruebas de laboratorio

Algoritmo de laboratorio para el Centro Nacional de Influenza (NIC)

Los laboratorios (NIC) deben continuar utilizando el algoritmo de laboratorio de influenza recomendado por la OPS para la vigilancia rutinaria de la influenza y de los casos inusuales de IRAG.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	Página 11 de 28
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

Las pruebas para el nCoV deben considerarse **sólo para pacientes que cumplan la definición del caso, una vez descartada la influenza y la influenza aviar**, por lo que la detección del nuevo Coronavirus se incorporará a los protocolos internos de detección del Centro Nacional de Influenza, según el Algoritmo rutinario de la OMS.

Laboratorios con capacidad de diagnóstico molecular (sistemas abiertos y cerrados) para implementar la detección molecular del 2019-nCoV

Los laboratorios con capacidad de diagnóstico molecular pueden considerar implementar varios protocolos de detección molecular de SARS-Cov-2, sin embargo el laboratorio debe mostrar la competencia de análisis en biología molecular y Bioseguridad mediante un panel de evaluación proporcionado por el Centro Nacional de Influenza (NIC) del Laboratorio Nacional de Salud. Los laboratorios que realizan pruebas moleculares para detección de SARS-COV-2, deben poseer manuales de operación estandarizada en cada parte del procedimiento, además de cumplir con el 100% de concordancia entre sus datos y los generados por el NIC.

Considerar que el Protocolo CHARITE "in House" recomendado por la Organización Panamericana de la Salud, es el más sensible y robusto de todos; por lo que resultados que no concuerden con la clínica del paciente deberá procederse a muestrear de nuevo y enviar el hisopado al Laboratorio Nacional de Salud; si no se pudiese hisopar de nuevo, enviar la alícuota trabajada, sin embargo esta debe mantenerse en todo momento con condiciones de refrigeración.

5. Procedimiento

5.1 Principio de la PCR

El ensayo consiste en una transcripción reversa del ARN del virus 2019-nCoV y posterior amplificación del cDNA mediante un PCR en tiempo real basado en sondas TaqMan.

5.2 Manipulación y Preparación de la Muestra

Mantener la muestra durante todo el tiempo de preparación en frío de 2 a 8°C, ya sea con bloques fríos o bandeja de hielo. Posteriormente, vortexear aproximadamente 30 segundos la muestra.

Los hisopados para primera evaluación deben ser retirados los hisopos que vengán dentro del medio luego del vortexeo.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Página 12 de 28

5.3 Precauciones de Seguridad

Toda muestra biológica de origen humano en Medio de Transporte Viral para el diagnóstico de Influenza y Virus Respiratorios incluyendo el SARS-Cov-2 con su respectiva documentación recibida en ventanilla deberá ser considerada como material potencialmente infeccioso.

5.4 REACTIVOS, SUMINISTROS Y REACTIVOS

5.4.1 Reactivos

En el caso del protocolo de Berlín "CHARITE"

- Kit de RT-PCR cuantitativo de un paso para sonda de hidrólisis (por ej., Taqman®).
- Invitrogen SuperScript™III Platinum® One-Step Quantitative Kit (cat# 11732-020 o 11745-100)
- BSA (1 mg/ml), ultrapuro.
- MgSO₄ (50mM).
- Agua libre de Nucleasas.
- Ácidos nucleicos.
- Primers y sondas (Sarbeco y SARSr): Las sondas TaqMan están marcadas en el extremo 5' con la molécula reportera 6' carboxifluoresceína (FAM) y en el extremo 3' o bien en el centro con un quencher-1 dT BlackHole. Las sondas quencheadas internamente están fosforiladas en el extremo 3' para inhibir la extensión de la sonda durante la amplificación.
- Controles positivos de ARNs.

