



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología

Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Parálisis Flácida Aguda



INDRE



Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE POLIOMIELITIS Y LA PARÁLISIS FLÁCIDA AGUDA

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
“Dr. Manuel Martínez Báez”

2018

PRIMERA EDICIÓN. 2018

INDRE

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE: INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”. LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA POLIOMIELITIS Y PARÁLISIS FLÁCIDA AGUDA, INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2018”

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”
FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, D. T. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480,
CIUDAD DE MÉXICO.

LA EDICIÓN ESTUVO A CARGO DE: DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑÓNEZ

EL DISEÑO ESTUVO A CARGO DE: DR. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA.

IMPRESO EN MÉXICO. *PRINTED IN MEXICO*

PARA DUDAS SOBRE EL CONTENIDO DE ESTE LINEAMIENTO PONERSE EN CONTACTO EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA PARA EL DIAGNÓSTICO DE POLIOMIELITIS Y LA PARÁLISIS FLÁCIDA, AGUDA A TRAVÉS DEL CORREO: edith.perez@salud.gob.mx y juan.roman@salud.gob.mx CON EL ASUNTO: REVISIÓN DE LINEAMIENTOS

SECRETARÍA DE SALUD

Dr. Jorge Alcocer Varela

SECRETARIO DE SALUD

Dra. Asa Cristina Laurell

SUBSECRETARIA DE INTEGRACIÓN Y DESARROLLO DEL SECTOR SALUD

Dr. Hugo López-Gatell Ramírez

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

Dr. José Luis Alomía Zegarra

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS

“DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”

INDRE

Biól. Irma López Martínez

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

Mtra. Lucía Hernández Rivas

DIRECTORA DE SERVICIOS Y APOYO TÉCNICO

Lic. Adriana Castro Cabrera

SUBDIRECTORA DE OPERACIÓN

Biól. Norma Angélica Montes Colima

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

Mtra. Dalia Viviana Vallejo Jauffred

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS

Mtra. Judith Estévez Ramírez

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

Mtro. Hiram Olivera Díaz

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES EMERGENTES Y URGENCIAS

Dra. Clara Gorodezky Lauferman

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

Mtra. Mónica Salas García

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

Dra. Gabriela Meneses Ruiz

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

GRUPO DE TRABAJO

QFB. ELDA EDITH PÉREZ SÁNCHEZ
JEFE DEL LABORATORIO DE POLIOVIRUS

M. EN C. RODRIGO APARICIO ANTONIO
JEFE DEL LABORATORIO DE SEROENCUESTAS

D. EN C. HERLINDA GARCÍA LOZANO
COORDINADORA DE VIRUS ENTÉRICOS Y NEUROVIRUS

Q.F.B. BENITA DÍAZ DE JESÚS
QF.B. ANA KAREN NAVA ACOSTA
TÉC. LAB. MARCO ANTONIO SANTILLÁN TORRES
D EN BIOL. EXP. OCTAVIO GODÍNEZ MARAVILLA
TÉC. LAB. ALFREDO SANTOS CISNEROS
TÉC LAB. ANA MARÍA LEAL MARTÍNEZ
TÉC. LAB. ALEJANDRA MATA ESPINOSA
TÉC. LAB. BRENDA GARCÍA HERNÁNDEZ
TÉC LAB. HILDA AGUIRRE PÉREZ
Q.B.P. PATRICIA STEPHANY JUSTO BERRUETA
M. EN SP. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA
DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑONEZ
BIÓL. IRMA LÓPEZ MARTÍNEZ

AGRADECIMIENTOS

SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

CENTRO NACIONAL PARA LA SALUD DE LA INFANCIA Y LA ADOLESCENCIA.

PERSONAL DEL LABORATORIO DE POLIOVIRUS

PERSONAL DEL LABORATORIO DE SEROENCUESTAS

CONTENIDO

CONTENIDO	9
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	15
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública.....	15
El Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico de la Poliomielitis y la Parálisis Flácida Aguda	16
MARCO LEGAL	18
DEFINICIONES OPERACIONALES	21
OBJETIVOS	23
VIGILANCIA DE LA POLIOMIELITIS Y LA PARÁLISIS FLÁCIDA AGUDA	24
Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia	24
Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública	24
TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA	24
Muestras de Contactos	26
Muestras de defunciones	26
Muestras de casos de Síndrome de Guillain-Barré asociado a la infección por el virus del Zika	27
Recolección de muestras	27
Conservación	28
Envío y transporte de la muestra	28
Criterios de aceptación y rechazo de muestras Los criterios de aceptación de muestras biológicas son:	30
ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO	31

ESTÁNDARES DE CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO	35
ALGORITMO PARA LA ELIMINACIÓN DE MATERIAL INFECCIOSO Y POTENCIALMENTE INFECCIOSO POR POLIOVIRUS	36
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	43
Anexo I: Bioseguridad	43
Anexo II: Técnicas diagnósticas	43

INTRODUCCIÓN

La Poliomiелitis es una enfermedad aguda, grave, que afecta al sistema nervioso central ocasionando parálisis flácida. Los casos leves de poliomiелitis presentan fiebre, malestar general, cefalea, náusea y vómito. Los que evolucionan a la forma aguda y grave presentan mialgias con rigidez de cuello y espalda con parálisis flácida asimétrica, alcanzando su máximo a los tres o cuatro días. La parálisis se presenta de acuerdo a la localización de la destrucción de las células, la mayor parte de los casos son asintomáticos o con cuadros clínicos inespecíficos.

Es causada por un enterovirus de la familia *Picornaviridae*, que se divide en tres tipos antigénicos: 1, 2 y 3; los tres pueden provocar parálisis. El periodo de incubación es de 7 a 14 días, con límite inferior de 5 y máximo de 35 días y de transmisibilidad una vez contagiado el paciente es de 7 a 10 días existiendo variaciones entre 3 a 35 días antes y después del comienzo de los síntomas. La susceptibilidad es universal, los niños menores de 5 años son más susceptibles que los adultos. El virus puede aislarse en heces desde dos semanas antes de la parálisis hasta 3 a 6 semanas después; de faringe y líquido cefalorraquídeo (LCR), generalmente sólo durante la fase aguda. La etapa de mayor infectividad es en los últimos días del período de incubación y los primeros días de la fase aguda. Esta se prolonga mientras se eliminan virus en las heces.

En condiciones normales, toda infección por virus de la poliomiелitis provoca una respuesta de inmunidad, capaz de proteger contra infecciones subsecuentes del mismo serotipo. Los anticuerpos neutralizantes persisten por toda la vida y los de fijación de complemento de uno a cinco años. La presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus se considera un parámetro indicativo y confiable de protección contra el desarrollo de poliomiелitis.

Fase final de la erradicación de la poliomiелitis en el mundo

El enorme progreso alcanzado por la iniciativa de erradicación mundial de la poliomiелitis se muestra que el número anual de casos que pasó de unos 350,000 en 1988 a 1,266 en 2004. Este avance significativo ha puesto de manifiesto algunos de los riesgos a los que debe hacer frente el mundo en esta etapa, así como los posibles escenarios en los cuales dichos riesgos deben enfrentarse,

tomando en consideración que la única experiencia previa ha sido la erradicación mundial de la viruela.

La Región de las Américas fue certificada libre de poliomielitis en 1994 (el último caso causado por el poliovirus salvaje se registró en el Perú en 1991). Una vez que la circulación autóctona del poliovirus salvaje ha finalizado en un país, en un continente, o en el mundo, aún persistiría el riesgo de aparición de casos de poliomielitis debido a un virus derivado de la vacuna oral (VDPV) que ha mutado luego de circular en la población (cVDPV), o bien proveniente de un excretor inmunocomprometido crónico (iVDPV), así como de casos producidos por la liberación accidental o intencional de un poliovirus salvaje almacenado en un laboratorio.

También existiría el riesgo de aparición de casos de parálisis asociados a la vacuna antipoliomielítica oral (VPO). Esos virus, conocidos como cVDPV (virus circulante, derivado de la vacuna) han presentado más de 1% de diferencia genética con el poliovirus vacunal. Se trata de virus que han recuperado la neurovirulencia y transmisibilidad propias del poliovirus salvaje.

Entre los brotes más importantes debidos a poliovirus derivados de la vacuna Sabin se encuentran el de Egipto que tuvo lugar entre 1988 y 1993 con el registro de 32 casos asociados a un poliovirus tipo 2, Filipinas en 2001 con tres casos por poliovirus tipo 1, Haití y República Dominicana en 2000-2001 con 22 casos por poliovirus tipo 1 Madagascar en 2002, con cuatro casos por poliovirus tipo 2; y China en 2004 con dos casos por poliovirus tipo 1.

Existen excretores crónicos en los cuales se han aislado poliovirus conocidos como iVDPV (virus de inmunodeficientes, derivados de la vacuna antipoliomielítica). Hasta junio de 2005 se han documentado 20 casos de excretores crónicos detectados en los últimos 40 años, ocho de ellos en Europa, siete en los Estados Unidos, y uno por cada país en Argentina, Irán, Japón, Perú y Taiwán. Los poliovirus aislados han sido siete de tipo 1, 12 de tipo 2 y uno de tipo 3. No se ha comprobado que estos casos hayan dado lugar a brotes de poliomielitis.

Se han documentado contaminaciones de virus salvajes a partir de virus almacenados en los laboratorios, y es por ello que la Comisión para la Certificación Global de la Erradicación de la Poliomielitis exige que además de interrumpir su transmisión en las comunidades, se lleve a cabo en cada país un plan nacional para la Contención del virus salvaje de la polio en los laboratorios.

Este plan incluye la creación de un comité nacional que tiene como tareas la creación de un listado nacional de laboratorios, la realización de una encuesta en estos y la elaboración de un inventario nacional de poliovirus salvajes o material potencialmente infeccioso, es decir, especímenes como heces, órganos, cultivos, etc., que por haber sido recogidos en épocas y lugares en los que existía circulación de virus salvaje de la poliomielitis, podrían albergar poliovirus que no han sido todavía identificados en estas.

Se ha documentado la existencia de casos de poliomielitis paralítica asociados al uso de la vacuna oral contra la polio (VAPP), con el registro de un caso en Haití y República Dominicana por poliovirus tipo 1, en Egipto durante 2000-2001: 22 casos por poliovirus tipo 2, China 1988-1993: 32 casos por poliovirus tipo 1, Madagascar 2004: 2 casos por poliovirus tipo 2, Filipinas 2002: 4 casos por poliovirus tipo 1 y en 2001: 3 casos.

Con la finalidad de disminuir los casos de Poliomielitis paralítica asociada a la vacunación (PPAV) en el año 2007 se introdujo la vacuna inactivada de Poliomielitis, incluida en la vacuna pentavalente acelular a los 2, 4, 6 y 18 meses de edad. El switch de vacuna trivalente oral contra la Poliomielitis (tOPV) a vacuna bivalente oral (bOPV), se llevó a cabo en México el año 2016, con la aplicación por última ocasión de la vacuna oral trivalente contra polio en la Primera Semana Nacional de Salud realizada en el mes de febrero de ese año, y la administración de la vacuna oral bivalente en la Primera Semana Nacional de Salud del 2017.

El Laboratorio de Poliovirus del InDRE es el Laboratorio Nacional de Referencia ante la OPS/OMS, pertenece a una Red de 11 Laboratorios en la Región de las Américas. (Figura 1)

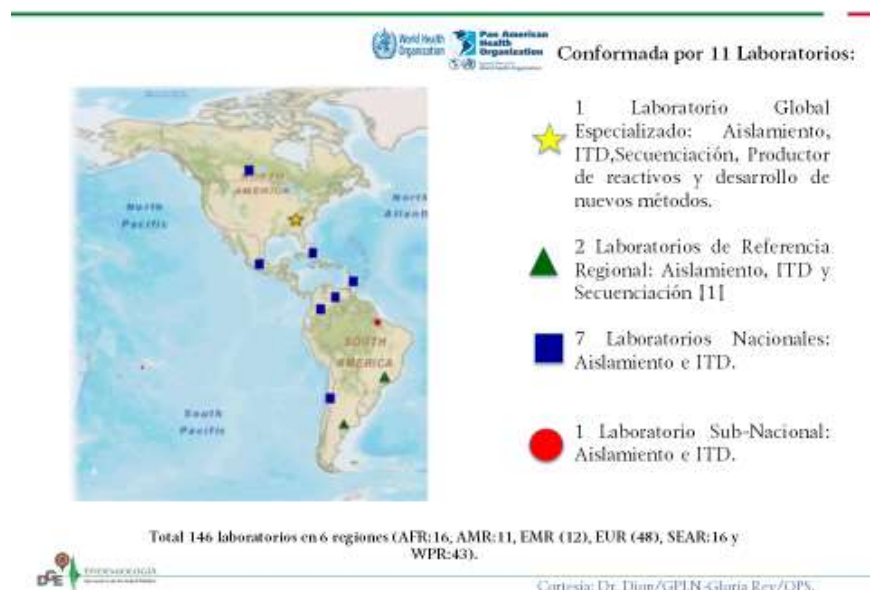


Figura 1. Red de Laboratorios de Polio en la Región de las Américas 2017

- Estos laboratorios basan sus actividades de acuerdo a las nuevas metodologías y procedimientos con base en el Manual de Laboratorio de Polio de la OMS (última edición 2004) y suplementos de Laboratorio de Polio OPS/OMS para la Red Mundial de Laboratorios y realizan la confirmación del diagnóstico mediante las técnicas de aislamiento viral (estándar de oro) en cultivos celulares, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real qTR-PCR en su versión actual 5.0 y la secuenciación final en los laboratorios certificados de la Región (CDC) de Atlanta Georgia, Estados Unidos, tanto para el diagnóstico de casos de PFA, estudio de evento o brotes de polio y para la realización de proyectos para la VA (Vigilancia Ambiental).

