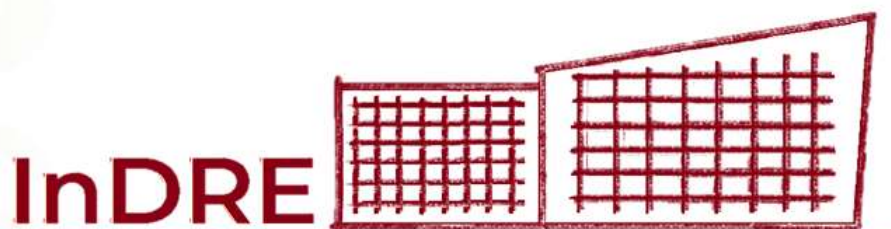
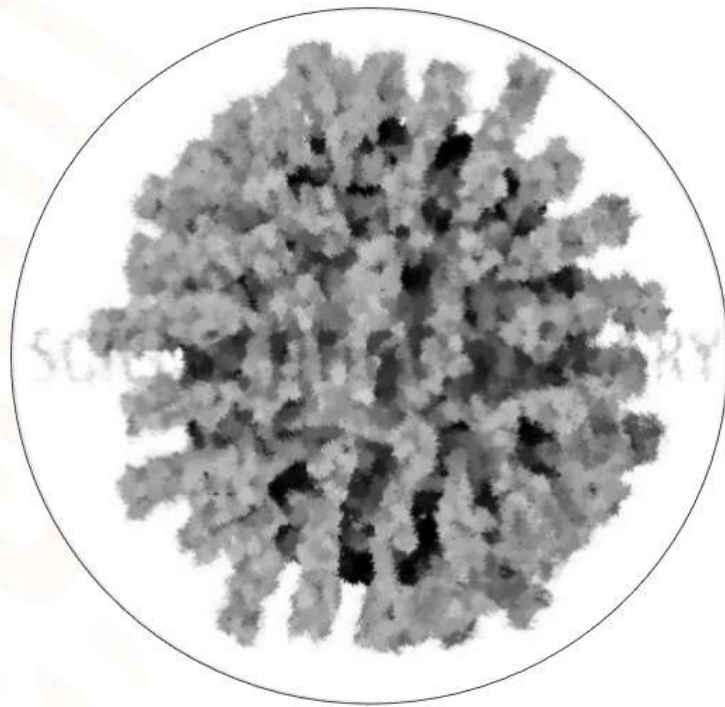




SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

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

Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Enfermedad Febril Exantemática



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

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES FEBRILES EXANTEMÁTICAS

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

2018

PRIMERA EDICIÓN. 2018

EFES-INDRE

ESTE DOCUMENTO FUE AVALADO POR LOS REPRESENTANTES DE LAS INSTITUCIONES QUE CONFORMAN EL GRUPO TÉCNICO INTERINSTITUCIONAL DEL COMITÉ NACIONAL PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (CoNAVE).

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE: "SECRETARÍA DE SALUD-INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ". LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES FEBRILES EXANTEMÁTICAS, INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2018"

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

ISBN: EN PROCESO

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"
FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, DEL. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480,
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 DR. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA AL CORREO juan.roman@salud.gob.mx Y CON EDITH CRUZ RAMÍREZ A edith.cruz@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. EDITH CRUZ RAMÍREZ

JEFA DEL LABORATORIO DE ENFERMEDADES FEBRILES EXANTEMÁTICAS

COORDINADORA DE LA RED NACIONAL DE DIAGNÓSTICO DE SALUD PÚBLICA PARA LA
VIGILANCIA DE LAS ENFERMEDADES FEBRILES EXANTEMÁTICAS

M EN C. JOSÉ ABEL PUENTE SILVA

QFB. ARMANDO CARRERA TERRAZAS

BIOL. JUAN ROBERTO PONCE LAUREL

QFB. GERARDO ANDRÉS TAPIA FLORES

QFB. ANDRÉS CHRISTIAN HERNÁNDEZ GARCÍA

M EN S.P. KATHIA ELIA LANDÍN MARTÍNEZ

AUX. LAB. MARIA GRISELDA DELGADO ARCOS

AUX LAB. LAURA MONROY GARCÍA

TEC. LAB. MINELI URQUIZA ACOSTA

GRADECIMIENTOS

SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD

CENTROS PARA EL CONTROL Y LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES (CDC) ATLANTA, GA.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	12
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	12
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de las Enfermedades Febriles Exantemáticas	13
3. MARCO LEGAL	16
4. DEFINICIONES OPERACIONALES	19
Definiciones operacionales de caso de Sarampión / rubéola y SRC	19
5. OBJETIVOS	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos	21
6. RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE EFE	21
7. FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RNLSP-EFE	23
Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública	23
Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia	25
8. TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA	26
Toma de Muestra	27
Suero.....	27
Exudado faríngeo	27
Conservación	28
Envío y transporte de la muestra	28
Criterios de aceptación y rechazo de muestras	29
9. ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO	30
10. ESTÁNDARES DE CALIDAD DE LA PRUEBA	35
11. PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO (PEED)	37
12. CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RNLSP-EFE	39
13. BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE	40
14. BIBLIOGRAFIA	41
Anexo I: Bioseguridad	44

Anexo II: Técnica de Diagnóstico
Anexo III: Imágenes

46
82

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades febriles exantemáticas (EFES) son un grupo de padecimientos que comparten signos y síntomas en común. Estas agrupan la vigilancia del Sarampión, Rubéola, Exantema Súbito, Escarlatina, Erisipela y Mononucleosis Infecciosa entre otras. La vigilancia sindromática de estas enfermedades bajo la denominación de Enfermedad Febril Exantemática (EFE) garantiza la oportuna detección, notificación, estudio de caso y determinación por laboratorio de estos padecimientos; principalmente el Sarampión y la Rubéola, que forman parte de la lista de enfermedades sujetas a vigilancia epidemiológica en México.

El sarampión es una enfermedad causada por el virus del sarampión perteneciente a la familia Paramixoviridae del género Morbillivirus, con genoma RNA monocatenario. Es sumamente contagioso y presenta un porcentaje de ataque secundario superior al 90% en personas susceptibles. Los síntomas de inicio son fiebre, tos, secreción nasal y conjuntivitis, presenta manchas de Koplik (manchas rojas con halo blanco detrás de los molares) y el exantema maculo pápular que inicia en cabeza, se extiende a tronco y extremidades. Puede ser grave en niños y causar neumonía, encefalitis y muerte. La transmisión ocurre por la propagación de microgotas o contacto directo con secreciones nasales o faríngeas a través del aire cuando una persona infectada tose o estornuda.

La rubéola es una enfermedad contagiosa causada por un virus con RNA en su genoma perteneciente a la familia Togaviridae del género Rubivirus. En niños pequeños suele ser leve con síntomas que pueden incluir fiebre baja, dolor de garganta y un exantema maculopapular que comienza en la cara y se extiende al resto del cuerpo. En los niños más grandes y adultos es más probable que se presente con dolor de cabeza, conjuntivitis y malestar general antes de la aparición del exantema. En algunos casos la enfermedad llega a ser asintomática. La complicación más grave de la infección de rubéola es el daño que puede causar al producto de la concepción en las mujeres embarazadas que no se han vacunado. Entre las complicaciones reportadas están el aborto espontáneo (pérdida del producto de la concepción en las primeras 23 semanas de gestación) o presentar graves defectos de nacimiento como problemas cardíacos, pérdidas de la audición o visión, discapacidad intelectual y daños en el hígado, el bazo o muerte del recién nacido poco después de nacer.

Los defectos de nacimiento graves son más frecuentes si la mujer contrae la infección en el primer trimestre (las primeras 12 semanas) del embarazo, con una probabilidad de 1 en 5 de presentar problemas con el embarazo.

El sarampión y la rubéola son enfermedades que impactan en la salud pública por las consecuencias graves que presentan en la población mundial.

América se convirtió en la primera región del mundo en ser declarada libre de rubéola y sarampión en 2015 y 2016 respectivamente por un Comité Internacional de Expertos (CIE), sin embargo, la globalización tiene como consecuencia que los países estén en un riesgo permanente de importación y reintroducción del virus en los siguientes años.

En la 29ª Conferencia Sanitaria Panamericana de la Salud (CSP) llevada a cabo en septiembre de 2017, los ministros de Salud de los países de la Región de América aprobaron "*La Estrategia y Plan de acción para la Sostenibilidad de la Eliminación del sarampión, rubéola y síndrome de rubéola congénita (SRC)*" para el periodo 2018-2023. El documento tiene como finalidad evitar el restablecimiento de la transmisión endémica del virus de sarampión y la rubéola en cualquiera de los países de la Región de América.

En México durante 1989 y 1990 se documentó la última epidemia de sarampión, registrando 89,163 casos. Esto provocó la intensificación de las acciones de prevención con la aplicación de vacuna monovalente anti-sarampión y del control de la enfermedad, lo que permitió la disminución de la morbilidad y mortalidad, logrando la eliminación de la transmisión autóctona en 1996.

En 2001 se identificaron 2 casos. En el año 2003 se presentó una nueva reintroducción del virus con 44 casos, identificando el genotipo H1. En 2004 se reportaron 64 casos de Sarampión genotipo H1 que circulaba en Japón, Corea y China. En 2005, 6 casos, 1 con el genotipo D9 y 5 con el genotipo B3, este se identificó durante el 2006, año en que se reportaron 23 casos, dicho genotipo estaba circulando en Venezuela y el estado de Nueva York en EUA.

En 2011 se presentaron tres casos importados en los que se identificó el genotipo D4 y en 2013 dos casos en turistas que visitaron Quintana Roo, México. Para 2014 se reportaron otros 3 casos, dos de los cuales fueron reportados en Quintana Roo, mismos en los que no se pudo determinar elevación en los títulos de IgG, por lo que fue necesario enviarlos a los Centros para el control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés), que reportaron positividad en prueba de avidéz confirmándolos y

clasificándose como importados. El otro caso corresponde a una paciente que viajó a un parque de diversiones en Anaheim California. En enero de 2015 se presentó un caso y el genotipo determinado fue D9.

Con respecto a rubéola; en México se llegaron a identificar un promedio de 41,000 casos anuales. A raíz de la introducción y doble aplicación de la vacuna triple viral (sarampión, rubéola y parotiditis) en 1997 la curva descendió rápidamente. En el periodo de 1990 a 1999 se notificaron 68 defunciones y para el periodo de 2000 a 2004 solo se reportaron 10 defunciones, ocurriendo el último deceso en 2004.

De 1993 a 2007 se identificaron 352,048 casos, 46 en 2008, 7 en 2009 y 5 en 2010. En el 2012 se identificaron 2 casos con el genotipo 2B. El último caso importado de rubéola se identificó en 2017 y no fue posible determinar el genotipo.

En este periodo de sostenibilidad de la eliminación de sarampión y rubéola la función permanente y primordial del Laboratorio de Enfermedades Febriles Exantemáticas (LEFE) del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR), es promover y mantener la vigilancia por laboratorio de los casos probables de Sarampión y Rubéola identificados por el SiNaVE, mediante la aplicación de algoritmos que utilicen pruebas de laboratorio que permitan la confirmación de casos con determinación molecular.

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 que genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas.

La RNLSP depende de la Secretaría de Salud, 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.

El Marco Analítico Básico de la RNLSP consta de 27 algoritmos, siendo el diagnóstico de las Enfermedades Febriles Exantemáticas uno de ellos.

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de las Enfermedades Febriles Exantemáticas

El Laboratorio de Enfermedades Virales se constituyó en 1972 dentro del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET), como resultado de un programa organizado por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para el desarrollo de Laboratorios en América Latina. En 1973 quedó estructurado con los siguientes laboratorios: virus exantemáticos, enterovirus, virus teratogénicos, hepatitis A y B, respiratorios y *Rickettsia* spp. Fue hasta 1983 que se transformó en Departamento de Diagnóstico de Enfermedades Virales y en 1991 dentro del Departamento de Virología se habilitó el Laboratorio de Enfermedades Febriles Exantemáticas.

A partir de 1992, México pertenece a la red de laboratorios para el diagnóstico de sarampión y rubéola donde el órgano rector es la Organización Panamericana de la Salud (OPS). En diciembre de ese año se estructuró la “Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico Etiológico de Enfermedad Febril Exantemática” (RNLEFE) en el InDRE con la finalidad de promover el diagnóstico etiológico de los cuadros de enfermedad febril exantemática principalmente sarampión y rubéola, así como para apoyar los programas de control epidemiológico de las mismas, particularmente el Programa de Eliminación del Sarampión en México.

Inicialmente, se integraron a la red 7 laboratorios periféricos (Estatales) en los estados de Guerrero, Jalisco, México, Nuevo León, Sonora, Veracruz, Yucatán y el Laboratorio de Enfermedades Febriles Exantemáticas (EFES) del InDRE como laboratorio de referencia ubicado en el Departamento de Virología Diagnóstica del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos y la Subdirección de Apoyo a la Red Nacional de Laboratorios.

De 1993 a 1998 se realizaron actividades de capacitación al personal operativo de diferentes disciplinas en los laboratorios restantes con la finalidad de que se incorporaran a la red de laboratorios.

En la Dirección General de Epidemiología (DGE) el laboratorio de EFES del InDRE es rector en vigilancia por laboratorio y responsable de forma conjunta con la Dirección General Adjunta de Epidemiología (DGAE) para la vigilancia epidemiológica del Sarampión y la Rubéola, en el ámbito federal.

En el 2002 la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) se incorporó al Programa Caminando a la Excelencia, cuya finalidad es evaluar el desempeño analítico de los estados en relación a los programas prioritarios de salud. A partir del 2006 se preparan y envían los paneles de eficiencia a los laboratorios estatales para medir el indicador “evaluación del desempeño” para el diagnóstico de EFES, desde entonces esta actividad se realiza cada año.

En el año 2007 en el InDRE se realizó el taller sobre técnicas para el aislamiento y detección del virus de Sarampión y Rubéola a nivel internacional en colaboración con los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) y La Organización Panamericana de la Salud (OPS).

A partir de 2008 se implementó el Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED) dos veces por año mediante la ejecución de un panel serológico. El LNR efectúa la evaluación a aquellos laboratorios que tienen implementado el diagnóstico serológico de Sarampión y Rubéola para ratificar el desempeño técnico de los mismos mediante el PEED.

Durante 2009 se retomaron los cursos de actualización para el diagnóstico de Sarampión y Rubéola con la finalidad de apoyar el proyecto Plan de eliminación de Sarampión, Rubéola y Rubéola Congénita de 2010 en Latinoamérica. En el transcurso de 2010 se integró a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia de la Enfermedad Febril

Exantemática el último laboratorio estatal, para quedar conformada por 31 LESP y un LNR.

En el curso de actualización para la red de laboratorios que se impartió en 2011, se capacitó a los asistentes en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real para sarampión, con la finalidad que cada laboratorio estatal lo implementara como parte de la metodología de diagnóstico en sus respectivos laboratorios. A lo largo del brote de sarampión que afectó a nuestro país en el año 2011, en la RNLSP se realizaron diversas actividades de diagnóstico para dar respuesta inmediata a los requerimientos del momento.

En 2012 el LNR fue la sede del Taller sobre identificación y genotipificación de los virus de sarampión y rubéola por técnicas de RT-PCR en tiempo real y secuenciación, contando con la participación de diez países de América Latina. El objetivo de este taller fue revisar el estatus de la eliminación del sarampión y la rubéola en Latinoamérica. Este evento fue auspiciado y coordinado por la OPS, el CDC de Atlanta, Estados Unidos y el InDRE.

En este mismo año se incorporó a la RNLSP-EFE el Laboratorio Central de Epidemiología (LCE) del IMSS como Laboratorio de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE) y el LNR se certificó en la técnica de sarampión-rubéola por ELISA otorgado por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (IMNC).

En diciembre del 2013 se realizó el cambio a las nuevas instalaciones del InDRE mientras la RNLSP-EFE apoyó manteniendo las actividades de vigilancia, regularizando las actividades del LNR en de abril de 2014. En ese mismo año se implementó el envío del panel molecular de Sarampión a la RNLSP como parte de la evaluación del desempeño y en el mes de diciembre se transfirió la técnica de RT-PCR de tiempo real para Rubéola por medio del curso anual.

