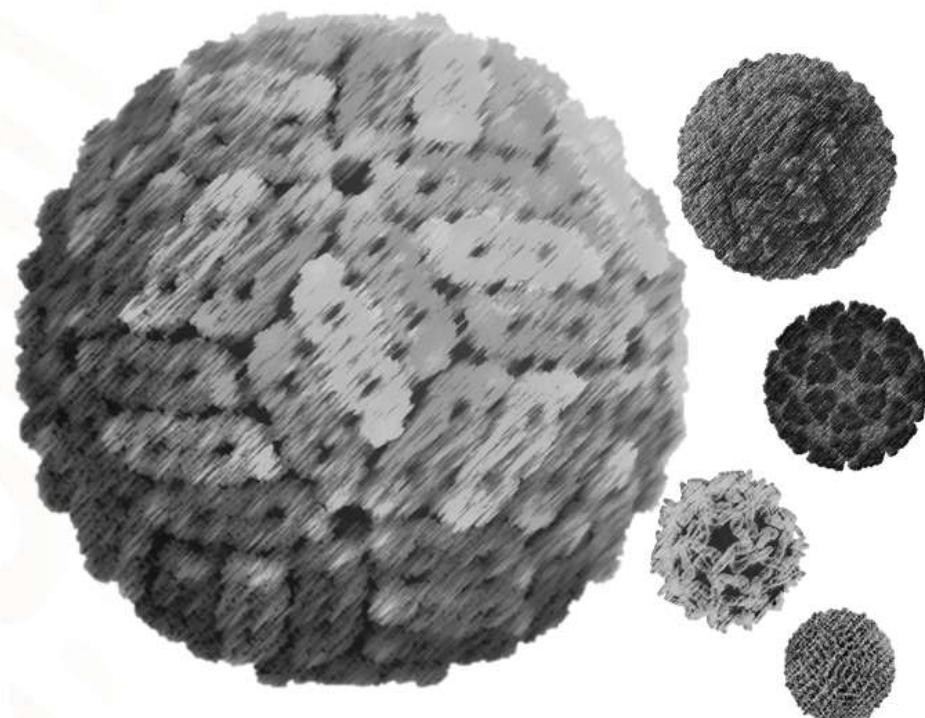
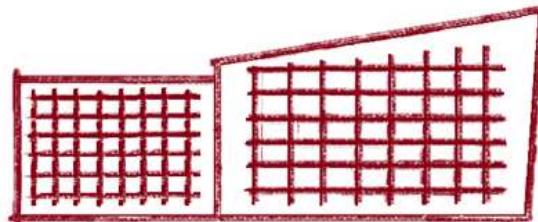




# Lineamientos de Vigilancia por Laboratorio

Dengue y otras arbovirosis

**80**1939-2019  
ISET-InDRE**InDRE**

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



# LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL DENGUE Y OTRAS ARBOVIROSES

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

**2019**

PRIMERA EDICIÓN. 2019

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: "INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ". LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL DENGUE Y OTRAS ARBOVIROSES, INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2019"

COLECCIÓN: PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

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, D. F. [www.gob.mx/salud](http://www.gob.mx/salud)

TEL. (55)50-62-16-00

EL DISEÑO Y EDICIÓN 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 CON [juan.roman@salud.gob.mx](mailto:juan.roman@salud.gob.mx) Y CON LA COORDINACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL DENGUE Y OTRAS ARBOVIROSES A TRAVÉS DEL CORREO: [mauricio.vazquez@salud.gob.mx](mailto:mauricio.vazquez@salud.gob.mx) CON EL ASUNTO: *CONTENIDO 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. Judith Estévez Ramírez**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

**Mtra. Mónica Salas García**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

**Dra. Gabriela Meneses Ruiz**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

## GRUPO DE TRABAJO

MTRO. MAURICIO VÁZQUEZ PICHARDO

JEFE DEL LABORATORIO DE ARBOVIRUS Y VIRUS HEMORRÁGICOS

COORDINADOR DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL DENGUE Y OTRAS ARBOVIROSES

QFB. CLAUDIA ROSALES JIMÉNEZ

QFB. ALMA NÚÑEZ LEÓN

QBP. ROSALBA PÉREZ MEZA

QFB. YANELLI ADRIANA TORRES OLmos

MTRA. MARÍA DE LA LUZ TORRES RODRÍGUEZ

TL. ADELA MONSEERRAT APARICIO ANTONIO

LIC. ROSA MARÍA HERRERA BAUTISTA

MTRO. DANIEL DURAN AYALA

QFB. CARLOS HUMBERTO FUENTES CUEVAS

MTRO. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA

BIÓL. IRMA LÓPEZ MARTÍNEZ

## A GRADECIMIENTOS

SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

CENTRO NACIONAL PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES, CENAPRECE

CENTROS PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES (CDC) DE SAN JUAN, PUERTO RICO,  
ATLANTA, GEORGIA Y FORT COLLINS, COLORADO

RED TEMÁTICA DE VIROSIS EMERGENTES – VIRORED

INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS DE CIUDAD DE PANAMÁ

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III DE MADRID, ESPAÑA

INSTITUTOS EVANDRO CHAGAS DE BELEN Y FIO CRUZ DE RIO DE JANEIRO BRASIL

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE LIMA, PERÚ

# CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	17
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	17
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Dengue y otras Arbovirosis	18
MARCO LEGAL	20
DEFINICIONES OPERACIONALES	22
Dengue .....	22
Chikungunya .....	24
Zika .....	24
Enfermedad de Fiebre del Oeste del Nilo.....	26
Fiebre Amarilla .....	26
OBJETIVOS	27
Objetivo General	27
Objetivos Específicos	27
RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL DENGUE Y OTRAS ARBOVIROSIS	27
Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Dengue y otras Arbovirosis	28
FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL DENGUE Y OTRAS ARBOVIROSIS	30
Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública	30
Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia	33
TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA	34

VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LAS COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA ENFERMEDAD POR VIRUS ZIKA	36
Recolección de la muestra	40
Conservación	40
Envío y transporte de la muestra	41
Criterios de aceptación y rechazo de muestras biológicas	42
ALGORITMO DE VIGILANCIA POR LABORATORIO	44
ESTÁNDARES DE CALIDAD EN EL SERVICIO	51
PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO	53
CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL DENGUE Y OTRAS ARBOVIROSES	57
BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE	58
BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS	63
Anexo I: Bioseguridad	63
Anexo II: Técnicas diagnósticas y preparación de reactivos	65
Anexo III: Vigilancia entomo-virológica mediante RT-PCR en tiempo real	76
Anexo IV: Imágenes de Portada	80

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial las enfermedades virales transmitidas por vector se catalogan como las de mayor impacto en Salud Pública. Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) cataloga a las Arbovirosis como problema prioritario en salud y en 1998 fueron consideradas como la décima causa de muerte por enfermedades infecciosas en el mundo.

El Dengue continúa siendo un problema de salud pública en la región de las Américas a pesar de los esfuerzos por parte de los Estados miembros para contener y mitigar el impacto de las epidemias. Es una enfermedad infecciosa, sistémica y dinámica. La infección puede cursar en forma asintomática o expresarse con un espectro clínico amplio que incluye expresiones graves y no graves. Después del período de incubación, la enfermedad comienza abruptamente y pasa por tres fases: febril, crítica y de recuperación. El Dengue requiere abordarse como una única enfermedad con presentaciones clínicas diferentes que van de estados benignos hasta evolución clínica severa y desenlaces que causan la muerte.

Existen cuatro serotipos del virus del Dengue (VDEN1, VDEN2, VDEN3, VDEN4) y cada uno de ellos concentra varios linajes y genotipos. Son Arbovirus pertenecientes a la familia *Flaviviridae*. La OMS estima que estos constituyen una amenaza para el 40% de la población mundial que habita en 112 países tropicales y subtropicales. Se considera que en la actualidad existen 50 millones de casos en todo el mundo, de los que aproximadamente 400,000 son casos graves y 25,000 fallecen a causa de esta enfermedad.

En el Continente Americano, el Dengue tuvo un surgimiento importante en los servicios de salud desde 1989, ya que el número de casos aumentó un 60% en comparación con el lustro anterior. En México es la principal enfermedad viral transmitida por vector.

El Dengue es una enfermedad febril, transmitida por el mosquito hembra hematófaga del género *Aedes* de las especies *aegypti* y *albopictus*, las principalmente involucradas en la transmisión. La enfermedad es de curso auto-limitado, incapacitante y con riesgo de complicaciones letales, esta se puede presentar como Dengue No Grave (DNG), Dengue con Signos de Alarma (DCSA) y Dengue Grave (DG)

Como resultado del movimiento poblacional, el cambio climático, la resistencia del vector a insecticidas y a la capacidad vectorial del mosquito para transmitir otros virus de importancia en salud pública, se identificó la

transmisión vectorial del virus chikungunya (VCHIK). Este ha sido considerado como emergente, ya que fue capaz de propagarse rápidamente en el Continente Americano desde el 2014.

VCHIK contiene también ARN como material genético, y pertenece al género Alfavirus de la familia *Togaviridae*. El nombre chikungunya deriva de una palabra en Kimakonde, del grupo étnico Makonde, tiene como raíz el verbo “kungunyala” y significa “aquel que se encorva” ya que describe la apariencia inclinada de las personas que padecen la característica y dolorosa artralgia. El virus se aisló de suero humano y de mosquitos a partir de una epidemia en Tanzania en 1952-1953. En Asia se aislaron cepas de VCHIK durante grandes brotes urbanos en Bangkok, Tailandia en la década de 1960, y en Calcuta y Vellore, India durante las décadas de 1960 y 1970.

Desde el año 2004 el VCHIK ha causado grandes epidemias de fiebre chikungunya (CHIK), provocando considerable morbilidad y discapacidad. Las epidemias atravesaron fronteras y mares, y el virus fue introducido en al menos 19 países por medio de viajeros que retornaban de áreas afectadas. La posibilidad de que el VCHIK se estableciera en las Américas aumentó y promovió el interés por desarrollar directrices para el diagnóstico, la prevención y el control de esta enfermedad en los Estados Miembros de la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

Desde entonces, el VCHIK ha causado brotes masivos y sostenidos en Asia y África, donde más de 2 millones de personas han sido infectadas, con tasas de hasta 68%. Debido al movimiento de viajeros, se registraron transmisiones a nivel intercontinental en áreas donde antes no se había encontrado el virus, como en el norte de Italia y el sur de Francia.

En 2006 y 2010 se detectaron 106 casos de CHIK probables y confirmados por laboratorio en viajeros que regresaban a Estados Unidos, en comparación a sólo tres casos reportados entre 1995 y 2005.

Existen en la actualidad tres genotipos del VCHIK conocidos como asiático, del Este de África y del Este -Centro-Sur de África (ECSA). Actualmente en América está circulando el genotipo asiático. Este se demostró por análisis nucleotídico del genoma completo, en el caso de México por el Instituto de diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) y por otras instituciones a nivel internacional.

Después de la picadura de un mosquito infectado con VCHIK, la mayoría de los individuos presentarán síntomas tras un período de incubación de tres a siete días (rango: 1-12 días), sin embargo, no todos los individuos infectados

desarrollarán síntomas. Estudios serológicos indican que entre el 3% y el 28% de las personas con anticuerpos tienen infecciones asintomáticas. Los individuos con infección aguda con manifestaciones clínicas o asintomáticas, pueden contribuir a la diseminación de la enfermedad si los vectores que transmiten el virus están presentes y activos en la misma zona.

El VCHIK puede causar enfermedad aguda, subaguda y crónica. La enfermedad aguda generalmente se caracteriza por inicio súbito de fiebre alta (típicamente superior a 39°C) y dolor articular severo. Otros signos y síntomas pueden incluir cefalea, dolor de espalda difuso, mialgias, náuseas, vómitos, poliartritis, rash y conjuntivitis. La fase aguda en promedio es menor a 5 días, pero puede durar de 3 a 10 días.

La enfermedad crónica se caracteriza por la persistencia de síntomas por más de tres meses. La frecuencia con que los pacientes reportan síntomas persistentes varía sustancialmente según el estudio y el tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y el seguimiento.

Por otro lado, la Arbovirosis que ha promovido el mayor reto en la Vigilancia Epidemiológica desde su introducción en la Región de las Américas, es la infección por virus Zika. Esta es causada por el virus del mismo nombre (VZIK), Flavivirus de la familia *Flaviviridae*.

El Zika, es transmitida por el mosquito *Aedes (aegypti y albopictus)* y consiste en exantema (principalmente maculo-papular), fiebre leve, cefalea, artralgias, mialgias, malestar general y conjuntivitis no purulenta que inicia entre tres a doce días después de la picadura del mosquito vector. Cuatro de cada cinco personas puede no desarrollar síntomas, pero en quienes son afectados la enfermedad es usualmente leve, con síntomas que pueden durar entre dos y siete días. La apariencia clínica es muchas veces similar a Dengue y Chikungunya.

Este virus fue aislado por primera vez en 1947 en el bosque de Ziika, cerca al Lago Victoria en Uganda (África). Desde entonces el virus se ha encontrado principalmente en África y Asia generando brotes pequeños y esporádicos. Durante 2007 una gran epidemia fue descrita en la Isla de Yap (Micronesia), donde cerca del 75% de la población resultó infectada. En febrero del 2014, el ministerio de Salud de Chile reportó un caso en la isla de Pascua. En mayo del 2015 ante los casos reportados por Brasil, la OMS emitió una alerta epidemiológica debido al aumento de los casos en dicho país. Durante septiembre de ese mismo año México reportó el primer caso importado de Colombia y en el mes de noviembre el primer caso autóctono, motivo por el

cual se agiliza y perfeccionan algoritmos de laboratorio y mecanismos de vigilancia y control del vector.