En nuestro país, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica establece como necesaria la confirmación por laboratorio para la clasificación final de casos probables y del estudio de evento o brote. La confiabilidad diagnóstica del InDRE, se reafirma mediante la evaluación externa del desempeño a través de un panel para el aislamiento viral que envía el RIVM (National Institute for Public Health and the Environment, por sus siglas en inglés) de Holanda y otro por parte de CDC para qPCR tiempo real para la actual versión 5.0 de ITD/VDPV (Diferenciación Intratípica) / (Virus Derivado de Vacuna de Polio).

El Laboratorio de Poliovirus del InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia, es la única instancia autorizada en México para generar información de laboratorio para la vigilancia epidemiológica de la PFA en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Actualmente, solo forma parte del marco analítico básico del InDRE.

Los aislamientos y la biocustodia del poliovirus Sabin tipo 2, poliovirus salvajes y VDPVs, requiere de laboratorios de contención o esenciales, por lo que esta actividad se realiza en un Laboratorio de Bioseguridad clase 3 (BSL3) avalado por la OMS. Por lo tanto la incidencia de las infecciones y circulación viral sólo se puede conocer por medio de estudios de laboratorio.

ANTECEDENTES

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) es el conjunto de laboratorios con objetivos específicos que permiten unificar métodos de diagnóstico, criterios de interpretación de resultados, transferencia tecnológica, generación de conocimiento y formación de recursos humanos que garanticen procedimientos técnico-administrativos que produzcan información de laboratorio útil para la vigilancia epidemiológica y la operación de los programas preventivos.

Es el soporte técnico-científico útil para la vigilancia epidemiológica, genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas.

La RNLSP está integrada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) como órgano rector de la red, los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE). Se encuentra estructurada en tres niveles: nacional, estatal y local o sus equivalentes para otras instituciones. El nivel nacional está representado por el InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).

Tiene fundamento legal en la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica y se encuentra definida en los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente “Vigilancia Epidemiológica”. En el caso del diagnóstico por laboratorio de la Parálisis Flácida Aguda, el InDRE es el único laboratorio en México reconocido por el SINAVE para la emisión de resultados.

El Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico de la Poliomielitis y la Parálisis Flácida Aguda

Desde 1970 se contaba con un *Laboratorio de Enterovirus*, ubicado en el entonces Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET), que apoyaba la vigilancia epidemiológica de poliomielitis con estudios virológicos y serológicos.

En mayo de 1985, el Dr. Carlos Canseco González, médico mexicano presidente del Club Rotario Internacional, con el propósito de celebrar el centenario de esta organización, lanzó la iniciativa de erradicar la poliomielitis del continente americano. En septiembre de ese mismo año, una vez analizada su factibilidad, la OPS acepta el proyecto, convoca a todos los estados miembros y desarrolla las estrategias operativas en cuanto a cobertura de vacunación, vigilancia epidemiológica y los estudios de casos y brotes.

Se puede afirmar que las acciones para la erradicación de la poliomielitis se iniciaron en México en 1986 con la instrumentación de la estrategia denominada “Días Nacionales de Vacunación”. En 1988, como parte del programa de erradicación de la polio, se conformó el Laboratorio de Poliovirus en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE), con un área específica participando en la Vigilancia Epidemiológica de casos de Parálisis Flácida Aguda (PFA) para el estudio de poliovirus en muestras de casos, contactos y en apoyo en estudios especiales.

Como parte de la rutina del sistema de vigilancia, desde 1990 se realiza monitoreo permanente de la calidad de las muestras de laboratorio, transporte, uso de equipos para almacenamiento y transporte de muestras, incluyendo

aspectos de calidad de la información, notificando periódicamente a los usuarios sobre los resultados.

El laboratorio ha apoyado la realización de estudios especiales en áreas y poblaciones de alto riesgo. En 1991, posterior a la notificación de casos de poliomielitis en la República de Guatemala, se realizó un estudio de monitoreo ambiental de Poliovirus y otros enterovirus en la zona de Tapachula, Chiapas, que se caracteriza por un alto índice de movimientos migratorios entre ambos países. Es una zona receptora de trabajadores agrícolas procedentes de Centroamérica y tiene condiciones sanitarias desfavorables, por lo que es una región de alto riesgo para la poliomielitis. En esa ocasión se realizó monitoreo de heces en niños y niñas menores de cinco años no vacunados y se empleó una metodología con técnica de PCR. El monitoreo de heces reveló la circulación de virus vacunal de la poliomielitis: nueve aislamientos de los distintos serotipos, particularmente en la ciudad de Tapachula, y el estudio reveló además la amplia circulación de otros enterovirus.

Otra situación de riesgo se presentó durante el invierno de 1992, al notificarse un brote de poliomielitis por serotipo 3 salvaje entre menonitas de Holanda; meses más tarde se demostró la circulación del mismo virus en Alberta, Canadá, lo cual encendió un foco rojo para incrementar la vigilancia de casos y virus en las comunidades menonitas de nuestro país. Entre las acciones realizadas se destacó el permanente monitoreo de heces en todas las áreas menonitas del país a partir del mes de febrero de 1993. De esta manera se logró obtener 808 muestras, entre las cuales se aislaron 130 casos con enterovirus no polio y 26 con Poliovirus, de los cuales todos se reportaron como cepas vacunales. A más tardar de un año de estudio y ante los resultados de la vigilancia reportados por las autoridades de salud de Canadá, el mes de marzo de 1994 se suspendió la vigilancia intensiva en comunidades menonitas de nuestro país.

Antes de 1993, se efectuaba el procesamiento de las muestras de contactos en casos específicos, como las defunciones, casos perdidos y compatibles; a partir de la mitad de ese año se procesaban todas las muestras de contactos, como apoyo al sistema de vigilancia y para el monitoreo ambiental, este es restringido.

Durante estos años, la diferenciación entre poliovirus salvaje y vacunal se había realizado en el laboratorio de los Centros de control de enfermedades (CDC) de Atlanta Georgia, que funciona como centro regional de referencia.

En 2009 se implementó en el InDRE, con apoyo del CDC y OPS, la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa, que permitiría la diferenciación entre virus salvaje y vacunal, y en 2011 se realizó el taller para la transferencia de la técnica de RT-PCR tiempo real, la cual ha venido evolucionando en sus diferentes versiones para adaptar la búsqueda sensible de los poliovirus 1, 2 o 3 (Sabin, salvaje, Sabin tipo 2 o VDPV “virus derivado de vacuna de polio”) de impacto mundial.

Desde 2009 hasta el primer trimestre del año 2017, el Laboratorio de Polio ha participado en 3 proyectos de Vigilancia Ambiental con el fin de conocer la circulación de los poliovirus en aguas residuales y para la validación de nuevas metodologías con apoyo de materiales, equipo, apoyo técnico- profesional y de transferencia tecnológica por parte del CDC en colaboración con OPS, CeNSIA, COFEPRIS, y los LESP de Aguascalientes, San Luis Potosí, Quintana Roo, Chiapas, Hidalgo y Ciudad de México (CDMX), teniendo resultados que han apoyado a la toma de decisiones para la Vigilancia epidemiológica del poliovirus.

En el año 2017 en el Laboratorio de Seroencuestas del InDRE se implementa la técnica de Determinación de anticuerpos séricos neutralizantes contra Poliovirus por microneutralización, en apoyo al Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico de la Poliomielitis y la Parálisis Flácida Aguda, esta herramienta de laboratorio actualmente es considerada el estándar de oro para evidenciar la inmunidad contra la enfermedad provocada por el virus, aunque también es útil para conocer la inmunidad poblacional o eficiencia de vacunas, sin embargo, actualmente no se recomienda para establecer el diagnóstico de poliovirus, es una técnica que sirve de apoyo al diagnóstico.

La Red de Laboratorios a nivel continental, es evaluada anualmente por el RIVM de Holanda y el CDC de Atlanta, los resultados en los paneles de control para el aislamiento viral y de pruebas moleculares, han sido realizados satisfactoriamente, incluso se ha hecho merecedor de reconocimientos por tener concordancia total en las evaluaciones.

MARCO LEGAL

Constitución de los Estados Unidos Mexicanos

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. Diario Oficial de la Federación 05/02/1917, Última Reforma D.O.F. 15/09/2017.

Leyes

- Ley General de Salud, México. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Última reforma publicada DOF 11/05/2018.
- Ley Federal de Responsabilidades de los Servidores Públicos. D.O.F. 13/03/2012. Última reforma en D.O.F. 18/07/2016.
- Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción; la Ley General de Responsabilidades Administrativas, y la Ley Orgánica del Tribunal Federal de Justicia Administrativa. D.O.F 18/07/2016.
- Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados. D.O.F. 26/01/2017.

Reglamentos

- Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. México. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 19 de enero de 2004. Última reforma en D.O.F. 07/02/2018
- Reglamento Sanitario Internacional (2005) 2da edición. Ginebra Suiza 2008. Organización Mundial de la Salud.

Normas Oficiales Mexicanas

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica, D.O.F. 19/02/2013.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. D.O.F. 27/03/2012
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. D.O.F. 22/10/1993; Modificación D.O.F. 23/06/2006.
- Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo. D.O.F. 09/10/2015.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Planes y Programas

- Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018. Diario Oficial de la Federación, D.O.F. 20/05/2013.
- Secretaría de Salud. Programa Sectorial de Salud 2013-2018. Diario Oficial de la Federación D.O.F. 12/12/2013.
- Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico 2013-2018. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, primera edición 2014.

Lineamientos y Manuales

- Secretaría de Salud, Manual metodológico Caminando a la Excelencia. México 2015.
- Dirección General de Epidemiología. Manual de Procedimientos Estandarizados de Operación en Materia de Vigilancia Epidemiológica Internacional. 2012. Secretaría de Salud. México.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez. Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para el reconocimiento a la competencia técnica de los laboratorios que apoyan a la vigilancia epidemiológica; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Manual para la toma, manejo y envío de muestras para diagnóstico a la red nacional de laboratorios de salud pública, InDRE. México: Secretaría de Salud; 2017.

Normas Mexicanas

- NMX-CC-9000-IMNC-2015 Sistemas de gestión de la calidad - Fundamentos y vocabulario (ISO 9000:2015)
- NMX-CC-9001-IMNC-2015 Sistemas de gestión de la calidad - Requisitos (ISO 9001:2015)
- NMX-EC-15189-IMNC-2015 Laboratorios clínicos - Requisitos de la calidad y competencia (ISO 15189:2012)

DEFINICIONES OPERACIONALES

De acuerdo al Manual de Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Prevenibles por Vacunación, vigente, las definiciones operacionales de caso son las siguientes:

- **Caso probable de PFA:** toda persona que presente parálisis o paresia flácida aguda (con tono muscular disminuido o abolido), que se instala en no más de cinco días, o bien, enfermedad paralítica en una persona en la que se sospeche poliomielitis.
- **Caso confirmado de Poliomielitis:** Enfermedad paralítica aguda asociada al aislamiento de poliovirus salvaje del caso o de sus contactos, con o sin parálisis residual.
- **Caso confirmado de Poliomielitis asociado a Vacuna:** Enfermedad paralítica aguda en la cual se demuestra mediante técnicas de laboratorio que el poliovirus vacunal es la causa de la enfermedad.
- **Caso descartado a Poliomielitis:** Enfermedad paralítica aguda en la que se demuestra etiología diferente a la poliomielitis o el cuadro no es clínicamente compatible, y que tiene al menos una muestra de heces adecuadas y con resultado negativo.
- **Caso probable de Síndrome de Guillain-Barré asociado a la infección por el virus del Zika.** Todo caso de PFA que en los 21 días previos al inicio de la parálisis haya cumplido definición de caso probable de Infección por virus Zika.
- **Caso confirmado de Síndrome de Guillain-Barré asociado a la infección por el virus del Zika.** Caso clasificado como SGB asociado a la infección por virus del Zika y con confirmación de laboratorio a este virus mediante la detección de ARN viral mediante RT-PCR en tiempo real.
- **Caso descartado de Síndrome de Guillain-Barré asociado a la infección por el virus del Zika.** Caso de SGB en quien se demuestre etiología diferente a la infección por virus Zika.

Después de la detección inicial, diferenciación intratípica y secuenciación por el Laboratorio, una cepa de poliovirus puede incluirse en alguna de estas tres categorías:

- Poliovirus Salvaje (Wild PolioVirus, WPV),
- Poliovirus Sabin (cepa de la OPV) y
- Poliovirus derivado de la vacuna (VDPV)

Esta última con divergencia $>1\%$ [PV1 y PV3] o $>0,6\%$ [PV2] con respecto a la correspondiente cepa en la OPV.

Un factor primordial del éxito de la erradicación de la Poliomielitis consiste en lograr una respuesta rápida y eficaz a cualquier evento de detección de un poliovirus o a un brote de poliomielitis causados por la importación de poliovirus o emergencia de un poliovirus derivado de la vacuna.

Para ello se ha emitido el documento *Plan de respuesta ante detección de eventos o brotes por poliovirus en México 2017*, (pág 37) emitido por la Secretaría de Salud, a través de la Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud con la Dirección General de Epidemiología (DGE) y el Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia (CeNSIA).

Definiciones epidemiológicas de detección de un evento y brotes causados por Poliovirus:

Se clasifican todas las cepas de poliovirus, según si su aparición se considera como un “evento” o un “brote”, con el objeto de describir la importancia de la transmisión de persona a persona y definir la respuesta pertinente.