En 2015 se envió a la RNLSP dos paneles (serológico-molecular) para la evaluación del desempeño y en el curso anual se transfirió la técnica de IgG para Sarampión y Rubéola por ELISA. Se liberó el diagnóstico serológico a 9 LESP debido a que demostraron desempeño satisfactorio en el panel de evaluación ($\geq 90\%$) y el cumplimiento de indicador de oportunidad de resultado ($\geq 80\%$).

Durante el 2016 el LNR obtuvo acreditación en la técnica de RT-PCR en tiempo real para sarampión y rubéola por el IMNC. También se supervisó a la RNLSP para evaluar la competencia técnica en el diagnóstico de sarampión y rubéola por la técnica de ELISA además del diagnóstico para sarampión por la técnica de RT-PCR en tiempo real. A finales del mismo año se dio inicio al funcionamiento de la “Plataforma de EFE”, en la cual todos los casos probables de sarampión y rubéola son capturados por el área de epidemiología y los resultados de laboratorio por la RNLSP y el LNR con la finalidad de compartirla con la OPS/OMS para la elaboración del “Boletín de Inmunización” publicado por la Unidad de Inmunización Integral de la Familia de la OPS y la Oficina Regional para las Américas de la OMS con el objetivo de facilitar el cambio de ideas e información acerca de los programas de inmunización de la Región.

En el 2017 se liberó el diagnóstico serológico de 19 LESP y se inició con la incorporación de muestras para RT-PCR en tiempo real para rubéola dentro del Panel de Evaluación Externa del Desempeño que se envía a la RNLSP. El Laboratorio Nacional de Referencia recibió la visita de OPS y CDC y como resultado la OPS otorgo el aval de “acreditado para la realización de pruebas de IgM e IgG, detección viral y secuenciación de sarampión y rubéola”. En este mismo año el LNR se re-acreditó en la técnica de RT-PCR en tiempo real para sarampión y rubéola.

En el 2018 el LNR se acreditó en la técnica de ELISA para determinación de anticuerpos IgM e IgG para sarampión y rubéola. Al interior de la RNLSP, 22 LESP incorporaron la técnica de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de rubéola dentro de su marco analítico básico.

MARCO LEGAL

Constitución Política 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-034-SSA2-2013, Para la prevención y control de los defectos al nacimiento.
- Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2012, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, faboterápicos (sueros) e inmunoglobulinas en el humano.
- 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-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. D.O.F. 26/10/2012.
- 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.
- PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-031-SSA2-2014, Para la atención a la salud de la infancia. D.O.F. 25/11/2015

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

- Dirección General de Epidemiología. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Prevenibles por Vacunación. DGAE. México: Secretaría de Salud. Vigente
- 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". Lineamientos para la toma, manejo y envío de muestras para diagnóstico a la red nacional de laboratorios de salud pública, InDRE. México: Secretaría de Salud; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2017
- Secretaría de Salud, Manual metodológico Caminando a la Excelencia. México 2015.

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

Para la detección oportuna de casos de sarampión /rubéola se hace necesario apegarse a las definiciones operacionales establecidas en el *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Prevenibles por Vacunación* (DGE. México: Secretaría de Salud; 2018).

Definiciones operacionales de caso de Sarampión / rubéola y SRC

- **Caso probable sarampión/rubéola:** Toda persona de cualquier edad que presente cuadro caracterizado por fiebre, exantema maculopapular, y uno o más de los siguientes signos y síntomas: tos, coriza, conjuntivitis o adenomegalias (retroauriculares, occipitales o cervicales).
- **Caso probable de Síndrome de Rubéola Congénita:** Lactante menor que presente una o más de las siguientes alteraciones, defectos o malformaciones:
 - Auditivas:** hipoacusia neurosensorial;
 - Patología ocular congénita:** catarata congénita, nistagmus, estrabismo, microftalmia, glaucoma congénito, retinopatía pigmentaria;
 - Enfermedad cardíaca congénita:** persistencia del conducto arterioso, estenosis de la arteria pulmonar, Tetralogía de Fallot, estenosis aórtica, comunicación interventricular, comunicación interauricular.
 - Hematopoyética:** púrpura trombocitopénica;
 - Neurológicas:** microcefalia, retraso en el desarrollo psicomotor
- **Caso Confirmado de sarampión/rubéola:** Todo caso probable en el que se demuestre infección reciente del virus de sarampión/rubéola mediante técnicas de laboratorio con reconocimiento por el InDRE, o caso probable que no cuente con muestra o resultado de laboratorio, y que esté asociado epidemiológicamente a otro caso confirmado por laboratorio.
- **Caso confirmado de Síndrome de Rubéola Congénita:** Todo caso probable en el que se demuestre infección por rubéola mediante técnicas de laboratorio reconocidas por el InDRE, o caso probable que

no cuente con muestra o resultado de laboratorio y que mediante criterios clínicos-epidemiológicos sea confirmado por un comité de expertos independiente

- **Caso descartado de sarampión/rubéola:** Caso probable en el que se descarte infección reciente a virus del sarampión/rubéola mediante pruebas de laboratorio, o caso probable en el que no se obtuvieron muestras de laboratorio, pero cuenta con evidencias clínicas y epidemiológicas suficientes para establecer un diagnóstico alternativo por un comité de expertos independiente.
- **Caso descartado de Síndrome de Rubéola Congénita:** Caso probable en que se descarte infección por rubéola mediante técnicas de laboratorio, o caso probable que no cuente con muestra o resultado de laboratorio y que mediante criterios clínicos-epidemiológicos sea descartado por un comité de expertos independiente.

La identificación de un caso probable de sarampión/rubéola es el detonante para la realización de las acciones de prevención y control correspondientes.

Clasificación de casos

- **Caso endémico de sarampión/rubéola :** Todo caso confirmado de sarampión/rubéola que forma parte de una cadena de transmisión local, que se ha mantenido por más de doce meses por un mismo genotipo
- **Caso importado de sarampión/rubéola:** Caso confirmado que según evidencias epidemiológicas y virológicas presentó la exposición al virus fuera del país en los 7 a 21 días previos al inicio del exantema para sarampión y 7 a 23 para rubéola.
- **Caso importado de Síndrome de Rubéola Congénita:** Es el caso confirmado con evidencias epidemiológicas y virológicas, de que la madre presentó exposición al virus de la rubéola fuera del país en los 23 días previos al inicio de la concepción y hasta la semana 20 de gestación.
- **Caso relacionado a importación de sarampión/rubéola:** Caso confirmado que forma parte de una cadena de transmisión local, originado por un caso importado, lo que está sustentado en evidencias epidemiológicas o virológicas o ambas, o se trata de un caso confirmado donde no se identifica nexo epidemiológico con un caso importado, pero el genotipo viral involucrado ha sido identificado en otra área con transmisión fuera del país.

- **Caso descartado con resultado positivo a sarampión/rubéola relacionado a la vacuna:** Caso probable con antecedente de aplicación de vacuna SRP o SR dentro de los 30 días previos a la fecha del inicio del exantema.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer y dar a conocer a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia de la Enfermedad Febril Exantemática, los procedimientos de diagnóstico, control de calidad y referencia que garanticen un resultado oportuno y confiable que permitan la confirmación de casos de Sarampión, Rubéola y Síndrome de Rubéola Congénita en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

Objetivos Específicos

- Ser el documento guía para el soporte técnico-científico de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la EFE para la identificación del virus del Sarampión y Rubéola en México y la caracterización genómica de los virus identificados.
- Garantizar la calidad del diagnóstico serológico de la EFE, específicamente sarampión y rubéola.

Ámbito de aplicación

El presente documento aplica a todos los laboratorios que forman parte de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Enfermedad Febril Exantemática.

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE EFE

El Laboratorio de EFES del InDRE como LNR a nivel federal, es responsable de la coordinación de la RNLSP-EFE, siendo el órgano rector de la Red para el diagnóstico, control de calidad, referencia, capacitación, actualización y evaluación de la competencia técnica. Actualmente se apoya a la Red de Laboratorios con el envío de muestras caracterizadas para el

diagnóstico molecular de sarampión y rubéola lo que fortalece la Vigilancia Epidemiológica por laboratorio. El LNR interacciona con los LESP, y éstos a su vez, son los enlaces funcionales con el nivel federal. (Figura 1.)

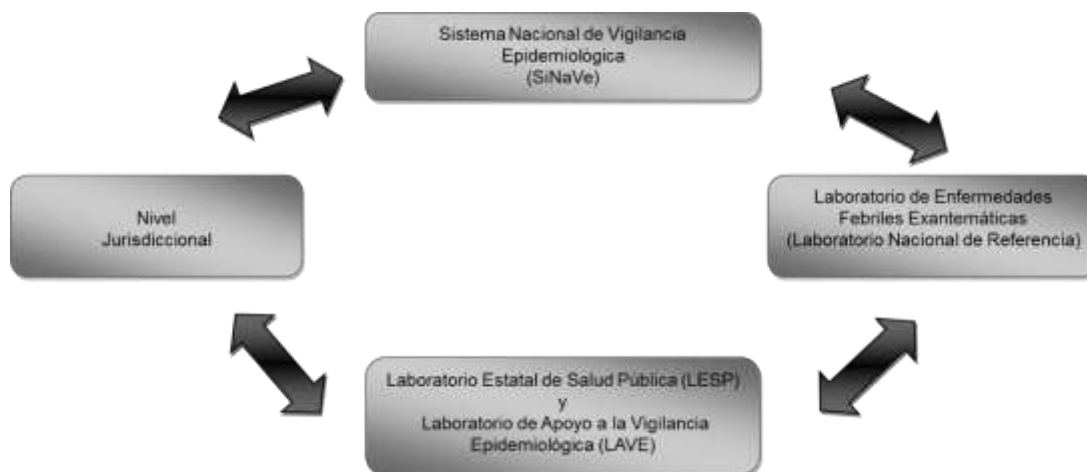


Figura 1. Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la EFE

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la EFE está constituida por:

- El Laboratorio de EFES como LNR, integrado al Departamento de Virología del InDRE.
- Los 31 Laboratorios Estatales de Salud Pública
- Laboratorio Central de Epidemiología (LCE) del IMSS como LAVE

En la RNLSP-EFE están liberados 25 Laboratorios Estatales de Salud Pública en el diagnóstico de EFE por ELISA para la determinación de anticuerpos IgM para sarampión y rubéola. Cada uno cumplió con una evaluación del desempeño satisfactorio en 5 paneles previos y con el indicador de oportunidad de resultado $\geq 80\%$ en la plataforma de EFE. 29 LESP tienen implementado el diagnóstico de sarampión y 22 el diagnóstico de rubéola por la técnica de RT-PCR en tiempo real. Figura 2.

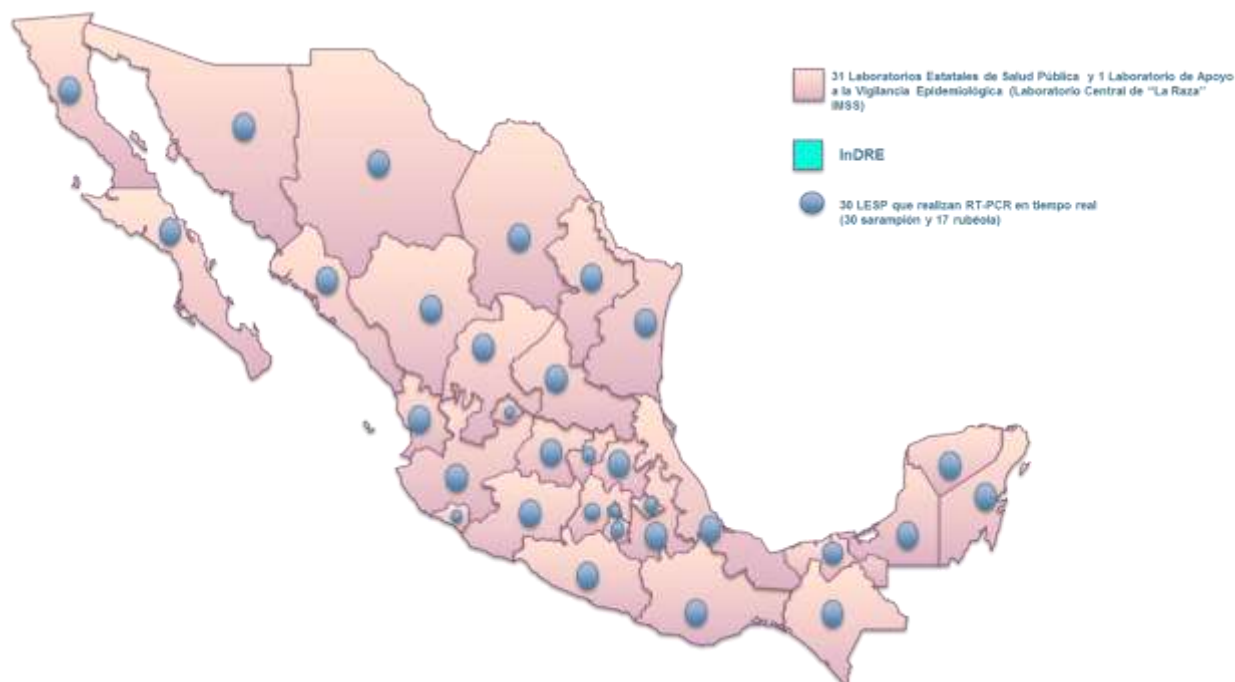


Figura 2. Distribución de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para el diagnóstico de la enfermedad febril exantemática.

FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RNLSP-EFE

Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública

- Realizar el diagnóstico serológico de sarampión, rubéola y rubéola congénita mediante la determinación de anticuerpos IgM por ELISA
- Realizar el diagnóstico molecular por la técnica de RT-PCR en tiempo real para sarampión y rubéola en muestras de exudado faríngeo.
- Enviar al InDRE las muestras positivas e indeterminadas a sarampión y rubéola según sea el caso, durante los dos días posteriores a la obtención de resultado y de manera mensual las muestras negativas
- Enviar al InDRE como control de calidad el 2% de muestras negativas y el 100% de muestras positivas a anticuerpos IgM de sarampión y rubéola que correspondan a los LESP no liberados.

- Enviar al InDRE el 2% de muestras negativas y el 100% de muestras positivas de exudados faríngeos para el control de calidad por la técnica de RT-PCR en tiempo real para sarampión y rubéola que correspondan a los LESP no liberados, enviar dichas muestras en hielo seco o con suficientes congelantes, anexando los valores de Ct, así como los gráficos.
- Emitir los resultados del diagnóstico serológico y molecular de sarampión y rubéola en un periodo de 4 días naturales a partir de la fecha de recepción en el LESP
- Capturar en plataforma los resultados del diagnóstico serológico y molecular de sarampión y rubéola dentro de las primeras 48 horas posteriores a la emisión de resultados. Es responsabilidad del LESP informar al área de Epidemiología que las muestras las deben enviar con el número de folio de la plataforma de EFE.
- Realizar el diagnóstico serológico de sarampión, rubéola y rubéola congénita mediante la determinación de anticuerpos IgG por ELISA.
- Procesar un panel serológico y molecular para el diagnóstico de sarampión y rubéola al año como parte de la evaluación del desempeño del LESP.
- Realizar el diagnóstico diferencial para arbovirus (Dengue, Chikungunya y Zika) a las muestras de suero positivas e indeterminadas a sarampión y rubéola.
- Enviar al InDRE todas las muestras positivas e indeterminadas para IgM de sarampión y rubéola como referencia que correspondan a los LESP liberados.
- Enviar al InDRE todas las muestras positivas para sarampión y rubéola por la técnica de RT-PCR en tiempo real como referencia que correspondan a los LESP liberados.
- Notificar a Epidemiología Estatal todos los casos positivos por ELISA y RT-PCR en tiempo real para sarampión y rubéola
- Capacitar de forma continua al personal del LESP y realizar la inducción al puesto del personal nuevo en el diagnóstico de sarampión y rubéola, generando evidencia.
- Realizar réplicas al personal del Laboratorio de todas las capacitaciones tomadas por el LESP en el InDRE, generando evidencia.
- Supervisar la documentación, equipos y reactivos de acuerdo a los manuales, métodos e instructivos que aseguren la calidad de los procesos.
- Difundir de forma anual al área de epidemiología la toma de muestra para el diagnóstico de sarampión y rubéola.