El VZIK es genética y antigenéticamente parecido al VDEN, lo que promueve reacciones serológicas cruzadas, favorecidas por componentes antigenéticos similares. Actualmente solo se conoce un genotipo de VZIK denominado asiático y en México el InDRE ha demostrado que es el responsable de las infecciones registradas en el país. Recientemente se ha identificado variabilidad genética que presume la aparición de nuevos linajes, que en un futuro pueden dar lugar a la aparición de nuevos genotipos.

Otro Arbovirus de importancia en salud pública en México es el virus del Oeste del Nilo (VON). Este pertenece al género flavivirus y al complejo antigenético de la encefalitis japonesa, también de la familia *Flaviviridae*. Es un virus de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de 11 Kb, que codifica tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales, característica específica de los flavivirus.

Su ciclo natural incluye la participación de aves silvestres y domésticas, migratorias y residentes, las cuales tienen el papel de reservorios y amplifican de manera eficiente las poblaciones virales. Los mosquitos ornitofílicos (en particular del género *Culex*) se alimentan de estas aves durante su tiempo de sueño.

Los seres humanos y otros mamíferos se consideran huéspedes incidentales y no son capaces de amplificar el virus (viremias bajas). La mayoría de los pacientes infectados (80%) no presenta síntomas, 20% desarrolla una fiebre muy similar a otras fiebres virales, como el Dengue y la influenza. Menos de 1% de los pacientes desarrolla síntomas neurológicos variables, desde una rigidez de nuca y desorientación hasta una parálisis flácida aguda, meningoencefalitis y muerte.

La Enfermedad de Fiebre del Oeste del Nilo (FON) es una enfermedad febril, neurotrópica y que puede ser grave cuando se ve afectado el sistema nervioso (Encefalitis del Nilo Occidental). La enfermedad leve (fiebre) o grave (encefalitis), es promovida por la infección por el virus del Oeste del Nilo (VON). Este virus es común en África, Europa, el Oriente Medio, América del Norte y Asia occidental.

Se identificó por primera vez en 1937 en una mujer febril en Uganda, al oeste del río Nilo. Los primeros casos de Fiebre asociada a encefalitis en seres humanos promovida por VON se notificaron en Israel en 1957 y desde entonces se han reportado epidemias en África, Europa y Medio Oriente. En 1999 se

reportó un brote de encefalitis en humanos en Nueva York, que coincidió con brotes en cuervos y aves exóticas con una elevada tasa de mortalidad. La llegada del VON al continente americano marcó la introducción de un virus al Nuevo Mundo, la cual ha sido identificada como la primera en la historia reciente.

Además de las aves también se han identificado equinos infectados con VON. Estos últimos presentan mayor sensibilidad al virus, según los informes del Centro para Prevención y Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC). En el estado de Texas la distribución de equinos infectados sobrepasa de manera muy evidente la de aves, mosquitos y por supuesto a la de los seres humanos.

En México los primeros seis casos registrados ocurrieron en 2003 afectando tres estados de la frontera norte (Chihuahua, Nuevo León y Sonora), estos fueron identificados mediante la técnica de MAC-ELISA. A partir de entonces solo se han identificado casos aislados, en 2004 en Sonora un caso, en 2006 uno en Chihuahua, en 2007 dos en Oaxaca y tres en Chihuahua, y en 2012 un caso más en Chihuahua, a partir de este año no se han identificado casos. Reportes más recientes incluyen la identificación de caballos, aves y mosquitos infectados. Hasta el momento hay registro solo de un caso confirmado en el LESP de Sonora y este caso representa el único aislado en México. La identificación por RT-PCR fue realizada por el Laboratorio de Arbovirus y virus hemorrágicos del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE).

En México, los estados fronterizos se mantienen alertas ante la posible detección de VON en humanos, equinos infectados, aves silvestres y especies de mosquitos vectores, ya que los estados de Texas y Luisiana de Estados Unidos de América han sido históricamente afectados por este. La Secretaría de Salud de México inició la vigilancia seroepidemiológica del VON desde el año 2003. Hasta la fecha ya se han registrado casos positivos en aves y equinos. En los últimos años, la Secretaría de Salud ha muestrado más de la mitad de los estados del país y todos los resultados fueron negativos con la técnica RT-qPCR (RT-PCR en tiempo real). Actualmente se registra la presencia de reacciones cruzadas con Dengue (mismo fenómeno que se observa entre Dengue, Zika, Fiebre Amarilla y demás flavivirus). Lo anterior promueve que la interpretación de los resultados positivos de serología para detección de anticuerpos IgM sean analizados de manera muy específica con al menos dos metodologías serológicas (comercial y MAC-ELISA) para confirmar los casos.

Actualmente la infección por un flavivirus que puede ser prevenible por vacunación es la Fiebre amarilla. Es una enfermedad hemorrágica, en la mayoría de los casos confirmados puede ser mortal. Se presenta de manera recurrente en África y en el Sur y Centro del Continente Americano.

Una vez infectada la persona por el virus y después de un período de incubación de 3 a 6 días, la enfermedad puede cursar en una o dos fases. La primera, con cuadro clínico caracterizado por presencia de fiebre, mialgias, dolor de espalda, cefalea, escalofríos, náuseas y vómito que desaparecen en 3 o 4 días.

En aproximadamente el 15% de los pacientes, se presenta una segunda fase tóxica a las 24 horas de la remisión inicial en donde vuelve la fiebre y se ven afectados diferentes sistemas orgánicos. El paciente presenta ictericia rápidamente, dolor abdominal y vómitos. Pueden presentarse hemorragias orales, nasales, oculares o gástricas. La función renal se deteriora. La mitad de los pacientes que presentan la fase tóxica mueren en un plazo de 10 a 14 días. La tasa de letalidad de éstos pacientes oscila entre 20 y 50%.

El cuadro clínico puede ser amplio, en el cual se considera desde fiebre, hasta daño grave a nivel hepático. Es transmitido por mosquitos del género *Aedes* y *Haemagogus*. Se conocen tres ciclos de transmisión: El selvático, intermedio y urbano. La identificación viral puede realizarse mediante RT-PCR en tiempo real o mediante aislamiento viral. La campaña de erradicación de la Fiebre Amarilla logró contener y eliminar la circulación del virus registrándose el último caso el 7 de febrero de 1923 en Pánuco, Veracruz. A pesar que se ha mejorado los programas de vacunación incrementando la cobertura en zonas endémicas, se siguen reportando casos esporádicos y brotes principalmente en América del Sur. En diciembre de 2016 se presentó un brote en Brasil que ha sido considerado el más importante desde la segunda década del siglo pasado. En Brasil, entre el 1 de julio de 2017 y el 15 de febrero de 2018 se notificaron 409 casos humanos confirmados de fiebre amarilla (incluidos 118 fallecidos), cifra inferior a lo reportado en el mismo período del año anterior (532 casos con 166 fallecidos). Al 2 de agosto del 2017, Perú confirmó 82 casos y Colombia 18.

Ante la dinámica poblacional y a la amplia distribución de vectores, la emergencia de diversos Arbovirus puede verse favorecida. Un virus que pertenece al género alfavirus y a la familia *Togaviridae*, que puede causar serios problemas de salud pública y que está muy relacionado filogenéticamente y antigenéticamente con VCHIK, es el virus Mayaro (VMAY). El

VMAY fue identificado en 1954 en Trinidad, pero hasta ahora sólo ha habido pequeños brotes aislados en la selva amazónica y otras partes de América del Sur como Brasil y Venezuela. Perteneces al complejo de "Semliki Forest virus". En septiembre del 2015 se identificó un caso autóctono en Haití, lo que sugiere una posible circulación activa en el Caribe y posiblemente en Centro América. Actualmente la vigilancia no es activa, pero se mantiene incluido dentro de la vigilancia diferencial que el LNR está realizando como parte de las actividades proactivas en la búsqueda de otros Arbovirus, en donde se incluyen metodologías de RT-PCR en tiempo real y RT-PCR punto final para familia Flavivirus y Alfavirus.

El presente documento establece los lineamientos de operación para la vigilancia epidemiológica del Dengue y otras Arbovirosis basada en laboratorio y la implementación del nuevo algoritmo de laboratorio. La descripción de los lineamientos incluye funciones y responsabilidades por nivel, toma, manejo y envío de muestras, así como las metodologías para el análisis de muestras, evaluación del desempeño, banco de material biológico y los estándares de calidad.

## ANTECEDENTES

### Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

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

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

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

A nivel nacional está representado por el InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).

Tiene fundamento legal en la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica y se encuentra definida en los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente, Vigilancia Epidemiológica.

En la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública se cuenta con el diagnóstico de Dengue, Chikungunya y Zika.

### **Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Dengue y otras Arbovirosis**

En 1995 en México se conformó la Red para el Diagnóstico de Dengue, integrada por siete Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP). A partir de ese año el Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos (LARB) del InDRE, desarrolla y promueve acciones de aseguramiento de la calidad, promueve la mejora continua en el desempeño técnico y ha ofrecido a la RNLSP cursos de capacitación, capacitaciones en servicio, supervisiones y asesorías, incluyendo el apoyo con personal altamente capacitado, equipo, insumos y en caso de emergencias epidemiológicas y desastres, se han incluido laboratorios móviles para una oportuna vigilancia molecular y serológica (Huracán Odile, 2015 y Sismos Oaxaca, 2017).

Desde 1999 el LARB inició un programa de control de calidad en el que la RNLSP enviaba al InDRE el 100% de las muestras positivas y 10% de las muestras negativas para Dengue, con la finalidad de identificar áreas de oportunidad y brindar resultados del diagnóstico diferencial.

En el 2002 la RNLSP se incorporó al Programa Caminando a la Excelencia para evaluar el desempeño de los LESP. Esta es una parte importante del sistema de calidad y tiene como objetivo promover la calidad analítica entre los laboratorios, ayudando a identificar áreas de oportunidad y estimular el mejor desempeño de los mismos, respecto a los programas prioritarios de la salud para fomentar su desarrollo. En el año 2003 se inició la evaluación del desempeño para el diagnóstico serológico de Dengue mediante el envío de paneles de eficiencia y se estableció únicamente el envío al InDRE de muestras probables de Fiebre Hemorrágica por Dengue o Dengue Grave para control de calidad o en su caso muestras con serotipo no identificado en los últimos años en el estado.

A finales del año 2006, apareció una alternativa analítica en formato de ELISA más fácil, rápida y oportuna para aplicar en los primeros días de evolución de la enfermedad. Esta técnica se basa en la identificación de la glicoproteína no estructural 1 del virus Dengue (NS1), implicada en los procesos de replicación viral, la cual es secretada de manera soluble, lo que permite su detección en la muestra de suero en fase aguda de la enfermedad. Esta técnica tiene documentada una sensibilidad entre el 80-100% (dependiente del serotipo y genotipo responsable de la infección, además de la presencia de altas concentraciones de anticuerpos IgM o IgG) y una especificidad de 100%.

Durante abril del 2008 el Laboratorio de Arbovirus y virus hemorrágicos implementó un nuevo algoritmo de diagnóstico que incluía la detección de antígeno NS1 en formato de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), metodología que es aplicable únicamente en muestras obtenidas durante la fase aguda de la enfermedad. Los resultados positivos de esta metodología han sido aprovechados para realizar la vigilancia virológica (tipificación del virus) en un porcentaje de muestras mediante la Prueba de Retro-transcripción y de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en tiempo real.

En marzo de 2010, el Laboratorio de Arbovirus y virus hemorrágicos del InDRE capacitó al personal de 28 laboratorios estatales que conformaban la RNLSP para dar a conocer el protocolo “Detección y Serotipificación de Virus Dengue Mediante RT-PCR Multiplex en tiempo real” validado por el CDC División Dengue (CDC-Dengue Branch) de San Juan, Puerto Rico, con la finalidad de que cada LESP realice la vigilancia virológica en su estado.

El seguimiento a la implementación de esta metodología se realizó mediante la aplicación de una cédula. Durante el 2011 fueron 15 los LESP que iniciaron la etapa de control de calidad para RT-qPCR para Dengue. A partir de 2012 se incorporaron seis LESP más a la Red Nacional de Laboratorios para el Diagnóstico molecular de Dengue. Actualmente se cuenta con 31 LESP con liberación molecular para la detección de VDEN.

En julio de 2012 la evaluación del desempeño se actualizó y mejoró, al implementar paneles algorítmicos que evalúan de manera integral el desempeño de cada LESP con respecto al algoritmo de diagnóstico vigente. A partir de 2013 fueron incluidos los paneles algorítmicos únicos “SMART-ONLY-DEN”, debido a la introducción de nuevos Arbovirus y a la fortaleza demostrada por la RNLSP.