Evento de Poliovirus:

No existen indicios de transmisión y el Laboratorio de Polio reporta resultado de muestra de heces como :

1) Detección de VDPV en :

- Un caso único de PFA o una persona asintomática (por ejemplo, contacto); o
- Una o más personas (una persona infectada puede corresponder en un caso de PFA o a una persona asintomática o sana) sin indicios de propagación a la comunidad (cepa VDPV relacionada con inmunodeficiencia [iVDPV] o ambigua [aVDPV]); o

2) Cepa tipo Sabin del serotipo 2 en una o varias muestras clínicas; o

3) Una persona infectada por un **Poliovirus Salvaje tipo 2** con exposición documentada a un virus del serotipo 2 en un laboratorio o un establecimiento de producción de vacunas.

Brote de Poliomiелitis:

Hay pruebas de transmisión y el Laboratorio de Polio reporta resultado de muestra de heces :

- Una o varias personas infectadas (una persona infectada puede corresponder en un caso de PFA o a una persona asintomática o sana) por un **Poliovirus Salvaje** (en el caso del **serotipo 2** se agrega: “sin exposición documentada a un poliovirus del serotipo 2 en un laboratorio o un establecimiento de producción de vacunas”) o
- Una o varias personas infectadas (una persona infectada puede corresponder en un caso de PFA o a una persona asintomática o sana) por un **cVDPV**.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer y dar a conocer al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica los procedimientos estandarizados de diagnóstico para las muestras obtenidas para la Vigilancia de la poliomiелitis y la Parálisis Flácida Aguda, que garanticen un resultado oportuno en el SINAVE.

Objetivos Específicos

- Garantizar la calidad del diagnóstico de la poliomiелitis y la Parálisis Flácida Aguda.
- Ser el documento guía para el soporte técnico-científico para la Vigilancia por Laboratorio de la Poliomiелitis y la Parálisis Flácida Aguda para el SINAVE.

Ámbito de aplicación

El presente documento aplica a todas las instituciones que integran el SINAVE.

VIGILANCIA DE LA POLIOMIELITIS Y LA PARÁLISIS FLÁCIDA AGUDA

Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia

El Laboratorio de Poliovirus del InDRE como LNR, es el órgano normativo para el diagnóstico de la Poliomielitis y la PFA en México y tiene las siguientes funciones:

- Aislamiento y tipificación de los serotipos de virus de la poliomielitis y otros enterovirus paralitogénicos
- Realiza la RT-PCR en Tiempo Real para la tipificación intratípica de los poliovirus: Sabin, No Sabin, VDPV, Indeterminado, así como el envío al CDC de Atlanta para la secuenciación. a diferenciación intratípica de los poliovirus vacunal, salvaje y virus derivado de vacuna (VDPV) de los así como el envío de muestras al CDC de Atlanta para la secuenciación a través de los CDC de Atlanta.
- Emisión oportuna del resultado para el SINAVE

Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública

- Se debe llevar a cabo puntualmente las indicaciones del Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Prevenibles por Vacunación (capítulo: Vigilancia Epidemiológica de Poliomielitis y Parálisis Flácida Aguda)
- La RNLSP deberá enviar de manera inmediata al Laboratorio de Poliovirus del InDRE todas las muestra de casos de PFA del sector salud (IMSS, ISSSTE, PEMEX, SEDENA, etc)
- Tomar muestras de heces al 100% de los casos de PFA menores de 15 años en los primeros 14 días posteriores a la fecha de inicio de la parálisis y enviarlas a la jurisdicción sanitaria. En casos de PFA en mayores de 15 años no se tomará muestra de heces, excepto cuando presenten cuadro clínico-epidemiológico compatible con poliomielitis y no exista un diagnóstico alternativo.

TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA

Para el diagnóstico por laboratorio de la Poliomielitis o la PFA, es necesario contar con muestras de calidad, respetar los días de evolución y envío al

laboratorio que apliquen para cada técnica, así como, entregar el estudio de caso con los datos del paciente que cumplan con las definiciones operacionales de caso vigentes.

Para ello se requieren muestras idóneas. Inmediatamente que hayan sido enviadas las muestras por cualquier vía, se llamará por teléfono al InDRE, a cualquiera de los siguientes números:

- 50 62 16 00 (Conmutador),
- Recepción de muestras, extensión 59340,59386
- Laboratorio de Poliovirus, extensión 59590,59569
- Dirección, 50 62 16 00 o en las extensiones: 59301, 59302 y 59303.

Se deberá indicar el medio de transporte, la hora de entrega a la compañía transportadora, hora probable de llegada y el número de guía. El remitente deberá verificar la llegada y condiciones de las muestras 24 a 48 horas después de haber sido enviadas.

El aislamiento del virus en muestras de heces, tanto de los casos de PFA como de sus contactos, es el método más sensible y eficaz para descartar la transmisión del Poliovirus salvaje o del virus derivado de vacuna. Es imprescindible obtener **una** muestra de heces del caso en los 14 días siguientes al inicio de la parálisis y muestras de cinco contactos como mínimo solamente si hay indicación epidemiológica para tomarlas a fin de confirmar la poliomielitis.

Para fines de la vigilancia de las PFA solo está recomendada la toma de UNA muestra de heces del caso tan pronto como se decida que se trata de un caso probable.

La serología de Poliovirus que actualmente se oferta en el InDRE, es en apoyo a las técnicas de diagnóstico actualmente establecidas a nivel internacional para la vigilancia epidemiológica de este virus. Su uso actualmente está limitado y solo se podrá solicitar cuando el médico tratante sospeche de que la persona no este vacunada contra Poliovirus, cuando por diagnóstico clínico sospeche de una infección por Poliovirus o ante un brote confirmado por Poliovirus, para lo cual se recomienda obtener una muestra de suero dentro 7 días siguientes al inicio de la parálisis y una segunda toma después de 28 días de haber iniciado con los signos de parálisis (ver anexo II, numeral 3).

Muestras de Contactos

Si existe indicación específica del epidemiólogo se obtendrán muestras de heces de cinco o más contactos en las siguientes circunstancias:

- En contactos menores de 5 años familiares y no familiares de un caso probable de Parálisis Flácida Aguda que no hayan recibido la vacuna oral contra la poliomielitis en los 30 días precedentes.
- En contactos menores de 5 años familiares y no familiares de un caso confirmado de poliomielitis importado nacional o extranjero, proveniente de cualquier región del mundo, con cuadro clínico de poliomielitis y con aislamiento de poliovirus salvaje de cualquier serotipo.
- En contactos menores de 5 años familiares y no familiares de un caso probable de Parálisis Flácida Aguda nacional o extranjero con aislamiento de poliovirus derivado de la vacuna de cualquier serotipo.
- En contactos menores de 5 años familiares y no familiares de un caso probable de Parálisis Flácida Aguda quién hubiese fallecido y que no cuente con muestra de heces.
- En contactos menores de 5 años familiares y no familiares de un caso probable de Parálisis Flácida Aguda en quién se sospeche clínicamente de poliomielitis y no exista ningún diagnóstico clínico alternativo.
- En contactos menores de 5 años familiares y no familiares de un caso probable de Parálisis Flácida Aguda que se pierda durante su seguimiento que no cuente con muestra de heces.
- En contactos menores de 5 años familiares y no familiares de un caso probable de PFA que sea un menor de 5 años, que presente una Parálisis Flácida Aguda asimétrica y que presente fiebre y mialgias al inicio de la parálisis y que no cuente con un diagnóstico alternativo ni muestra de heces.

Muestras de defunciones

En caso de **defunción** de un caso probable, se deben obtener muestras del contenido intestinal o de las heces ya formadas. Las muestras se enviarán al InDRE donde se realizará el aislamiento del virus de la poliomielitis, la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (RCP), detección de anticuerpos y un análisis histopatológico. En caso de muerte de un caso probable, se puede confirmar o descartar el diagnóstico definitivo de poliomielitis mediante un

examen de la médula espinal. Es importante que el examen histopatológico lo realice un patólogo competente y experimentado.

Muestras de casos de Síndrome de Guillain-Barré asociado a la infección por el virus del Zika

Para la vigilancia de casos de Síndrome de Guillain-Barré asociados con infecciones por ZIKV mediante asociación epidemiológica y sin toma de muestra en fase aguda, la muestra de interés deberán ser las establecidas en los *Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio del Dengue y otras Arbovirosis*, tal como se describe a continuación:

- **Saliva** (RT-qPCR) / Para vigilancia de casos asociados a Parálisis Flácida Aguda (PFA), como seguimiento a síndrome de Guillain-Barré (SGB) asociados con infecciones por VZIK y que no se les tomo muestra en fase aguda. Indicar al paciente que deposite la saliva directamente en el contenedor de plástico. Toma de muestra como máximo hasta 17 días de inicio de la parálisis y el antecedente de inicio de síntomas de caso probable de infección por VZIK. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.
- **Orina** (RT-qPCR) / Para vigilancia de casos asociados a PFA, como seguimiento a SGB asociados con infecciones por VZIK y que no se les tomo muestra en fase aguda. Toma de micción espontánea. Desechar el primer chorro y recoger la parte media-final de la micción en el contenedor estéril. Toma de muestra como máximo hasta 17 días de inicio de la parálisis y el antecedente de inicio de síntomas de caso probable de infección por VZIK. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio. El volumen de medio de transporte viral para enviar sedimento debe ser de 1.5 a 3.0 mL.

Recolección de muestras

- **Muestra de heces:** Se colectan de 5 a 10 gramos de heces (si el paciente no puede evacuar, tomar hisopo rectal manchado con 1 a 5 ml de solución salina fisiológica en tubo de plástico y tapón de rosca) dentro de los primeros catorce días de haber iniciado la parálisis. Debe utilizarse envases de plástico con tapa de rosca y de boca ancha. Mantener la red fría desde la toma de muestra hasta que llega al laboratorio de Poliovirus del InDRE (de 0 a 10°C).

Conservación

- Debido a la naturaleza del agente viral, la muestra de heces debe mantenerse siempre en refrigeración de 0 a 10 °C desde el momento de la toma y hasta su llegada al laboratorio de diagnóstico.
- **Importante:** En circunstancias especiales y previa notificación al LNR las muestras de heces se deberán mantenerse en congelación (ver apartado *Envío y transporte de la muestra* de este lineamiento)

Envío y transporte de la muestra

Todas las muestras deben ser enviadas mediante los LESP y LAVE a través de la Jurisdicción Sanitaria correspondiente o del Departamento de Epidemiología Estatal, quienes se encargarán de su envío al InDRE. Las muestras deberán contar con un listado nominal, indicando el folio SiNaVE cuando aplique. Apegándose a las especificaciones de manejo y envío de muestras establecidas en los *Lineamientos para la toma, manejo y envío de muestras para diagnóstico a al RNLSP*, el *Manual para la Toma y Envío de muestras al InDRE* y el *Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades prevenibles por vacunación*, vigentes.

El envío de las muestras deberá ser inmediato; en circunstancias especiales, se podrá esperar hasta cinco días después de tomadas (por ejemplo si un epidemiólogo acudiera a investigar el caso o en fin de semana). En esta situación las muestras para aislamiento (heces) se deberán mantenerse en congelación:

- Las muestras de heces se enviarán al LNR donde se realizará el aislamiento viral, y la prueba de PCR en Tiempo Real.

Las muestras de heces se enviarán al InDRE mediante el sistema básico de triple embalaje asegurando la red fría durante el traslado (de 0 a 10°C para las muestras de heces), estas deberá venir acompañada con el Formato Único de Envío de Muestras Biológicas del InDRE y el formato generado de plataforma del SiNaVE con toda la información solicitada. Los formatos enviados no deberán poseer datos alterados o sobrescritos, y si es el caso, es conveniente que se indique la gravedad del paciente.

Para las muestras de heces se sugiere trasladarlas en cajas térmicas bien selladas, cajas de aislamiento preferiblemente congeladas o con paquetes congelados de conservación; siempre que sea posible se utilizará hielo seco. Se colocarán en bolsas de plástico opacas que las protejan de la luz y anudadas con ligas. Cada envase con muestras deberá ser identificado claramente, indicando nombre, fecha de toma, institución remitente y en caso de muestra de contacto, nombre del caso al que pertenece. (Figura 2)

IMPORTANTE: En todo caso probable es obligatoria la toma y envío de muestras al Laboratorio de diagnóstico correspondiente en el InDRE. Deberá concluirse el estudio con el envío completo de muestras, aún si fuera descartado, ya que la poliomiелitis puede ser causa de cuadros atípicos de parálisis. Los casos probables no deberán ser vacunados hasta que se haya concluido los estudios de laboratorio y se tenga el diagnóstico definitivo; los contactos no recibirán la vacuna hasta la obtención de las muestras correspondientes.

En situaciones especiales, se usará el servicio especializado de mensajería (con cargo a la DGAE), inmediatamente que hayan sido enviadas las muestras por cualquier vía, se llamará por teléfono al InDRE, a cualquiera de los siguientes números:

- 50 62 16 00 (Conmutador),
- Recepción de muestras, extensión 59340, 59386
- Laboratorio de Poliovirus, extensión 59590, 59569
- Dirección, 50 62 16 00 o en las extensiones:: 59301, 59302 y 59303.

Se deberá indicar:

- El medio/compañía de transporte,
- La hora de entrega a la compañía transportadora,
- Hora probable de llegada y
- Número de guía.