- Realizar durante un año el resguardo de las muestras procesadas.
- Recibir las supervisiones del LNR e implementar las acciones de mejora.
- Enviar una base de datos con la información de las muestras procesadas para rubéola congénita de manera mensual, formato ubicado en los anexos
- Enviar una base de datos de manera semanal con los resultados procesados por RT-PCR de rubéola hasta que se modifique la plataforma de EFE para que estos se puedan capturar. Formato ubicado en los anexos

Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia

El Laboratorio de EFES del InDRE es el Laboratorio Nacional de Referencia, es el órgano normativo para el diagnóstico de la EFE en México y tiene las siguientes funciones:

- Coordinar las actividades de la RNLSP-EFE.
- Establecer la normatividad referente a las técnicas de diagnóstico de la EFE en México.
- Realizar la determinación de anticuerpos IgM anti-sarampión y anti-rubéola en muestras recibidas de los LESP o Institutos de Salud para diagnóstico, control de calidad y referencia.
- Realizar la determinación de anticuerpos IgG anti-sarampión y antirubéola en muestras indeterminadas o positivas a IgM de sarampión o rubéola y en muestras con diagnóstico de rubéola congénita.
- Realizar la técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección de sarampión y rubéola en muestras de exudado faríngeo recibidas por los LESP para diagnóstico, control de calidad y referencia.
- Realizar la determinación de avidez en anticuerpos IgG para sarampión o rubéola en muestras únicas con un resultado positivo a IgM de sarampión o rubéola según sea el caso. Se considera muestra única cuando no fue posible obtener la muestra de exudado faríngeo o una segunda muestra de suero por parte del área de vigilancia epidemiológica.
- Realizar el diagnóstico serológico diferencial para Epstein Barr, Parvovirus B-19, parotiditis y varicela, y otros virus exantemáticos.
- Reportar resultados serológicos y moleculares de sarampión y rubéola en un lapso no mayor a 4 días naturales a partir de la recepción de la muestra.

- Realizar la captura de resultados de las muestras recibidas para diagnóstico, control de calidad y referencia en la plataforma de EFE.
- Monitorear el desempeño técnico de los laboratorios integrantes de la Red de EFES que realizan el diagnóstico serológico y molecular de sarampión y rubéola mediante la supervisión directa, el envío de paneles de evaluación serológico y molecular y el control de calidad.
- Actualizar a los LESP por medio de capacitaciones para el diagnóstico serológico y molecular para sarampión y rubéola.
- Supervisar la oportunidad de la captura de resultados en la plataforma de EFE. Realizar el diagnóstico de muestras de otros LESP o Institutos de Salud que no puedan llevarlo a cabo de manera permanente transitoria. Lo anterior bajo solicitud a la Dirección de Diagnóstico y Referencia del InDRE. Si cuenta con la liberación diagnóstica y envía muestras para diagnóstico este se cobrará.
- Proporcionar a los LESP muestras caracterizadas positivas para la realización de la técnica de RT-PCR en tiempo real para sarampión y rubéola.
- Participar en la evaluación internacional del desempeño para diagnóstico serológico y molecular de sarampión y rubéola mediante el procesamiento de paneles enviado por los organismos internacionales como OPS y CDC.
- Determinar algoritmos de diagnóstico y referencia que permitan generar resultados confiables para la toma de decisiones.
- Participar en las capacitaciones internacionales del diagnóstico serológico y molecular de sarampión y rubéola impartidas por los Centros Colaboradores de OPS.
- Analizar la información generada por la RNL y por el LNR.
- Realiza verificaciones de los métodos serológicos y moleculares para el diagnóstico de sarampión y rubéola.
- Revisar la información de sarampión y rubéola que se genera a nivel mundial.

TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA

Las muestras para el diagnóstico de sarampión, rubéola y Síndrome de Rubéola Congénita son suero y exudado faríngeo. Ambas muestras se deben

tomar de forma obligatoria y de manera simultánea con la finalidad de llevar a cabo la detección serológica y molecular para la confirmación de casos. Las muestras deben cumplir con la definición operacional de caso probable de sarampión/rubéola o caso probable de rubéola congénita y los días de evolución para ser recibidas en el laboratorio de procesamiento.

Precauciones universales

Todas las muestras para diagnóstico, confirmación o investigación en eventos de interés en salud pública serán consideradas potencialmente infecciosas, por lo que siempre se deben seguir las medidas de prevención de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, así como las recomendaciones del Manual de bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, 2005).

Toma de Muestra

Suero

De 0 a 35 días de evolución a partir de la fecha de inicio de exantema

Obtener 5 mL de sangre por punción venosa utilizando en un tubo de plástico de extracción al vacío sin anticoagulante con o sin gel separador. Una vez tomada la muestra rotular el tubo con el nombre del paciente, tipo de muestra y la fecha. Almacenar el tubo entre 2 y 8°C, centrifugar cuando el coágulo este retraído a 3000 rpm durante 10 minutos, separar el suero en un tubo de plástico con cierre de rosca e identificar con datos del paciente y de la muestra. El volumen de suero requerido es 1 mL,

En recién nacidos obtener 1 mL de sangre por punción venosa, el volumen solicitado de suero es de 100 a 200µL.

En caso de requerir una segunda muestra para el seguimiento del caso, esta se debe tomar 2 semanas después de la primera toma. Se debe considerar que la segunda muestra debe estar dentro de los treinta días posteriores a la aparición del exantema.

Exudado faríngeo

De 0 a 5 días de evolución a partir de la fecha inicio de exantema

La toma de muestra se obtiene frotando la pared posterior de la faringe con un hisopo estéril de dacrón o rayón a fin de desprender las células epiteliales. El hisopo se coloca en 2 mL de medio de transporte viral (MTV) estéril contenido en un tubo de plástico con cierre de rosca, rotulado con el nombre del paciente, la fecha de toma y el tipo de muestra.

Conservación

Las muestras de suero y exudado faríngeo se deben mantener de 2 a 8 °C desde el momento de la toma hasta el envío al laboratorio.

Una vez recibida la muestra de exudado faríngeo en el laboratorio se mezcla en un agitador tipo vortex, se extrae la máxima cantidad de líquido del hisopo presionándolo contra la pared del tubo. Se recomienda dividir la muestra en tres porciones y almacenar a -70°C hasta su proceso.

Envío y transporte de la muestra

- Todas las muestras se debe empacar con el sistema de triple embalaje y transportar en condiciones de refrigeración (2-8°C).
- Las muestras se deben acompañar con los siguientes documentos: Oficio de solicitud de estudio, especificando si la muestra es para diagnóstico, control de calidad o referencia. Formato único de envío o el formato impreso de la plataforma con la información completa que cumpla con los requisitos de aceptación.
- Una vez recibidas las muestras de laboratorio capturar inmediatamente la fecha de llegada al laboratorio en la plataforma.
- Las muestras enviadas para control de calidad de serología deberán estar acompañadas con los datos de la absorbancia de la muestra, interpretación, marca del estuche, número de lote, fecha de caducidad y un volumen mínimo de 500 µL.
- Las muestras enviadas para control de calidad para RT-PCR en tiempo real deberán estar acompañadas de los valores de Ct, interpretación, gráficos, el impreso de las lecturas emitidas directamente del equipo, la marca y el número de lote de la enzima utilizada con un volumen mínimo de muestra de 600 µL.
- Una vez tomadas las muestras de suero y exudado faríngeo deben llegar en 48 horas al laboratorio.
- En el envío de una segunda muestra, el oficio de solicitud debe mencionar que se trata de este tipo de muestra y en el formato debe estar registrada

la fecha de toma. La segunda muestra se solicita cuando se obtiene un resultado positivo o indeterminado a IgM de sarampión o rubéola.

- Para el diagnóstico de Síndrome de Rubéola Congénita (SRC), enviar el suero y exudado faríngeo del recién nacido y el suero de la madre.

Criterios de aceptación y rechazo de muestras

Los criterios de aceptación de muestras de exudado faríngeo y suero son:

- Cumplir con la definición operacional de caso probable de sarampión/rubéola o de Síndrome de Rubéola Congénita (SRC)
- Cumplir los días de evolución, en suero de 0 a 35 días y en exudados faríngeos de 0 a 5 días.
- Menos de 48 horas de tránsito para las muestras de suero y exudado faríngeo.
- Recibir las muestras en tubos de plástico con cierre de rosca
- Identificar las muestras con nombre del paciente legible, tipo de muestra y fecha de toma.
- Acompañar las muestras con el oficio de solicitud y formato de envío de muestra o el impreso de la plataforma de EFE con los datos del paciente, edad del paciente, datos de la institución, fecha de inicio de exantema, fecha de toma, antecedentes de viaje y fecha de vacunación, cabe aclarar que toda la información debe ser legible.
- Acompañar las muestras para el diagnóstico de SRC con el formato epidemiológico de Síndrome de Rubéola Congénita, registrando claramente el nombre del recién nacido y la fecha de toma.
- Enviar la muestra de exudado faríngeo en 2mL medio de transporte viral.
- Las muestras para control de calidad deberán estar acompañadas de los resultados con valores de absorbancia, interpretación, número de lote del reactivo, fecha de caducidad, valores de Ct, gráficos y el impreso de las lecturas emitidas directamente del equipo según sea el caso.

Los criterios de rechazo de muestras biológicas son:

- Incumplimiento de los criterios de aceptación
- Recepción de muestras derramadas.
- Recepción de muestras contaminadas
- Recepción de muestras en contenedor primario de vidrio

- Muestras sin nombre o sin clave de identificación del laboratorio de origen
- Si el contenedor está vacío.
- Muestras con volumen insuficiente excepto para casos de recién nacidos
- Recepción de muestras con solicitud para diagnósticos cerrados.
- Recepción de muestras sin oficio de solicitud o sin formato de envío de muestras, formato EFE-1 o formato de plataforma.
- Recepción de muestras que no coincida el nombre del paciente, clave de la muestra o tipo de muestra con el oficio de recepción.
- Recepción de formatos de envío o formato de plataforma sin fecha de toma, sin fecha de inicio de exantema para muestras de sarampión y rubéola.

Muestras de alto valor

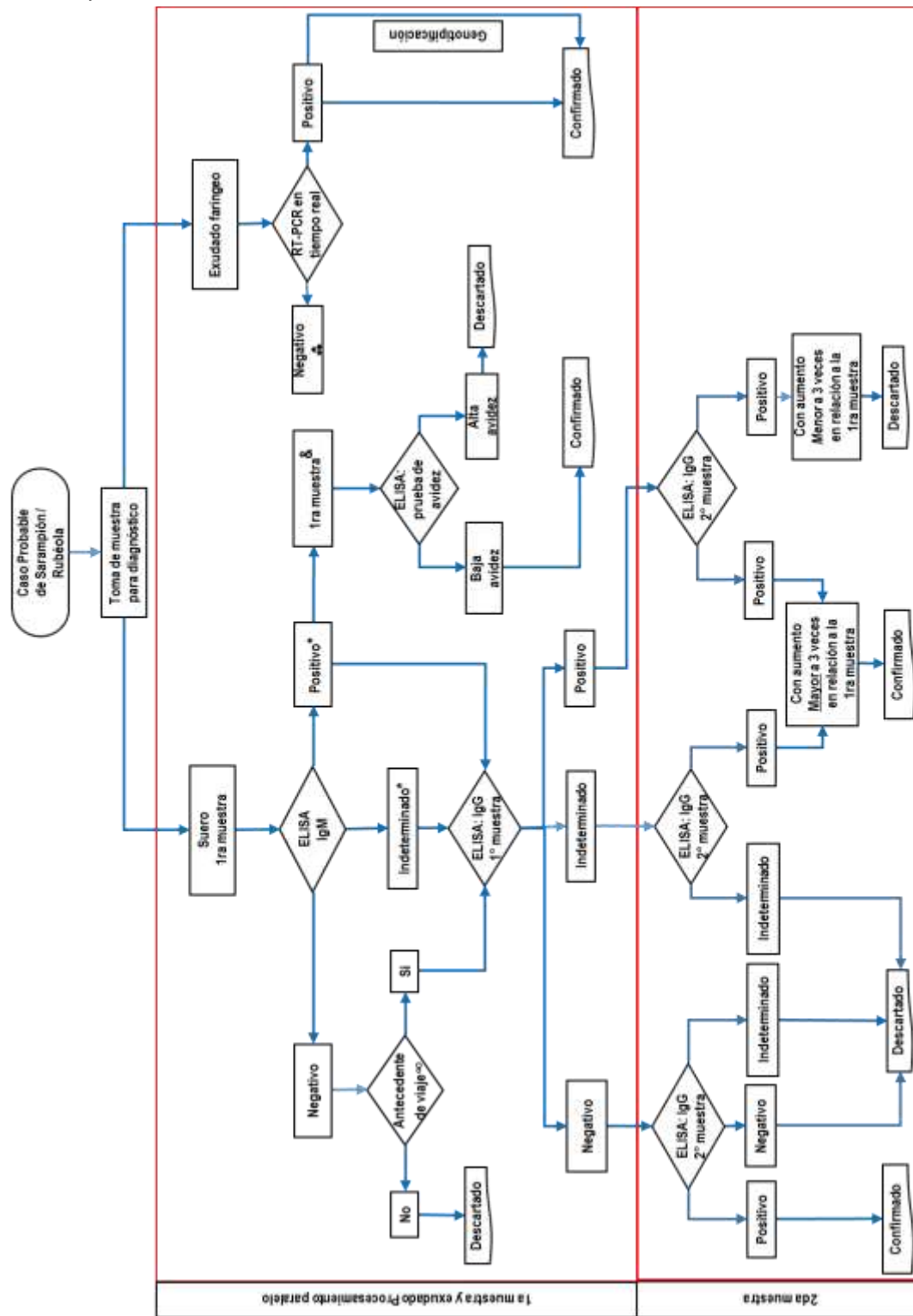
Es aquella que se recibe en el laboratorio y que no cumple con alguno de los criterios de aceptación pero que por las características de evolución del paciente (alta, mejoría o defunción), se considera una muestra de alto valor epidemiológico. Cuando el laboratorio opta por procesar la muestra de alto valor se debe asegurar que en el informe de resultados se indique la naturaleza del problema y se especifique que se requiere precaución cuando se interprete el resultado. El proceso de estas muestras se especificará en el apartado de observaciones.

ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

En el contexto de la sostenibilidad de la eliminación de sarampión, rubéola y rubéola congénita es fundamental reforzar el diagnóstico de laboratorio modificando el algoritmo de la Red de Laboratorios.

Las muestras de suero y exudado faríngeo se procesan de manera paralela, estas deben cumplir con la definición de caso probable de sarampión/rubéola o SRC, además de los días de evolución especificados en el apartado de toma, manejo y envío de muestra. Todos los sueros se analizan por medio de la técnica de ELISA para sarampión/rubéola, mientras que todos los exudados faríngeos son analizados por la metodología de RT-PCR en tiempo real para los dos diagnósticos.

A continuación, se establece el algoritmo de Laboratorio para el diagnóstico de sarampión y rubéola (se encuentran adicionalmente en el Anexo III)



*Diagnóstico diferencial paralelo, & Muestra única de suero, ∞ o contacto con extranjeros que provienen de países con evidencia de circulación del virus, & evaluar

Figura 3. Algoritmo de Laboratorio para diagnóstico de Sarampión y Rubéola

Los LESP realizarán el diagnóstico serológico por las técnicas de ELISA para anticuerpos IgM e IgG para sarampión y rubéola además del diagnóstico molecular por la técnica de RT-PCR en tiempo real para ambos diagnósticos. El InDRE es el responsable de realizar la determinación de anticuerpos IgG por la técnica de Avidex y de la genotipificación. En esta etapa de post-eliminación si una muestra tiene un resultado negativo a los anticuerpos IgM para sarampión o rubéola y el paciente cuenta con antecedente de viaje a países con evidencia o antecedente de circulación del virus o contacto con un extranjero que provenga de alguno de estos países se deberá solicitar segunda muestra para comparación de anticuerpos IgG.

En muestras con un resultado positivo a IgM a sarampión o rubéola es necesario e indispensable solicitar una segunda muestra para la comparación de anticuerpos IgG entre ambas muestras.

Para el diagnóstico del SRC el algoritmo se dividen en dos: un Algoritmo para el diagnóstico de Rubéola Congénita de 0 a 6 meses (figura 4) y Algoritmo para diagnóstico de Síndrome de Rubéola Congénita de 6 a 12 meses (figura5)

Para el diagnóstico de Síndrome de Rubéola Congénita es indispensable la toma de muestra de suero y de exudado faríngeo. Para el diagnóstico de 0 a 6 meses se realizará la determinación de anticuerpos IgM y el RT-PCR en tiempo real. En caso de que exista una alta sospecha se deberá realizar una segunda toma de ambas muestras.