En 2015 se implementó un nuevo panel de evaluación el cual incluye la identificación molecular de VCHIK mediante RT-qPCR y detección serológica de anticuerpos IgM específicos mediante estuche comercial de ELISA avalado por OMS/OPS/CDC, el cual fue evaluado en InDRE. Dicho panel se nombró “SMART-ONLY-ARBO”, para el 2016, incluye la evaluación de la detección molecular de VZIK mediante RT-qPCR y en 2017 se implementa el panel con detección simultánea de VDEN, VCHIK y VZIK mediante RT-qPCR y detección de anticuerpos IgM anti Zika mediante IFI y ELISA. Ante la actualización constante a partir de julio del 2018 se informa de una nueva actualización que incluye la incorporación de ELISA IgM de captura para VDEN y VZIK, lo que propone dar de baja la IFI (Tamiz) y ELISA (confirmación). La aplicación de dicho algoritmo aplicará exclusivamente para fase convaleciente en casos probables de DCSA, DG, mujeres embarazadas y seguimiento a recién nacidos (RN) con malformaciones congénitas respectivamente.

Actualmente en apoyo a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Dengue y otras Arbovirosis (RNLSP) se promueve el envío de material, que incluye el envío de controles positivos sintéticos o cepas inactivadas producidas en InDRE para validar corridas de RT-qPCR para la identificación de los diferentes Arbovirus que se incluyen en la vigilancia virológica. El Laboratorio Central de Epidemiología (LCE) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) cuenta con el reconocimiento a la competencia técnica como Laboratorio de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE), para el diagnóstico molecular y serológico de Dengue, Chikungunya y Zika.

## MARCO LEGAL

### Constitución de los Estados Unidos Mexicanos

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

### Leyes

- Ley General de Salud, México. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Última reforma publicada DOF 11/05/2018.

- Ley Federal de Responsabilidades de los Servidores Públicos. D.O.F. 13/03/2012. Última reforma en D.O.F. 18/07/2016.
- Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción; la Ley General de Responsabilidades Administrativas, y la Ley Orgánica del Tribunal Federal de Justicia Administrativa. D.O.F 18/07/2016.
- Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados. D.O.F. 26/01/2017.

## Reglamentos

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

## Normas Oficiales Mexicanas

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.
- Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
- 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.
- 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.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

## Planes y Programas

- Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024.

## Lineamientos y Manuales

- Dirección General de Epidemiología. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector. DGAE. México: Secretaría de Salud; 2019.
- 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, InDRE. México: Secretaría de Salud; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2018.
- Secretaría de Salud, Manual metodológico Caminando a la Excelencia. México 2019.

## DEFINICIONES OPERACIONALES

Para realizar las acciones de vigilancia epidemiológica del Dengue, Chikungunya, Zika, Fiebre del Oeste del Nilo, y Fiebre Amarilla, se deben considerar las definiciones de caso vigentes en la versión actualmente disponible del Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector.

### Dengue

**Caso probable de Dengue No Grave (DNG):** Toda persona de cualquier edad que resida o que proceda, en los 14 días previos al inicio de signos y síntomas, de una región donde exista transmisión de la enfermedad y que presente fiebre y dos o más de los siguientes signos y síntomas:

- Náusea, vómitos, exantema;
- Mialgias, artralgia;

- Cefalea, dolor retro-ocular;
- Petequias o prueba del torniquete positiva;
- Leucopenia.

En menores de 5 años, el único signo a considerar es la fiebre. Todos los casos probables se deben registrar en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SiNaVE).

**Caso confirmado de Dengue No Grave:** Todo caso probable de DNG en el que se confirme infección reciente por Dengue virus mediante técnicas de laboratorio reconocidas por el InDRE.

**Caso probable de Dengue con Signos de Alarma (DCSA):** Todo caso probable que además de cumplir con cuadro de DNG presente uno o más de los siguientes signos de alarma:

- Dolor abdominal intenso y continuo, o dolor a la palpación del abdomen;
- Vómito persistente o incoercible;
- Acumulación de líquidos (ascitis, derrame pleural, pericárdico);
- Sangrado de mucosas;
- Letargo o irritabilidad;
- Hipotensión postural (Lipotimia);
- Hepatomegalia mayor de 2 cm;
- Aumento progresivo del hematocrito;
- Disminución progresiva de plaquetas;
- Disminución progresiva de la hemoglobina.

Ante la presencia de un signo de alarma identificado en el primer nivel de atención, el paciente deberá ser enviado de manera inmediata al segundo nivel para su atención y se deberá tomar muestra al 100% de los casos.

**Caso confirmado de Dengue con Signos de Alarma:** Todo caso probable de DCSA en el que se confirme infección reciente por virus de Dengue mediante técnicas de laboratorio avaladas por el InDRE.

**Caso probable de Dengue Grave (DG):** Todo caso probable de Dengue que presenta uno o más de los siguientes hallazgos:

- Choque debido a extravasación grave de plasma evidenciado por: taquicardia, extremidades frías y llenado capilar igual o mayor a tres segundos, pulso débil o indetectable, presión diferencial convergente  $\leq 20$  mm hipotensión arterial en fase tardía, acumulación de líquidos que conlleve a insuficiencia respiratoria.
- Sangrado grave, según la evaluación del médico tratante (ejemplos: hematemesis, melena, metrorragia voluminosa, sangrado del sistema nervioso central).

- Compromiso grave de órganos tales como: daño hepático importante (AST o ALT>1000), afección renal, sistema nervioso central (alteración de la conciencia), corazón (miocarditis) u otros órganos.

**Caso confirmado de Dengue Grave:** Todo caso probable en el que se confirme infección reciente por virus de Dengue mediante técnicas de laboratorio reconocidas por el InDRE.

**Caso descartado de Dengue:** Todo caso probable en el que no se confirme infección reciente por virus de Dengue mediante técnicas de laboratorio reconocidas por el InDRE.

### Chikungunya

**Caso probable de Fiebre Chikungunya:** Toda persona que presente cuadro febril agudo más la presencia de poliartralgias severas (incapacitantes) o artritis de comienzo agudo y que se identifique alguna asociación epidemiológica:

- Presencia del vector *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*.
- Antecedente de visita o residencia en áreas de transmisión en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico.
- Existencia de casos confirmados en la localidad.

En menores de 5 años, el único signo a considerar puede ser la fiebre.

**Caso confirmado de Fiebre Chikungunya:** Todo caso probable con resultado positivo a virus Chikungunya mediante alguna de las siguientes pruebas de laboratorio específicas reconocidas por el InDRE:

- Detección de ARN viral mediante RT-PCR en tiempo real en muestras de suero tomado en los primeros cinco días de inicio de la fiebre.
- Detección de anticuerpos IgM en muestra de suero a partir de sexto día y hasta el día 12 de iniciada la fiebre.

**Caso descartado:** Todo caso en el que no se demuestre evidencia de la presencia de algún marcador serológico o virológico para virus Chikungunya por técnicas de laboratorio reconocidas por el InDRE.

### Zika

**Caso probable de Enfermedad por el Virus del Zika:** Paciente que presente exantema (generalmente maculopapular y pruriginoso) y al menos dos o más de los siguientes signos o síntomas:

- Fiebre;

- Cefalea;
- Conjuntivitis (no purulenta/hiperemia);
- Artralgias;
- Mialgias;
- Edema periarticular;
- Prurito;
- Dolor retroocular; y además se identifique alguna asociación epidemiológica:
  - Presencia del vector *Aedes aegypti* o *albopictus*, o
  - Antecedente de visita o residencia en áreas de transmisión en la últimas dos semanas previas al comienzo del cuadro clínico, o
  - Existencia de casos confirmados en la localidad.
  - Tenga antecedente de contacto sexual sin protección en las 2 semanas previas a la aparición de los síntomas, con una persona que en las 8 semanas previas al contacto sexual tenga antecedentes de residencia o viaje a un área con transmisión local del VZIK o con presencia de vectores.

**Caso probable en mujeres embarazadas de Enfermedad por el Virus del Zika:**  
 Toda mujer embarazada que presente dos o más de los siguientes signos o síntomas: fiebre, exantema, conjuntivitis (no purulenta), cefalea, mialgias, artralgias o dolor retroocular, edema periarticular, prurito y que se identifique alguna asociación epidemiológica:

- Presencia del vector *Aedes aegypti* o *albopictus*, o
- Antecedente de visita o residencia en áreas de transmisión en la últimas dos semanas previas al comienzo del cuadro clínico, o
- Existencia de casos confirmados en la localidad.
- Tenga antecedente de contacto sexual sin protección en las 2 semanas previas a la aparición de los síntomas, con una persona que en las 8 semanas previas al contacto sexual tenga antecedentes de residencia o viaje a un área con transmisión local del VZIK o con presencia de vectores.

**Caso confirmado de Enfermedad por el Virus del Zika:** Todo caso probable con resultado positivo a VZIK mediante la detección de ARN viral mediante RT-PCR en tiempo real en muestras de suero tomado en los primeros cinco días de inicio del cuadro clínico.

*En seguimiento a casos de Síndrome de Guillain-Barré (SGB) asociados a Zika, positivos mediante RT-PCR en tiempo real, en muestras especificadas desde el inicio de la parálisis hasta el día 17. Las muestras idóneas son la orina y saliva.*

## Enfermedad de Fiebre del Oeste del Nilo

### Caso probable de Encefalitis del Oeste del Nilo: Formas Neurológicas

- **Caso probable:** Toda persona que presenta un cuadro clínico de fiebre y manifestaciones neurológicas (meningitis o encefalitis), con resultados de LCR compatibles con infección viral y que se identifique alguna asociación epidemiológica:
  - Presencia del vector;
  - Antecedente de:
    - Visita o residencia en áreas de transmisión en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico.
    - Existencia de casos confirmados en la localidad.
    - Existencia de diagnósticos confirmados en animales de la localidad.

**Caso confirmado.** Todo caso probable con resultados positivos a virus del Nilo Occidental mediante técnicas específicas reconocidas por el InDRE.

**Caso descartado.** Todo caso probable en quien no se detecta la presencia del virus del Nilo Occidental por las técnicas específicas reconocidas por el InDRE.

### Caso probable de Enfermedad de Fiebre del Oeste del Nilo: Formas No Neurológicas.

En localidades en las que se confirme un caso en humanos o la circulación del virus en animales, se establecerá el diagnóstico diferencial de Virus del Nilo Occidental en un 10 % de los casos negativos a Dengue con el fin de poder identificar formas no graves del padecimiento.

*El porcentaje seleccionado para análisis de diagnóstico diferencial a partir de los casos descartados de Dengue, debe realizarse en coordinación con epidemiología estatal.*

## Fiebre Amarilla

**Caso sospechoso:** Toda persona procedente de zona con transmisión de virus de Fiebre Amarilla (casos en humanos, epizootias o de aislamiento viral en el vector) sin antecedente vacunal contra este virus y que presente fiebre de inicio agudo, acompañado de dos o más de los siguientes signos o síntomas: mialgias, cefalea, ictericia, náusea o vómito, dolor abdominal o hemorragias.

**Caso confirmado:** Todo caso sospechoso en el que se demuestre infección reciente a virus de la Fiebre Amarilla mediante técnicas de laboratorio reconocidas por el InDRE.

**Caso descartado:** Todo caso sospechoso en el que no se demuestre mediante técnicas de laboratorio reconocidas por el InDRE la presencia de virus de Fiebre Amarilla

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Establecer y dar a conocer a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Dengue y otras Arbovirosis (RNLSP), los procedimientos estandarizados de diagnóstico, control de calidad y referencia de las muestras, para un diagnóstico y de calidad, que garantice un resultado oportuno en el SiNaVE.

### Objetivos Específicos

- Garantizar la calidad del diagnóstico del Dengue y otras Arbovirosis.
- Ser el documento guía para el soporte técnico-científico de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Dengue y otras Arbovirosis dentro del SiNaVE.

### 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 del Dengue y otras Arbovirosis.

## RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL DENGUE Y OTRAS ARBOVIROSES

El Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos del InDRE como LNR a nivel federal, es responsable de la coordinación de la RNLSP, siendo el órgano

rector de la Red para el diagnóstico, referencia, capacitación, actualización y evaluación de la competencia técnica.

Actualmente apoya a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Dengue y otras Arbovirosis, promueve el envío de material de referencia, por ejemplo el envío de muestras caracterizadas para validar corridas de RT-qPCR para la identificación de los diferentes Arbovirus que se incluyen en la vigilancia virológica y fortalece los procesos de Vigilancia Epidemiológica basada por Laboratorio mediante investigación operativa, basados en gestión de la calidad y gestión de riesgo biológico.

El LNR interacciona con los LESP, y éstos a su vez, son los enlaces funcionales entre los laboratorios del nivel jurisdiccional o local y el nivel federal. En la figura 1 se muestra la direccionalidad que debe seguir el flujo de información, muestras y resultados en el SiNaVE, desde el nivel federal hasta el componente local.