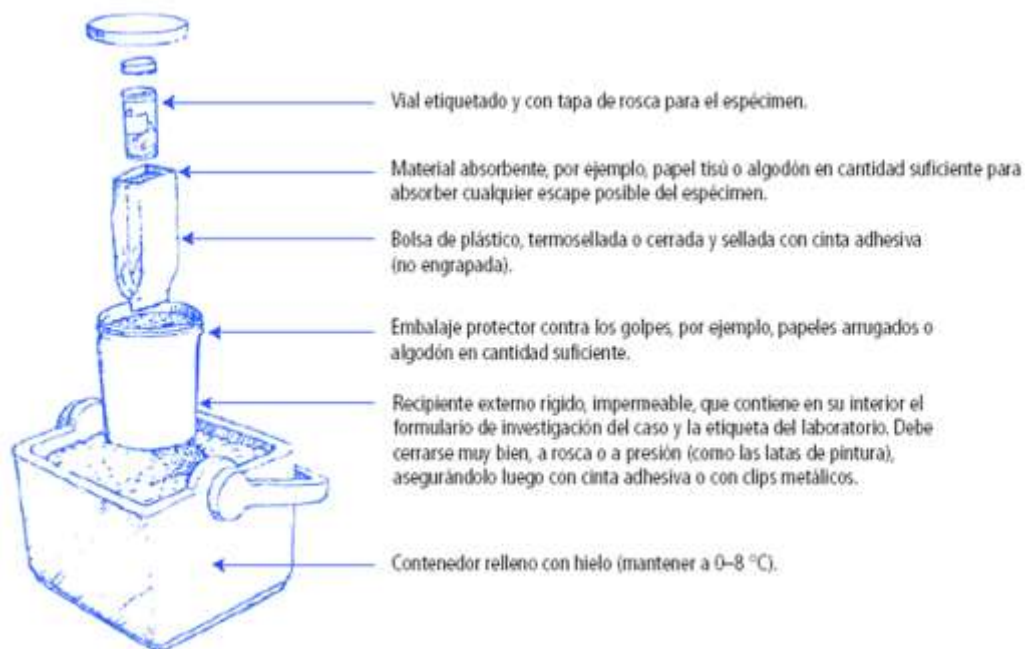


Figura 2. Etiquetado y embalaje de la muestra para envío al LNR

El remitente deberá verificar con el área de vigilancia epidemiológica la llegada y condiciones de las muestras 24 a 48 horas después de haber sido enviadas. Los resultados de los estudios realizados se envían a quien remitió las muestras, quien tiene la responsabilidad legal de informar a los distintos niveles e instituciones en el estado.

Criterios de aceptación y rechazo de muestras

Los criterios de aceptación de muestras biológicas son:

- La muestra de materia fecal ó hisopo rectal (diarreica, pastosa o formada) debe ser reciente (menos de 24 horas).
- Muestras en red fría de acuerdo a la temperatura establecida anteriormente.
- Muestras acompañadas con la documentación debidamente requisitada, incluyendo folio SiNaVE (cuando exista plataforma de sistema de información).

Los criterios de rechazo de muestras biológicas son:

- Las heces obtenidas del suelo, excusado o pañal no son aceptadas por la contaminación ambiental a que fueron expuestas.
- Segundas muestras de heces.
- Muestras de hisopos rectales secos.
- Muestras de mayores de 15 años, sin evidencia de estudio epidemiológico.
- Muestras de contactos sin evidencia de estudio epidemiológico.
- Muestras enviadas en frascos de vidrio.
- Muestras de LCR e hisopo rectal en Medio Cary Blair.

Muestras no útiles para el diagnóstico

- **Exudado Faríngeo.** Es improbable que se detecte el virus, por lo tanto, no se recomienda obtener muestras.
- **Líquido cefalorraquídeo (LCR).** Es improbable que se detecte el virus, por lo tanto, no se recomienda obtener muestras.

ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

Además de identificar si el poliovirus aislado se trata de un poliovirus salvaje, VDPV (virus derivado de la vacuna), poliovirus tipo 2 o poliovirus Sabin tipo 1 o 3 el estudio genético de las muestras puede permitir identificar:

- Si es de importación.
- Fallas en la contención de los poliovirus.
- Si se trata de un poliovirus derivado de la vacuna (c)circulante (i) inmonogénico u (a) ambiguo
- Así como por cuanto tiempo el virus podría estar circulando o siendo excretado en el caso del aislamiento de un iVDPV.

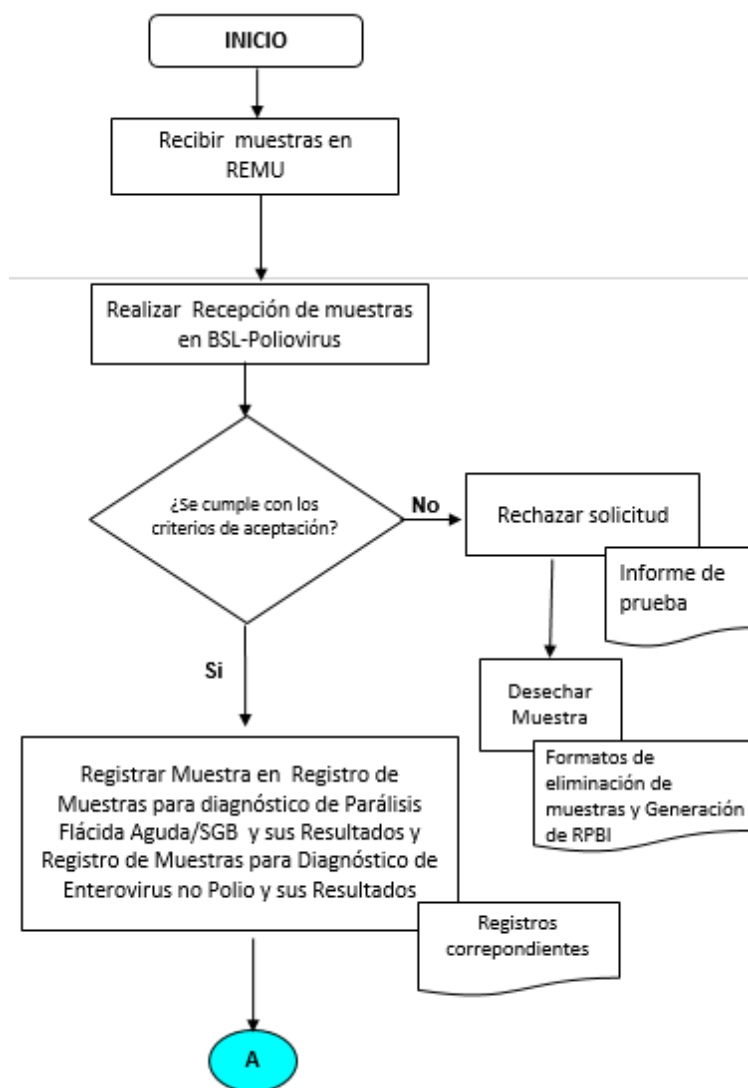


Figura 3. a) Aislamiento en heces e identificación por RT-PCR en tiempo real de Poliovirus, Clave de Tabulador: 1A4515001

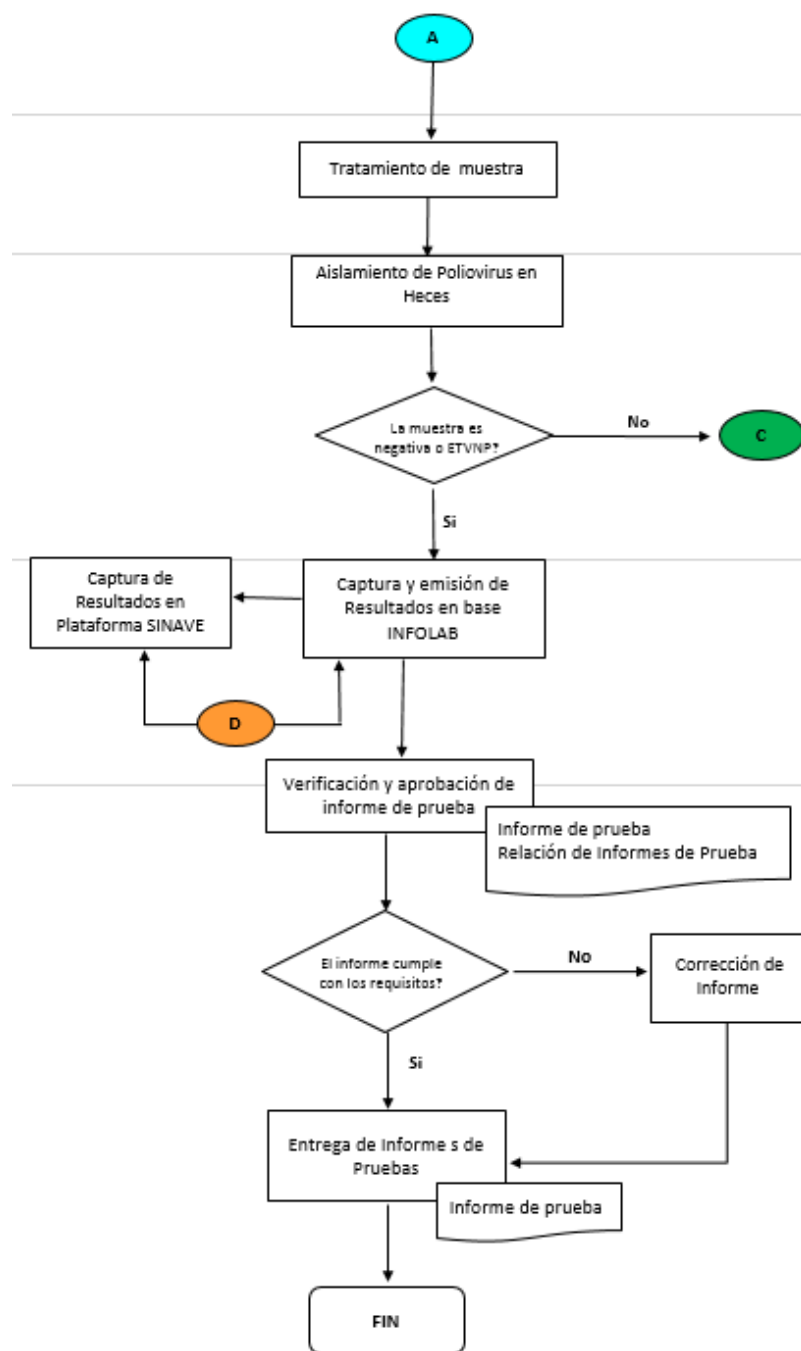


Figura 3. b) Aislamiento en heces e identificación por RT-PCR en tiempo real de Poliovirus, Clave de Tabulador: 1A4515001

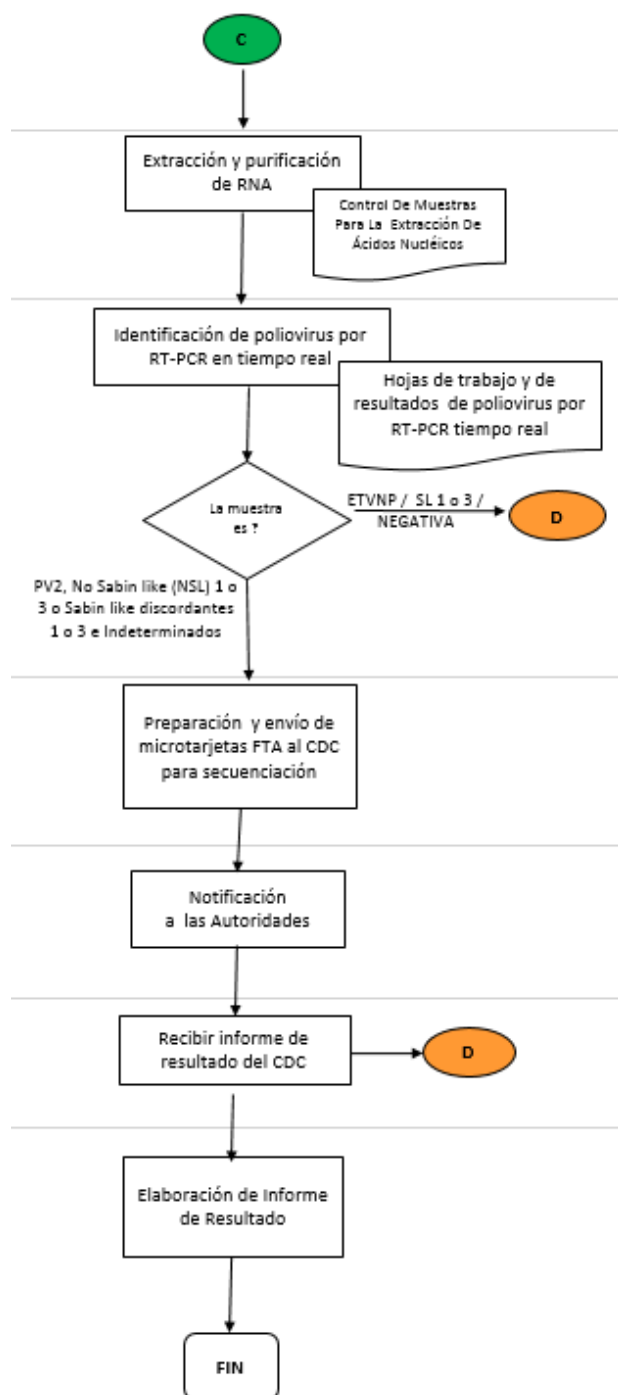


Figura 3. c) Aislamiento en heces e identificación por RT-PCR en tiempo real de Poliovirus, Clave de Tabulador : 1A4515001

ESTÁNDARES DE CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO

De acuerdo con la NOM-035-SSA3-2012, En materia de información en salud, el contar con información oportuna y de calidad permite coadyuvar a la planeación del Sistema Nacional de Salud para reforzar las acciones de atención a los problemas sanitarios y factores que condicionen y causen daño a la salud.

La evaluación de los indicadores descritos a continuación permitirá medir los avances e identificar las áreas de oportunidad para mejorar el desempeño; es decir, permitirá detectar los puntos críticos e implementar con oportunidad las acciones que se requieran para asegurar una vigilancia epidemiológica efectiva que contribuya al logro de los objetivos del Programa. Dichos indicadores se sujetan a los compromisos nacionales e internacionales, definidos para PFA y su evaluación será responsabilidad de las áreas de vigilancia epidemiológica en todos los niveles, la cual debe realizarse mensualmente o con mayor frecuencia si la situación epidemiológica lo requiere.