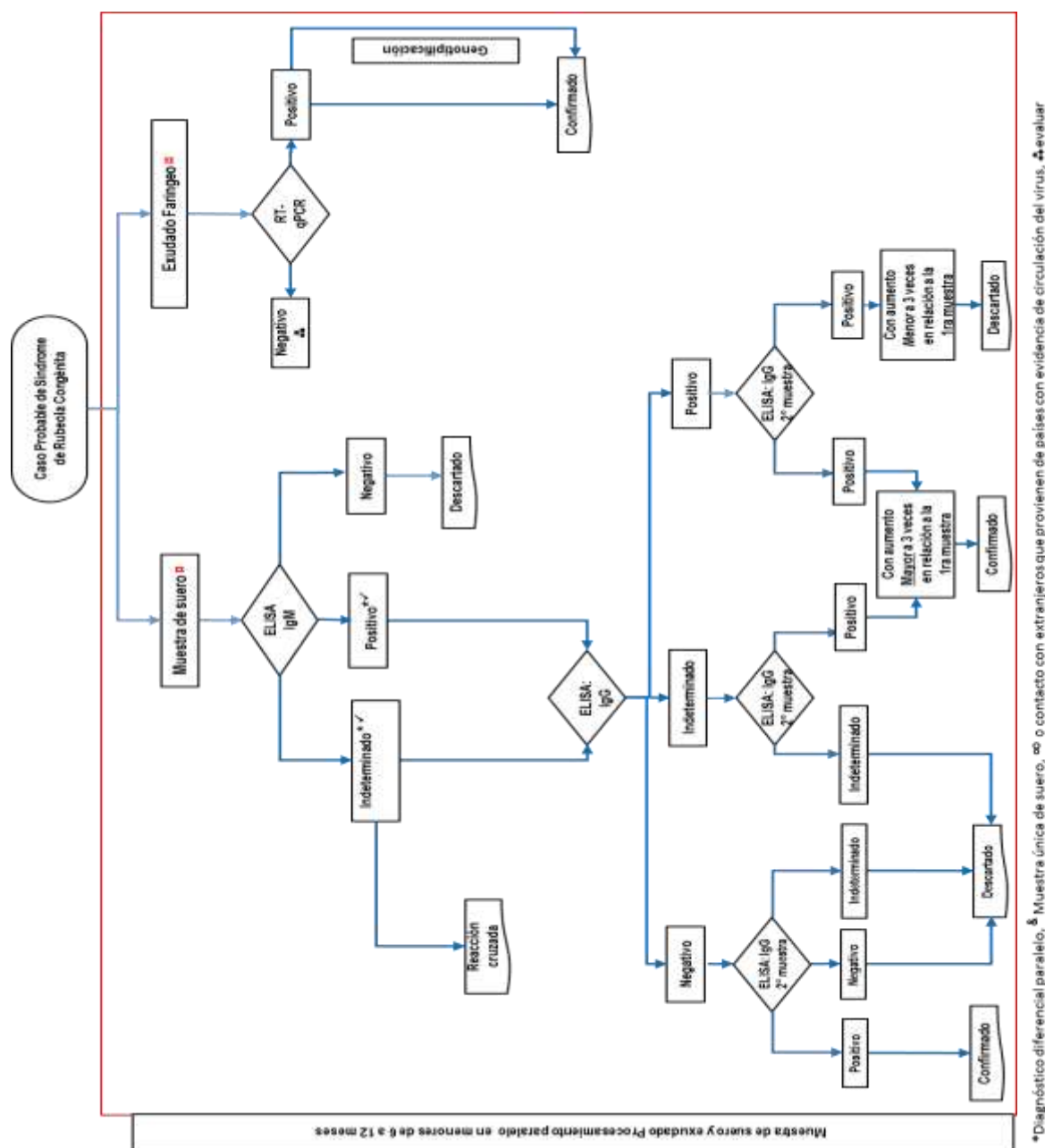


Figura 5. Algoritmo para diagnóstico de Síndrome de Rubéola Congénita de 6 a 12 meses

Para el diagnóstico de 6 a 12 meses, en caso de un resultado IgM positivo o indeterminado es recomendable la toma de una segunda muestra para la comparación de anticuerpos IgG, en niños más pequeños no es factible la comparación de estos anticuerpos ya que estos provienen de la madre.

Enviar al InDRE para referencia o control de calidad las muestras de suero con un resultado positivo o indeterminado a sarampión o rubéola, **también** los LESP deberán procesar el total de dichas muestras para el diagnóstico diferencial de dengue, chikungunya y zika. Se debe seguir el algoritmo vigente en los *Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio del dengue y otras arbovirosis* y en caso de tener un resultado positivo, este se debe notificar al InDRE y al área de vigilancia epidemiológica para su registro en el sistema de vigilancia de enfermedades transmitidas por vector.

Para el caso de los LESP liberados deberán enviar todas las muestras positivas e indeterminadas por serología al InDRE para ser analizadas como Referencia. Para los LESP no liberados, estos deberán enviar al InDRE el 2% de las muestras negativas por serología y 100 % de las positivas para ser analizadas para el Control de Calidad. Las muestras indeterminadas y positivas a sarampión o rubéola se envían de forma inmediata y las negativas de forma mensual.

En el caso de contar con un resultado positivo serológico relacionado a vacuna no es necesaria la toma de una segunda muestra. (Revisar la clasificación de caso descartado con resultado positivo a sarampión/rubéola relacionado a la vacuna).

Para los LESP no liberados deberán enviar al InDRE el 2% de las muestras negativas y 100 % de las positivas por la metodología de RT-PCR en tiempo real para sarampión y rubéola como Control de Calidad. Los LESP liberados deberán enviar al InDRE todas las muestras positivas por la técnica de RT-PCR en tiempo real para sarampión y rubéola como referencia.

Todas las muestras positivas se envían según sea el caso de forma inmediata y las negativas de forma mensual.

ESTÁNDARES DE CALIDAD DE LA PRUEBA

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.

Para cumplir con los estándares de calidad en la RNLSP-EFE es indispensable apegarse a los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica, implementar y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad en apego a los requisitos de las normas ISO (International Organization for Standardization) 9001:2015 Sistemas de Gestión de la Calidad e ISO 15189:2013 Requisitos de la calidad y competencia.

Además, alinearse a los requisitos establecidos en el Manual Caminando a la Excelencia, los criterios de liberación de pruebas diagnósticas y cumplir con los indicadores de calidad en el servicio diagnóstico establecidos para la RNLSP-EFE

Fase pre-analítica: Estos indicadores (Oportunidad en la toma, el envío y porcentaje de rechazo) comprenden actividades propias del área de vigilancia epidemiológica que inciden en la calidad de la muestra.

- **Oportunidad en la Toma:**
 - La muestra de suero se toma de 0 a 35 días a partir del inicio de exantema y
 - La muestra de exudado faríngeo se toma del día 0 al día 5 a partir del inicio de exantema. Ambas muestras se deben tomar en el primer contacto con el paciente.
- **Oportunidad en el envío:** se deben enviar al laboratorio las muestras de suero y exudado faríngeo de manera inmediata, para ser recibidas en un tiempo menor a 48 horas.
- **Porcentaje de rechazo:** La proporción de rechazos permitida es del 0%. Cuando se registre un rechazo, el laboratorio debe comunicar al área de vigilancia epidemiológica las oportunidades de mejora con la finalidad de que realicen las acciones conducentes.

Fase analítica: este indicador (estándar del servicio) compete a la RNLSP e incide en la obtención de un resultado confiable y oportuno.

- **Estándar del Servicio:** Aplica desde la recepción de la muestra en el laboratorio hasta la obtención del resultado y es de 4 días naturales.

Fase post-analítica: (emisión del resultado) compete a la RNLSP e inciden en el registro oportuno de un resultado en el sistema de vigilancia epidemiológica (plataforma SiNaVE) y la entrega a las partes interesadas.

- **Emisión del resultado:** Una vez obtenido el resultado, es obligatorio el registro en la plataforma en menos de 48 horas.
En caso de enviar muestras al InDRE para control de calidad o referencia es necesario revisar que en plataforma estén capturadas las fechas de toma, fecha de recepción en el LESP y fecha de envío al InDRE.
Cuando las muestras para control de calidad o referencia sean reiteradamente discordantes, será meritoria una capacitación en servicio en el InDRE.

PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO (PEED)

Los laboratorios integrantes de la RNLSP-EFE deben participar en el Programa de Evaluación Externa de Desempeño (PEED) organizado por el LNR.

- **Objetivo:** Evaluar el desempeño diagnóstico de los laboratorios de la red e identificar a aquellos con áreas de oportunidad por fallas técnicas u operativas para la mejora continua.

Los laboratorios reciben anualmente un panel de evaluación conformado por muestras para ser analizadas mediante la técnica de ELISA y RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de sarampión y rubéola, además de un cuestionario.

Actividades para los laboratorios integrantes RNLSP-EFE:

- Recepción de notificación oficial vía electrónica por medio de la Coordinación Nacional de la Red de Laboratorios con la información relacionada de los componentes del panel, fecha de envío de los resultados al LNR, fecha de envío de la notificación oficial del informe y resultados del panel a la red de laboratorios por parte del LNR. Se adjuntan los formatos para envío de resultados y cuestionario.
- Recepción de muestras para el panel serológico, para el panel molecular de sarampión y para el panel molecular de rubéola.

- Envío de resultados al LNR en el tiempo establecido en la notificación oficial enviada por la CNRL.

Actividades para el LNR:

- El LNR enviará a la RNLSP la notificación oficial vía electrónica por medio de la CNRL en dicha notificación se explica la composición del panel, la evaluación, fecha de envío de los resultados, fecha de envío del informe y resultados a la RNL, formatos de reporte y cuestionario.
- A la par de la notificación oficial se envía el panel serológico, el panel molecular para sarampión y el panel molecular para rubéola.
- Recepción de resultados del panel en la fecha estipulada en el documento oficial enviado por la CRNL.
- Envío del informe y del oficio con el resultado de la concordancia más la evaluación del cuestionario será enviado en la fecha estipulada.
- El resultado requerido en el Panel de Evaluación del Desempeño es igual o mayor del 90%.

Criterios de evaluación:

Con base a los resultados obtenidos en el cuestionario y en la concordancia de los paneles se clasifica el desempeño de la siguiente manera:

- Satisfactorio: 90 -100%
- No Satisfactorio: 80-89%
- No aceptable < 80%

Los laboratorios que obtuvieron un resultado Sobresaliente realizarán las siguientes actividades:

Continuar con el diagnóstico y están obligados a capturar los resultados de sus muestras procesadas en la plataforma de EFE durante las primeras 48 horas después de obtenidos los resultados.

Los laboratorios que obtuvieron un resultado No Satisfactorio procederán de la siguiente manera:

Requerirán comprar un panel, el costo del panel de evaluación se establecerá de acuerdo al tabulador vigente. Cabe mencionar que la calificación del mismo no será considerada en el Boletín Caminando a la Excelencia, el objetivo de este panel es verificar el desempeño técnico. El panel deberá ser solicitado dentro de los primeros 10 días después de haber recibido el resultado del panel por vía electrónica. La notificación oficial del resultado se envía por medio de la CRNL. Se solicitan medidas correctivas al proceso y su cumplimiento en máximo 2 meses mediante supervisión.

Los laboratorios que obtuvieron un resultado No aceptable procederán de la siguiente manera:

Se suspenderá el diagnóstico, se solicitará una capacitación en servicio, este es un requisito para reanudar el diagnóstico y se deberá solicitar un nuevo panel de evaluación con costo. Cabe mencionar que la calificación del mismo no será considerada en el Boletín Caminando a la Excelencia, el objetivo de este panel es verificar el desempeño técnico.

Si algún laboratorio de la RNLSP-EFE no puede realizar el panel y emitir los resultados en el tiempo estipulado, obtendrán CERO de calificación, esta afectará directamente al Boletín Caminando a la Excelencia y de no contar con calificación aceptable en el siguiente panel, esto traería como consecuencia el retiro de los diagnósticos liberados.

CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RNLSP-EFE

La liberación de cada laboratorio de la RNLSP-EFE representa la autonomía diagnóstica, es decir, la autorización de la metodología para realizar el diagnóstico. Esta se basará en el cumplimiento de los siguientes criterios:

- Demostrar un desempeño sobresaliente $\geq 90\%$ en 5 paneles de evaluación anteriores a la liberación.
- Reporte oportuno de resultados (4 días a partir de que se recibe la muestra en el laboratorio) en la plataforma de EFE.

- Envío del 100% de muestras positivas o indeterminadas para referencia
- Demostrar con evidencia que se cuenta con los insumos necesarios para la realización del diagnóstico
- Obtener ≥ 90 de concordancia en las muestras para control de calidad

Estos criterios aplican para la liberación del diagnóstico serológico y el diagnóstico molecular. Si cumple con los criterios antes mencionados, se emitirá al LESP o LAVE, el oficio de liberación de la metodología correspondiente. El InDRE tiene la atribución de suspender la realización del diagnóstico o solicitar una capacitación en sitio a los LESP o LAVE en cuanto se detecte alguna desviación en el proceso, esta se notificará mediante un oficio al LESP correspondiente. Para continuar con la liberación deberán de cumplir con los primeros cuatro puntos anteriores.

BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE

El material biológico se resguarda con la finalidad de contar con muestras para realizar los paneles de evaluación, vigilancia de genotipos, evaluación de reactivos y obtención de controles de referencia.

Almacenamiento de muestras positivas a sarampión y rubéola

Las muestras de suero y exudado faríngeo **positivas** a sarampión y rubéola se almacenan en criotubos de 2.0 mL perfectamente identificadas, se colocan en cajas de polipropileno para 100 crioviales. Estas se rotulan con el tipo de diagnóstico, el rango de numeración de muestras contenidas, el año en que se almacena y el número consecutivo de caja. Los sueros se resguardan en congeladores de -30°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) y los exudados faríngeos en ultracongeladores de -70°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$), son almacenadas por tiempo indefinido. Es indispensable mantener un inventario del material biológico almacenado.

Almacenamiento de muestras negativas e indeterminadas a sarampión y rubéola

Las muestras de suero negativas o indeterminadas así como los exudados faríngeos **negativos** a sarampión y rubéola se almacenan en criotubos de 2.0 mL perfectamente identificadas, se colocan en cajas de polipropileno para 100 crioviales. Estas se rotulan con el tipo de diagnóstico, el rango de numeración de muestras contenidas, el año en que se almacena y el número consecutivo de caja. Los sueros se resguardan en congeladores de -30°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$)

y los exudados faríngeos en ultracongeladores de -70°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$), se almacenan durante un año. Es indispensable mantener un inventario del material biológico almacenado.

Se recomienda que los LESP realicen un almacenamiento de muestras de suero y exudado faríngeo de forma semejante con la finalidad de tener un resguardo por si requieren realizar un nuevo envío debido a algún incidente en el mismo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bellini W.J. y Rota P.A. Genetic diversity of wild-type measles viruses: Implications for global measles elimination programs. *Emerging Inf. Dis.*, 1998, 4:29-35.
2. Bosma TJ, Corbett KM, O'Shea S, Banatvala JE, Best JM. PCR for Detection of Rubella Virus RNA in Clinical Samples. *J Clin. Microbiol*, 1995, 33:5, 1075-1079.
3. Bosma TJ, Corbett KM, Eckstein MB, O'Shea S, Vijayalakshmi P, Banatvala JE, Morton K, Best JM. Use of PCR for prenatal and postnatal diagnosis of congenital rubella, *J Clin Microbiol*, 1995, 33(11):2881-2887.
4. Centers for Disease Control and Prevention: Measles. U.S.A. 2014 November 3. Disponible en: <https://www.cdc.gov/measles/lab-tools/index.html>
5. Centers for Disease Control and Prevention: Rubella. U.S.A; 2016 March 31. Disponible en: <https://www.cdc.gov/rubella/lab/index.html>
6. Chomezynski P and N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987; 162(1):156-9
7. Organización Panamericana de la Salud OMS. Actualización Epidemiológica. Presentado en: Taller Subregional: Respuesta a Brotes de Sarampión en la Era Post-Eliminación. San Salvador, El Salvador. 2017. p 1-8.
8. Organización Panamericana de Salud. Eliminación de la rubéola y del síndrome de rubéola congénita. Guía práctica. Washington. 2005.
9. Organización Mundial de la Salud. Manual para el diagnóstico de Laboratorio para los virus del sarampión y la rubéola. 2da. Ed, 2006.