En el caso de kits comerciales con aprobación FDA u OMS

- Kit Power Check
- Kit Atila
- Kit SD Biosensor
- Kit Roche

5.4.2 Materiales:

- Placas ópticas o tubos ópticos según termociclador
- Tapaderas ópticas o films, según termociclador
- Guantes libres de polvo
- Tubos de 1.5mL estériles y libres de nucleasas
- Puntas de pipeta bloqueadas, 10uL, 200uL y 1000uL.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	Página 13 de 28
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

- Bloque frío
- Tubos de 2 ml, estériles, libres de nucleasas, color ámbar
- Marcador permanente de laboratorio
- Pipetas ajustables de 20 µl y 200 µl y puntas (tips) con barrera de aerosol

5.4.3 Equipos:

- Termociclador de PCR tiempo real
- Campana de bioseguridad Tipo A Clase II
- Campana o estación de trabajo
- Vortex
- Minicentrífuga
- Centrifuga de placas
- Juegos de pipetas de diferentes volúmenes

5.5. Calibración de Equipo

Mantenimiento de equipo, según necesidad.

5.6 PROCEDIMIENTO

5.6.1 Preparación de la Campana del cuarto limpio:

- Trabajar en el laboratorio limpio destinado a la preparación de las mezclas de reacción, bajo campana, usar bata y guantes.
- Limpiar toda la superficie con un desinfectante (hipoclorito de sodio al 0.5%) seguido de RNaseAway si se cuenta con el, seguidamente quitar los restos de desinfectantes con abundante alcohol al 70% con papel toalla, o algún tipo de papel que no deje residuos en la superficie.
- Colocar pipetas, tips, gradillas y beakers con bolsita para descartarte dentro de la campana.
- Rotular los tubos de 1.5mL calidad PCR con los datos para cada mezcla de reacción, colocando el nombre del kit utilizado

5.6.2 Preparación de los reactivos

- Descongelar reactivos (Primers, Sondas y SuperScript Taq Platinum III, lentamente y colocarlos en bloque frío.
- Aplicar Vortex y Quick Spin de 5 segundos.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISITENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Página 14 de 28

5.6.3 Preparar la mezcla de reacción

- Evitando la contaminación de muestras
Debido a la sensibilidad de pruebas de RT-PCR en tiempo real, deberán tomarse precauciones especiales para evitar amplificaciones que sean falsos positivos. Se recomiendan las siguientes medidas de precaución:
 - a) Mantenga áreas separadas para la preparación de las mezclas de reacción y la manipulación de los ácidos nucleicos.
 - b) Mantenga equipos (por ej., pipetas, microcentrífugas) y materiales (por ej., tubos de microcentrífuga, puntas de pipetas) separados para la preparación de las mezclas de reacción y manipulación de los ácidos nucleicos extraídos.
 - c) Utilice una bata de laboratorio limpio y guantes desechables libre de polvo (no previamente usados) cuando esté preparando los ensayos.
 - d) Mantenga los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos tanto como sea posible.
 - e) Trabajar en cuarto limpio, bajo campana, usando bata y guantes.
 - f) Preparar una mezcla de reacción para cada marcador; según el kit elegido para el ensayo.

5.6.3 Cebadores y sondas (en el caso del uso del protocolo CHARITE)

- Descongele las alícuotas de cebadores y sondas (las alícuotas descongeladas de sondas pueden almacenarlas en la oscuridad hasta 3 meses a 2-8 °C. No vuelva a congelar las sondas).
- Mezcle en un vortex todos los cebadores y sondas.
- Centrifugue brevemente todos los cebadores y sondas, y luego coloque en una gradilla refrigerada.

5.6.4 Reactivos de RT-PCR tiempo real

- Coloque el Master Mix (Mezcla Maestra) y enzima en una gradilla refrigerada.
- Realice los cálculos según el kit comercial que este utilizando
- Mezclar bien con pipeta y dar un Quick Spin de 5 segundos.
- Colocar en cada pozo 20 uL de mezcla de reacción procurando que quede al fondo del pozo; como ejemplo seguir el esquema de la placa de la figura:



PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS	
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISITENCIA SOCIAL	
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)	
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2	
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS
No. Revisión:	2
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada
Fecha de revisión	03/Febrero/2021
Pagina 15 de 28	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sarbeco NTC 1	Sarbeco 1	Sarbeco 2	Sarbeco 3	Sarbeco 4	Sarbeco 5	Sarbeco 6	Sarbeco 7	Sarbeco 8	Sarbeco 9	Sarbeco NTC 2	Sarbeco C+
B	SARSr 1 NTC 1	SARSr 1 1	SARSr 1 2	SARSr 1 3	SARSr 1 4	SARSr 1 5	SARSr 1 6	SARSr 1 7	SARSr 1 8	SARSr 1 9	SARSr 1 NTC 2	SARSr 1 C+
C	SARSr 2 NTC 1	SARSr 2 1	SARSr 2 2	SARSr 2 3	SARSr 2 4	SARSr 2 5	SARSr 2 6	SARSr 2 7	SARSr 2 8	SARSr 2 9	SARSr 2 NTC 2	SARSr 2 C+
D	Sarbeco 10	Sarbeco 11	Sarbeco 12	Sarbeco 13	Sarbeco 14	Sarbeco 15	Sarbeco 16	Sarbeco 17	Sarbeco 18	Sarbeco 19	Sarbeco 20	Sarbeco 21
E	SARSr 1 10	SARSr 1 11	SARSr 1 12	SARSr 1 13	SARSr 1 14	SARSr 1 15	SARSr 1 16	SARSr 1 17	SARSr 1 18	SARSr 1 19	SARSr 1 20	SARSr 1 21
F	SARSr 2 10	SARSr 2 11	SARSr 2 12	SARSr 2 13	SARSr 2 14	SARSr 2 15	SARSr 2 16	SARSr 2 17	SARSr 2 18	SARSr 2 19	SARSr 2 20	SARSr 2 21
G												
H												

NOTA: El extracto del control negativo (NTC) debe ser añadido primero (columna 1) antes de añadir las muestras para comprobar si hay una contaminación en la mezcla Master mix. El MOCK debe añadirse después de añadir las muestras para comprobar la contaminación cruzada durante la preparación o adición de las muestras. El control Positivo (C+) debe ser añadido al último, después de que todas las muestras y la columna de NTCs hayan sido selladas.

- Sin embargo el diseño de la placa queda a discreción del analista cuidando en colocar siempre controles negativos, positivos y Mock.
- Antes de mover la placa al área de manejo de ácido nucleicos, prepare el NTC de la columna 1 en el área de preparación de la mezcla de la prueba. Como se muestra arriba, las muestras se pueden agregar por columna. Tape los pocillos NTC 1 en el cuarto Blanco.
- Pipetee 5 µl de agua libre de nucleasas a los pocillos NTC 2. Cambie las puntas de las pipetas después de cada adición. Cubra la placa de reacción y lleve al área de manejo de ácido nucleicos.
- Mezcle los tubos que contienen las muestras de ácidos nucleicos durante 5 segundos.
- Organice las muestras de ácidos nucleicos en una gradilla refrigerada de preferencia.
- Como se indicó más arriba, las muestras pueden agregarse por columna. Pipetee 5 µl de la primera muestra a todos los pozos etiquetados para esa muestra.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISITENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Pagina 16 de 28

- Cambie las puntas de las pipetas después de cada adición.
- Tape la columna a la que la muestra ha sido agregada. Esto le ayudará a prevenir la contaminación cruzada de muestras y le permitirá llevar el control de dónde se quedó trabajando en la placa.
- Cambie los guantes cuando sea necesario para evitar contaminación.
- Adicionalmente puede añadir 5 µl de agua extraída (MOCK) a los pocillos. Tape los pocillos de MOCK.
- Por último, pipetee 5 µl de ARN del control positivo en todos los pocillos de Control Positivo (C+). Tape los pocillos C+.

5.6.5 Preparación de C+

- Los controles positivos tienen una alta concentración de ácido nucleico viral por lo que se deben manipular siguiendo las precauciones necesarias.
- Trabajar en el cuarto de templado en campana.
- Descongelar controles positivos. Mezclar dando golpes suaves con el dedo.
- Agregar 5µL de controles positivo siguiendo el esquema de la placa mostrado al final del documento.
- Cerrar los pozos con una tira de tapaderas ópticas.
- Finalmente cerrar con tira óptica la columna 12 que quedó abierta desde el inicio.
- Centrifugar la placa en centrifuga de placas durante 3 minutos a 3000 rpm.
- Colocar la placa dentro del termociclador e iniciar el programa.
- Regresar al cuarto de templado y limpiar cuidadosamente toda el área usando RNase Free y Lysol. Colocar la estación de trabajo de PCR en UV por 15 minutos.

5.6.6 Preparación de la Campana del cuarto de templado

- Trabajar en cuarto de templado (cuarto sucio), bajo campana. Usar guantes y bata.
- Limpiar completamente toda la superficie con RNase Free.
- Colocar pipetas, tips, gradilla y beakers con un recipiente para descartarte.
- Exponer a luz ultravioleta durante 15 minutos.