La evaluación debe hacerse en forma integral (Sector Salud) y desglosada por Institución en cada uno de los niveles técnico-administrativos:

- Nivel Jurisdiccional: jurisdiccional y por municipio.
- Nivel estatal: estatal y por jurisdicción.
- Nivel federal: nacional y por estado.

Indicadores de vigilancia epidemiológica:

Para los casos de PFA de menores de 15 años, se deberá realizar la evaluación del sistema mediante los siguientes indicadores:

Indicador	Construcción		Valor mínimo
Muestra Adecuada	Casos de PFA de <15 años de las últimas 52 semanas con una muestra de heces tomada en los primeros 14 días posteriores al inicio de la parálisis	x 100	= ó > 80%
	Total de casos de PFA <15 años de las últimas 52 semanas acumuladas hasta la semana que se evalúa		
Casos de PFA con antecedente de cuadro de infección por virus Zika	Total de casos de PFA con antecedente de infección por ZIKV con toma muestra de saliva que estén dentro de los 17 días entre el inicio de parálisis y la fecha de inicio de cuadro de ZIKV	x 100	80%
	Total de casos de SGB con antecedente de infección por ZIKV detectados dentro de los 17 días entre el inicio de parálisis y fecha de inicio de cuadro de ZIKV		

*Indicador Internacional.

** La muestra siempre se deberá obtener al primer contacto.

- Indicador de Muestras adecuadas:

El laboratorio es un elemento de la vigilancia epidemiológica que mide la especificidad del sistema. Para ello se debe tomar una muestra de heces dentro de los primeros 14 días de iniciada la parálisis. Este periodo se considera de mayor excreción de poliovirus

Indicadores Internacionales de calidad de muestra Laboratorio de Poliovirus

- Oportunidad de toma: Desde el inicio de parálisis hasta la fecha de toma: **máximo 14 días naturales.**
- Días de tránsito: Desde la fecha de toma hasta la llegada al InDRE: **máximo 5 días naturales.**
- Temperatura: Hasta **10 °C.**

ALGORITMO PARA LA ELIMINACIÓN DE MATERIAL INFECCIOSO Y POTENCIALMENTE INFECCIOSO POR POLIOVIRUS

La eliminación del riesgo en instalaciones no esenciales (BSL-1 y BLS-2) se logra a través de la destrucción de los materiales infecciosos o potencialmente

infecciosos de WPV u OPV/Sabin, o su traslado a instalaciones esenciales. La destrucción aplica a todos los tipos de materiales potencialmente contaminados con alguna cepa o tipo de OPV o WPV, donde la presencia de poliovirus no pueda ser descartada.

El éxito mundial de la eliminación del riesgo necesita que cada país prohíba la retención y subsecuente adquisición de materiales de poliovirus en todas las instalaciones no esenciales. GAPIII establece un esquema de fases alterno buscando un equilibrio entre los plazos de trabajo final con muestras de poliovirus en la investigación, la producción y la necesidad de cumplir con los requerimientos globales. Consideración para muestras potencialmente infecciosas:

Se establece una división del periodo histórico de recolección de las muestras potencialmente

infecciosas en dos componentes.

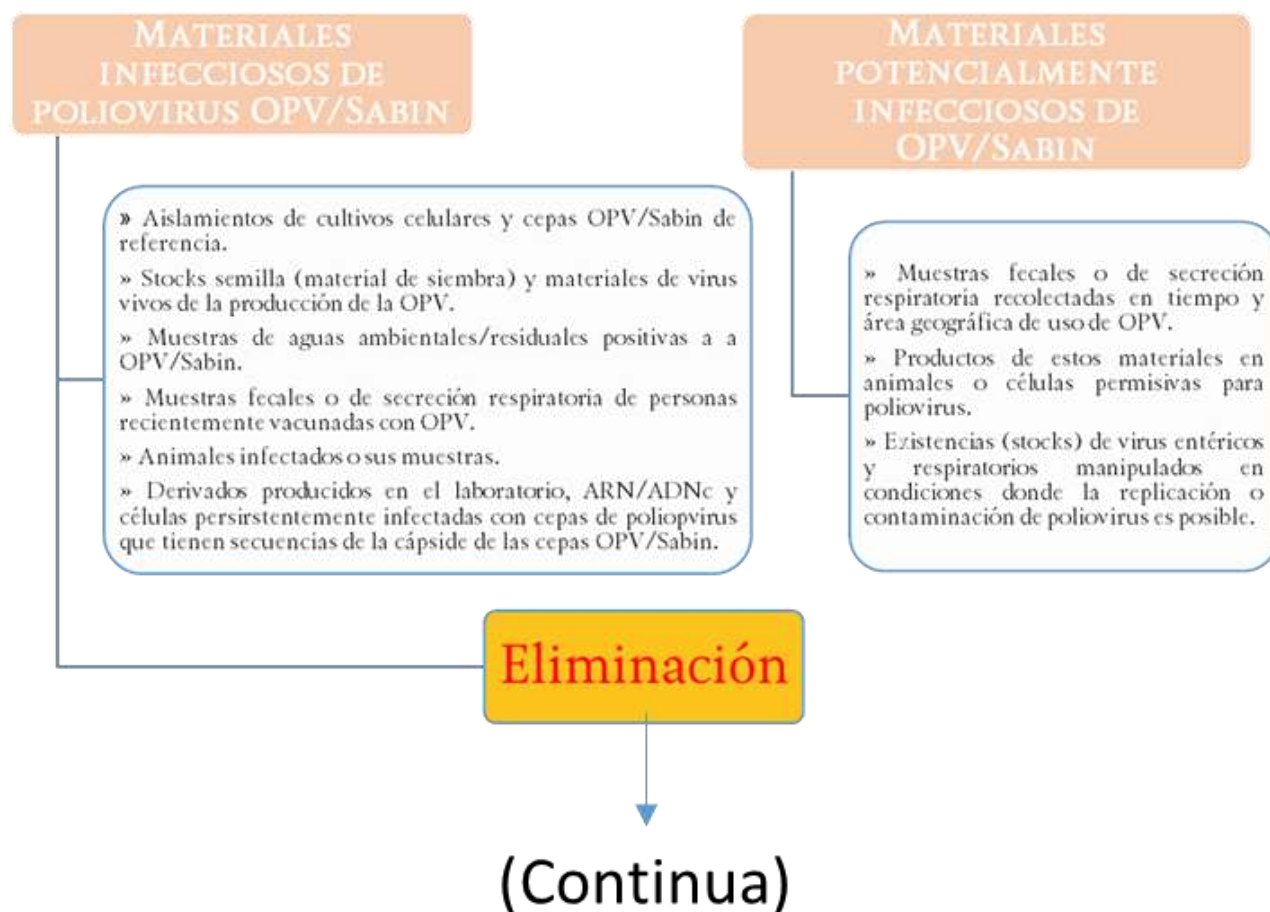
Figura 4: División de periodo histórico de recolección de la muestra potencialmente infecciosas

de poliovirus*.

*Aplica solo para muestras recolectadas en países de la Región de Las Américas.



Figura 5: Algoritmo de eliminación de material infeccioso y potencialmente infeccioso por Poliovirus. Organización Mundial de la Salud. WHO/CDS/CSR/LYO/LAB/2003. Ginebra, 2003.



(Continuación)

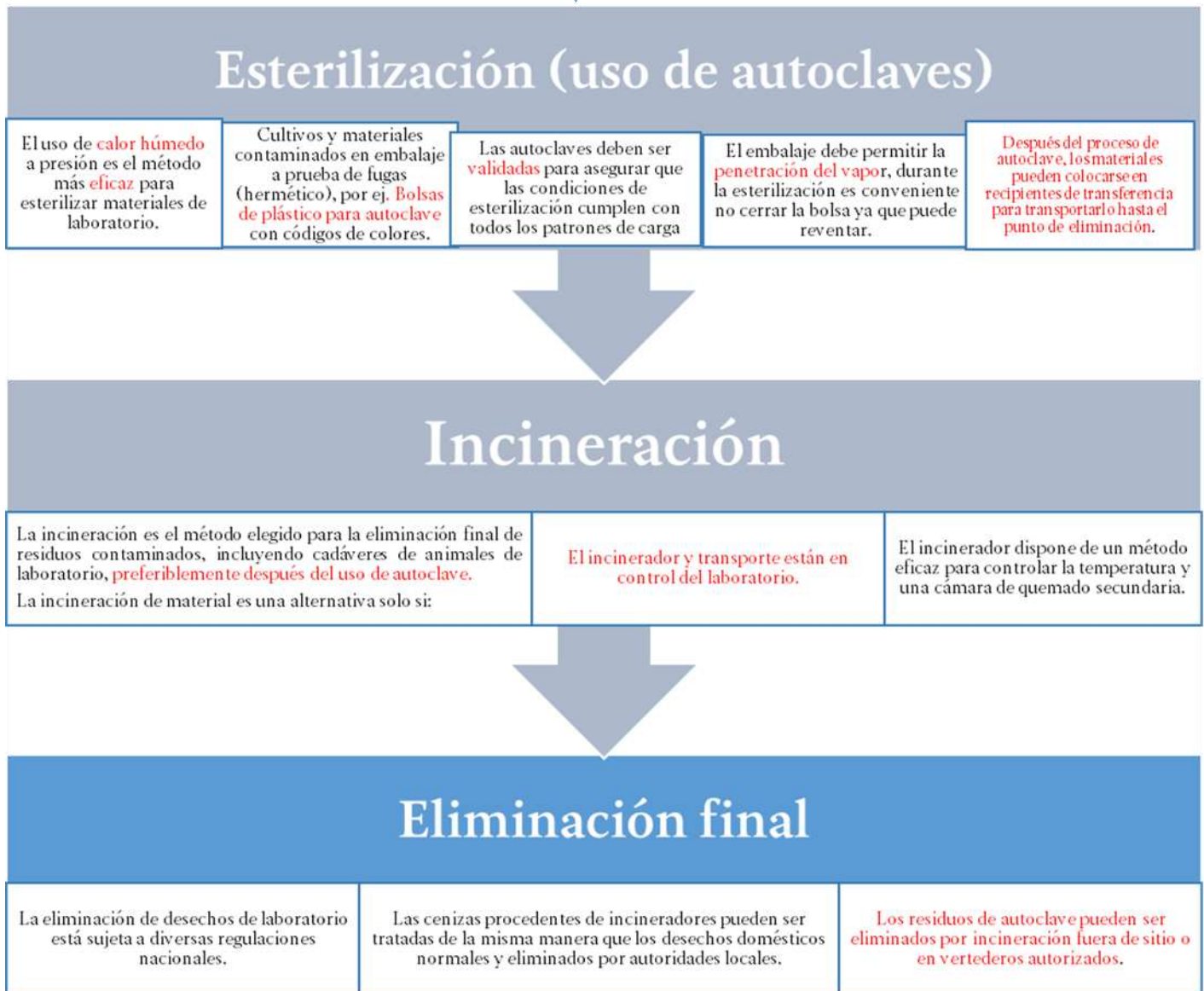


Figura 4. Algoritmo de eliminación de material infeccioso y potencialmente infeccioso por Poliovirus. Organización Mundial de la Salud. WHO/CDS/CSR/LYO/LAB/2003. Ginebra, 2003.

BIBLIOGRAFÍA

1. Asenjo Vila, Ana María. "Vigilancia epidemiológica. Selección de un problema de salud. Poliomiélitis." IX Curso de Experto Universitario en Epidemiología y Nuevas
2. Bustin, S. A., and R. Mueller. 2005. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clin. Sci. 109:365-379.
3. Bustin, S. A., and T. Nolan. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. J. Biomolec. Tech. 15:155-166.
4. Bustin, S. A., Benes V, Nolan T, y Pfaffl MW. 2005. Quantitative real-time RT-PCR a perspective.- Journal of molecular Endocrinology.43, 597 – 601.
5. CONAPO. Proyecciones poblacionales 2005 – 2050.
6. Fact Sheet: Guillain-Barré Syndrome (GBS), November 2, 2009. (Disponible en http://www.cdc.gov/h1n1flu/vaccination/factsheet_gobs.htm)
7. Fiore, A; Shay, D. Prevention and Control of Influenza: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. MMWR Recommendations and Reports August 8, 2008 / 57(RR07);1-60
8. Freedman D.A; Stark, P.B. The Swine flu vaccine and Guillain – Barré Syndrome: A case study in relative risk and specific causation. (disponible en <http://www.law.duke.edu/journals/64LCPFreedman>)
9. General Questions and Answers on Guillain-Barré Syndrome (GBS), September 14, 2009. (Disponible en http://www.cdc.gov/hiniflu/vaccination/gbs_ga.htm)
10. Granerod J.; White J.M.; Crowcroft N.S. Vaccine coverage in England: the impact of health service reorganisation. Arch Dis Child 2006; 91:805-807.4 February 2009.
11. Haber P., Sejvar J. Vaccines and Guillain-Barré Syndrome. Drug Safety, 32(4) 309-323, 2009.
12. Haber, P; DeStefano. F. Guillain – Barré Syndrome following Influenza Vaccination. JAMA, November 24, 2004. Vol. 292 No. 20
13. Inserto para Poliovirus rRT-PCR ITD 5.0. distribuido por el WHO, en colaboración del Centro para Enterovirus y Poliovirus. Centro de Control y Prevención de Enfermedades, 1600 Clifton Road NE, Mailstop G-10, Atlanta, Georgia 30333 USA.
14. Inserto para Poliovirus VDPV 5.0 rRT-PCR. distribuido por el WHO, en colaboración del Centro para Enterovirus y Poliovirus. Centro de Control y Prevención de Enfermedades, 1600 Clifton Road NE, Mailstop G-10, Atlanta, Georgia 30333 USA.
15. Juurlink D.N., et al. Guillain-Barré Syndrome After Influenza Vaccination in Adults. American Medical Association. Arch Inter Med/ Vol. 166. Nov 13, 2006.
16. Kilpatrick D.R, Ching K, Iber J, Chen Q, Yang S, De L, Williams A.J., Mandelbaum M, Sun H, Oberste M and Kew O.M. - 2014. Identification of vaccine-derived polioviruses using dual-stage real-time RT-PCR. J. Virol. Meth. 197. P. 25-28
16. Kilpatrick D.R.* Yang CH.F. †, Ching K, Vincent A, Iber J., Ray Campagnoli, Mandelbaum M., De L., Yang S.J., Nix A., y Kew O.M.- Rapid Group-, Serotype-, and Vaccine Strain-Specific Identification of 17. Poliovirus Isolates by Real-Time Reverse Transcription PCR Using Degenerate Primers and Probes Containing Deoxyinosine Residues.- Division of

Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia 30333.