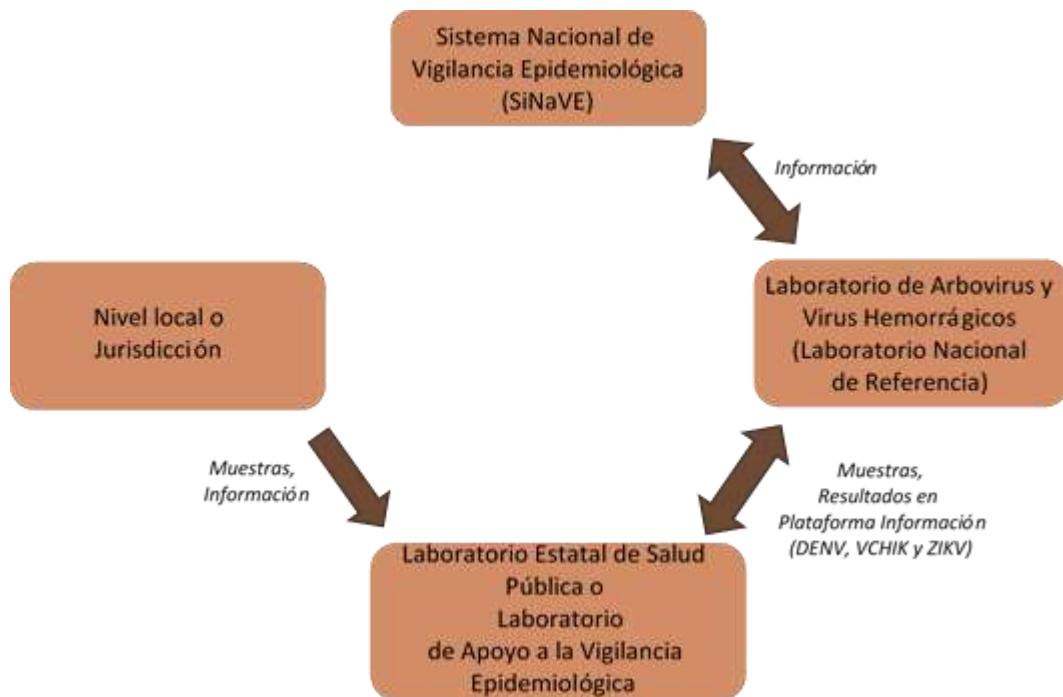


Figura 1. Flujo de trabajo e información entre los niveles nacional, estatal y local.

Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Dengue y otras Arbovirosis

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Dengue y otras Arbovirosis está constituida por:

- El Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos del InDRE como LNR.

- Los 31 Laboratorios Estatales de Salud Pública y
- El Laboratorio Central de Epidemiología del IMSS como LAVE

El LNR establece a través de los “Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio del Dengue y otras Arbovirosis” el marco normativo de la RNLSP para el diagnóstico por laboratorio de infecciones por virus Dengue, Chikungunya y Zika en México, además de virus del Oeste del Nilo y Fiebre Amarilla.

Actualmente se cuenta con una red de Arbovirosis que contempla la vigilancia de infecciones por los cuatro serotipos de virus dengue, infecciones por virus chikungunya e infecciones por virus Zika. Los LESP de Chiapas, Chihuahua, Jalisco, Nuevo León, Sonora y Tamaulipas, tienen la capacidad analítica para detectar VON mediante RT-PCR en tiempo real. El LNR cuenta con las metodologías para la detección e identificación de VON y del virus de fiebre amarilla, también cuenta con las metodologías para realizar la vigilancia mediante RT-PCR en tiempo real para el virus de la encefalitis del Este, encefalitis del Oeste, encefalitis de San Luis, encefalitis de Venezuela y últimamente se incorporó a la vigilancia por laboratorio el VMAY. La detección de otros Arbovirus se lleva a cabo mediante PCR de familia (FLAVI y ALFA), metodologías que son incorporadas como herramienta de búsqueda mediante los servicios de investigación operativa y encuesta incorporados en el LNR.

Los estados que cuentan con las metodologías liberadas cumplieron con los parámetros de concordancia requeridos por el Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos (promedio de 95% de concordancia en fase de control de calidad y en paneles de evaluación externa del desempeño). La fase de control de calidad, incluye un nuevo análisis que permite tener evidencias trazables para cumplir con las nuevas indicaciones para la implementación y liberación de nuevas metodologías. Esta información incluye el envío vía electrónica de evidencia del proceso de implementación. El LESP de Tlaxcala en el mes de julio del 2017 recibió la liberación de metodologías de RT-PCR para la vigilancia molecular de Arbovirus. Aunque es un estado que aún no tiene presencia de mosquitos vectores, es necesario contar con ella para cualquier contingencia o diagnóstico oportuno de casos importados.

La misma situación se presenta en el laboratorio de la Ciudad de México, el proceso de verificación de instalaciones e implementación de metodologías se está realizando actualmente. Esto último permitirá que dichos estados identifiquen sus áreas de oportunidad y emitan acciones a realizar. Una vez que un LESP obtenga la liberación tendrán habilitados los métodos analíticos y las herramientas para poder utilizarlos ante cualquier contingencia y durante la vigilancia de rutina.

Todos los LESP y LAVE que cuentan con las técnicas diagnósticas serológicas y moleculares liberadas, también deben realizar las gestiones necesarias con el programa de vectores estatal para activar la vigilancia intencionada directamente en mosquitos trasmisores de virus (vigilancia entomo-virologica). Esta última debe ser realizada en completa coordinación con el InDRE (Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos y el Laboratorio de Entomología del InDRE y el Laboratorio de entomología del LESP) y el Programa de Control de Vectores Nacional y Estatal. (Anexo III)

## **FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL DENGUE Y OTRAS ARBOVIROSIOS**

### **Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública**

#### **Para el diagnóstico**

- Realizar procesos analíticos para la detección de infecciones causadas por Dengue y otros Arbovirus de acuerdo a este documento.
- Asegurar la calidad del diagnóstico en el laboratorio, mediante los procedimientos, métodos y técnicas que el LNR promueve.
- Emitir en tiempo y forma los resultados de los exámenes de laboratorio, incluyendo la captura en plataforma de ETV, de la fecha de recepción y el folio asignado en el laboratorio, en cuanto se reciba la muestra. Así como el rechazo correspondiente cuando aplique.
- Referir muestras de calidad al InDRE en caso de solicitar cualquier servicio de diagnóstico, referencia y control de calidad. En caso de enviar muestras para la justificación de investigación operativa o encuestas, se debe notificar con antelación vía correo electrónico y como respuesta a la solicitud realizada por el LNR.
- Generar evidencia y notificar inmediatamente al órgano normativo estatal y/o nacional los casos confirmados y descartados, por las vías establecidas (plataforma de ETV e informes si se requieren).
- Participar como mecanismo de apoyo técnico, proporcionando la información relacionada y requerida por el programa sustantivo del área de su competencia.

- Recibir y resguardar las muestras de las jurisdicciones y cuanto aplique (el tiempo de resguardo debe ser tomado en cuenta para cumplir con los tiempos de tránsito que son máximo de 15 días naturales), de redes de apoyo (laboratorios de apoyo al SiNaVE). Se reconocen a estos últimos como los laboratorios clínicos, de investigación y de referencia, públicos y privados de todo el país que realizan exámenes en muestras humanas, de animales y ambientales relacionadas con enfermedades infecciosas y no infecciosas sujetas a vigilancia epidemiológica.
- Realizar semanalmente el análisis de la información (recepción de muestras) en el ámbito estatal durante la temporada de mayor circulación y mensualmente durante la temporada de menor circulación, con la finalidad de verificar que no se rebase la capacidad instalada.
- Proporcionar datos mediante informes, notas informativas o reportes para que sea difundida a las instancias estatales y nacionales correspondientes contribuyendo a la vigilancia epidemiológica estatal y nacional de manera veraz y oportuna.
- No emitir resultados vía telefónica.
- Supervisar lo referente a los equipos asignados al laboratorio conforme a lo establecido en los documentos autorizados y manuales de operación correspondientes para el aseguramiento de la calidad de los procesos.
- Gestionar y promover la capacitación continua del personal operativo y replicar todo conocimiento adquirido por cualquier instancia, además de generar la evidencia pertinente.
- Enviar al LNR el primer día hábil del mes en el formato correspondiente y establecido por el LESP, el número de muestras negativas que se procesaron en el LESP para diagnóstico diferencial de acuerdo al algoritmo descrito en este documento.
- En caso de obtener un resultado positivo en el diagnóstico diferencial es responsabilidad del laboratorio la notificación vía telefónica y por correo electrónico en menos de 24 hrs al LNR, a la DDYR y al área de vigilancia epidemiológica que remitió la muestra para diagnóstico.
- Notificar oportunamente a través de un comunicado oficial a las partes interesadas, vigilancia estatal y federal, programa de vectores estatal y federal, al LNR y al CEVE sobre el desabasto de insumos, para discutir al interior de este último la suspensión o disminución de la toma de

muestras. Cualquiera que sea la decisión deberá notificarse vía oficial al LNR, epidemiología y programa de vectores federal, con copia de la minuta de reunión en donde se registra la decisión acordada al interior del CEVE como una medida temporal.

- Notificar oportunamente a través de un comunicado oficial a vigilancia estatal y federal, programa de vectores estatal y federal, y al LNR del ajuste en las localidades para el porcentaje de tipificación para VDEN en los casos de DNG y DCSA, dependiendo de la existencia de insumos en el LESP.

Para la evaluación del desempeño

- Referir muestras del banco de sueros al InDRE para mantener los paneles de eficiencia del Programa de Evaluación Externa del Desempeño, además de solventar las evaluaciones de estuches comerciales serológicos y moleculares (ver apartado de banco de material biológico).

Para el Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED)

- Participar en la evaluación del desempeño del InDRE, a través de los programas oficiales correspondientes.
- Realizar la evaluación del desempeño en los componentes de Dengue y otras Arbovirosis a los laboratorios locales.
- Generar la evidencia de la evaluación para la red local y enviar los resultados al laboratorio evaluado y copia al InDRE.
- Organizar la información de estas actividades y proporcionarla cuando sea requerida por las instancias evaluadoras.

Para la capacitación

- Capacitar al personal de los laboratorios jurisdiccionales o locales del Sector Salud y personal de salud que lo soliciten en su entidad de acuerdo con las necesidades detectadas en la técnica de toma, manejo, envío de muestras del diagnóstico de Dengue y otras Arbovirosis.
- Es responsabilidad del LESP brindar la capacitación técnica y la inducción al puesto correspondiente al personal de nuevo ingreso o de

cambio de adscripción que estará vinculado a los procesos de Vigilancia de Arbovirus y generar la evidencia necesaria.

Para el apoyo técnico

- Colaborar o elaborar trabajos de investigación operativa que proporcione información prioritaria estatal, una vez que los protocolos sean aceptados por los comités de ética e investigación.
- Participar en la elaboración y actualización de los manuales técnicos referentes a diagnóstico y temas especializados (bioseguridad, manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos, etc.) para uso en el ámbito estatal y local.

### Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia

El Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos del InDRE como LNR, es el órgano normativo para el diagnóstico del Dengue y otras Arbovirosis en México y tiene las siguientes funciones:

- Coordinar las actividades de la RNLSP.
- Establecer la normatividad referente a las técnicas de diagnóstico del Dengue y otras Arbovirosis en México.
- Reglamentar los criterios de interpretación de resultados, que permitan generar resultados confiables para la toma oportuna de decisiones.
- Proporcionar servicios confiables de diagnóstico, referencia y control de calidad de infecciones por VDEN, VCHIK y VZIK, y otros Arbovirus dentro de los estándares de servicio indicados.
- Realizar el control de calidad de la RNLSP mediante la ejecución del Programa de Evaluación Externa del Desempeño y la supervisión directa e indirecta.
- Revisar y actualizar los algoritmos de diagnóstico y referencia, que incluyan la incorporación de metodologías de vanguardia para el diagnóstico de rutina y el diagnóstico diferencial de infección por Arbovirus.
- Monitorear el desempeño de la RNLSP mediante la supervisión directa y la supervisión indirecta por medio de la aplicación de los paneles de eficiencia y el control de calidad.

- Supervisar la oportunidad en la captura de la fecha de recepción de muestras/folio laboratorio y fecha de resultado o rechazo en Plataforma de ETV.
- Realizar capacitación en el servicio (cuando sea identificada la necesidad) para la formación de recursos humanos altamente capacitados en el diagnóstico por laboratorio de DEN, CHIK, ZIK y otros Arbovirus. Todas las capacitaciones que se realicen serán dirigidas únicamente al personal que avale el perfil requerido y tendrán las modalidades que mejor se ajusten al cumplimiento de los objetivos (capacitaciones en el LESP o en el LNR).
- Realizar, desarrollar y coordinar la investigación operativa y el avance tecnológico de manera eficaz, en apoyo al SiNaVE.
- Realizar el análisis de algunas muestras que otros laboratorios de la RNLSP no puedan realizar de manera permanente o transitoria. Lo anterior aplica únicamente bajo solicitud y previa autorización a la Dirección de Diagnóstico y Referencia del InDRE; si cuenta con liberación diagnóstica y envía sus muestras para diagnóstico al InDRE este les será cobrado y no podrá ser incluido en el SIS, ya que no lo realizó el laboratorio RNLSP.
- No emitir resultados vía telefónica.

## TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA

Para la vigilancia por laboratorio de Dengue y otras Arbovirosis, es necesario contar con muestras e información de calidad, respetar los días de evolución que apliquen para cada técnica y cumplir las definiciones operacionales de caso vigentes.

Para la vigilancia de las Arbovirosis dentro del Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Vector (Dengue, Chikungunya, Zika, Fiebre del Oeste del Nilo, Fiebre Amarilla) las muestras de suero en fase aguda (0 a 5 días a partir de la fecha de inicio de síntomas) o de otras Arbovirosis (Encefalitis de San Luis, Encefalitis Equina Venezolana, Encefalitis Equina del Este, Encefalitis Equina del Oeste, Fiebre por virus Mayaro) se siguen las mismas especificaciones:

- **Suero/fase aguda – hasta cinco días de evolución:** Obtener 5 mililitros de sangre total por venopunción en tubos de polipropileno tipo “Vacutainer ®” sin anticoagulante con gel separador. Una vez tomada la muestra, reposar en una gradilla a temperatura ambiente y después dejar el tubo en refrigeración (2 a 8 °C) durante dos horas para permitir la retracción del coágulo. Centrifugar a 3,000 r.p.m durante 10 min.