10. Organización Panamericana de la Salud OMS. Plan de Acción para la Sostenibilidad de la Eliminación del Sarampión, Rubéola y el Síndrome de Rubéola Congénita. Presentado en: 69.^a Sesión del Comité Regional de la OMS para las Américas. Washington, D.C. U.S.A. 2017. p 1-15.
11. Organización Panamericana de la Salud. Sarampión, Rubéola y SRC Rubella Watch. Washington. 2009.
12. Riddell M. A., Chibo D, Kelly H, Catton M. G, y Birch C.J., Investigation of Optimal Specimen Type and Sampling Time for Detection of Measles Virus RNA during a Measles Epidemic. J Clin Microbiol. 2001 Jan;39 (1):375-6.
13. Revello MG, Baldanti F, Sarasini A, Zavattoni M, Torsellini M y Gerna G, Prenatal Diagnosis of Rubella Virus Infection by detection and Semiquantitation of Viral RNA in Clinical Samples by Reverse Transcription-PCR, J Clin Microbiol, 1997, 35(3): 708-713.
14. Reef S. MD, Reed S, Aberhathy E. MS, Icenogle J Ph.D. Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases. Centers for Disease Control and Prevention. 6ta. ed. 2013.
15. Rota JS, Hickman C, Sower SB, Rota P, Mercader S. Bellini W. Two Case Studies of Modified Measles in Vaccinated Physicians Exposed to Primary Measles Cases. Centers for Disease Control and Prevention; The Journal of Infectious Diseases. 2011; 204: S559-S563.
16. Rota P.A, KHAN A.S, Durigon E, Yuran T, Villamarzo Y.S. y Bellini W.J., Detection of measles virus: RNA in urine specimens from vaccine recipients; J. Clin. Microbiol, 1995, 33: 2485-2488.
17. Rota P.A., Liffick S.L., Rota J.S., Katz R. R., Redd S., Papania M. y Bellini W.J.M, Molecular Epidemiology of Measles Viruses in the United States, 1997-2001, Emerg Infect Dis. 2002 Sep;8(9):902-8.
18. Shyamala G, Malathi J, Moses Y.S., Therese KL y Madhavan HN, Nested reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of rubella virus in clinical specimens, Indian J Med Res, 2007, 125: 73-78.
19. Tipples G, Hamkar R, Mohktari T. Evaluation of Rubella IgM Enzyme Immunoassay. J. Clin. Virol. 2004. 30(3):233-238.
20. Tipples G, Hamkar R, Mohktari T. Assessment of Immunoglobulin M Enzyme Immunoassay for Diagnosis of Measles. J. Clin. Microbiol. 2003. 41(10):4790-4792.
21. Tzeng W-P, Zhou Y, Icenogle J, y Frey TK, Novel Replication-Based Reporter Gene Assay for Detection of Rubella Virus in Clinical Specimens, J Clin Microbiol, 2005, 43: 2, 879-885.

22. Zhang D, Nikkari S, Vainionpää R, Luukkainen R, yli-Kerttula U y Toivanen P, Detection of Rubella, Mumps and Measles Virus Genomic RNA in Cells from Synovial fluid and Peripheral Blood in Early Rheumatoid Arthritis. J Rheumatol., 1997, 24(7), 1260-1265.

ANEXOS

Anexo I: Bioseguridad

La recolección y el procesamiento de muestras exponen al personal de salud en un riesgo de materiales potencialmente infecciosos, para reducir el riesgo se deben aplicar todas las medidas de bioseguridad de manera obligatoria siguiendo todos los criterios de las hojas de seguridad de sarampión y rubéola así como el Bio-RAM correspondiente. Todo el personal que tiene contacto con muestras para el diagnóstico de sarampión y rubéola deberá estar vacunado o contar con títulos de anticuerpos a estos dos agentes patógenos, estos datos deben estar registrados en una bitácora.

Para minimizar el riesgo de infección, el personal debe seguir las recomendaciones y orientaciones del Manual de Bioseguridad de Laboratorio, 3ra edición de la OMS, como portar el equipo de protección personal (EPP) que consta de bata blanca de algodón, guantes y calzado cerrado. Está prohibido el uso de prendas de laboratorio en lugares como: oficinas administrativas, salas para el personal y cafeterías. En las zonas de trabajo no está permitido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.

Evitar utilizar material de vidrio en la recepción y procesamiento de las muestras. Estará estrictamente prohibido pipetear con la boca. Todos los LESP deberán manejar las muestras biológicas en un gabinete de bioseguridad tipo II utilizando buenas prácticas de laboratorio.

Los mecanismos de contención dependen del agente infeccioso, en el caso de extracción de material genético y amplificación se requiere de áreas exclusivas, con gabinetes de bioseguridad nivel 2 para extracción y preparación de reactivos e incorporación de los RNA de muestras problema, se requieren gabinetes con especificaciones para trabajar reacciones de PCR. Cada gabinete deberá estar ubicado en áreas delimitadas y separadas. El manejo de virus en biología molecular requiere personal altamente capacitado y protección específica para el analista.

Todos los derrames, accidentes y exposiciones reales o potenciales a materiales infecciosos se comunicarán al jefe del laboratorio o al área de gestión ambiental. Se mantendrá un registro escrito de esos accidentes e incidentes.

Todo material contaminado que deba salir del laboratorio para su descontaminación debe ser colocado dentro de bolsas especiales debidamente cerradas y etiquetadas. Disponer los residuos biológicos infecciosos según lo indica la NOM-087-SEMARNAT.

Las mujeres en edad fecunda deberán ser informadas de los riesgos que supone para el producto la exposición profesional al virus de la rubéola y de las medidas concretas que se requieren adoptar para proteger al producto.

El jefe de laboratorio debe velar que los procedimientos y prácticas de seguridad en el laboratorio formen parte de la capacitación básica del personal.

El símbolo y signo internacional de peligro biológico deberá colocarse en las puertas de los locales donde se manipulen microorganismos del grupo de riesgo 2 o superior. Sólo podrá entrar en las zonas de trabajo del laboratorio el personal autorizado. Las puertas del laboratorio se mantendrán cerradas.

Anexo II: Técnica de Diagnóstico

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgM PARA SARAMPIÓN O RUBÉOLA MEDIANTE ELISA INDIRECTO

Propósito

Detectar los anticuerpos IgM específicos contra el virus de Rubéola y Sarampión en muestras de suero humano, utilizando un estuche comercial de ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto.

Equipo

- Balanza Granataria de dos platos
- Centrifuga Refrigerada.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Lector de ELISA.
- Lavador de placas.
- Baño maría.
- Refrigerador de Laboratorio.
- Congelador de Laboratorio.
- Pipeta Multicanal 50-300 µL.
- Pipeta Multicanal 5-50 µL.
- Pipeta Monocanal 20-200 µL.
- Pipeta Monocanal 100-1000 µL.
- Pipeta Monocanal 10-100 µL.

Material

- Microtubos dilutores con capacidad de 1 mL.
- Puntas desechables con capacidad de 1-200 µL.
- Puntas desechables con capacidad de 1-1000 µL.
- Reservorios y contenedores.
- Gasas.
- Guantes de nitrilo.
- Contenedor para desechos RPBI

Reactivos

- Enzygnost® Anti-Measles/IgM
- Enzygnost® Anti-Rubella/IgM
- Reactivos Adicionales para Enzygnost®/TMB
- Etanol al 70 %
- Agua destilada o bidestilada

Preparación de reactivos

Los reactivos se preparan como se muestra en la siguiente tabla

Reactivo	Preparación	Almacenamiento	Estabilidad
Solución de conjugado (dilución 1+50)	50 µL de conjugado Anti IgM o Anti-IgG humana /POD más 2.5 mL de tampón para conjugado por cada tira doble.	Se prepara y usa en el momento.	No se almacena
Solución de cromógeno (dilución 1+10)	200 µL de cromógeno TMB más 2 mL de tampón sustrato TMB por tira doble.	Se prepara y usa en el momento.	No se almacena
Absorbente RF	Adicionar 5 mL de H ₂ O bi-distilada al vial con liofilizado.	2 a 8 °C	4 semanas
Solución de Lavado POD (dilución 1+19)	100 mL de solución concentrada WASHPOD más 1900 mL de Agua bidestilada para 2 litros de solución	2 a 8 °C 18 a 25 °C	1 semana 1 día

Metodología para la determinación de anticuerpos IgM

1. Realizar el esquema de distribución de las muestras, considerando que al principio se colocará un control negativo y un positivo, posteriormente se añadirán las muestras (M1, M2, etc) y al final se dispensará un segundo control positivo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PN	P/N										
B	P/P	P/P										
C	M1	M1										
D	M2	M2										
E	M...	M...										
F	M...	M...										
G	Mn	Mn										
H	P/P	P/P										

Distribución de muestras y controles. P/N control negativo; P/P control positivo;
Mn muestra desde la primera hasta la última.

2. Diluir las muestras y los controles en proporción 1+20 con Tampón para muestras POD dentro de tubos para dilución. Ejemplo: a 400 µL de Tampón para muestras adicionarle 20 µL de muestra o de control. La muestra diluida puede conservarse durante una noche de 2-8 °C en recipientes con baja fijación de proteína.
3. Tomar 200 µL de cada una de las muestras prediluidas 1+20 y añadirlos a 200 µL de la solución absorbente (FR) quedando una dilución de la muestra 1:42. Incubar 15 min a temperatura ambiente. “Los controles no son tratados con la solución absorbente”
4. Distribuir las muestras en la placa de ELISA siguiendo el orden del esquema previamente realizado adicionando 150 µL de las muestras absorbidas y de los controles diluidos a cada pozo correspondiente.
5. Cubrir la placa de ELISA con una lámina adhesiva e incubar de 36 a 38 °C durante una hora.
6. Lavar la placa, el lavado se puede realizar de forma manual con ayuda de una pipeta multicanal o utilizando un lavador de microplacas de ELISA. El proceso consiste en: Eliminar el contenido de los pozos, seguido se dispensa en cada pozo 300 µL de solución de lavado, una vez terminado esto se elimina la solución y nuevamente se dispensan en cada pozo 300 µL de solución de lavado. Se realizan en total 4 lavados.

7. Dispensar en cada pozo 100 µL de solución de conjugado, cubrir con una tira adhesiva e incubar de 36 a 38 °C durante una hora.
8. Repetir el lavado como se indica en el punto 6.
9. Adicionar a cada pozo 100 µL de solución de cromógeno, cubrir la placa de cualquier fuente de luz e incubar a temperatura ambiente de 28 a 32 minutos.
10. Adicionar 100 µL de solución de paro a cada pozo pasando la última incubación, y leer las absorbancias utilizando los filtros de 450/650nm.
11. Realizar los cálculos y reportar los resultados.

Cálculo de resultados

Los cálculos se realizan como se muestra en el ejemplo siguiente. Se obtuvieron los resultados de absorbancias a una lectura de 450/650 nm.

Result Data												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.910	0.017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0.501	0.016	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0.069	0.017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0.078	0.022	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	1.200	0.014	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0.085	0.021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0.758	0.013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0.950	0.023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ABS de pozos con
antígeno viral

ABS de pozos con
antígeno control

1. Obtener la diferencia de las absorbancias de los pozos con antígeno viral menos las absorbancias de los pozos con antígeno control para obtener los valores de ΔA . en este caso la columna 1 se le restará la columna 2.
2. Calcular la media de las ΔA de los P/P.
3. Calcular el factor de corrección para ese ensayo con el dato del valor nominal incluido en la Tabla de valores de código de barras del estuche con la siguiente fórmula.

$$\text{Factor de corrección (FC)} = \frac{\text{Valor teórico}}{\Delta A \text{ promedio del P/P}}$$

4. A las ΔA de las muestras multiplicarles el factor de corrección. Este es el valor (ΔA corregida) que se reporta.

	1	2	ΔA
A	0.910	0.017	0.893
B	0.501	0.016	0.485
C	0.069	0.017	0.052
D	0.078	0.022	0.056
E	1.200	0.014	1.186
F	0.085	0.021	0.064
G	0.758	0.013	0.745
H	0.950	0.023	0.927

MEDIA
 $\bar{X}(P/P) = 0.910$

Si el Valor nominal del estuche es: 0.9

Factor de corrección
 $FC = \frac{0.9}{0.910} = 0.989$

ΔA	ΔA_{FC}
0.893	P/N
0.485	0.480
0.052	0.051
0.056	0.055
1.186	1.173
0.064	0.063
0.745	0.737
0.927	P/N

Los ΔA de los controles no se multiplican por el FC.

Criterios de aceptación o rechazo del ensayo.

- Los valores de ΔA los controles (P/P) para ensayos de IgM, han de encontrarse dentro de los intervalos marcados en la tabla de código de barras de valores incluida en el estuche.

$$\text{Limite inferior} \leq \Delta A \text{ control}(P/P) \leq \text{limite superior}$$

- Los valores individuales de ΔA de los controles (P/P) para IgM no deben desviar $\pm 20\%$ de CV%
- Para el ensayo de IgM el ΔA del control (P/N) debe ser menor o igual a 0.099.

Interpretación de resultados

La interpretación de los resultados se realiza a partir de las absorbancias corregidas utilizando la siguiente tabla

Resultado	Absorbancia	Significado
Negativo	$\Delta A < 0.100$	No fueron detectados anticuerpos IgM
Indeterminado	$0.100 \leq \Delta A \leq 0.200$	No se puede descartar la infección con total seguridad.
Positivo	$\Delta A > 0.200$	Se detectaron anticuerpos IgM

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgG PARA SARAMPIÓN O RUBÉOLA MEDIANTE ELISA INDIRECTO

Propósito

Detectar los anticuerpos IgG específicos contra el virus de Rubéola y Sarampión en muestras de suero humano, utilizando un estuche comercial de ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto.

Equipo

- Balanza Granataria de dos platos.
- Centrifuga Refrigerada.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Lector de ELISA.
- Lavador de placas.
- Baño maría.
- Refrigerador Laboratorio.
- Congelador de Laboratorio.
- Pipeta Multicanal 50-300 µL.
- Pipeta Multicanal 5-50 µL.
- Pipeta Monocanal 20-200 µL.
- Pipeta Monocanal 100-1000 µL.
- Pipeta Monocanal 10-100 µL.

Material

- Microtubos dilutores con capacidad de 1 mL.
- Puntas desechables con capacidad de 1-200 µL.
- Puntas desechables con capacidad de 1-1000 µL.
- Reservorios y contenedores.
- Gasas.
- Guantes de nitrilo.
- Contenedor para desechos RPBI.

Reactivos

- Enzygnost® Anti-Measles/IgG.
- Enzygnost® Anti-Rubella/IgG.
- Reactivos Adicionales para Enzygnost®/TMB.
- Etanol al 70 %.
- Agua destilada o bidestilada

Preparación de reactivos

Los reactivos se preparan como se muestra en la siguiente tabla

Reactivo	Preparación	Almacenamiento	Estabilidad
Solución de conjugado (dilución 1+50)	50 µL de conjugado o Anti-IgG humana /POD más 2.5 mL de tampón para conjugado por cada tira doble.	Se prepara y usa en el momento.	No se almacena
Solución de cromógeno (dilución 1+10)	200 µL de cromógeno TMB más 2 mL de tampón sustrato TMB por tira doble.	Se prepara y usa en el momento.	No se almacena
Solución de Lavado POD (dilución 1+19)	100 mL de solución concentrada WASHPOD más 1900 mL de Agua bidestilada para 2 litros de solución	2 a 8 °C 18 a 25 °C	1 semana 1 día

Metodología para la determinación de anticuerpos IgG

- Realizar el esquema de distribución de las muestras a trabajar y considerar que al principio se colocará un control positivo y al final de las muestras un segundo control positivo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PN	P/N										
B	M1	M1										
C	M2	M2										
D	M3	M3										
E	M...	M...										
F	M...	M...										
G	Mn	Mn										
H	P/N	P/N										

Distribución de muestras y controles. P/N control positivo; Mn muestra desde la primera hasta la última.