17. Kilpatrick, D. R., Ching K, Iber J, Chen Q, Yang S-J, De L y col. 2014. Identification of vaccine-derived polioviruses using dual-stage real-time RT-PCR. J. Virol. Meth. 197, p. 25-28

18. Kilpatrick, D. R., Nottay B, Yang C.-F., Yang S.J., Silva E.D., Peñaranda S., Pallansch M., y Kew O. 1998. Serotype - Specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. J. Clin. Microbiol. P. 352 – 357.

19. Laboratory Biosafety Manual (2004). Third Edition. World Health Organization. Gêneva, Suiza.

20. Langmuir A. An Epidemiologic and Clinical Examination of Guillain – Barré Syndrome reported in association with the administration of Swine Influenza Vaccines. J of Epidemiology 841 (1984)

21. Libro de resúmenes. XVIII Reunión del grupo técnico asesor sobre enfermedades prevenibles por vacunación. 2009. OPS/OMS, San José Costa Rica. pag.14.

22. Method Validation Protocol and Summary Report. Protocol PPLB-Method.001.Rev.No. 2. agosto 2014 Laboratory: Polio and Picornavirus Laboratory Branch (PPLB)/ Polio Molecular Diagnostic Development Laboratory. CDC Infectious Disease Laboratories.

23. NMX-CC-9001-INMC-2015.Sistema de gestión de la calidad-Requisitos (ISI/FDIS9001:2015)

24. NMX-EC-15189-IMNC-2015. Laboratorios clínicos — Requisitos de la calidad y competencia (ISO 15189:2012).

25. NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

26. NOM-017-SSA2-2012, “Para la vigilancia epidemiológica”

27. NOM-023-SSA2-1994, “Para el control, Eliminación y Erradicación de las Enfermedades Evitables por Vacunación.

28. Organización Panamericana de la Salud. Guía práctica para la Erradicación de la poliomielitis Publicación Científica y Técnica No. 607, Tercera edición. Washington, DC 2005

29. Polio Laboratory Manual 4th edition, 2004. Immunization, Vaccines and Biologicals, World Health Organization, Geneva 27, Switzerland.

30. Poliomyelitis, Paralytic. 1997 Case Definition. (Disponible en http://www.cdc.gov/ncphi/diss/nndss/print/poliomyelitis_paralytic_current.htm)

31. Poliovirus infection, nonparalytic, 2007. (Disponible en http://www.cdc.gov/ncphi/diss/nndss/poliovirus_nonparalytic.htm)

32. Safety of pandemic vaccines. Pandemic (H1N1) 2009 briefing note 6 (Disponible en http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/briefing_20091119/en/print.html)

33. Schoeberger, LB. Guillain – Barré Syndrome following Vaccination in the National Influenza Immunization Program, United States 1976 – 1977. . J of Epidemiology 105 (1979)

34. Secretaría de Salud, Manual Metodológico Caminando a la Excelencia. México, 2008-2012

35. Secretaría de Salud, Manual para la Vigilancia Epidemiológica de la Poliomielitis. México, 1990.
36. Secretaría de Salud, Manual simplificado para la vigilancia epidemiológica de las Enfermedades Prevenibles por Vacunación. México, 2005.
37. Sharma, D, K., Nalavade, U, P., y Deshpande, J, M.- Octubre 2015. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for identification of wild 1 & 3. J Med Res. 142. P. 471-478.
38. Stowe J., Andrews N., et al. Investigation of temporal asociation of Guillain-Barré syndrome with influenza vaccine and influenzalike illness using the United Kingdom general practice research database. American Journal of Epidemiology. Vol 169, No. 3. November 24, 2008.
39. Supplement to the WHO Polio Laboratory Manual, 2011.
39. Tecnologías Aplicadas. España, 2009. En línea: [http://sameens.dia.uned.es/Trabajos9/Trab_Publicos/Trab_8/Asenjo_Vila_8/segu](http://sameens.dia.uned.es/Trabajos9/Trab_Publicos/Trab_8/Asenjo_Vila_8/segunda.htm)
[nda.htm](http://sameens.dia.uned.es/Trabajos9/Trab_Publicos/Trab_8/Asenjo_Vila_8/segunda.htm) (30.julio.2015).
40. Vellozzi C., et al. Safety of trivalent inactivated influenza vaccines in adults: Background for pandemic influenza vaccine safety monitoring. Elsevier Ltd. Doi: 10.1016/j.vaccine 27 (2114-2120), 2009.

ANEXOS

Anexo I: Bioseguridad

Una vez que la muestra se ha recibido en el laboratorio, es responsabilidad del personal asegurar que se cumplan con todos los criterios de bioseguridad y análisis de bioriesgo que apliquen y que se especifiquen en cada hoja de bioseguridad de los agentes etiológicos y en el BIORAM (del inglés, "Biorisk Assessment Model") correspondiente.

Anexo II: Técnicas diagnósticas

1. Aislamiento Viral e Inoculación en Líneas Celulares

Propósito

Los procedimientos de Inoculación y Aislamiento sirven para la detección veraz y oportuna de la presencia de poliovirus y enterovirus no polio en muestras de heces humanas del Programa de Vigilancia Epidemiológica de PFA.

Principio del Método

La inoculación de clarificado de muestras de heces para el diagnóstico de Parálisis Flácida Aguda en cultivos celulares susceptibles al virus, nos permite detectar la presencia del poliovirus en forma cualitativa por el grado de daño celular que ocasionan a las células susceptibles del ECP (efecto citopático). La evidencia de la detección oportuna con apoyo de la vigilancia epidemiológica evitará la transmisión o importación de Poliovirus salvaje y del Virus Derivado de Vacuna de Polio (VDPV), de gran impacto en la salud pública mundial.

Materiales

Tubos con tratamiento para cultivo celular con tapón de rosca, de poliestireno, estériles, libres de pirógenos, marca CORNING® de 16 x 125 mm. No. Cat. 430172, gradilla con 50 tubos.

Tubo estéril de poliestireno, con tapón de rosca de 16 X 125 mm, libres de pirógenos, marca Corning, No. de Cat. 430157 (bolsa con 25 tubos).

Gradillas de plástico para tubos de 16 X 125.

Puntas de 100 a 1000 ucl con filtro, estériles y libre de pirógenos.

Charola de acero inoxidable con baño de agua-hielo o contenedor con paquetes refrigerantes.

Gasas estériles.

Bata desechable de cirujano.

Guantes desechables de cirujano.

Cofia (cubre pelo).

Cubre bocas con careta o cubrebocas y Goggles.

Reactivos y materiales biológicos

Tubos de cultivo celular con monocapa de células RD, incubados a 36°C.

Tubos de cultivo celular con monocapa de células L20B, incubados a 36°C.

Tubos de cultivo celular con monocapa de células Hep2-C, incubadas a 36 °C.

Medio de cultivo MEM de mantenimiento para el aislamiento e identificación, proporcionado por el área de cultivo celular.

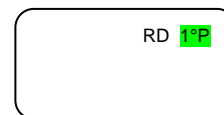
Alcohol al 70% (70 partes de alcohol y 30 de agua destilada), se almacena a temperatura ambiente.

Hipoclorito de sodio al 10% (Una parte de hipoclorito y 9 de agua destilada), se almacena a temperatura ambiente.

- Equipo
- Gabinete de bioseguridad clase 2 tipo.
- Agitador vórtex.
- Microscopio invertido.
- Refrigerador, congelador y ultracongelador.
- Incubadora de CO₂
- Micropipetas unicanal 100-1000 µl calibradas.

Procedimiento.

La inoculación de las muestras se realiza diariamente siempre y cuando el área de Recepción y Tratamiento de muestras obtenga los clarificados de las muestras tratadas o se realicen 2dos pases, nuevos algoritmos o reinoculaciones. Se mantendrá en todo momento la red fría. Las muestras congeladas serán descongeladas a temperatura ambiente y se guardan en refrigeración (4-8 °C) hasta que sean utilizadas para la inoculación.



Elabora etiquetas con los siguientes datos:

Línea celular (RD y L20B por duplicado, Hep-2C una sola etiqueta),

Número de pase (1° P, para las muestras recién tratadas; identificadas con color verde y 2° P para las muestras que se inocularon anteriormente en 1er pase y que cumplieron con cinco días de lectura; identificadas con color rosa). De ser necesario un tercer pase la etiqueta se identificara con color naranja y 3° P. Se muestra el ejemplo en la imagen de al lado.

Por cada muestra etiqueta una serie de tubos con líneas celulares: RD y L20B por duplicado y HEp-2C un solo tubo, una vez etiquetados se colocan en una gradilla para tubos de cultivo, de forma horizontal (en un ángulo aproximado de 5°) en el siguiente orden: RD, L20B y HEp-2C.

Registra las muestras que se van a inocular en la bitácora de registro de las muestras para inocular con número del caso codificado por el laboratorio.

Trabaja en Cabina de Bioseguridad Clase II tipo A2, usando el equipo de protección personal (EPP): bata blanca, bata desechable, cofia, goggles o careta, cubrebocas y zapatos cerrados y antiderrapantes; de preferencia blancos, el personal que utilice anteojos podrá prescindir del uso de lentes protectores/goggles.

Inoculación de la muestra en tubos con células RD, L20B y Hep2C.

Es importante que las células utilizadas para el diagnóstico, tengan la Prueba de Sensibilidad Celular para conocer la capacidad de captar el virus.

La inoculación del clarificado de la muestra tratada se realiza en tubos con monocapas celulares de RD, L20B y Hep2C en 1 ml de medio mantenimiento, que proporciona el área de Cultivo Celular (previo cambio de medio de crecimiento al de mantenimiento

para que las monocapas no se desprendan rápidamente y conserven su morfología normal el mayor tiempo posible).

En el 1º pase inocular cada tubo con 200 uL de clarificado (previa agitación en vórtex al menos 10 seg), de manera individual, para evitar contaminaciones cruzadas. Los tubos con el clarificado de la muestra deben de mantenerse en baño de agua-hielo o congelantes durante todo el proceso. En cada corrida se deberá inocular de la misma forma que una muestra el clarificado correspondiente al control negativo.

En el 2º pase, los tubos de 1º pase se congelan-descongelan previamente y de igual forma, agitar en vórtex por al menos 10 seg e inocular con 200 uL en tubos con cultivos celulares frescos de cada línea celular. Inocular una línea celular por vez (RD en RD, L20B en L20B y HEp2C en HEp2C) para evitar contaminaciones cruzadas. Siempre mantener la red fría.

Cierre los tubos inoculados y colóquelos en forma horizontal, en ángulo aproximado de 5º cuidando que el medio de cultivo cubra completamente la monocapa celular. Repetir este proceso por cada muestra a inocular. Evitar abrir tubos de muestras de casos diferentes al mismo tiempo para evitar contaminaciones cruzadas.

Se dejan 2 tubos de cada línea celular, RD, L20B y Hep2C, sin inocular, los cuales serán los Controles celulares.

Una vez concluida la inoculación de todas las muestras, incubar a 36 °C en incubadora de CO₂: con 5% de CO₂ cerrar los tubos sin apretar por completo y en caso de que no se utilice CO₂ cerrar herméticamente.

Los clarificados de muestras tratadas deberán almacenarse en congelación (-20 + 5°C) por 3 meses después de recibir la muestra o hasta completar los resultados (ITD y secuenciación si es necesario) y no se deben de almacenar por periodos mayores de 12 meses.

El material biológico-infeccioso generado en el proceso se desecha de acuerdo al procedimiento establecido.

Observación al Microscopio y Registro e Interpretación de lecturas con base al Nuevo Algoritmo.

Con el objeto de acelerar y garantizar la identificación de poliovirus salvaje y virus derivado de vacuna (VDPV) en todo el mundo, se diseñó un algoritmo abreviado para la identificación del virus con el fin de reducir el tiempo de obtención de los resultados del laboratorio y aumentar la sensibilidad de detección del poliovirus, sin que se pierda la sensibilidad para la detección de los enterovirus no polio (ETVNP). Debe de haber una

notificación oportuna de los resultados de 10 a 14 días después de la llegada de la muestra al laboratorio, en por lo menos el 80% de las muestras.

Los controles celulares de cada línea se observan al microscopio de platina invertida para obtener una referencia al observar los tubos inoculados con las muestras. Anotar las lecturas de observación en el Registro correspondiente.