En la Tabla 1 se describen otros tipos y características de muestras según el diagnóstico y servicio solicitado.

**Tabla 1. Tipo de muestra según el diagnóstico y servicio solicitado**

DIAGNÓSTICO/ SERVICIO	TIPO DE MUESTRA Y TOMA / FASE DE LA ENFERMEDAD
<b>VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA ACTIVA</b> (Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector)	
<b>FASE AGUDA:</b>	
Toma de muestras hasta 5 días a partir de la fecha de inicio de síntomas	
Dengue, Chikungunya, Zika y Fiebre Amarilla	<p><b>Suero / fase aguda- hasta cinco días de evolución (RT-qPCR):</b> Obtener 5 mililitros de sangre total por venopunción en tubos de polipropileno tipo “Vacutainer ®” sin anticoagulante con gel separador. Una vez tomada la muestra, dejar el tubo en refrigeración (2 a 8 °C) durante dos horas para permitir la retracción del coágulo. Centrifugar a 3,000 r.p.m durante 10 min. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p>
Otras Arbovirosis (Fiebre del Oeste del Nilo)	<p><b>LCR / fase aguda – hasta cinco días de evolución (RT-qPCR):</b> Obtener 1 mililitro por punción lumbar, realizada por personal calificado. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p> <p><b>Suero / fase aguda - hasta cinco días de evolución (RT-qPCR):</b> Obtener 5 mililitros de sangre total por venopunción en tubos de polipropileno tipo “Vacutainer ®” sin anticoagulante con gel separador. Una vez tomada la muestra, dejar el tubo en refrigeración (2 a 8 °C) durante dos horas para permitir la retracción del coágulo. Centrifugar a 3,000 r.p.m durante 10 min. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p>
<b>FASE DE CONVALECENCIA:</b>	
Casos de DCSA y DG: toma de muestras de 6 a 14 días posteriores a la fecha de inicio de síntomas, SIN toma en fase aguda.	

<p><b>Chikungunya:</b> toma de muestras de 6 a 12 días posteriores a la fecha de inicio de síntomas.</p> <p><b>Mujeres embarazadas:</b> con toma de muestras de 6 a 30 días a partir de la fecha de inicio de síntomas, SIN toma en fase aguda.</p>	
DCSA y DG / ELISA de captura de anticuerpos IgM específica para Dengue	<p><b>Suero, solo casos de DCSA y DG, SIN toma de muestra en fase aguda - desde el día 6 al 14 de evolución. (ELISA IgM):</b> Obtener al menos 2.0 mL de suero, obtener 5 mililitros de sangre total por venopunción en tubos de polipropileno tipo "Vacutainer ®" sin anticoagulante con gel separador. Una vez tomada la muestra, dejar el tubo en refrigeración (2 a 8 °C) durante dos horas para permitir la retracción del coágulo. Centrifugar a 3,000 r.p.m durante 10 min. *La aplicación de esta ELISA queda sujeta únicamente para casos de Dengue con Signos de Alarma y Dengue Grave. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p>
Chikungunya / ELISA IgM	<p><b>Suero / convaleciente – desde el día 6 al 12 de evolución (ELISA IgM):</b> Obtener 5 mililitros de sangre total por venopunción en tubos de polipropileno tipo "Vacutainer ®" sin anticoagulante con gel separador. Una vez tomada la muestra, dejar el tubo en refrigeración (2 a 8 °C) durante dos horas para permitir la retracción del coágulo. Centrifugar a 3,000 r.p.m durante 10 min. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p>
Zika/ELISA de captura de anticuerpos IgM específica para Zika	<p><b>Suero / convaleciente (mujer embarazada SIN toma de muestra en fase aguda) – desde el día 6 al 30 de evolución (ELISA IgM específica):</b> Obtener 5 mililitros de sangre total por venopunción en tubos de polipropileno tipo "Vacutainer ®" sin anticoagulante con gel separador. Una vez tomada la muestra, dejar el tubo en refrigeración (2 a 8 °C) durante dos horas para permitir la retracción del coágulo. Centrifugar a 3,000 r.p.m durante 10 min. *La aplicación de esta ELISA queda sujeta únicamente al seguimiento de embarazadas y neonatos por Infecciones por VZIK. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p> <p><i>Aplica para mujeres embarazadas que no tienen muestra en los primeros cinco días de inicio de síntomas.</i></p>

#### VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LAS COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA ENFERMEDAD POR VIRUS ZIKA

Enfermedad por virus Zika / RT-qPCR	<p><b>Vigilancia epidemiológica de seguimiento a casos de SGB.</b></p> <p><b>Suero (RT-qPCR) /</b> Toma de muestra hasta 5 días después del inicio de la parálisis y el antecedente de inicio de síntomas de caso probable de infección por VZIK. Toma de muestra preferentemente al mismo tiempo que la toma de orina. Muestra obtenida por venopunción a partir de sangre total, en tubos de polipropileno tipo "Vacutainer ®" para análisis de suero sin anticoagulante con gel separador, (Se recomienda el uso de tubos BD Microtainer ® tapa de color rojo</p>
-------------------------------------	--

	<p>especificados para recién nacidos, se debe realizar homogenización de 8 a 10 veces por inversión para ayudar a mejorar el desempeño del tubo BD Microtainer ®, el volumen de muestra que se obtiene con este tipo de tubo es de 250-500 µL. Una vez tomada la muestra, dejar el tubo en refrigeración (2 a 8 °C) durante dos horas para permitir la retracción del coágulo. Centrifugar a 3,000 r.p.m durante 10 min. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio. Al menos se deben obtener 300 µL de suero.</p> <p><b>Orina* (RT-qPCR)</b> / Para aplicar en casos asociados con infecciones por VZIK y que no se les tomo muestra en fase aguda. Toma de micción espontánea. Desechar el primer chorro y recoger la parte media-final de la micción en el contenedor estéril. Toma de muestra como máximo hasta 17 días de inicio de la parálisis y el antecedente de inicio de síntomas de caso probable de infección por VZIK. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio. El volumen de medio de transporte viral para enviar sedimento debe ser de 1.5 a 3.0 mL.</p> <p><b>Saliva* (RT-qPCR)</b> / Para vigilancia de casos asociados a Parálisis Flácida Aguda (PFA), como seguimiento a síndrome de Guillain-Barré (SGB) asociados con infecciones por VZIK y que no se les tomo muestra en fase aguda. Indicar al paciente que deposite la saliva directamente en el contenedor de plástico. Toma de muestra como máximo hasta 17 días de inicio de la parálisis y el antecedente de inicio de síntomas de caso probable de infección por VZIK. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p> <p><i>* La toma de orina y saliva deben ser al mismo tiempo. En caso de que la muestra de orina no llegue al laboratorio en el transcurso de las siguientes 48 horas, después de haber sido tomada se debe realizar la metodología de centrifugación para obtener sedimento (al menos 2.5 mL) y en su caso enviar en medio de transporte viral.</i></p> <p><b>Vigilancia epidemiológica en seguimiento a malformaciones congénitas.</b></p> <p><b>Suero de madre/hasta cinco días después del nacimiento del bebé (RT-qPCR):</b> 5 mililitros de sangre total por venopunción en tubos de polipropileno tipo "Vacutainer ®" sin anticoagulante con gel separador. Una vez tomada la muestra, dejar el tubo en refrigeración (2 a 8 °C) durante dos horas para permitir la retracción del coágulo. Centrifugar a 3,000 r.p.m durante 10 min. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p> <p><b>Suero de recién nacido (RT-qPCR)</b> - Toma de muestra inmediatamente, en el día del nacimiento y hasta 5 días después. Toma de muestra preferentemente al mismo tiempo que la toma de orina. Muestra obtenida por venopunción a partir de sangre total, en tubos de polipropileno tipo "Vacutainer ®", para análisis de suero sin anticoagulante con gel separador (se recomienda el uso de tubos BD</p>
--	---

	<p>Microtainer tapa de color rojo® especificados para recién nacidos, se debe realizar homogenización de 8 a 10 veces por inversión para ayudar a mejorar el desempeño del tubo BD Microtainer®, el volumen de muestra que se obtiene con este tipo de tubo es de 250-500 µL). Una vez tomada la muestra, dejar el tubo en refrigeración (2 a 8 °C) durante dos horas para permitir la retracción del coágulo. Centrifugar a 3,000 r.p.m durante 10 min. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio. Al menos se deben obtener 300 µL de suero.</p> <p><b>Orina de recién nacido** (RT-qPCR)</b> - Toma de muestra de preferencia en los primeros 5 días del nacimiento. En caso de no haber obtenido muestra en los primeros 5 días, se debe tomar la muestra hasta 17 días después de nacimiento (no tomar muestra de suero con más de 5 días después del nacimiento). Muestra obtenida mediante bolsa perineal o mediante maniobras de estimulación vesical en neonatos. Tomar la muestra en contenedor estéril, en volumen de aproximadamente 1-5 mL. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio. Se deben considerar dar total cumplimiento a las especificaciones de envío y transporte.</p> <p><b>Líquido amniótico (RT-qPCR) / <u>Restringida únicamente a mujeres embarazadas, en donde el producto muestre malformaciones congénitas, sustentadas con los resultados de las ecografías realizadas. El volumen requerido es mínimo de 300 microlitros.</u></b> Obtener mediante amniocentesis, realizada por personal experto, en la cual se debe retirar una pequeña cantidad de líquido del saco que rodea al feto en el útero. Toma en el momento necesario, para realizar únicamente RT-PCR en tiempo real. Esto se basa según indicaciones y lineamientos establecidos por el Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p> <p><b>Necropsia de cerebro, cerebelo, muestra de la vellosidad coriónica o placentaria, cordón umbilical (RT-qPCR) /<u>Para vigilancia de mortalidad en casos probables de enfermedad por VZIK. En casos de producto propio de la concepción (aborto o mortinato).</u></b> Toma realizada por personal experto inmediatamente después de la defunción (necropsia), para realizar RT-PCR en tiempo real. Tomar de 2-3 cm<sup>3</sup> en solución salina estéril al 0.85%. <u>No usar formol.</u> Contenedor de plástico (frasco de polipropileno con tapa, estéril con capacidad para 50 mL, de 55mm de diámetro x 45mm de altura). Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p> <p><b>**La muestra de orina es una muestra idónea para diagnóstico en casos de microcefalia. Las fechas para la toma de muestra deben ser menor al día 17 después del nacimiento. En caso de que la muestra de orina no llegue al laboratorio en el transcurso de las siguientes 48 horas, después de haber sido tomada se debe realizar la metodología de centrifugación para obtener sedimento (al menos 2.5 mL) y en su caso enviar en medio de transporte viral.</b></p>
--	--

	<p><i>El envío de otras muestras para protocolos de seguimiento (protocolo del Instituto Nacional de Perinatología) para búsqueda de otras causas que promueven la malformación en el feto (sangre completa) queda sujetos al envío extraordinario y bajo indicaciones de la Dirección General de Epidemiología y deben indicarse en los oficios de solicitud y envío de muestras. Las muestras que apliquen para los protocolos antes mencionados serán almacenadas en la Red de Fría en el LESP y por medio de esta vía serán transportadas a la Ciudad de México (InDRE) para que el Laboratorio de Genómica Humana del Instituto Nacional de Perinatología realice el procesamiento de las muestras. Por medio de la técnica MLPA se realizará detección de las aneuploidías más frecuentes, detección de síndromes más comunes de microdelección, identificación de pérdidas de regiones subteloméricas e identificación de mutaciones puntuales asociadas con microcefalia. Los volúmenes se encuentran especificados en el Manual de Defectos del Tubo Neural y Craneofaciales.</i></p>
<p>Enfermedad por virus Zika / ELISA de captura de anticuerpos IgM específica para Zika.</p>	<p>Vigilancia epidemiológica en seguimiento a malformaciones congénitas.</p> <p><b>Suero de madre hasta cinco días después del nacimiento del bebé (ELISA IgM específica):</b> 5 mililitros de sangre total por venopunción en tubos de polipropileno tipo "Vacutainer ®" sin anticoagulante con gel separador. Una vez tomada la muestra, dejar el tubo en refrigeración (2 a 8 °C) durante dos horas para permitir la retracción del coágulo. Centrifugar a 3,000 r.p.m durante 10 min. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p> <p><b>Suero de recién nacido (ELISA IgM específica) -</b> Toma de muestra inmediatamente, en el día del nacimiento y hasta 5 días después. Toma de muestra preferentemente al mismo tiempo que la toma de orina. Muestra obtenida por venopunción a partir de sangre total, en tubos de polipropileno tipo "Vacutainer ®" para análisis de suero sin anticoagulante con gel separador, (Se recomienda el uso de tubos BD Microtainer® tapa de color rojo® especificados para recién nacidos, se debe realizar homogenización de 8 a 10 veces por inversión para ayudar a mejorar el desempeño del tubo BD Microtainer®, el volumen de muestra que se obtiene con este tipo de tubo es de 250-500 µL). Una vez tomada la muestra, dejar el tubo en refrigeración (2 a 8 °C) durante dos horas para permitir la retracción del coágulo. Centrifugar a 3,000 r.p.m durante 10 min. Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio. Al menos se deben obtener 300 µL de suero.</p> <p><i>Debe tomarse en cuenta la toma de suero del neonato con microcefalia y de la madre para identificación de anticuerpos IgM mediante cualquiera de las metodologías avaladas (ELISA de captura de IgM).</i></p>
<p><b>DEFUNCIONES</b> Con definición operacional de caso probable</p>	

<p style="margin: 0;">Dengue, Chikungunya, Zika y Fiebre Amarilla</p>	<p><b>Necropsia de hígado, ganglios, bazo, riñón, (RT-qPCR).</b> Toma realizada por personal experto inmediatamente después de la defunción (necropsia), hasta una hora después, para realizar RT-PCR en tiempo real. Tomar de 2-3 cm<sup>3</sup> en solución salina estéril al 0.85%. <u>No usar formol</u>. Contenedor de plástico (frasco de polipropileno con tapa, estéril con capacidad para 50 mL, de 55mm de diámetro x 45mm de altura). Manejo y envío en red fría (2 a 8 °C) desde la toma hasta la recepción en el Laboratorio.</p> <p><i>En caso de solicitar búsqueda de Arbovirus causantes de encefalitis, enviar necropsia de cerebro y especificar el agente virológico del que se sospecha.</i></p>
---	---

#### NOTAS:

- En caso de muestras provenientes de recién nacidos vivos el volumen antes indicado queda exento y se requiere como mínimo 300 microlitros. Aplica para cualquier muestra en recién nacidos. En caso de alguna otra situación que se genere al respecto del cumplimiento a lo antes indicado, se debe especificar en el oficio de solicitud del estudio.
- Para todas las muestras excepto la orina, aplican máximo los 15 días naturales de tránsito.