5.6.7 Preparación del termociclador:

- Condiciones de amplificación de RT-PCR:
- El volumen de reacción es de 25 µl.
- El buffer de RT-PCR contiene ROX como referencia pasiva; en el caso de los kits comerciales chequear el inserto
- Programe el termociclador según el kit utilizado:

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISITENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Pagina 17 de 28

5.6.8 Mapa de la Placa Óptica

En este mapa cada cuadro cada cuadro es un pozo, cada pozo se identifica en la parte superior con marcador viral en estudio y en la parte inferior, la número de muestra en análisis; se puede colocar el nombre Sarbeco o los genes específicos (E, RdRP, etc.)

Sarbeco 1

5.7 Control de Calidad

En el caso del CHARITE, los primers y sondas deben estar alicuotados en pequeños volúmenes y protegidos de la luz. Se almacenan en freezer de reactivos *non frost-free* - 20°C situado en cuarto limpio, separados de los especímenes clínicos y de cualquier ácido nucleico que sea potencialmente contaminante. Las diluciones de trabajo se guardan a 4°C protegidas de la luz. Evitar ciclos de congelamiento descongelamiento. Las diluciones de trabajo son estables por 6 meses.

Los NTC1 y NTC2 (*Mock extraction*) deben tener como resultado negativo.

Llevar a cabo la calibración del equipo de PCR en tiempo real cada 6 meses o cuando el equipo lo solicite y registrarlo en el Cartapacio de Control de Calidad.

5.7.1 Interpretación de resultados:

- **Pozos NTC:** Estos pozos no deben tener curvas de fluorescencia que atraviesen el umbral de detección. Si esto ocurre en una o más reacciones, hay posibilidad de contaminación entre muestras. A estas muestras se les llama falsos positivos. En este caso se invalida la corrida y se repite el ensayo siendo más estrictos en las medidas para evitar contaminación. Se debe limpiar todas las superficies y materiales con RNase away. Si la contaminación persiste puede ser que los reactivos estén contaminados, en este caso es necesario cambiar de alícuota. Una contaminación en los pozos NTC de RNP sugiere contaminación con material del personal del laboratorio: no se debe hablar, siempre trabajar con guantes y minimizar cualquier contacto con la mezcla de reacción.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISITENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	Página 18 de 28
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

- **Pozos con muestras clínicas:** Una muestra se considera positiva cuando la curva de fluorescencia cruza el umbral antes de los 40 ciclos. Además, todos los C+ deben de amplificar correctamente dentro del rango de Cts esperados mientras que las NTC no deben presentar amplificación.
- **Controles positivos:** Todas las curvas de fluorescencia deben de cruzar el umbral antes de los 40 ciclos. Si esto no ocurre puede deberse a degradación del ácido nucleico viral. Se debe revisar los ciclos de congelamiento/descongelamiento que sufrió la muestra y las condiciones y tiempo de almacenamiento

Tabla de Resultados y Derivación al Centro Nacional de Influenza

E	RdRP	Rasa P humana (charite) o control Interno (kit comercial)	Interpretación del resultado
Positivo	Negativo	Positivo	SARS/SARSCoV2
Positivo	Positivo	Positivo	SARSCoV2
Negativo	Positivo	Positivo	Enviar al NIC-LNS
Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Negativo	Negativo	Negativo	No adecuado Verificar extracción, si se está seguro que la extracción es eficiente, este es el indicador de las malas muestras, reportar como tal.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Página 19 de 28

6. Vigilancia Genómica SARS-CoV-2

A. Criterios de inclusión para el estudio genómico

1. Características de priorización:

- Casos de supercontagios o muertes en supercontagios.
- Vuelos que ingresen a Guatemala de países que tienen reporte de alguna cepa o variante distinta (ver Anexo 2. Lineamientos para el abordaje de casos positivos para SARS-CoV-2 de viajeros que ingresan al país por aeropuerto internacional "La Aurora")
- Departamentos fronterizos o afluencia comercial alta (Huehuetenango, San Marcos, Quetzaltenango, Izabal, Petén, Chiquimula, Jutiapa, Zacapa)
- Departamentos con áreas de turismo (Sololá, Sacatepéquez)
- Aumento de casos graves en niños
- Cuando aparece un caso con sintomatología no reportada por OMS
- Casos de reinfecciones
- Cualquier otra indicación que se emita nacional o internacionalmente durante la vigilancia.
- Casos en personas completamente inmunizadas