Las muestras inoculadas se observan de ser posible diariamente por un período de 5-7 días al microscopio y se registra la lectura en el formato LPOL-F-10. La presencia de efecto citopático (ECP) indica el porcentaje de células afectadas por el virus: 1+ para 25%; 2+ de 25% a 50%; 3+ de 50% a 75% y 4+ de 75% a 100%, así como la presencia de toxicidad¹, degeneración celular o contaminación². Los fines de semana o días festivos se tomarán en cuenta como lectura siempre y cuando al siguiente hábil no se presente ningún ECP, en caso contrario se tendrá que hacer una reinoculación para descartar una posible toxicidad de la muestra y se contará el período de observación de 5-7 días nuevamente.

Si el ECP característico aparece en algún momento después de la inoculación (células redondeadas, retráctiles/ refringentes y desprendidas de la superficie del tubo), anotar observaciones y permitir que el ECP llegue hasta un 75% de células afectadas (3+ ECP). En este momento se congelan (-80 + 5°C) y posteriormente se dejan descongelar a temperatura ambiente para realizar un segundo pase⁴ en la línea celular opuesta, según el nuevo algoritmo (RD en L20B y L20B en RD, ver punto 15). Si los cultivos que presentan un ECP mayor o igual a 3+ están por duplicado y son de la misma línea celular pueden ser mezclados⁵ en un solo tubo (pool) y serán inoculadas en tubos con monocapas celulares frescas por duplicado.

Nota 1. Los efectos positivos de cultivos de L20B se pasan en cultivos celulares de RD, se incuban a 36°C y se observan diariamente (como se menciona en el punto 9.7.2). El ECP característico de los enterovirus puede aparecer en la mayoría de los cultivos de RD y se debe de permitir que se desarrolle hasta que un ECP 3+ o 4+ se observe. Los tubos RD positivos ahora se congelan (-80 + 5°C) para ser referidos al área de PCR para Diferenciación Intratípica (ITD). Un pequeño número de muestras contienen virus que muestran ECP en células L20B que no es reproducible⁶ cuando los virus son pasados en células RD. Los cultivos de RD deben de ser examinados por un lapso de 5 días antes de ser reportados como negativos.

Nota 2. Los ECP positivos de RD son pasados en células L20B e incubados a 36°C y observados diariamente. Este pase es con el fin de separar los poliovirus que puedan estar presentes en mezclas con otros enterovirus y amplificar el título de cualquier poliovirus que pueda estar presente. Si el ECP no se obtiene cuando los cultivos de L20B son examinados por un lapso de 5 días, el cultivo es considerado como negativo para poliovirus. El ECP característico de enterovirus, sin embargo, puede aparecer en algunos cultivos de L20B y debe permitirse que se desarrolle hasta que se observe un ECP 3+ o

4+. Otro pase del virus se realiza, regresando a las células RD4, con la subsecuente observación del ECP. Este pase es con el fin de amplificar el título del virus. Este paso se realizará solo si existe alguna duda o para confirmar el resultado de ITD que se describe en la nota 1.

Los aislamientos para ITD/VDPV se remiten al área de PCR, preparando una alícuota de aprox. 500µL y se entregará al personal correspondiente para su tipificación.

¹ Toxicidad: Si el cultivo celular presenta una rápida degeneración celular, al día siguiente de haberse inoculado, puede tratarse de una toxicidad inespecífica de la muestra. Esa muestra debe congelarse (-80 + 5°C) y posteriormente transferir un volumen de 200ul (este procedimiento es similar a un pase pero no debe ser contemplado como tal) a un cultivo de la misma línea celular, siempre y cuando la observación se realice en día hábil de lo contrario se procederá de acuerdo al punto 9.7.2. Si la toxicidad aparece nuevamente, retome el clarificado, diluya en solución de Hank 1:10 y reinocule el cultivo como está indicado en el punto 9.6.1 (esta nueva inoculación debe considerarse como día cero de observación y primer pase).

² Contaminación microbiana: La contaminación del medio por bacterias y hongos trae como resultado la muerte de las células, provocando que la detección de un ECP viral sea incierto o imposible. Físicamente se observa turbidez o vire del indicador (amarillo) en el medio de los tubos inoculados y se confirma microscópicamente con la presencia de bacterias u hongos. En este caso se congela (-80 + 5°C)-descongela el tubo o tubos, se filtran con membrana de 0.22 µm y se reinoculan, si la contaminación persiste se toma el clarificado, se re-procesa con cloroformo (LPOL-P-02), y se inocula nuevamente en cultivos frescos como se describe en el punto 9.6.1.

³ Pase ciego: Congele los tubos (-80 + 5°C), descongele y pase 200 ul de la muestra a tubos con cultivo celular fresco y de la misma línea celular.

4 Pase de un cultivo celular positivo (con ECP): Congele los tubos (-80 + 5°C), descongele y pase 200 ul de la muestra a tubos con cultivo celular fresco de diferente línea, examinarlos diariamente durante cinco días.

5 Mezcla de cultivos celulares positivos (con ECP): Pueden mezclarse solo y únicamente si ambos cultivos son de la misma línea y presente ECP mayor o igual a 3+ el mismo día. En otra situación, cada muestra debe pasarse por separado a un nuevo cultivo celular.

Si no existe la presencia de ECP después de terminados los días de observación en el primer pase, realizar un pase ciego³ (2º pase) en la misma línea celular y continuar la observación por 5 a 7 días más. Los cultivos se observan por lo menos 10 días y máximo 14 (de 5 a 7 días post-inoculación y post-pase) antes de considerarlos como negativos y descartarlos.

Nota: El contenido de los duplicados del cultivo celular negativos de un caso individual, no deben mezclarse con su duplicado para realizar el pase, y se deben de inocular en forma separada.

Los resultados de las lecturas se anotan en los registros correspondientes para posteriormente ser enviados a la Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública y/o hospital es que lo requieran, a través del área de Recepción de Muestras.

Si el resultado de la rRT-PCR (ITD/VDPV) es NSL 1, 2 o 3, SL 2 o SL Discordante (1,2 o 3) el aislamiento en células RD se envía al CDC para secuenciación en FTA CARDS. Los Sabin Tipo 1 y 3 o ETVNP se resguardan en el Laboratorio, por tiempo indefinido a $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$ y se registran en el formato de Control de muestras almacenadas. Los aislamientos de SL 2 y SL Discordantes se destruyen en autoclave una vez que se haya recibido el resultado de secuenciación.

Al final de cada procedimiento, el personal deberá de registrarse en las bitácoras de uso de los dispositivos médicos.

1.7 Interpretación por el laboratorio

Intervalo reportable

La presencia de efecto citopático (ECP) indica el porcentaje de células afectadas por el virus (células redondeadas, refringentes y separadas de la superficie del tubo) y se reporta como:

- 1+ para el 25%;
- 2+ de 25% a 50%;
- 3+ de 50% a 75%
- 4+ de 75% a 100%

Todos los resultados se reportan, sean negativos o positivos, encontrando las siguientes opciones:

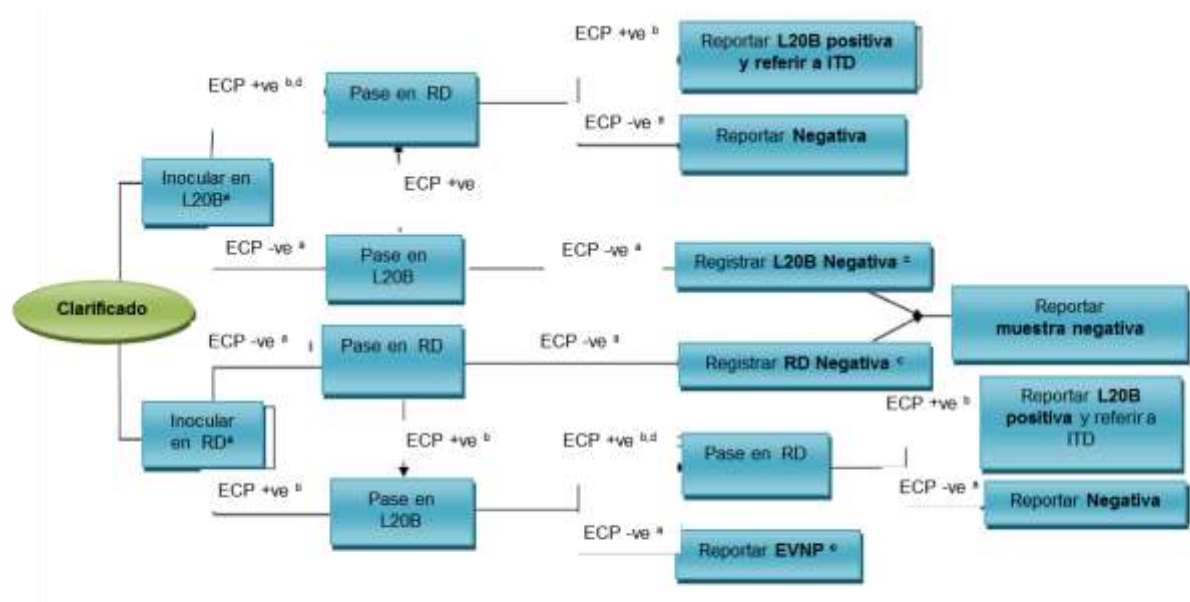
Negativo: sin ECP en ninguna línea celular, en ningún pase.

Positivos en L20B o RD positivos provenientes de L20B positivos: después de la PCR para ITD/VDPV, el resultado puede ser Sabin 1, 2 o 3 o mezcla de dos o más de ellos, Enterovirus no Polio (ETVNP), No Sabin Like 1, 2 o 3 o mezcla de dos o más de ellos o SL 1,2 o 3 Discordante o mezclas de dos o más de ellos.

Positivos sólo en RD y no en L20B después de aplicar el nuevo algoritmo y/o Hep2C: se reporta como Enterovirus no polio (ETVNP).

Interpretación de resultados

Los resultados se interpretan con base en el Diagrama de flujo del Nuevo Algoritmo para el Aislamiento del poliovirus en células RD y L20B mostrado en el diagrama 1. Diagrama de flujo del Nuevo Algoritmo para el Aislamiento del poliovirus en células RD y L20B.



- ^a Observar por un mínimo de 5 días.
- ^b Observar hasta obtener un ECP > 3+ (normalmente 1-2 días, 5 días como máximo; re-inocular cuando se observe toxicidad o contaminación).
- ^c Tiempo total de observación mínimo de 10 días (2 x 5 días).
- ^d Mezcla de tubos positivos (si los dos tubos de muestra presentan ECP > 3+ en el mismo día) antes del pase final de RD.
- ^e Los aislamientos pueden ser serotipificados por los laboratorios que estén interesados en el diagnóstico de EVNP o para confirmar la prueba de proeficiencia.

Diagrama 1. Diagrama de flujo del Nuevo Algoritmo para el Aislamiento del poliovirus en células RD y L20B

Valores de alerta críticos

Las muestras positivas del Nuevo Algoritmo en RD (R+L+R+ y L+R+) son remitidas a la RT-PCR en Tiempo Real para la Diferenciación Intratípica (ITD) y la prueba de Virus Derivado de Vacuna Polio (VDVP). Si se confirma positivo a NSL 1, 2 o 3, SL 2 o SL Discordante (1,2 o 3) el aislamiento en RD se envía al CDC en FTA CARDS para confirmación (mediante secuenciación) del resultado, ya que la evidencia de Virus Salvaje o Derivados de Vacuna Oral de Polio es de muy alto impacto epidemiológico.

2. Prueba de PCR en tiempo Real

Propósito

Contribuir al diagnóstico de Parálisis Flácida Aguda y casos de cuadros compatibles a poliomielitis causada por Poliovirus, utilizando el método molecular de Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (rRT-PCR) así como realizar la confirmación y caracterización de casos positivos en aislamientos celulares (L20B). De esta manera apoyar a la Iniciativa Mundial de la Erradicación de la Poliomielitis y a la vigilancia epidemiológica en México de la no circulación de Poliovirus salvaje y virus derivado de vacuna como integrante de la Red Internacional de Laboratorios de la Américas OPS/OMS.

Principio del Método

El método de rRT-PCR es un ensayo indirecto que permite monitorear la acumulación del producto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), mientras se lleva a cabo la reacción, analizando ciclo a ciclo los cambios en la señal de fluorescencia generados durante las tres fases de PCR (geométrica, linear, plateau).

Esta metodología aumenta la sensibilidad en los diagnósticos de Poliovirus derivados de vacuna (VDPV) disminuyendo el límite máximo de los valores de detección (Ct values) y aumentando la fluorescencia global. Este método está establecido por los Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

Materiales

Guantes de nitrilo.

Microplacas de 96 pozos de 0.1 mL, libres de RNAsas y DNAsas.

Microtubos (8 tubos en tira) de 0.1 mL, libres de RNAsas y DNAsas.

Tira de 8 tapas, libres de RNAsas y DNAsas para usarse en placas y tubos.

Gasas.

Puntas con filtro, estériles para pipeta automática de varios volúmenes, 0.5 a 3.0 µL, 1 a 10µL, 20 a 200 µL y 100 a 1000 µL.

Gradillas para microtubos.

Labtop Cooler.

Gradillas para microplacas.

Contenedor para desechar puntas.

Marcadores indelebles punto fino.

Batas desechables.

Carrusel para Micropipetas.

Reactivos y materiales biológicos

Reactivos

Estuche vigente de rRT-PCR para el diagnóstico de la diferenciación intratípica (ITD) proporcionado por el CDC.

Estuche vigente de rRT-PCR para la búsqueda del poliovirus derivado de vacuna (VDVP) proporcionado por el CDC.

Enzima Quanta Biosciences qScript XLT One-Step RT-qPCR ToughMix.

Etanol 70%.

RNasa Away.

Nota: Almacenar de acuerdo a las indicaciones del reactivo.

Material Biológico

RNA extraído y purificado.

Equipo.

Cabinas para PCR.

Cabina de bioseguridad clase II, tipo A2.