#### Recolección de la muestra

El procedimiento para la toma de muestra sanguínea está descrito en la OMS/SIGN: Carpeta de material sobre seguridad de las inyecciones y los procedimientos conexos. Organización Mundial de la Salud, 2011; así como en las directrices de la OMS sobre la extracción de sangre: las mejores prácticas en la flebotomía (*WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy*. Organización Mundial de la Salud, 2010).

#### Conservación

Debido a la naturaleza del material genético de los Arbovirus, la muestra debe mantenerse siempre en refrigeración de 2-8 °C desde el momento de la toma hasta su llegada al laboratorio de diagnóstico. Debido a que el ARN es termolábil y se degrada a una temperatura mayor a la indicada.

## Envío y transporte de la muestra

- Para transportar la muestra de suero se empaca mediante el sistema básico de triple embalaje asegurando la red fría durante el traslado.
- Cuando las muestras se reciben en los LESP o LAVE por parte de las áreas de vigilancia epidemiológica estatal, se debe cumplir con todos los requisitos indicados para mantener la estabilidad de la muestra. Todo material biológico remitido a los LESP o LAVE debe estar acompañado con la impresión legible y completa del registro del caso generado por la plataforma de ETV correspondiente, para aquellas Arbovirosis que se capturen en ésta, o con los formatos indicados con la información debidamente requisitada.
- Una vez recibida la muestra en el LESP o LAVE, se debe capturar en plataforma de ETV, la fecha de recepción y el folio asignado en el laboratorio. Lo anterior brindara oportunidad en el seguimiento a las muestras recibidas en el laboratorio.
- El material biológico enviado al LNR, debe estar acompañado con la impresión legible del registro del caso generado por la plataforma de ETV para aquellas Arbovirosis que si cuenten con Plataforma SiNaVE o el Formato Único de Envío de Muestras Biológicas del InDRE con toda la información solicitada en caso de aquellas Arbovirosis que no cuentan con plataforma del SiNaVE. El Formato Único de Envío de Muestras Biológicas del InDRE debe estar sin datos alterados o sobrescritos, y si es el caso, es conveniente que se indique la gravedad del paciente, o en caso de muestras provenientes de defunciones, indicarlo claramente en el rubro correspondiente.
- Cada una de las muestras para la vigilancia epidemiológica de las complicaciones asociadas a Enfermedad por virus Zika, como seguimiento a casos de SGB y las malformaciones congénitas, deben venir acompañadas del Formato Único de Envío de Muestras Biológicas del InDRE. Debido a que los casos relacionados con estos seguimientos no se capturan en plataforma de ETV.
- Todas las muestras enviadas al InDRE deberán ser remitidas por los LESP o LAVE y en el caso de muestras provenientes de la Ciudad de México, deberán ser remitidas por la jurisdicción sanitaria correspondiente. Deben contar con un listado nominal de las muestras enviadas, y las impresiones del registro de caso en plataforma de ETV

cuando aplique. A partir de que el Laboratorio de la CDMX tenga la liberación correspondiente y reconocimiento a la competencia técnica, será el receptor de las muestras correspondientes para la Vigilancia de Dengue y otras Arbovirosis y tendrá la responsabilidad de dar cumplimiento oportuno al proceso de vigilancia por laboratorio descrito en este documento.

## Criterios de aceptación y rechazo de muestras biológicas

### Criterios de aceptación:

- Muestras que cumplan con definición de caso probable para cualquiera de las Arbovirosis.
- Contenedor primario adecuado (*tubos tipo eppendorf o crioviales de polipropileno, estériles y libres de ARNsa*).
- Muestras en red fría (2-8°C).
- Muestras acompañadas con la documentación legible y debidamente requisitada, incluyendo la impresión legible y completa del registro del caso de plataforma de ETV o Formato de envío de muestras, según aplique.

### Criterios de rechazo:

- Muestras lipémicas (*esta condición queda exenta por motivos de condición médica y debe ser aclarada en el formato de envío de muestras o en el registro de plataforma de ETV*).
- Muestras contaminadas.
- Muestras hemolizadas.
- Muestras con volumen insuficiente (*esta condición queda exenta en los casos de recién nacidos o que por condición del paciente no se pueda cumplir con este criterio y debe ser aclarada en el formato de envío de muestras o en el registro de plataforma de ETV*).
- Muestras sin la documentación establecida, con datos incorrectos, sobre escritos o por falta de ellos.
- Muestras con incumplimiento a la red fría.
- Muestras con más de 15 días naturales de tránsito (*queda exenta la orina debido a que debe ser recibida en el laboratorio en las siguientes 48 horas después de haber sido tomada*).
- Muestras en contenedor primario de vidrio.

- Muestras que excedan con días de evolución según técnica de diagnóstico.
- Muestras remitidas por LESP o LAVE que cuenten con liberación diagnóstica y que no hayan informado oportunamente al LNR del motivo de la solicitud de servicio.

Las muestras que por algún criterio o causa sean rechazadas, se debe capturar el motivo de rechazo y la fecha del mismo en plataforma de ETV.

#### 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 (hospitalización o defunción) del paciente se considera una muestra de alto valor epidemiológico. Por tal motivo el laboratorio de procesamiento tiene la atribución de no rechazar la muestra y se otorga una concesión.

El laboratorio 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.

#### Muestras de defunciones

En los casos de defunción de un caso probable de cualquiera de las Arbovirosis de vigilancia epidemiológica, las muestras de bazo, hígado, riñón o ganglios deben ser tomadas por personal experto inmediatamente después de la defunción (necropsia), hasta una hora después, para realizar RT-qPCR.

Con el objetivo de brindar mayor información al Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica (CONAVE) y al Comité Estatal de Vigilancia Epidemiológica (CEVE) para contribuir con información de calidad para el dictamen de las defunciones y en coordinación con el médico epidemiólogo, quien especificará este requerimiento, las muestras de suero, biopsias u otro tipo de muestra de defunciones por probable DEN, CHIK, ZIK, deben ser procesadas por los LESP. Todas las muestras de defunciones confirmadas o descartadas en la RNLSP para cualquiera de las Arbovirosis, deben ser remitidas al LNR para conformación de banco de muestras biológicas o para brindar el servicio de investigación operativa y encuesta para la búsqueda intencionada de otros Arbovirus (RT-PCR de familia *Flavi* y *Alfa*) en aquellas muestras negativas mediante las metodologías de rutina en la RNLSP.

En el caso que algún LESP no cuente con alguna de las metodologías para la vigilancia de los agentes etiológicos antes mencionados, deberá informar por correo electrónico y oficial al LNR y al CEVE del envío de la muestra. En el oficio de solicitud, aclarar que se trata de una **MUESTRA DE DEFUNCIÓN**, “especificando claramente el diagnóstico etiológico que requiere y los resultados de los diagnósticos realizados en el LESP”. Para el dictamen de defunciones en los CEVE y el CONAVE se tomarán en cuenta solo los resultados obtenidos en la RNLSP. Si se requiere el envío de las muestras al InDRE por alguna circunstancia determinada en el CONAVE, se solicitará al LESP el envío inmediato de las muestras.

## ALGORITMO DE VIGILANCIA POR LABORATORIO

A partir de la evidencia científica que demuestra la existencia de reacción cruzada entre VDEN, VZIK, VON, VESL, VFA y otros flavivirus, debido a la similitud antigenica favorecida por pertenecer a la misma familia, se ha promovido uno de los mayores retos en la vigilancia de los Arbovirus:

- La determinación de antígeno NS1 (por sus siglas en inglés “*non structural 1*”) debido a la sensibilidad mostrada para cada serotipo por sí sola no puede ser usada para la vigilancia y **debe ser reemplazada** directamente por el RT-qPCR.
- La metodología serológica para Dengue (ELISA de captura de IgG) y ELISA de captura de IgM para VON, quedaran fuera de uso para la vigilancia, lo cual aplicará hasta que exista evidencia científica sobre metodologías y estuches evaluados que cumplan con el desempeño. La detección de IgM mediante ELISA de captura quedara sujeta únicamente en casos probables de DCSA y DG.

Lo anterior modifica el algoritmo propuesto en 2008, el cual basaba su fortaleza en la interacción de la vigilancia serológica y molecular en diferentes días de evolución de la enfermedad. Por tal motivo de manera inmediata se deberá de aplicar en la RNLSP únicamente la Vigilancia molecular de VDEN, VZIK y VON, basada en metodologías de RT-qPCR (RT-PCR en tiempo real) avaladas por el InDRE, OMS, OPS y CDC. Lo anterior se ve favorecido ya que reportes de la DGE evidencian que aproximadamente el 85% de los casos son muestreados en los primeros 5 días de evolución.

La vigilancia por laboratorio de Dengue y otros Arbovirus estará basada en la interacción de metodologías moleculares y serológicas (IgM) que cuentan

con los datos de su desempeño y que permiten un análisis por laboratorio más específico y sensible.

### Algoritmo de laboratorio para la vigilancia de Arbovirosis en fase aguda (Dengue, Chikungunya y Zika).

El nuevo algoritmo (Figura 2) para la confirmación de Arbovirus contempla su aplicación desde el inicio y la toma de muestras durante la fase aguda de la enfermedad (0 a 5 días a partir de la fecha de inicio de síntomas) para realizar una prueba de multi detección simultánea que se puede identificar como: “TRIPLEX” mediante RT-qPCR. Para aplicar este algoritmo se deberá partir de muestras que cumplan con definición operacional de caso probable para cualquiera de las tres Arbovirosis vigentes en el “Manual de Procedimientos estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector”. En las muestras confirmadas para más de un Arbovirus se confirma como coinfección.

Las muestras con resultado positivo a VDEN, deben ser seleccionadas para tipificación. La selección se aplicará en el 10 % de los casos confirmados de Dengue No Grave y el 100% de los casos de Dengue Grave y Dengue con Signos de Alarma. Las muestras no tipificables, con valores de Cq menor o igual a 30, deben ser enviadas al LNR para ser analizadas por métodos de Referencia. La selección de muestras debe estar sujeta a la búsqueda en diferentes municipios que permitan identificar con precisión las áreas de riesgo. En los casos de brote en donde se haya identificado el o los serotipos circulantes; el porcentaje de tipificación para los DNG puede ajustarse hasta el 2%. Este ajuste debe ser informado oportunamente al CEVE, a la DGE y al InDRE.

La estrategia para realizar una confiable detección de serotipos está basada en la tipificación durante períodos silenciosos y epidémicos. Se recomienda que la vigilancia para serotipos sea intencionada, ya que durante este período se pueden detectar serotipos con muy baja circulación y así evitar que sean enmascarados por alta circulación de otros.

Una vez que se ha identificado un serotipo en una determinada área (municipio) y este ha circulado en por lo menos dos años, la vigilancia de serotipos debe disminuir, sin dejar de realizarla en estas áreas, fortaleciendo la búsqueda intencionada en otras localidades. Esto último se refuerza con la estrategia a nivel nacional para la vigilancia de las Arbovirosis, donde se

plantea que se tome muestra al 100% de los casos probables en donde no se ha detectado casos confirmados (serotipos). Las muestras negativas para RT-qPCR deben ser analizadas para diagnóstico diferencial en al menos un 5%, según criterios clínico-epidemiológicos; debe ser seleccionadas en perfecta coordinación con los epidemiólogos estatales y federales.

Las muestras que se consideren para diagnóstico diferencial para Rickettsias, Leptospira y EFE´s deberán ser también seleccionadas según criterios clínico epidemiológicos.

Para la búsqueda intencionada de otros flavivirus y alfavirus, el Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos lo realizará, mediante servicios de Referencia o de investigación operativa y encuesta, que incluyan RT-PCR específicos y de familia (PAN-alfavirus, PAN-flavivirus). Los resultados de este último análisis serán emitidos por el momento mediante notas informativas a quien corresponda.