2. Si no cumplen con criterios de priorización:

Los demás departamentos, enviar un porcentaje de sus muestras positivas para realizar la vigilancia, de acuerdo a los siguientes criterios:

- Fallecidos o pacientes graves que no presentaban factores de riesgo asociados.
- Pacientes mayores de 60 años sin condiciones subyacentes
- Personas asintomáticas con pruebas positivas de Covid-19
- Casos de áreas con un aumento significativo de casos en unas pocas semanas (no explicado por la relajación de las medidas de salud pública)
- Niños en áreas con mayor incidencia de enfermedades pediátricas

3. Criterio de aceptación para las muestras:

- Muestras con rt-PCR positivo, con un Ct menor o igual a 30 en gen E(muestras con Ct mayor a 30 tomar en cuenta la relevancia epidemiológica)
- Muestras con Ag positivo (se debe confirmar con PCR en el LNS*)
- Muestras con Ag negativo que presenta sintomatología (se debe confirmar con PCR en el LNS*)
- Volumen mínimo de muestras: 700 µl.
- Evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación de la muestra.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISITENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	Página 20 de 28
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

- Cumplir con cadena de frío para transporte: 2-8°C.
- Cumplir con temperatura de almacenamiento: 2-8°C
- Tiempo de traslado: 48 a 72 horas después de la toma de muestra, siempre y cuando cumpla con la temperatura de almacenamiento y de transporte.
- Llenado completo y correcto de la boleta de solicitud de análisis (Ver Anexo 1)
- Muestra debe venir en el medio de transporte viral, tomada con hisopo de dacrón o poliéster (no madera).
- Tipo de muestra: hisopado nasofaríngeo
- Embalaje correcto (no muestras derramadas)
- El caso que se va a investigar para secuenciación genómica debe estar ingresado en SICOVID.
- Correcta identificación de la muestra, de manera legible.
- La boleta "nombre y apellido" debe ser llenada con toda la información solicitada, con letra clara y legible.
- La información de la muestra debe coincidir con la información de la ficha.

B. Notificación de casos y entrega de resultados

Laboratorio Nacional de Salud: Enviará los resultados generados al departamento de Epidemiología del MSPAS a partir de una base de datos que realizará el LNS. Esta información se enviará cada vez que se termine un lote de muestras para su secuenciación y posterior análisis.

Áreas de Salud/Hospitales de la Red Nacional: Deben enviar la muestra al LNS, llenando la boleta de solicitud para secuenciación, VSIRF014 (Ver Anexo 1)

Departamento de Epidemiología a áreas de salud/hospitales: A determinarse por las partes involucradas.

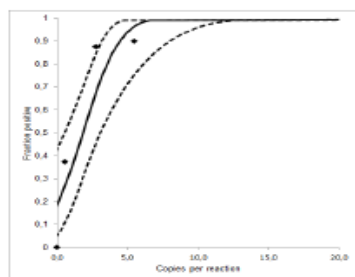


PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Página 21 de 28

7. ANEXO

Anexo No. 1

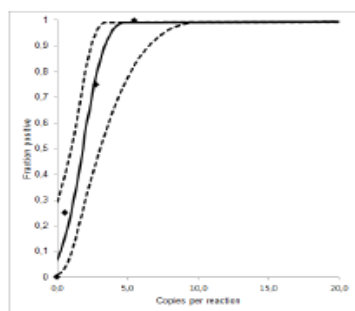
A



A. First line assay: E gene

Technical limit of detection (LOD) =
5.2 RNA copies/reaction, at 95% hit
rate; 95% CI: 3.7-9.6 RNA
copies/reaction.

B



B. Confirmatory assay: RdRP gene

Technical LOD = 3.8 RNA
copies/reaction, at 95% hit rate; 95%
CI: 2.7-7.6 RNA copies/reaction.