Microcentrífugas.

Refrigerador-Congelador

Termociclador Applied Biosystems (Software Versión 2.0.5) ABI 7500 Fast .

Agitador vortex

Micropipetas de 0.1 a 3, 0.5 a 10, 10 a 100, 20 a 200 y de 100 a 1000µL

Procedimiento.

Para rRT-PCR de ITD

Para realizar esta metodología es indispensable contar con áreas separadas, para evitar contaminaciones con el material genético de Poliovirus, controles positivos o con DNA genómico.

Limpia perfectamente la cabina de PCR específica para este uso, utilizando etanol al 70% o RNasa Away.

Registra el número de muestras a trabajar en el formato correspondiente antes de proceder a iniciar el método.

Descongela a temperatura ambiente los reactivos para ITD y centrifuga a 8000 rpm/30 segundos.

Prepara la mezcla de reacción como se indica en el formato correspondiente.

Se adiciona a cada pozo 19µL de la mezcla de reacción de acuerdo al formato correspondiente.

Tapa la placa con una cubierta de papel aluminio y traslada al área de templados manteniendo la red fría (0-4°C).

Antes de colocar las muestras de RNA, agita en vortex y centrifuga a 8000 rpm por 30 segundos.

Adiciona 1 µL de muestra de RNA a cada pozo de acuerdo a la plantilla correspondiente.

Tapa la placa con una cubierta de papel aluminio y traslada al área de controles positivos manteniendo la red fría (0-4°C).

Adiciona 1µL de los controles positivos correspondientes para cada serotipo (el control positivo de Sabin se utiliza para para Cuádruplex EV + Sabin y Pan PV).

Tapa la placa con las tiras de 8 tapas y mantenla en refrigeración hasta el momento de colocarla en el termociclador.

Registra los datos de las muestras en el programa del Termociclador ABI 7500. (Las muestras deben ser colocadas de acuerdo al formato correspondiente).
Nota: Selecciona adecuadamente los fluoróforos correspondientes para el ensayo.

Selecciona el programa ITD/VDPV.

Verifica los ciclos y temperaturas de corrimiento.

Coloca la placa en el termociclador e inicia la corrida.

Terminada la corrida interpreta los resultados, comparando los gráficos de las muestras, contra el gráfico del control de reactivos y control positivo. Registra los resultados en el formato correspondiente.

Las muestras con resultados positivos a Sabin se procesan por rRT-PCR VDPV.

Para rRT-PCR de VDPV

Trabajar de acuerdo a los puntos a al c del procedimiento para rRT-PCR de ITD

Descongelar a temperatura ambiente los reactivos para VDPV.

Centrifugar a 8000 rpm/30 segundos.

Preparar la mezcla de reacción como se indica en el formato correspondiente.

Adicionar a cada pozo 19 µL de la mezcla de reacción de acuerdo al formato correspondiente.

Tapar la placa con una cubierta de papel aluminio. Trasladar al área de templados manteniendo la red fría (0-4°C)

Antes de colocar las muestras de RNA, agitar en vórtex y centrifugar a 8000 rpm por 30 segundos.

Adicionar 1 µL de muestra de RNA a cada pozo, de acuerdo a la plantilla correspondiente.

Tapar la placa con una cubierta de papel aluminio. Trasladar al área de controles positivos manteniendo la red fría (0-4°C).

Adicionar 1 µL de los controles positivos (PV1 o PV3), correspondiente para cada prueba.

Tapar la placa con las tiras de 8 tapas.

Introducir los datos de las muestras al programa del Termociclador ABI 7500 y seleccionar el programa ITD/VDPV.

Nota: Seleccionar adecuadamente los fluoróforos correspondientes para el ensayo.

Verificar ciclos y temperaturas.

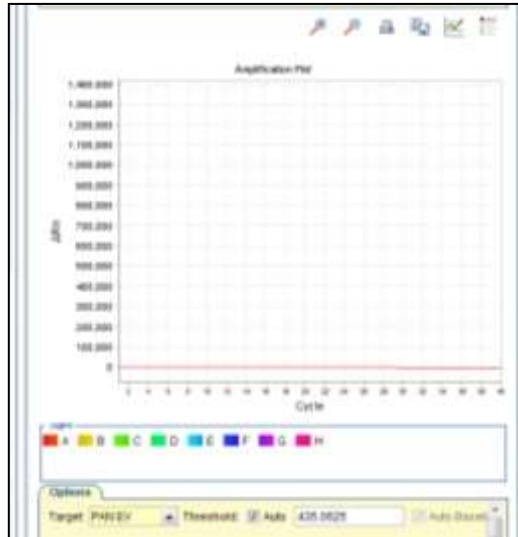
Colocar la placa en el termociclador e iniciar la corrida.

Terminada la corrida interpretar los resultados, comparando los gráficos de las muestras, contra el gráfico del control de reactivos y control positivo. Registrar los resultados en el formato correspondiente.

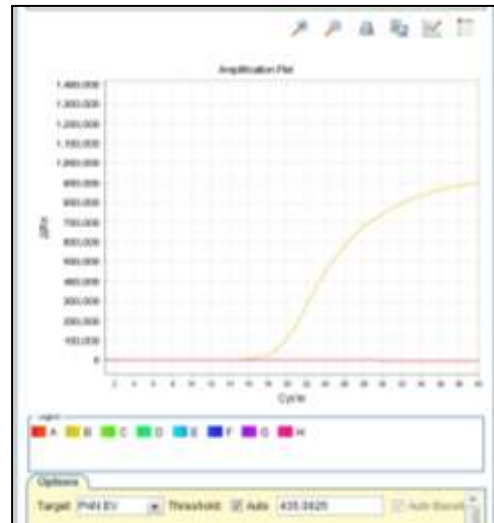
2.7 Interpretación por el laboratorio

Intervalo reportable

Los siguientes gráficos muestran la presencia o ausencia de DNA



NEGATIVO



POSITIVO

Presencia de DNA es considerado positivo (+).

Ausencia de DNA es considerado negativo (-).

Muestras con fluorescencia plana o perfil anormal deben repetirse desde la extracción de RNA.

Interpretación de resultados

Interpretación para rRT-PCR de ITD.

Pan EV	Pan PV	Sabin 1	Sabin 2	Sabin3	WPV1	AFR WPV3	SOAS WPV3	PV Tipo 2	RESULTADO ITD	COMENTARIOS	S1 VDPV PV1	S3 VDPV PV3	RESULTADO FINAL	COMENTARIOS
-	-	-	-	-	-	-	-	-	NEV	Reportar	NA	NA	NEV	Reportar
+	-	-	-	-	-	-	-	-	EVNP	Reportar	NA	NA	EVNP	Reportar
+	+	+	-	-	-	-	-	-	SL1	Realizar VDPV1	+	-	SL1	Reportar
+	+	-	-	+	-	-	-	-	SL3	Realizar VDPV3	-	+	SL3	Reportar
+	+	-	-	-	-	-	-	-	Indeterminado	Reportar y Referir a Secuencia	NA	NA	Indeterminado	Reportar y Referir a Secuencia
+	+	+	-	-	-	-	-	-	SL1	Realizar VDPV 1	NSL1	NA	SL1 discordante	Reportar y Referir a Secuencia
+	+	-	-	+	-	-	-	-	SL3	Realizar VDPV 3	NA	NSL3	SL3 discordante	Reportar y Referir a Secuencia
+	+	-	+	-	-	-	-	+	PV2	Reportar y Referir a secuencia	NA	NA	PV2	Reportar y Referir a Secuencia
+	+	-	-	-	-	-	-	+	PV2	Reportar y Referir a secuencia	NA	NA	PV2	Reportar y Referir a Secuencia
+	+	-	-	-	+	-	-	-	NSL1	Reportar y Referir a secuencia	NA	NA	NSL1	Reportar y Referir a Secuencia
+	+	-	-	-	-	+	+	-	NSL3	Reportar y Referir a secuencia	NA	NA	NSL3	Reportar y Referir a Secuencia
+	+	-	-	-	-	-	+	-	NSL3	Reportar y Referir a secuencia	NA	NA	NSL3	Reportar y Referir a Secuencia
+	+	-	-	-	-	+	-	-	NSL3	Reportar y Referir a secuencia	NA	NA	NSL3	Reportar y Referir a Secuencia

Interpretación para rRT-PCR de VDPV.

VP1	RESULTADOS
Positivo	SL (reportar)
Negativo	NSL (reportar y referir a secuenciación)

Valores de alerta Crítico.

Si se observan los siguientes resultados, las muestras se enviarán inmediatamente al CDC de Atlanta para su secuenciación.

Pan EV	Pan PV	Sabin 1	Sabin 2	Sabin 3	WPV1	AFR WPV3	SOAS WPV3	PV Tipo 2	Resultado ITD	Comentarios
+	+	-	+	-	-	-	-	+	PV2	Referir a secuenciación
+	+	-	-	-	-	-	-	+	PV2	Referir a secuenciación
+	+	-	-	-	+	-	-	-	NSL1	Referir a secuenciación
+	+	-	-	-	-	+	-	-	NSL3	Referir a secuenciación
+	+	-	-	-	-	-	+	+	NSL3	Referir a secuenciación
+	+	-	-	-	-	-	-	-	Indeterminado	Referir a secuenciación

3. Determinación de anticuerpos séricos neutralizantes contra Poliovirus por microneutralización

La realización de esta técnica es responsabilidad del Laboratorio de Seroencuestas perteneciente al Departamento de Virología del InDRE, la información obtenida de esta metodología puede ser de utilidad para los siguientes casos:

- Evidenciar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra los tres serotipos de Poliovirus tipo Sabin (PV) en el individuo en estudio.
- Evidenciar seroconversión en individuos expuestos a Poliovirus.
- Conocer el estado inmunológico de una población en particular.
- Inmunogenicidad de vacunas

La muestra necesaria para llevar a cabo el análisis por el laboratorio se deberá de coleccionar como a continuación se detalla:

- **Muestra de suero:** Este tipo de muestra se procesará solo a la solicitud del usuario solicitante. Independientemente del proceso normativo de vigilancia epidemiológica establecido en el Manual de Vigilancia epidemiológica de las Enfermedades Prevenibles por Vacunación. El procedimiento para la toma de muestra sanguínea está descrito en la OMS/SIGN: Carpeta de material sobre seguridad de las inyecciones y los procedimientos conexos. Organización Mundial de la Salud (apartado 3),

2011; así como en las directrices de la OMS sobre la extracción de sangre: las mejores prácticas en la flebotomía (WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy. Organización Mundial de la Salud, 2010). La sangre total se obtendrá en tubos sin anticoagulante y se sugiere recuperar 2.5 mL de suero el cual deberá ser almacenado en red fría (de 2 a 8 °C) desde su obtención y hasta ser enviado al Laboratorio de Seroencuestas del InDRE

El envío de las muestra de suero se realizara mediante el sistema básico de triple embalaje asegurando la red fría durante el traslado de 2 a 8 °C tal como lo establece el presente lineamiento.

Las muestras deberán venir acompañada con el Formato Único de Envío de Muestras Biológicas del InDRE y el formato generado de plataforma del SiNaVE con toda la información solicitada. Los formatos enviados no deberán poseer datos alterados o sobrescritos, y si es el caso, es conveniente que se indique la gravedad del paciente.

Los criterios de aceptación de muestras de suero son los siguientes:

- La toma de la primera muestra de suero se realizará dentro de los primeros 7 días siguientes al inicio de la parálisis.
- La toma de la segunda toma de muestra de suero se realizará después de 28 días de haber iniciado con los signos de parálisis
- Muestras en red fría de acuerdo a la temperatura establecida anteriormente.
- Muestras acompañadas con la documentación debidamente requisitada.

Los criterios de rechazo de muestras biológicas son:

- Muestras de suero lipémicas (esta condición queda exenta por motivos de condición médica y debe ser aclarada en el formato de envío de muestras y en la plataforma SiNaVE).
- Muestras contaminadas.
- Muestras de suero hemolizadas.
- Muestras de suero con volumen insuficiente (esta condición queda exenta en los casos de recién nacidos o que por condición del paciente no se pueda cumplir con este criterio y debe ser aclarada en el formato de envío de muestras y en la plataforma SiNaVE).
- Muestras con datos incorrectos o por falta de ellos.
- Muestras con incumplimiento a la red fría.
- Muestras de contactos fuera de criterios de envío (defunción ó emergencia de salud pública)

Fundamento de la técnica

La técnica consiste en realizar diluciones seriadas del suero en una placa de 96 pozos de poliestireno, inmediatamente se le adiciona una suspensión viral a una concentración de 100 DICC₅₀ y se incuban por 3 horas, para que se lleve la reacción antígeno-anticuerpo, después de transcurrir este tiempo se adiciona una suspensión celular de la línea HEp- 2 y finalmente se incuban por 5 días.

Los anticuerpos anti-poliovirus presentes en las muestras de suero se unen a sitios antigénicos de las proteínas de superficie del virus de tal manera que “bloquean” la infección del virus a células susceptibles. Para poner de manifiesto la presencia o ausencia de anticuerpos, las placas se fijan y se tiñen con una solución de cristal violeta. El título de anticuerpos se considera como el inverso de la última dilución en la cual se mantenga la monocapa celular y se puede expresar como logaritmo, unidades internacionales o recíprocas del factor de dilución.

Interpretación de resultados:

Negativo: No existe presencia de anticuerpos neutralizantes contra el serotipo de Poliovirus que se trate.

Positivo: Presencia de anticuerpos contra el serotipo de Poliovirus en cuestión.

- Indicador de oportunidad para la técnica de Microneutralización: Desde la recepción de muestras hasta la fecha de emisión de resultado: máximo 15 días naturales.



Siendo Referencia Nacional en Salud Pública

INDRE

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"