El análisis específico para Fiebre Amarilla se realizará exclusivamente en caso de visita a zona endémica al 100% de los casos negativos que cuenten con esta asociación epidemiológica.

Las muestras que no cuenten con amplificación del marcador específico y control interno (RP), deberán ser repetidas por duplicado, comenzando con una nueva extracción, amplificando el nuevo y viejo extracto, esta indicación aplica para cualquier RT-PCR en tiempo real.

Todos aquellos LESP que identifiquen algún serotipo que en los últimos dos años no ha sido identificado en su estado, deberán informarlo inmediatamente a los sistemas de salud estatal y federal y subir el resultado inmediatamente a la plataforma y reportarlo en el informe semanal. Deberán enviarse vía correo electrónico las corridas en formato original por el termociclador para analizar las curvas de amplificación obtenidas. También se debe enviar la(s) muestra(s) correspondiente(s) al LNR para banco de material biológico.

#### **Algoritmo de laboratorio para la vigilancia de DEN, CHIKy ZIKA (en muestras de fase aguda).**

El siguiente algoritmo se aplica en muestras tomadas entre los días 0-5 de iniciados los síntomas y corresponde a la detección simultánea de tres Arbovirus.

**Algoritmo de Diagnóstico en Fase aguda – RT-PCR en tiempo real (0-5 días de evolución)**

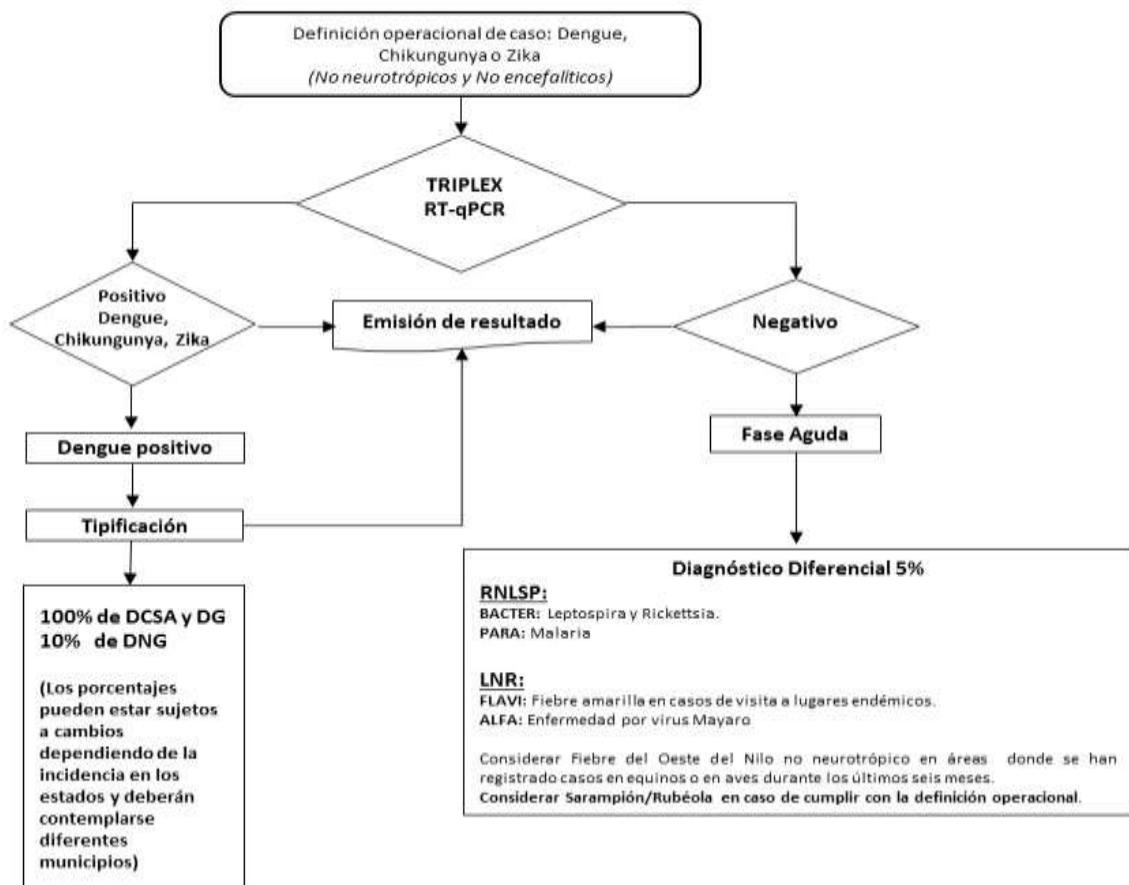


Figura 2. Algoritmo de Laboratorio para la vigilancia de Arbovirus (VDEN, VCHIK y VZIK RT-qPCR TRIPLEX) en fase aguda. (se incluirán nuevas claves en próxima actualización del tabulador).

Algoritmo de laboratorio para la vigilancia de DCSA y DG, SIN muestra en fase aguda (en muestras de fase convaleciente).

El siguiente algoritmo se aplica **EXCLUSIVAMENTE** en muestras de suero tomadas entre el día 6-14 de iniciada la fiebre y únicamente en los casos probables de DCSA y DG, que **NO** tengan toma de muestra en fase aguda.

Fase convaleciente (Dengue con Signos de Alarma y Dengue Grave) – ELISA  
IgM Específica Dengue  
(6-14 días de evolución)

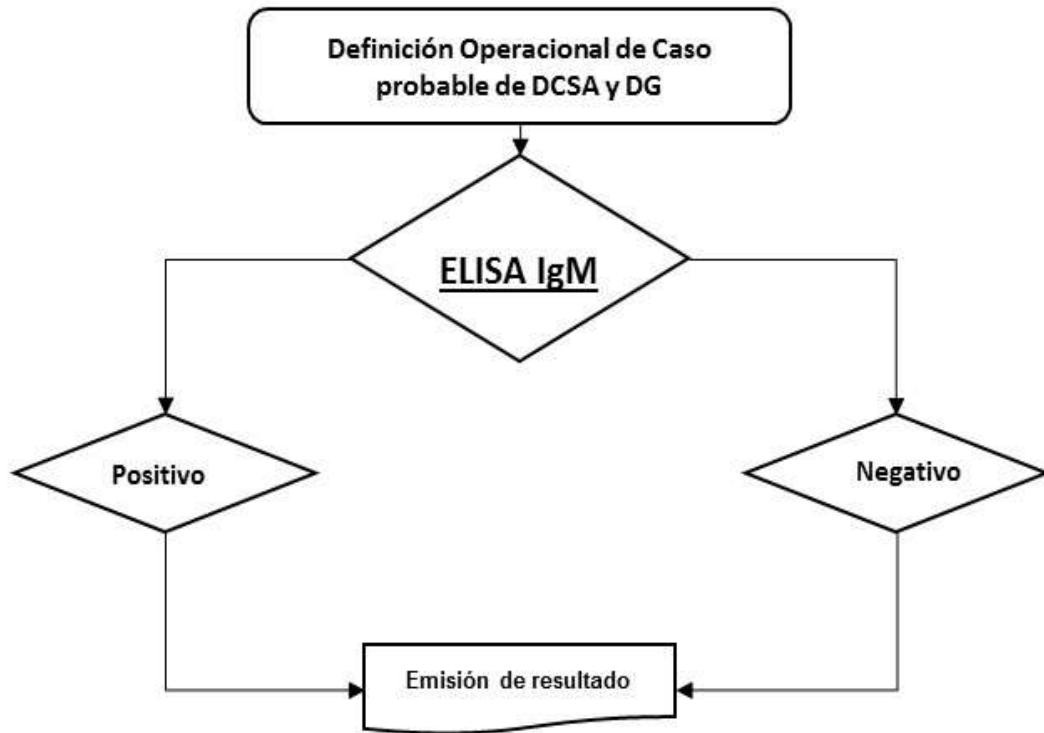


Figura 3. Algoritmo de laboratorio para casos probables de DCSA y DG, en fase convaleciente, que incluye únicamente ELISA de captura de anticuerpos IgM específicos para virus dengue. Para aplicar en casos SIN toma de muestra en fase aguda. Clave de tabulador: (se incluirán nuevas claves en próxima actualización del tabulador).

Algoritmo de laboratorio para la vigilancia de Zika, SIN toma de muestra en fase aguda (en muestras de fase convaleciente).

El algoritmo siguiente se aplica **EXCLUSIVAMENTE** en muestras de suero tomadas entre el día 6-30 de iniciados los síntomas para los casos de mujeres embarazadas que no tienen toma de muestra durante la fase aguda, además para el seguimiento a recién nacidos. Esta ELISA define también la presencia de otros flavivirus con el uso de antígenos de reacción cruzada, motivo por el

cual las muestras con resultados obtenidos como positivos a otros flavivirus deberán ser enviadas para Referencia o encuesta/investigación para búsqueda de anticuerpos para otros flavivirus.

**Fase convaleciente (Zika, mujeres embarazadas y recién nacidos)**  
**ELISA IgM Específica Zika**  
**(6-30 Días de evolución)**

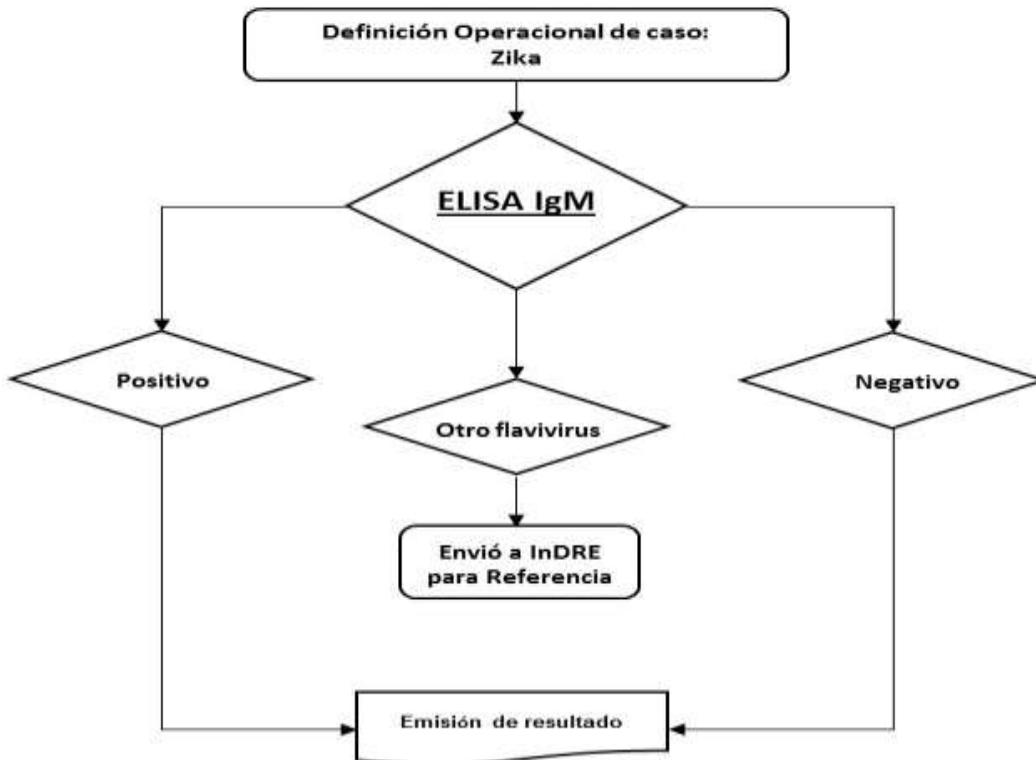


Figura 4. Algoritmo de laboratorio para la vigilancia de ZIKA mediante uso de ELISA IgM en fase convaleciente, para mujeres embarazadas SIN toma de muestra en fase aguda y seguimiento a malformaciones congénitas. Clave de tabulador: (se incluirán nuevas claves en próxima actualización del tabulador).

**Algoritmo de laboratorio para la vigilancia de Chikungunya (en muestras de fase convaleciente).**

El aumento de anticuerpos IgM en fase convaleciente, permite que este algoritmo se aplique en muestras de suero tomadas entre los días 6-12 de evolución de la enfermedad. Este algoritmo es determinante para confirmar casos de CHIK en muestras que no fueron tomadas en fase aguda para aplicar el RT-qPCR TRIPLEX. El uso de esta ELISA está condicionado hasta que se confirme por laboratorio la circulación de otro alfavírus (ejemplo: VMAY), ya

que se pueden presentar también reacciones cruzadas por mismo fenómeno antigenico que se observa entre VDEN y VZIK.