Figure 3. A, E-gene assay, B, RdRp gene assay. X-axis shows input RNA copies per reaction. Y-axis shows positive results in all parallel reactions performed, squares are experimental data points resulting from replicate testing of given concentrations (x-axis) in parallel assays (8 replicate reactions per datum point). The inner line is a probit curve (dose-response rule). The outer dotted lines are 95% confidence intervals.

RdRp assay sensitivity with single probe application using the assay variant that only contains the 2019-nCoV specific probe.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISITENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Pagina 22 de 28

Anexo 2

LINEAMIENTOS PARA EL ABORDAJE DE CASOS POSITIVOS PARA SARS-CoV-2 DE VIAJEROS QUE INGRESAN AL PAÍS POR EL AEROPUERTO INTERNACIONAL "LA AURORA" (AILA)

26 enero 2021

OBJETIVOS

1. Generar información genética mediante la vigilancia genómica de casos confirmados de COVID-19 en el Aeropuerto Internacional "La Aurora".
2. Determinar las variantes genéticas del SARS-CoV-2 de casos confirmados para COVID-19 de pasajeros que ingresan al país.
3. Detectar oportunamente las variantes genómicas del SARS-CoV-2 de interés nacional e internacional.

ALCANCE

Aplica a los pasajeros que ingresan al país por el Aeropuerto Internacional "La Aurora".

ESTRATEGIA

La gestión de los viajeros enfermos en puertos, aeropuertos y pasos fronterizos terrestres internacionales en el contexto de COVID-19 comprende las siguientes medidas:

1. Detección de los viajeros enfermos. Los viajeros enfermos pueden detectarse gracias a la información proporcionada por ellos mismos y también mediante la observación visual o la medición de la temperatura (6).
2. Interrogatorio a los viajeros enfermos en relación con COVID-19, este deberá incluir:
 - Toma de la temperatura con un termómetro que no requiera contacto;
 - Evaluación de los signos y síntomas indicativos de COVID-19 solamente mediante el interrogatorio o la observación (el personal de los puntos de entrada no debe realizar exploraciones físicas);

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	Página 23 de 28
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

- Cumplimiento por parte del viajero del llenado del Pase de Salud para Guatemala, disponible en línea en la dirección electrónica: <https://servicios.igm.gob.gt/pasedesalud/> (7).
- Observación adicional por parte del personal sanitario de los puntos de entrada.

Se debe examinar a los viajeros para detectar:

A. Signos o síntomas de enfermedad indicativos de caso sospechoso: infección respiratoria aguda que incluya fiebre superior a 38°C o la sensación de fiebre; tos; dolor de garganta; dificultad respiratoria; pérdida de olfato o gusto. (8)

B. Antecedentes de posible exposición al 2019-nCoV: viajes en los 14 días previos de la aparición de los síntomas a uno o más países con transmisión del 2019-nCoV; visitas en los 14 días previos de la aparición de los síntomas a centros de salud a uno o varios países con transmisión del virus; contacto físico cercano en los 14 días previos con un viajero que sea un caso sospechoso de COVID-19; visitas en los 14 días previos de la aparición de los síntomas a mercados de animales en uno o varios países con transmisión del virus (5).

Se deberá aislar de inmediato en los puntos de entrada a los viajeros que, tras el interrogatorio, se consideren casos sospechosos de COVID-19 y a los que presenten síntomas clínicos indicativos de infección respiratoria y/o hayan podido estar expuestos al 2019-nCoV.

- Realización de la prueba diagnóstica para COVID-19 y referencia para Secuenciación.
Para la realización de pruebas rápidas de antígeno en el laboratorio del aeropuerto Internacional "La Aurora" se presentan los posibles escenarios indistintamente del país de origen (Anexo 1) y la referencia de muestra para realizar la secuenciación de SARS-CoV-2.

ESCENARIO A

Si el **resultado es positivo para la prueba rápida de antígeno** deberá tomar nueva muestra de hisopado nasofaríngeo en medio de transporte viral (MTV) y deberá ser enviada al Laboratorio Nacional de Salud, en cadena de frío y con su respectiva solicitud de análisis de secuenciación (Anexo 2), para la confirmación del diagnóstico por medio de PCR en tiempo real y secuenciación de SARS-CoV-2.