- Diluir las muestras y los controles en proporción 1+20 con *Tampón para muestras POD* dentro de tubos para dilución. Ejemplo: a 400 µL de

Tampón para muestras adicionarle 20 μL de muestra o de control. La muestra diluida puede conservarse durante una noche 2-8 $^{\circ}\text{C}$ en recipientes con baja fijación de proteína.


3. Dispensar 200 μL de la solución Tampón para muestras POD en cada micropozo de una tira doble, seguido se toman 20 μL de cada una de las muestras y controles prediluidos 1+20, estos se añaden a los 200 μL de Tampón para muestras en la placa. Homogenizar al menos 2 veces con ayuda de una pipeta.
4. Cubrir la placa de ELISA con una lámina adhesiva e incubar de 36 a 38 $^{\circ}\text{C}$ durante una hora. Terminado este tiempo se prosigue a realizar el lavado.
5. Lavar la placa, el lavado se puede realizar de forma manual con ayuda de una pipeta multicanal o utilizando un lavador de microplacas de ELISA. El proceso consiste en: Eliminar el contenido de los pozos, seguido se dispensa en cada pozo 300 μL de solución de lavado, una vez terminado esto se elimina la solución y nuevamente se dispensan en cada pozo 300 μL de solución de lavado. Se realizan en total 4 lavados.
6. Dispensar en cada pozo 100 μL de solución de conjugado, cubrir con una tira adhesiva e incubar de 36 a 38 $^{\circ}\text{C}$ durante una hora.
7. Repetir el lavado como se indica en el punto 5.
8. Adicionar a cada pozo 100 μL de solución de cromógeno, cubrir la placa de cualquier fuente de luz e incubar a temperatura ambiente de 28 a 32 minutos.
9. Adicionar 100 μL de solución de paro a cada pozo pasando la última incubación, inmediatamente leer las absorbancias utilizando los filtros de 450/650nm.
10. Registrar las absorbancias obtenidas y con éstas realizar los cálculos.


Cálculo de resultados

Los cálculos se realizan como se muestra en el ejemplo siguiente

Se tienen los siguientes resultados de absorbancias a una lectura de 450/650 nm.

Result Data												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.910	0.017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0.501	0.016	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0.069	0.017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0.078	0.022	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	1.200	0.014	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0.085	0.021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0.758	0.013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0.950	0.023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

 ABS de pozos con antígeno viral

 ABS de pozos con antígeno control

1. Realizar diferencia de absorbancias de los pozos con antígeno viral menos las absorbancias de los pozos de antígeno control para obtener los valores de ΔA . en este caso la columna 1 se le restara la columna 2.
2. Calcular la media de las ΔA de los P/P.
3. Calcular el factor de corrección para ese ensayo con el dato del valor nominal incluido en la Tabla de valores de código de barras del estuche con la siguiente fórmula.

$$\text{Factor de corrección (FC)} = \frac{\text{Valor teórico}}{\Delta A \text{ promedio del P/P}}$$

4. A las ΔA de las muestras multiplicarles el factor de corrección, obteniendo las absorbancias corregidas. (ΔA_{FC})

	1	2	ΔA
A	0.910	0.017	0.893
B	0.501	0.016	0.485
C	0.069	0.017	0.052
D	0.078	0.022	0.056
E	1.200	0.014	1.186
F	0.085	0.021	0.064
G	0.758	0.013	0.745
H	0.950	0.023	0.927

MEDIA

$\bar{X} (P/P) = 0.910$

Si el Valor nominal del estuche es: 0.9

Factor de corrección

$FC = \frac{0.9}{0.910} = 0.989$

→

ΔA	ΔA_{FC}
0.893	P/N
0.485	0.480
0.052	0.051
0.056	0.055
1.186	1.173
0.064	0.063
0.745	0.737
0.927	P/N

La determinación cuantitativa de IgG de una muestra se realiza cuando se obtiene un resultado indeterminado o positivo, utilizando los criterios de absorbancia corregida (ΔA_{FC}). Los resultados negativos se expresan en absorbancia y no deben ser cuantificados.

NOTA: Las muestras que presenten un valor medido (ΔA) sin corregir > 2.5 , deben repetirse a una dilución de las muestras 1+2309, de lo contrario no pueden valorarse adecuadamente debido a las desviaciones de la ley de *Beer-Lamber* que aplican a los métodos fotométricos.

La cuantificación en IU/mL para rubéola o mIU/mL para sarampión se realiza según las siguientes fórmulas:

$$\log_{10} IU/mL = (\alpha)(\Delta A_{FC})^{\beta}$$

$$\log_{10} mIU/mL = (\alpha)(\Delta A_{FC})^{\beta}$$

Los valores para las constantes α y β , son dependientes del lote de los reactivos. Se deben tomar de la tabla de código de barras que viene incluida en el estuche de los reactivos. Nótese que las fórmulas para sarampión y rubéola son muy similares, lo que hace la diferencia para obtener los valores ya sea en mIU/mL o IU/mL son los valores de α y β .

A continuación se muestra un ejemplo de cómo realizar el cálculo con los siguientes datos para rubéola.

$$\alpha = 1.6841$$

$$\beta = 0.4016$$

Para una muestra con $\Delta A_{FC} = 1.173$ Sustituyendo en la fórmula

$$\log_{10} IU/mL = (\alpha)(\Delta A_{FC})^{\beta}$$

$$\log_{10} IU/mL = (1.6841)(1.173^{0.4016})$$

$$\log_{10} IU/mL = 1.7955$$

Eliminado el logaritmo base 10 se obtiene el resultado en IU/mL

$$IU/mL = 10^{1.7955}$$

$$IU/mL = 62.44$$

El resultado de 62.44 IU/mL será el resultado que se reportará.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Equipo

- Gabinete de Bioseguridad clase II.
- Refrigerador.
- Congelador.
- Agitador magnético.
- Pipeta Monocanal de 20-200 μL .
- Pipeta Monocanal 100-1000 μL .

Material

- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 20-200 μL .
- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 200-1000 μL .
- Tubos tipo eppendorf, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 1.7 mL.
- Gasas estériles.
- Guantes de nitrilo (libres de talco).
- Batas desechables.
- Gradillas de unicel para tubos tipo eppendorf.
- Estaciones para trabajo en frío para tubos tipo eppendorf.

Reactivos

- Estuche para extracción de ARN viral, (QIAamp® Viral RNA Mini Kit) Marca QIAGEN, catálogo 52906.
- Agua calidad o grado biología molecular. Marca Roche, catálogo: 033 159 32 001.
- Etanol al 75%.
- Etanol grado biología molecular (96-100%).
- Solución para eliminación de ARNasas

Preparación de reactivos

Secuencia de Etapas	Actividad
Solución de acarreador	Con una micropipeta utilizando puntas con filtro se adiciona 310 μL de Amortiguador AVE a el tubo del acarreador de RNA liofilizado obteniendo una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
	Se realizan alícuotas de (100 μL) y se almacenan a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nota: Evitar congelar y descongelar más de tres veces.

Solución de AVL de trabajo	Se prepara la cantidad necesaria acorde a la cantidad de muestras a trabajar. En un tubo cónico se adicionan 10 partes de buffer AVL mas una parte de solución de acarreador buscando una dilución de 1:10. Ejemplo:			
	# Muestras	Buffer AVL (mL)	Acarreador (µL)	
	1	0.56	5.6	
	4	2.24	22.4	
	8	4.48	44.8	
	12	6.72	67.2	
	16	8.96	89.6	
	20	11.20	112.0	
	24	13.44	134.4	
Solución AW1	No. de preparaciones	Vol. de AW1 concentrado	Vol. de etanol (96-100%)	Volumen final
	50	19 mL.	25 mL.	44 mL.
	250	98 mL.	125 mL.	223 mL.
Solución AW2	No. de preparaciones	Vol. de AW2 concentrado	Vol. de etanol (96-100%)	Volumen final
	50	13 mL.	30 mL.	43 mL.
	250	66 mL.	160 mL.	226 mL.

Metodología para la extracción de ARN

- Realizar el listado de las muestras a trabajar. En base a listado se rotularan tubos cónicos de 1.7 mL con el número de muestra. Se rotula un tubo extra como control de extracción CE.
- A cada tubo rotulado se le adiciona 140 µL de muestra correspondiente previamente descongelada y homogenizada. Terminado esto a todos los tubos cónicos con muestra se les adiciona 560 µL de solución de trabajo AVL y se homogenizan con un agitador vortex durante 15 segundos. Al tubo CE se le adiciona agua en lugar de muestra y se trabaja de la misma forma que las muestras.
- Se incuban las muestras durante 10 min a temperatura ambiente, terminado este tiempo se centrifugan las muestras durante 30 segundos a 8000 rpm.
- A cada tubo se adicionan 560 µL de etanol grado biología molecular, se agitan durante 15 segundos y nuevamente se centrifugan durante 15 segundos a 8000 rpm.

- Se rotulan las tapas de las columnas con el número de muestra que se trabaja y a estas se les adiciona 630 µL del lisado de muestra correspondiente.
- Se centrifuga durante un minuto a 8000 rpm a una temperatura de 4 a 8° C.
- Se cambia el tubo colector por uno nuevo y a la columna adicionarle nuevamente 630 µL del lisado de muestra correspondiente.
- Se centrifuga durante un minuto a 8000 rpm a una temperatura de 4 a 8° C.
- Cambiar el tubo colector por uno nuevo y a la columna adicionarle 500 µL de solución de AW1 y centrifugar durante un minuto a 8000 rpm a una temperatura de 4 a 8 °C.
- Cambiar el tubo colector por uno nuevo y a la columna adicionarle 500 µL de solución de AW2 y centrifugar durante tres minutos a 14000 rpm a una temperatura de 4 a 8 °C.
- La columna se cambia a otro tubo cónico nuevo previamente rotulado con el mismo número de la columna. Se adiciona 60 µL de solución AVE a cada columna y se centrifugan durante un minuto a 8000 rpm a una temperatura de 4 a 8°C.
- Se elimina la columna, los tubos con eluato se tapan y se almacenan de -15 a -25 °C si se realizara la amplificación ese mismo día, de no ser así se almacenan de -65 a -75 °C.

Consideraciones

Todos los desechos de los tubos colectores se deben descartar en un recipiente exclusivo para su posterior eliminación como residuo CRETl.

Las soluciones de extracción AVL y AW1 contienen sales de guanidina, las cuales pueden formar compuestos altamente reactivos cuando se combinan con cloro.

La extracción de ARN puede realizarse mediante equipos automatizados. Para esto se recomienda comparar el rendimiento obtenido mediante la metodología automatizada contra la metodología de extracción manual

DETECCIÓN DEL VIRUS DE RUBÉOLA MEDIANTE RT PCR TIEMPO REAL

Equipo

- Gabinete de Bioseguridad para PCR
- Estación de trabajo con Flujo Laminar
- Refrigerador
- Congelador
- Ultracongelador
- Microcentrífuga
- Agitador magnético
- Micropipeta de volumen variable entre 0.5-10 μ L
- Micropipeta de volumen variable entre 20-200 μ L
- Micropipeta de volumen variable entre 100-1000 μ L (2)
- Termociclador en tiempo real

Material

- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 0.5-10 μ L.
- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 2-20 μ L.
- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 10-100 μ L.
- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 20-200 μ L.
- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 200-1000 μ L.
- Tubos tipo eppendorf, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 1.7 mL.
- Gasas estériles.
- Guantes de nitrilo (libres de talco).
- Batas desechables.
- Papel aluminio.
- Gradillas de unicel para tubos tipo eppendorf.
- Estaciones para trabajo en frío para tubos tipo eppendorf.
- Placas de polipropileno con 96 pozos claros especiales para PCR en tiempo real con capacidad de 5.0-125 μ L.
- Tiras con 8 tubos especiales para PCR en tiempo real con capacidad de 0.2 mL.
- Tiras con 8 tapas ópticas ultra claras especiales para PCR en tiempo real.

- Marcadores indelebles de punto fino.
- Contenedores y bolsas para desecho de material biológico-infeccioso.
- Pinzas

Reactivos

- Enzima para amplificación: SuperScript III One-Step RT-PCR con Platinum, Marca Invitrogen, Marca Bio-Rad, o Marca Ag-path.
- Agua calidad PCR libre de ARNsa.
- Iniciador delantero de Rubéola (RV11): 5' CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC 3'
- Iniciador reverso de Rubéola (RV12): 5' CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA 3'
- Iniciador reverso de Rubéola (RV12-2): 5' CCA CGA GCC GCG AAC AGT CG 3'
- Sonda de Rubéola: 5' FAM-AG GTC CAG GTC CCG CCC GAC -BHQ1 3'
- Iniciador delantero de ARNsaP humano (HURNASE-P-F): 5' AGA TTT GGA CCT GCG AGC G 3'.
- Iniciador reverso de ARNsaP humano (HURNASE-P-R): 5' GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT 3'.
- Sonda (BHQ1 HURNASE-P):5'FAM-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-BHQ1 3'
- Etanol al 75%.
- Etanol grado biología molecular (96-100%).
- Hipoclorito de sodio al 5%.
- Solución para eliminación de DNA y RNA

Materiales Biológicos

- Cepa caracterizada de Rubéola utilizada como control positivo.


Preparación del área de trabajo

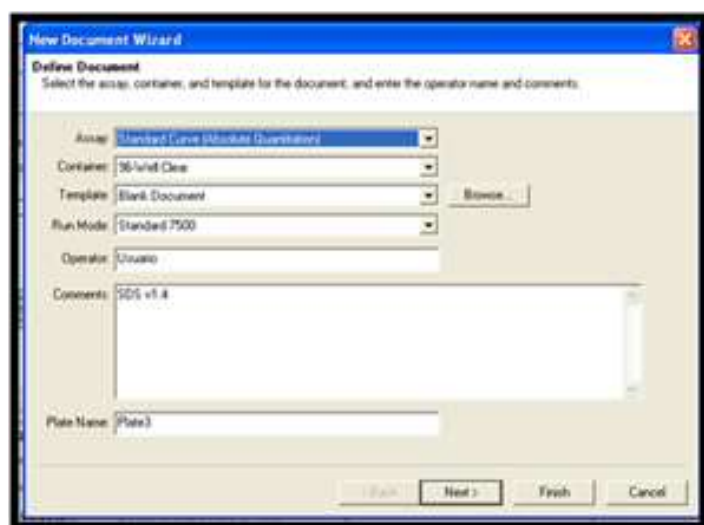
Cada una de las áreas de trabajo, debe de contar con el material, equipo, reactivos y personal exclusivo.

Antes de empezar, el gabinete de bioseguridad o flujo laminar de cada una de las áreas de trabajo (extracción de ARN, preparación de mezcla maestra de reacción y de ARN's de muestras problemas), deberá limpiarse con hipoclorito

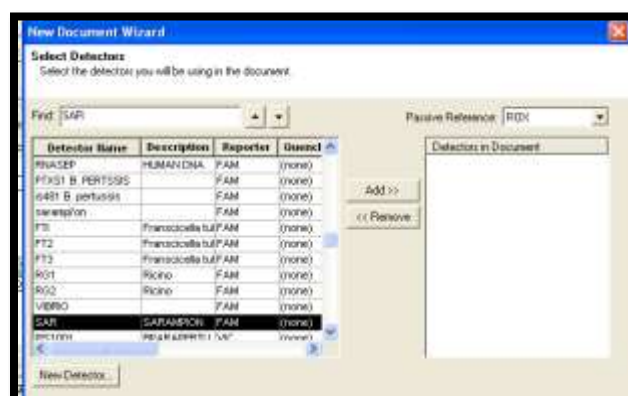
de sodio al 5%, agua bidestilada y etanol al 75%, siguiendo ese orden. Irradiar con luz ultravioleta durante 20 minutos antes y después de a trabajar. Si se cuenta con soluciones inhibidoras de ARN's y ADN's, se recomienda realizar la limpieza con estas soluciones antes y después de trabajar. El material necesario que se va a usar debe estar listo en cada una de las áreas de trabajo.