ESCENARIO B

Si el **resultado es negativo para la prueba rápida de antígeno y presenta síntomas** deberá tomar nueva muestra de hisopado nasofaríngeo en medio de transporte

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISITENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Pagina 24 de 28

viral (MTV) para su confirmación por PCR en tiempo real y secuenciación de SARS-CoV-2 en el caso que el resultado final sea positivo, en cadena de frío y con su respectiva solicitud de análisis de secuenciación (Pendiente de aprobación del protocolo de secuenciación).

ESCENARIO C

Si el viajero no presenta resultado de PCR o es mayor de 96 horas previas al ingreso del país se deberá realizar la prueba rápida de antígeno en el aeropuerto, si el **resultado es positivo aun siendo asintomático** se deberá enviar nueva muestra de hisopado nasofaríngeo en medio de transporte viral (MTV) en cadena de frío y con su respectiva solicitud de análisis de secuenciación (Pendiente de aprobación del protocolo de secuenciación) para su confirmación por PCR en tiempo real y secuenciación de SARS-CoV-2 en el caso que el resultado final sea positivo.

4. Notificación de alertas relativas a los viajeros enfermos sospechosos de ser casos de COVID-19.

Realizar la notificación de casos según lo establecido en la Guía de Vigilancia Epidemiológica de Infección Respiratoria Aguda por COVID-19 vigente (8).

5. Aislamiento de los viajeros enfermos sospechosos de ser casos de COVID-19 y adopción de medidas iniciales de gestión y traslado de casos.

En el punto de entrada deberá aislarse a los viajeros enfermos con signos y síntomas febriles y/o respiratorios que hayan podido haber estado expuestos a la COVID-19 hasta que puedan ser transportados de forma segura a un centro de salud para su evaluación, diagnóstico y tratamiento posteriores (5).

El traslado de pasajeros enfermos de los que se sospecha que tienen COVID-19 a centros de atención sanitaria para su evaluación, diagnóstico y atención médica se realizará con rapidez para poder ofrecerles una atención de salud temprana y evitar el hacinamiento de casos sospechosos en el punto de entrada (5).

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Actualización epidemiológica semanal – 19 de enero de 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update---19-january-2021>

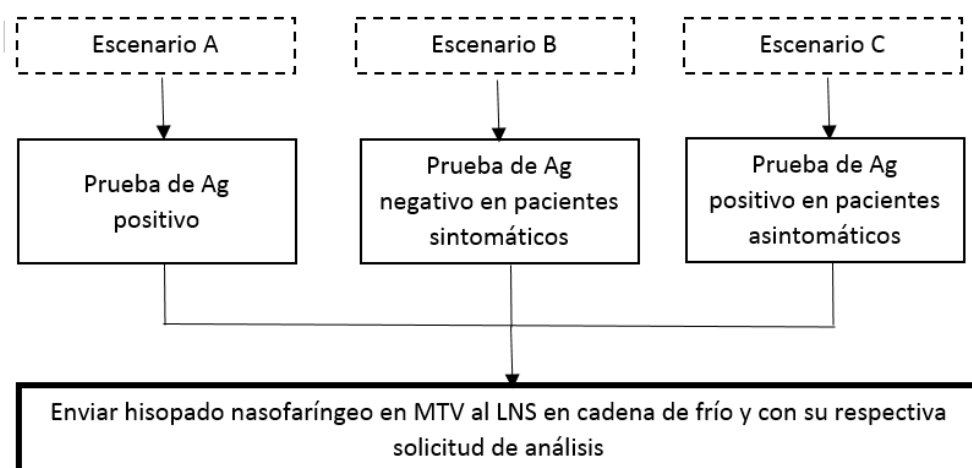
PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	Página 25 de 28
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

- Nota técnica: Caracterización genómica del SARS-CoV-2 y variantes circulantes en la Región de las Américas. Organización Mundial de la Salud, 08 de octubre de 2020. <https://www.paho.org/es/documentos/nota-tecnica-caracterizacion-genomica-sars-cov-2-variantes-circulantes-region-americas>
- Organización Mundial de la Salud. Actualización epidemiológica semanal – 27 de enero de 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update---27-january-2021>
- Organización Mundial de la Salud. Ocurrencia de variantes de SARS-CoV-2 en las Américas. Información preliminar. 11 enero 2021. <https://www.paho.org/es/documentos/ocurrencia-variantes-sars-cov-2-americas-informacion-preliminar>
- Gestión de los viajeros enfermos en los puntos de entrada –aeropuertos, puertos y pasos fronterizos terrestres internacionales- en el contexto del brote de COVID-19. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331193/WHO-2019-nCoV-POEmgmt-2020.1-spa.pdf>
- Acuerdo Ministerial número 299-2020. Alerta Sanitaria Número 02-2020. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 21 de diciembre 2020. <https://legal.dca.gob.gt/GestionDocumento/VisualizarDocumento?verDocumentoPrevia=True&versionImpresa=False&doc=79429>
- Dirección General del Sistema de atención Integral en Salud –DGSIAS- Departamento de Epidemiología, Unidad de Gestión de Riesgos, COPRECOVID. PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACIÓN Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS COVID-19 MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL: Lineamiento nacional para la prevención de COVID-19 para viajes internacionales hacia y desde Guatemala. Anexo 3.9. <https://igm.gob.gt/protocolo-de-ingreso-al-pais-covid19/>
- Guía de Vigilancia Epidemiológica de Infección Respiratoria Aguda por COVID-19. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Página 26 de 28

ANEXOS

Anexo 1. Escenarios para la realización de prueba diagnóstica de COVID-19 y referencia para secuenciación.



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud, Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica, Área Virología.

Anexo 2. Solicitud de Análisis, Secuenciación SARS-CoV-2

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	
		Pagina 27 de 28



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
DIRECCION GENERAL DE REGULACION, VIGILANCIA Y CONTROL DE LA SALUD
LABORATORIO NACIONAL DE SALUD
UNIDAD CENTRAL DE REFERENCIA PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA
Kilómetro 22 Carretera al Pacífico Bárcena, Villa Nueva, Guatemala C.A.
PBX 6644-0599 EXT. 214
ÁREA DE VIROLOGÍA
SOLICITUD DE ANÁLISIS, SECUENCIACIÓN SARS-CoV-2

VSIRF014
Rev. 0
Pág. 1 de 1

ÁREA DE SALUD: _____ Fecha: _____

Nombre/Identificador	Procedencia	Sexo	Edad	Antecedente de viaje	Fecha de inicio de síntomas	Síntomas presentados (Severos, leves, fuera de lo normal)	Resolución de caso	Tipo de muestra	Fecha de toma de muestra	Observaciones

Nombre, Firma y Sello del solicitante

Este documento pertenece al Sistema de Gestión del LNS, la copia impresa se convierte en una versión no controlada.

8. Referencias Bibliográficas:

Manual de normas y procedimientos para la toma de muestras y su envío al Laboratorio Nacional de Salud. Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica. Laboratorio Nacional de Salud, Dirección General de Regulación, Vigilancia y Control de la Salud. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 2015.

International Air Transport Association (IATA). (2015). Dangerous Goods Regulations 3.6.2.2 Classification of Infectious 3.6.2 Division 6.2-Infectious Substances.

Pan American Health Organization. (2018). Variant influenza A viruses and other novel influenza A viruses with pandemic potential.

World Health Organization. (2009). International Health Regulations Annex 2 Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. Retrieved from <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19133en/s19133en.pdf>

PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACION Y RESPUESTA FRENTE AL NUEVO CORONAVIRUS		
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
COMPONENTE: Laboratorio Nacional de Salud/Centro Nacional de Influenza (NIC)		
Manual de Laboratorio para el diagnóstico por PCR en tiempo Real en Laboratorios Descentralizados y Vigilancia Genómica de SARS-CoV-2		
Fecha de elaboración:	03/Febrero/2021	
Elaborado por:	CENTRO NACIONAL DE INFLUENZA (NIC)/MSPAS	Página 28 de 28
No. Revisión:	2	
Revisado por	M. Barrera / C. Estrada	
Fecha de revisión	03/Febrero/2021	

World Health Organization. (2015). OMS | Detección temprana, evaluación y respuesta ante eventos agudos de salud pública (No. WHO/HSE/GCR/LYO/2014.4). World Health Organization. Geneva: World Health Organization. Retrieved from https://www.who.int/ihr/publications/WHO_HSE_GCR_LYO_2014.4/es/

World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific. (2008). A Guide to Establishing Event-based Surveillance.

World Health Organization. (2004). Laboratory biosafety manual Third edition. Geneva, Switzerland.

World Health Organization. (2011). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. World Health Organization.