Programación del equipo

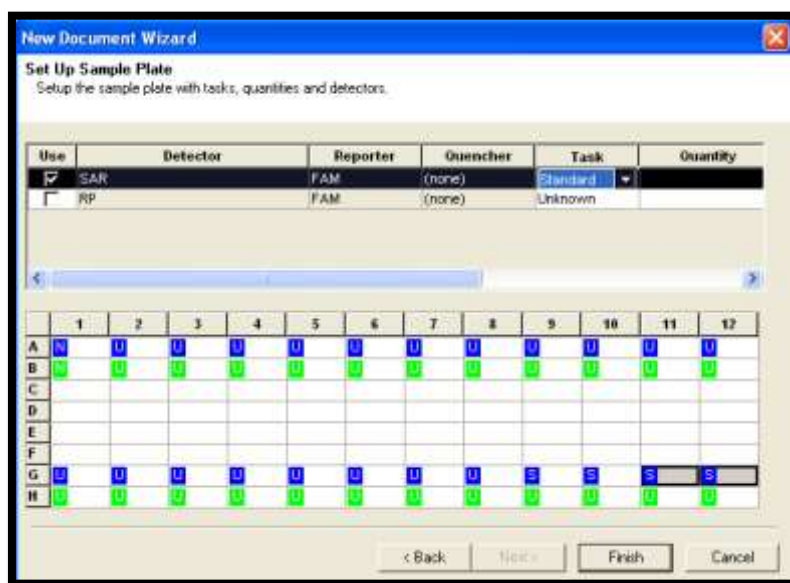
1. Encender el Termociclador y su computadora portátil correspondiente.
2. En la pantalla del escritorio dar doble clic en el siguiente icono .
3. En la pantalla “New Document Wizard”, seleccionar “standard 7500” dando clic en “Run Mode”, nombrar la plantilla de trabajo y dar clic en “next”.



4. En la pantalla “Select Detectors” seleccionar los detectores RUB (color a elección) y RP (color a elección) con su Fluoróforo FAM, así como seleccionar el colorante de referencia “ROX” y dar clic en “next”. Si se corren sarampión y rubéola en la misma placa, el color de los detectores deben ser diferentes.



5. En "Set up simple plate" seleccionar los espacios donde se desea colocar a los detectores de Rub y RP para el análisis de las muestras, en el espacio "task" seleccionar "NTC" para los controles de reactivo; "unknown" para las muestras y controles de RP; "Standard" para los controles positivos así como, escribir la concentración de los mismos y dar clic en "Finish".



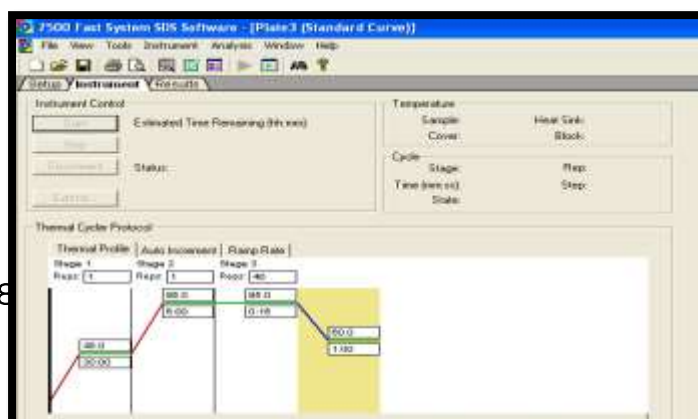
6. Seleccionar las condiciones del ensayo siguientes.

Paso 1. Transcripción reversa (RT): 48°C / 30 min.

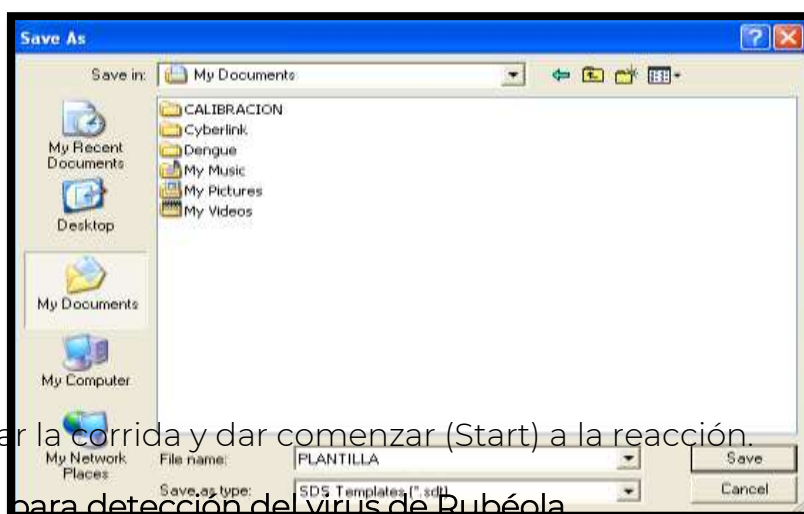
Paso 2. Activación de la ADN polimerasa y desnaturalización: 95°C / 5 min.

Paso 3. 40 ciclos de amplificación (PCR): 95°C / 15 seg.

Paso 4. Extensión: 60°C / 1 min.



7. Guardar la plantilla como ""SDS templates" (figura 5).



8. Guardar la corrida y dar comenzar (Start) a la reacción.

Metodología para detección del virus de Rubéola

Preparación de reactivos.

Los iniciadores para Rubéola (gen E1) se hidratan con agua grado biología molecular y se deben de preparar a una concentración de 20 μ M para obtener una solución de trabajo.

La sondas para rubéola (gen E1) se preparan a una concentración de 10 μ M para obtener una solución de trabajo.

Los iniciadores de ARNsa P se hidratan con agua grado biología molecular, para prepararlos a una concentración de 20 μ M para tener una solución de trabajo

La sondas para ARNasa P se prepara a una concentración de 10 μ M para obtener una solución de trabajo.

El control positivo de ARN para rubéola es suministrado por el laboratorio de EFES del InDRE a través de lisados celulares infectados por el virus de rubéola in vitro para usarlo como stock y preparar los controles altos y bajos.

1. Realizar la extracción de ARN del lisado celular.
2. Una vez extraído el ARN, hacer 5 diluciones seriales; 1/10 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000.
3. Con las diluciones anteriores realizar una curva cualitativa en un ensayo de RT-PCR en Tiempo Real para determinar los controles de rubéola con una concentración baja (CP BAJO) y los controles de rubéola con concentración alta (CP ALTO).
4. El CP BAJO, debe presentar un valor de Ct entre 29 - 35.
5. El CP ALTO, debe presentar un valor de Ct entre 22 – 27.

Una vez obtenidos los productos de ARN con las diluciones que correspondan para controles con concentración baja y alta, de acuerdo al valor de Ct obtenido, se deberá alícuotar y conservar a -20 ó -70°C hasta su uso.

Importante. Siempre trabajar con el ARN a 4 +/-1 °C. No se deberá trabajar con ARNs en el mismo lugar donde se realiza la preparación de la master mix.

El control positivo de ARNsa P humana: utilizar una muestra de exudado faríngeo con resultado negativo al gen E1 de rubéola, con un valor de Ct para RP entre 26 – 30.

Cálculo de reactivos y ubicación de muestras.

1. Realizar un esquema de la distribución de las muestras y de los controles los cuales deben colocarse por duplicado. Con base al número de muestras, y controles (positivos y negativos, tanto del gen viral como de ARNsa P) se realizarán los cálculos correspondientes para preparar la mezcla maestra de reacción, estos datos, se deben anotar en la bitácora de trabajo correspondiente. Se recomienda utilizar, alguna de las siguientes distribuciones para las muestras y controles:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
B	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
C	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23
D	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23
E												
F												
G								CN EXT	CP ALTO	CP ALTO	CP BAJO	CP BAJO
H								CN EXT		CP RP	CP RP	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	M4	M8	M12								CN EXT
B	NTC	M4	M8	M12								CN EXT
C	M1	M5	M9	M13							CP ALTO	CP ALTO
D	M1	M5	M9	M13							CP RP	CP RP
E	M2	M6	M10	M14							CP BAJO	CP BAJO
F	M2	M6	M10	M14								
G	M3	M7	M11	M15								
H	M3	M7	M11	M15								

2. Realizar los cálculos de cada uno de los reactivos, de acuerdo al número de muestras y controles. Se recomienda preparar un excedente para una muestra más. En las siguientes tablas, se muestra la cantidad de reactivos para amplificar 1 muestra

Rubéola	
componente	Vol/rx (μL)
Agua libre de nucleasas	7.2
Mix de reacción 2x	12.5
RV11	0.5
RV12	0.5
RV12-2	0.5
Sonda	0.5
ROX	0.05
Inhibidor de ARNsa	0.25
Enzima	0.5
RNA	2.5
total	27.25

ARNsa RP	
componente	Vol/rx (μL)
Agua libre de nucleasas	7.2
Mix de reacción 2x	12.5
HURNASE-P-F	0.5
HURNASE-P-R	0.5
Sonda	0.5
ROX	0.05
Inhibidor de ARNsa	0.25
Enzima	0.5
RNA	2.5
total	24.5

3. Abrir el programa del termociclador, para crear un nuevo documento (placa) basándose en el formato existente ("Plantilla Rubéola"); para ubicar en la misma posición las muestras y los controles en la placa del programa así como en la bitácora de trabajo.
4. Guardar el documento elaborado con el formato de fecha (dd/mm/aa) en la carpeta correspondiente.

Preparación de mezcla maestra de reacción.

1. Limpiar el área, y sacar del congelador los reactivos a utilizar, manteniéndolos en frío en un contenedor con cama de hielo.
2. Agregar a un tubo tipo eppendorf de 1.7 mL cada uno de los reactivos que conforman la mezcla maestra de reacción en base a la bitácora de trabajo realizada.
3. Agregar 22.5 μL de la mezcla maestra de reacción a cada tubo o pozo a utilizar.
4. Agregar 2.5 μL de agua calidad biología molecular al tubo o pozo que contendrá el control negativo de reactivos (NCT) y taparlo.
5. Pasar al área de adición de ARN los tubos o pozos que contienen la mezcla maestra de reacción evitando exponerlos al ambiente, para ello se deben trasladar en una caja limpia, cerrada y libre de ARNas y ADNas.

Adición de los RNA de muestras problemas y controles.

1. Limpiar el área.

2. Agregar 2.5 μ L del ARN de la muestra problema a cada tubo/pozo siguiendo la ubicación de la bitácora de trabajo correspondiente, en primer lugar se agrega el RNA de la muestra problema, agregando al final los controles positivos y los estándares (en caso de cuantificación). Al terminar de colocar una hilera, esta deberá de taparse usando las tiras de tapas. Se debe evitar el contacto directo de los guantes al momento de tapar.
3. Ingresar los tubos/pozos al termociclador, seleccionar en el programa el protocolo de amplificación ("Rubéola") e iniciar la corrida.

Análisis e Interpretación de los resultados.

Los valores de CT de las muestras y los controles se obtienen después de ajustar el valor del umbral (threshold). Este se ajusta sobre los valores de la fluorescencia emitidos por los controles NTC.

La interpretación de los resultados (CT) se hace a partir de la siguiente tabla:

Gen Viral (CT)	Gen de la <u>RNAsas P</u> (CT)	Resultado
< 40 ciclos	< 40 ciclos	Positivo
< 40 ciclos	Indeterminado	Positivo
Indeterminado	< 40 ciclos	Negativo
Indeterminado	Indeterminado	Muestra no adecuada

Criterios de aceptación o rechazo del ensayo.

Los criterios se muestran en la siguiente tabla

Control	Valores de CT	Interpretación
NTC	Indeterminado	Valido
CN EXT	Indeterminado	Valido
\bar{X} CP bajo	Entre 29 a 35	Valido
\bar{X} CP alto	Entre 22 y 27	Valido
CP RP	Entre 26 y 30	Valido

Si alguno los controles no es válido, la prueba deberá repetirse.

Si se obtiene un resultado positivo, éste se deberá repetir desde el procedimiento de extracción.

DETECCIÓN DEL VIRUS DE SARAMPIÓN MEDIANTE RT PCR TIEMPO REAL

Equipo

- Gabinete de Bioseguridad para PCR
- Estación de trabajo con Flujo Laminar
- Refrigerador
- Congelador
- Ultracongelador
- Microcentrífuga
- Agitador magnético
- Micropipeta de volumen variable entre 0.5-10 μL
- Micropipeta de volumen variable entre 20-200 μL
- Micropipeta de volumen variable entre 100-1000 μL (2)
- Termociclador en tiempo real

Material

- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 0.5-10 μL .
- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 2-20 μL .
- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 10-100 μL .
- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 20-200 μL .
- Puntas con filtro, estériles, libres de ARNsa y ADNsa, con capacidad de 200-1000 μL .

- Tubos tipo eppendorf, estériles, libres de ARNsa y ADNsa con capacidad de 1.7 mL.
- Gasas estériles.
- Guantes de nitrilo (libres de talco).
- Batas desechables.
- Papel aluminio.
- Gradillas de unicel para tubos tipo eppendorf.
- Estaciones para trabajo en frío para tubos tipo eppendorf.
- Placas de polipropileno con 96 pozos claros especiales para PCR en tiempo real con capacidad de 5.0-125 μ L.
- Tiras con 8 tubos especiales para PCR en tiempo real con capacidad de 0.2 mL.
- Tiras con 8 tapas ópticas ultra claras especiales para PCR en tiempo real.
- Marcadores indelebles de punto fino.
- Contenedores y bolsas para desecho de material biológico-infeccioso.
- Pinzas

Reactivos

- Enzima para amplificación: SuperScript III One-Step RT-PCR con Platinum, Marca Invitrogen, Marca Bio-Rad, o Marca Ag-path.
- Agua calidad PCR libre de ARNsa.
- Iniciador delantero de Sarampión (MVN1139-F): 5' TGG CAT CTG AAC TCG GTA TCA C 3'
- Iniciador reverso de Sarampión (MVN1213-R): 5' TGT CCT CAG TAG TAT GCA TTG CAA 3'
- Sonda de Sarampión (MVNP1163-P): 5' FAM- CCG AGG ATG CAA GGC TTG TTT CAG A –BHQ1 3'
- Iniciador delantero de ARNsaP humano (HURNASE-P-F): 5' AGA TTT GGA CCT GCG AGC G 3'.
- Iniciador reverso de ARNsaP humano (HURNASE-P-R): 5' GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT 3'.
- Sonda (BHQ1 HURNASE-P): 5' FAM-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-BHQ1 3'
- Etanol al 75%.
- Etanol grado biología molecular (96-10%).
- Hipoclorito de sodio al 5%.
- Solución para eliminación de ADN y RNA.

Materiales Biológicos


- Cepa caracterizada de Sarampión utilizada como control positivo.

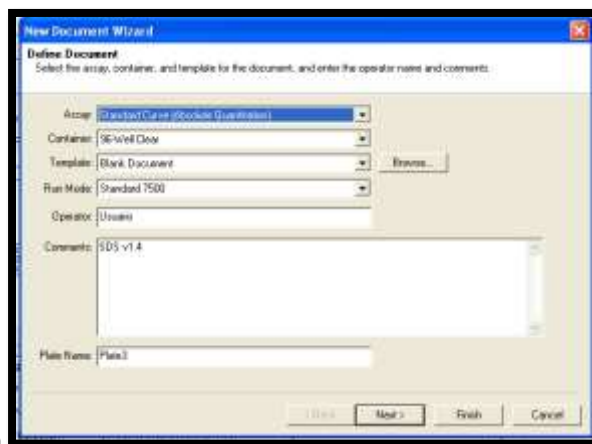
Preparación del área de trabajo

Cada una de las áreas de trabajo, debe de contar con el material, equipo, reactivos y personal exclusivo.

Antes de empezar, el gabinete de bioseguridad o flujo laminar de cada una de las áreas de trabajo (extracción de ARN, preparación de mezcla maestra de reacción y de ARN's de muestras problemas), deberá limpiarse con hipoclorito de sodio al 5%, agua bidestilada y etanol al 75%, siguiendo ese orden. Irradiar con luz ultravioleta durante 20 minutos antes y después de a trabajar. Si se cuenta con soluciones inhibidoras de ARN's y ADN's, se recomienda realizar la limpieza con estas soluciones antes, y después de trabajar. El material necesario que se va a usar debe estar listo, en cada una de las áreas de trabajo.

Programación del equipo

1. Encender el Termociclador y su computadora portátil correspondiente.
2. En la pantalla del escritorio dar doble clic en el siguiente icono .
3. En la pantalla “New Document Wizard”, seleccionar “standard 7500” dando clic en “Run Mode”, nombrar la plantilla de trabajo y dar clic en “next”.



9. En la pantalla **Select Detectors** siguiente seleccionar los detectores SAR (color a elección) y RP (color a elección) con su Fluoróforo FAM, así como seleccionar el colorante de referencia "ROX" y dar clic en "next". Si se

corren sarampión y rubéola en la misma placa, el color de los detectores deben ser diferentes.



4. En “Set up sample plate” donde se desea colocar a los detectores de SAR y RP para el análisis de las muestras, en el espacio “task” seleccionar “NTC” para los controles de reactivo; “unknown” para las muestras y controles de RP; “Standard” para los controles positivos así como, escribir la concentración de los mismos y dar clic en “Finish”.



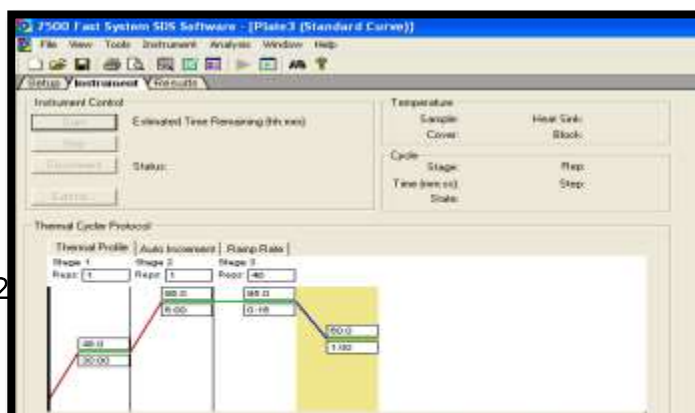
5. Seleccionar las condiciones del ensayo siguientes.

Paso 1. Transcripción reversa (RT): 48°C / 30 min.

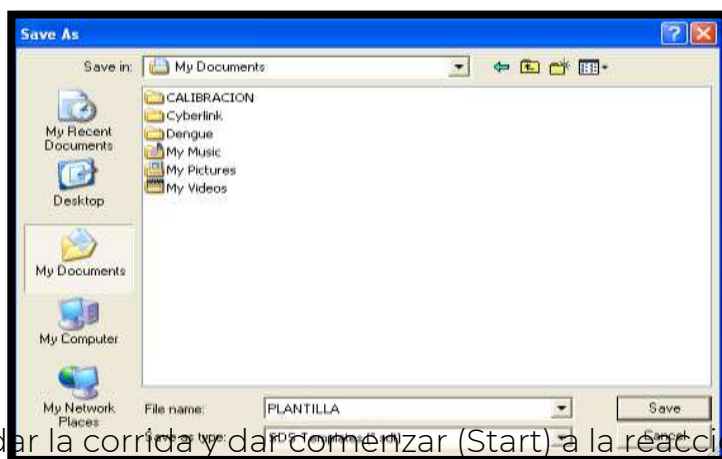
Paso 2. Activación de la DNA polimerasa y desnaturalización: 95°C / 5 min.

Paso 3. 40 ciclos de amplificación (PCR): 95°C / 15 seg.

Paso 4. Extensión: 60°C / 1 min.



6. Guardar la plantilla como “”SDS templates” (figura 5).



7. Guardar la corrida y dar comenzar (Start) a la reacción.

Metodología para detección del virus de Sarampión.

Preparación de reactivos.

Los iniciadores para Sarampión se hidratan con agua grado biología molecular y se deben de preparar a una concentración de 15 μM para obtener una solución de trabajo.

Las sondas para sarampión se preparan a una concentración de 12.5 μM para obtener una solución de trabajo.

Los iniciadores de ARNsa P se hidratan con agua grado biología molecular, para prepararlos a una concentración de 15 μM para tener una solución de trabajo

Las sondas para ARNasa P se preparan a una concentración de 5 μM para obtener una solución de trabajo.

Preparación de controles

El control positivo de ARN para sarampión es suministrado por el laboratorio de EFES del InDRE a través de lisados celulares infectados por el virus de sarampión in vitro para usarlos como stock y preparar los controles altos y bajos.

1. Realizar la extracción de ARN del lisado celular.
2. Una vez extraído el ARN, hacer 5 diluciones seriales; 1/10 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000.
3. Con las diluciones anteriores realizar una curva cualitativa en un ensayo de RT-PCR en Tiempo Real para determinar los controles de sarampión con concentración baja (CP BAJO) y los controles de sarampión con concentración alta (CP ALTO).
4. El CP BAJO, debe presentar un valor de Ct entre 29 - 35.
5. El CP ALTO, debe presentar un valor de Ct entre 22 – 27.

Una vez obtenidos los productos de RNA con las diluciones que correspondan para controles con una concentración baja y alta, de acuerdo al valor de Ct obtenido, se deberá alícuotar y conservar a -20 ó -70°C hasta su uso.

Importante. Siempre trabajar con el ARN a 4 +/-1 °C. No se deberá trabajar con ARNs en el mismo lugar donde se realiza la preparación de la master mix.

El control positivo de ARNsa P humana: utilizar una muestra de exudado faríngeo con resultado negativo al gen N de sarampión, con un valor de Ct para RP entre 26 – 30.

Cálculo de reactivos y ubicación de muestras.

1. Realizar un esquema de distribución de las muestras y de los controles los cuales se deben colocar por duplicado. Con base al número de muestras, y controles (positivos y negativos, tanto del gen viral como de ARNsa P) se realizarán los cálculos correspondientes para preparar la mezcla maestra de reacción, estos datos, se deben anotar en la bitácora de trabajo correspondiente. Se recomienda utilizar alguna de las siguientes distribuciones para las muestras y los controles:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
B	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
C	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23
D	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23
E												
F												
G								CN EXT	CP ALTO	CP ALTO	CP BAJO	CP BAJO
H								CN EXT		CP RP	CP RP	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	M4	M8	M12								CN EXT
B	NTC	M4	M8	M12								CN EXT
C	M1	M5	M9	M13							CP ALTO	CP ALTO
D	M1	M5	M9	M13							CP RP	CP RP
E	M2	M6	M10	M14							CP BAJO	CP BAJO
F	M2	M6	M10	M14								
G	M3	M7	M11	M15								
H	M3	M7	M11	M15								

- Realizar los cálculos de cada uno de los reactivos, de acuerdo al número de muestras y controles. Se recomienda preparar un excedente para una muestra más. En las siguientes tablas, se muestra la cantidad de reactivos para amplificar 1 muestra

Sarampión	
componente	Vol/rx (μL)
Agua libre de nucleasas	7.2
Mix de reacción 2x	12.5
MVN1139-F	0.5
MVN1213-R	0.5
Sonda	0.5
ROX	0.05
Inhibidor de ARNsa	0.25
Enzima	0.5
RNA	2.5
total	24.5

ARNsa RP	
componente	Vol/rx (μL)
Agua libre de nucleasas	7.2
Mix de reacción 2x	12.5
HURNASE-P-F	0.5
HURNASE-P-R	0.5
Sonda	0.5
ROX	0.05
Inhibidor de ARNsa	0.25
Enzima	0.5
RNA	2.5
total	24.5

3. Abrir el programa del termociclador, para crear un nuevo documento (placa) basándose en el formato existente ("Plantilla Sarampión"); para ubicar en la misma posición las muestras y los controles en la placa del programa así como en la bitácora de trabajo.
4. Guardar el documento elaborado con el formato de fecha (dd/mm/aa) en la carpeta correspondiente.

Preparación de mezcla maestra de reacción.

1. Limpiar el área, y sacar del congelador los reactivos a utilizar, manteniéndolos en frío en un contenedor con cama de hielo.
2. Agregar a un tubo tipo eppendorf de 1.7 mL cada uno de los reactivos que conforman la mezcla maestra de reacción en base a la bitácora de trabajo realizada.
3. Agregar 22.5 μL de la mezcla maestra de reacción a cada tubo o pozo a utilizar.
4. Agregar 2.5 μL de agua calidad biología molecular al tubo o pozo que contendrá el control negativo de reactivos (NCT) y taparlo.
5. Pasar al área de adición de ARN los tubos o pozos que contienen la mezcla maestra de reacción evitando exponerlos al ambiente, para ello se deben trasladar en una caja limpia, cerrada y libre de ARNas y ADNas.

Adición de los ARN de muestras problemas y controles.

1. Limpiar el área.

2. Agregar 2.5 µL del ARN de la muestra problema a cada tubo/pozo siguiendo la ubicación de la bitácora de trabajo correspondiente, en primer lugar se agrega el ARN de la muestra problema, agregando al final los controles positivos y estándares (en caso de cuantificación). Al terminar de colocar una hilera, esta deberá de taparse usando las tiras de tapas. Se debe evitar el contacto directo de los guantes al momento de tapar.
3. Ingresar los tubos/pozos al termociclador, seleccionar en el programa el protocolo de amplificación ("Sarampión") e iniciar la corrida.

Análisis e Interpretación de los resultados.

Los valores de CT de las muestras y los controles se obtienen después de ajustar el valor del umbral (threshold). Este se ajusta sobre los valores de la fluorescencia emitidos por los controles NTC.

La interpretación de los resultados (CT) se hace a partir de la siguiente tabla:

Gen Viral (CT)	Gen de la <u>RNAsas P</u> (CT)	Resultado
< 40 ciclos	< 40 ciclos	Positivo
< 40 ciclos	Indeterminado	Positivo
Indeterminado	< 40 ciclos	Negativo
Indeterminado	Indeterminado	Muestra no adecuada

Criterios de aceptación o rechazo del ensayo.

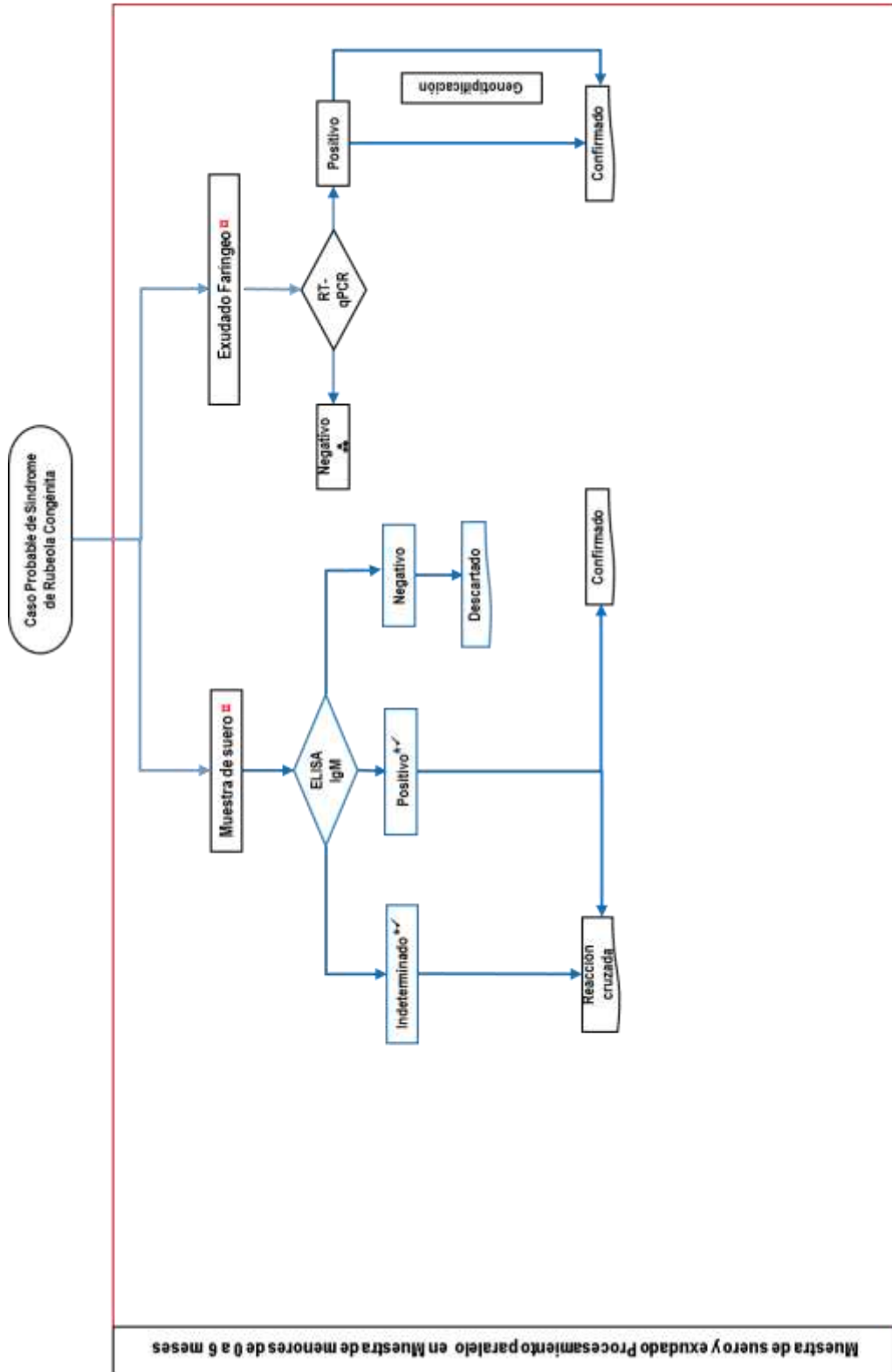
Los criterios se muestran en la siguiente tabla

Control	Valores de CT	Interpretación
NTC	Indeterminado	Valido
CN EXT	Indeterminado	Valido
\bar{X} CP bajo	Entre 29 a 35	Valido
\bar{X} CP alto	Entre 22 y 27	Valido
CP RP	Entre 26 y 30	Valido

Si alguno los controles no es válido, la prueba deberá repetirse.

Si se obtiene un resultado positivo, éste se deberá repetir desde el procedimiento de extracción.

Anexo III: Algoritmos de diagnóstico



* Diagnóstico diferencial paralelo, ✓ Envío al InDRE: Laboratorios liberados solicitar Servicio de Referencia. Laboratorios NO liberados solicitar Servicio de Control de Calidad. ** evaluar
 ■ Se deben enviar ambas muestras para realizar el diagnóstico.

[illegible]

InDRE
Noviembre 2018

Figura 5. Algoritmo para diagnóstico de Síndrome de Rubéola Congénita 6 a 12 meses

[illegible]

PLANTILLA DE RESULTADOS DE RT-qPCR DE RUBÉOLA AL INdRE									
ESTADO:	PERSONA QUE ENVIA LA INFORMACIÓN:								
FECHA DE CORTE:									
FOLIO PLATAFORMA DE EFE	NOMBRE DEL PACIENTE	FECHA DE TOMA	FECHA DE ENVIO AL LESP	FECHA DE RECEPCIÓN EN EL LESP	FECHA DE PROCESO	RUBÉOLA		FECHA DE EMISIÓN DE RESULTADOS	
						RESULTADO	CT GEN E1	CT RP	

Guía de pruebas de laboratorio en casos esporádicos de sarampión o rubéola

Técnicas	Situaciones		
	Situación 1	Situación 2	Situación 3
	Sarampión IgM positivo o indeterminado/ Rubéola IgM positivo o indeterminado	Sarampión IgM negativo o Rubéola IgM negativo El paciente cuenta con antecedente de viaje o contacto con visitantes extranjeros.	Sarampión IgM positivo Rubéola IgM positivo Paciente con aplicación de vacuna ≤ 30 días anteriores a la aparición de exantema.
ELISA IgG	Realizar a la primera y segunda muestra <ul style="list-style-type: none"> Elevación de tres veces la concentración entre la primera y segunda confirma el caso cuando se procesan en tiempos diferentes. Elevación de dos veces la concentración entre la primera y segunda confirma el caso cuando se procesan al mismo tiempo. 	Realizar a la primera y segunda muestra <ul style="list-style-type: none"> Elevación de tres veces la concentración entre la primera y segunda confirma el caso cuando se procesan en tiempos diferentes. Elevación de dos veces la concentración entre la primera y segunda confirma el caso cuando se procesan al mismo tiempo. 	NA
RT-PCR en tiempo real	Negativo: es necesario la revisión de los resultados de IgG, diagnóstico diferencial y avidez. Positivo: Se confirma el caso.	Negativo: es necesario la revisión de los resultados de IgG. Positivo: Se confirma el caso.	Positivo: Procede a la genotipificación en InDRE
ELISA diagnóstico diferencial	InDRE realizará el diagnóstico diferencial para otros virus exantemáticos.	NA	NA
Avidez IgG	InDRE realizará la prueba de avidez en muestras únicas.	NA	NA



1939 · 2019

AÑOS

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"