### **Fase convaleciente (ELISA IgM Específica Chikungunya) (6-12 Días de evolución)**

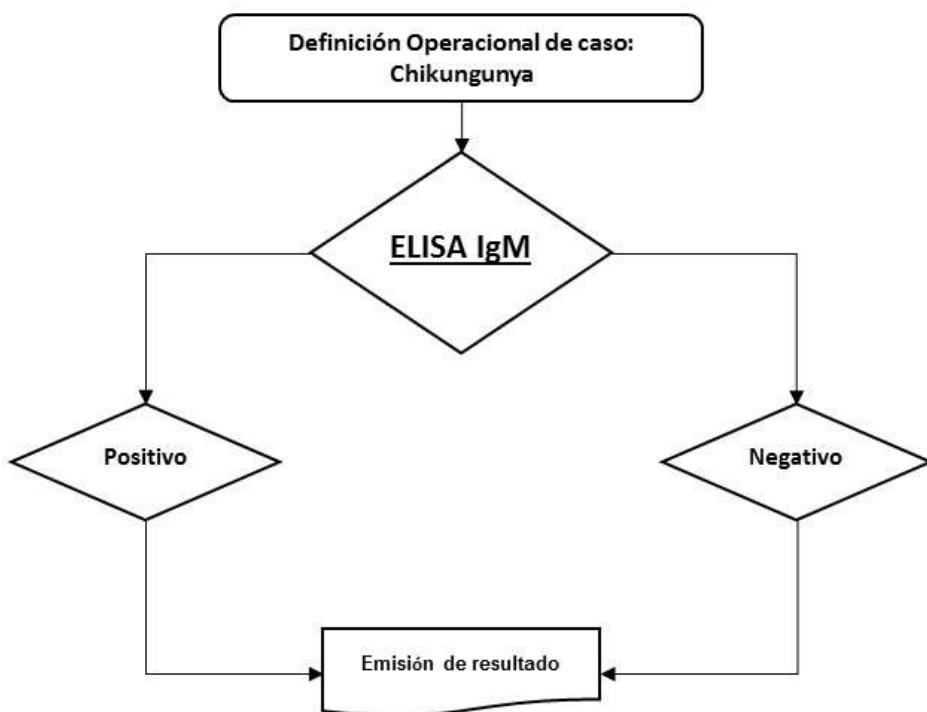


Figura 5. Algoritmo de laboratorio para la vigilancia de Chikungunya en fase convaleciente. Clave de tabulador: (se incluirán nuevas claves en próxima actualización del tabulador).

El uso de cualquier metodología que no esté reconocida por el InDRE para la confirmación molecular o serológica de casos de Dengue, Chikungunya y Zika y tipificación de VDEN, no será considerada válida y los resultados obtenidos NO serán avalados, hasta no ser enviadas al InDRE las muestras de interés.

Para brindar un mejor servicio y tener una evidencia trazable de la atención recibida, se deberán enviar como producto de solicitud de información, resultados, dudas, comentarios, asesorías técnicas, etcétera, únicamente a través de correo electrónico: [larb.indre@salud.gob.mx](mailto:larb.indre@salud.gob.mx) [arbored.indre@gmail.com](mailto:arbored.indre@gmail.com)

Todos los LESP deberán enviar por correo electrónico de manera semanal el informe de la existencia de reactivos para realizar la Vigilancia de Arbovirus al correo [larb.indre@salud.gob.mx\\_y\\_arbored.indre@gmail.com](mailto:larb.indre@salud.gob.mx_y_arbored.indre@gmail.com)

Por consiguiente, aquellos LESP que tengan desabasto de insumos (reactivos o materiales) para realizar la Vigilancia por Laboratorio de Arbovirus, deben informar a través de un comunicado oficial a las partes interesadas, vigilancia estatal y federal, programa de vectores estatal y federal, al LNR y al CEVE, sobre esta situación, para que al interior del comité se evalúe y acuerde la decisión que se tomará de manera temporal al respecto, dependiendo del período que se tenga sin insumos, considerando a causa de esto, que no se deben recibir muestras ni acumularlas si el período de desabasto es mayor a dos semanas epidemiológicas. El procesamiento después de este período genera gasto innecesario, porque el procesar muestras fuera de tiempo, no representa la oportunidad para la Vigilancia Epidemiológica. El apoyo que pueda brindar el LNR se emitirá por las vías oficiales correspondientes.

## ESTÁNDARES DE CALIDAD EN EL SERVICIO

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 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, ISO 15189:2015 Requisitos de la calidad y competencia y UNE-CWA 15793 Gestión de Riesgo biológico en el Laboratorio.

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.

**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:** Representa el tiempo que transcurre entre la fecha de inicio de síntomas y la fecha de toma de la muestra. Fase aguda: de 0 a 5 días naturales para diagnóstico de Dengue, Chikungunya y Zika. Fase convaleciente: DCSA y DG de 6 a 14 días, Zika en mujeres embarazadas y recién nacidos 6 a 30 días y para diagnóstico de Chikungunya 6 a 12 días. Al menos el 90% de las muestras deben de ser tomadas en los períodos indicados.
- **Oportunidad en el envío:** Es el tiempo transcurrido entre la fecha de toma de la muestra y la fecha de recepción en el laboratorio. Este tiempo no debe exceder de 15 días naturales a partir de la fecha de toma. Para las muestras de orina no debe exceder de 48 horas. Al menos el 90% de las muestras deben llegar en el tiempo establecido.
- **Porcentaje de rechazo:** La proporción de rechazos permitida es del  $\leq 10\%$ . Cuando se registre mayor al 10% del 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) competen a la RNLSP e inciden en la obtención de un resultado confiable y oportuno.

- **Estándar del servicio:** Aplicará desde la recepción de la muestra en el laboratorio hasta la obtención del resultado.
  - El estándar de servicio para el diagnóstico de RT-PCR en tiempo real para la detección de ARN de cualquier Arbovirus es de hasta tres días hábiles.
  - Para la detección de anticuerpos IgM para Chikungunya, Zika y Dengue, también son de tres días hábiles.
  - En el caso de detección de ARN a partir de muestras de mosquitos mediante RT-PCR en tiempo real, el estándar de servicio es de cinco días hábiles.

**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-ETV) y la entrega a las partes interesadas.

- **Emisión del resultado:** Una vez obtenido el resultado se cuentan con máximo 48 hrs para el registro de este en la plataforma de información del sistema de vigilancia epidemiológica.

## PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO

Los laboratorios integrantes de la RNLSP deben participar en el programa de evaluación externa del desempeño (PEED) organizado por el LNR. Los LESP son responsables de conducir programas de evaluación del desempeño dirigidos a los laboratorios que integran su red estatal.

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

A partir del 2015 se implementaron los paneles “SMART-ONLY-ARBO”, es decir, se analizan muestras para serología y biología molecular según aplique, para VDEN, VCHIK y VZIK, siguiendo las indicaciones e instrucciones para cada muestra y bajo indicaciones del algoritmo de diagnóstico vigente. A partir del Panel 27° correspondiente al segundo ciclo del 2018, incorpora la detección molecular de virus de fiebre amarilla y de virus el Oeste del Nilo, el cual tiene objetivo de analizar la capacidad de respuesta de aquellos LESP seleccionados y que pueden ampliar su marco analítico básico como estrategia ante el Panorama Epidemiológico actual.

Las áreas de oportunidad en la vigilancia que se identifiquen durante cada año como resultado de asesorías realizadas a los LESP, serán tomadas en cuenta para actualizar los formatos de cada panel. Además, se realiza el análisis de las tres fases del proceso:

- **Fase pre-analítica:** se identifican las áreas de oportunidad para aceptación y rechazo de una muestra, así como la eficacia para analizar las muestras según definiciones operacionales vigentes. Estas desviaciones serán informadas inmediatamente por el LNR a la DGE para que se brinden indicaciones oportunas a quien corresponda.
- **Fase analítica:** evalúa la eficacia para aplicar los algoritmos para cada agente etiológico y la aplicación de formatos específicos para cada metodología.
- **Fase post-analítica:** analiza la interpretación de los resultados obtenidos y su emisión en los formatos especificados por cada laboratorio y plataformas de información del sistema especial de vigilancia epidemiológica.

## Procedimiento para los laboratorios integrantes de la RNLSP:

- Recepción de un primer panel de eficiencia (durante el primer semestre del año). Conformado para la determinación de ARN de VDEN, VCHIK y VZIK. Además del componente serológico mediante ELISA IgM para Dengue, Chikungunya y Zika. Lo anterior depende de la regionalización del marco analítico en cada LESP. A partir del panel 24 y 25 se incluyen, el desarrollo de curvas de detección para identificación de eficiencia de reacción y el límite de detección; datos que permitirán identificar áreas de oportunidad en el proceso analítico, a las cuales se les dará seguimiento en el segundo panel.
- Envío de un segundo panel de eficiencia (durante el segundo semestre del año). Conformado para la determinación de ARN de VDEN, VCHIK y VZIK. Además del serológico mediante ELISA IgM para Dengue, Chikungunya y Zika. Lo anterior depende de la regionalización del marco analítico en cada LESP. El formato del panel se basa en el algoritmo de diagnóstico vigente para Dengue y otras Arbovirosis, en la determinación de los componentes serológicos y el molecular según aplique para cada algoritmo, en el cual se pondrá a prueba el marco analítico de cada LESP (paneles inteligentes únicos). En este panel, en caso de que aplique, deberán haber aplicado las medidas correctivas en caso de haber detectado áreas de oportunidad durante el primer panel.

Con base en los resultados de concordancia obtenidos en los paneles se clasificará a los LESP como sigue:

- **Sobresalientes:** LESP que hayan obtenido de 90.0 a 100% de concordancia.
- **Satisfactorios:** LESP que hayan obtenido de 80.0 a 89.99% de concordancia.
- **No aceptables:** LESP que hayan obtenido <80% de concordancia.

Para los laboratorios que obtengan clasificación **Sobresaliente** o **Satisfactoria** se procederá de la siguiente forma:

- La evaluación del desempeño se realizará únicamente a través de paneles, que serán enviados 2 veces por año.
- La ponderación de cada muestra del panel será informada en las indicaciones pertinentes realizadas durante el envío.
  - Por el momento, ningún laboratorio deberá enviar muestras para control de calidad (la evidencia solicitada en electrónico en los formatos correspondientes durante la fase de implementación será de al menos de dos meses, la cual sustituirá el envío de muestras para control de

calidad), únicamente deberá asegurar y mantener la solvencia diagnóstica para dar seguimiento oportuno a la Vigilancia Epidemiológica.

- En el caso de que se identifique alguna área de oportunidad que ponga en riesgo la confiabilidad y oportunidad del diagnóstico en el LESP, se realizaran supervisiones y en caso de que lo amerite se suspenderá el diagnóstico hasta que no se solventen las desviaciones encontradas y se aplicaran en específico las acciones abajo indicadas.

Para los laboratorios que obtengan clasificación **No aceptable**, se procederá de la siguiente forma:

#### Por desviación en la aplicación de los Lineamientos:

- No será necesario solicitar un segundo panel y no perderán el diagnóstico en el LESP.
- Se solicitará que el LESP, refuerce en todo el personal operativo, el conocimiento y aplicación de los Lineamientos establecidos para la Vigilancia Epidemiológica y por Laboratorio. Para ello se solicitará la estrategia a seguir y la evidencia para la difusión, comprensión y aplicación de los mismos.

#### Por falta de competencia técnica:

- Se solicitará la elaboración de un plan de mejora que deberán enviar al LNR en un tiempo no mayor a una semana después de la notificación de esta clasificación.
- El LNR analizará el plan de mejora y de no cumplir con las expectativas necesarias para solventar la contingencia, el LNR realizará una auditoría y/o asesoría técnica al laboratorio implicado para evaluar la competencia técnica y detectar áreas de oportunidad.
- Se enviará un tercer panel, a petición y con costo para el LESP, que nuevamente servirá para las acciones correctivas implementadas por el laboratorio.
- Si nuevamente se obtiene un resultado No aceptable se solicitará el cambio del analista para el diagnóstico de Dengue y otras Arbovirosis en el LESP y se suspenderá el diagnóstico.
- El nuevo analista recibirá capacitación inmediata en el LNR.
- Una vez capacitado el analista, se reanudará el diagnóstico inmediatamente y tendrá que enviar evidencias durante el siguiente mes de todo el proceso de vigilancia para Dengue y otras Arbovirosis.

Los LESP que por alguna circunstancia no puedan realizar los paneles de evaluación y emitir los resultados en el tiempo establecido, obtendrán

“CERO” de calificación. Esta última afectará directamente al Boletín Caminando a la Excelencia y de no contar con calificación aceptable en el siguiente panel, la liberación del diagnóstico se retirará inmediatamente.

Todos los viernes se debe enviar el informe semanal vía correo electrónico ([larb.indre@salud.gob.mx](mailto:larb.indre@salud.gob.mx)) en el formato establecido “Informe Semanal ARBO”, el cual se compartió vía electrónica a la RNLSP desde el año 2003 y que se actualiza según necesidades. Lo anterior se solicita para monitorear serotipos identificados, además de dar seguimiento a la capacidad de insumos que se tienen para el diagnóstico de cada una de las Arbovirosis incluyendo la vigilancia entomo-virológica. Aquellos LESP que no envíen el informe semanal, serán acreedores a la disminución de la calificación obtenida en el PEED. En caso que por alguna razón de emergencia se queden sin insumos, notificarlo inmediatamente vía correo electrónico ([larb.indre@salud.gob.mx](mailto:larb.indre@salud.gob.mx)) e informar a las partes interesadas, como se ha mencionado anteriormente.

Aquellos LESP que no tengan implementada alguna metodología establecida, la calificación del PEED se verá afectada específicamente en los resultados no emitidos por la metodología no implementada.

La periodicidad de las actividades del PEED propuesto se establece en la siguiente Tabla 2, mismo que estará sujeto a modificaciones de acuerdo a las necesidades de la RNLSP, en este caso se realizará la difusión por medio de la Coordinación de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública.

Tabla 2. Cronograma de actividades para el PEED

ACTIVIDAD	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
Envío del primer panel Inteligente Algorítmico para Arbovirus “SMART ONLY ARBO” a la RNLSP						X						
Recepción de resultados en el InDRE del panel “SMART ONLY ARBO”							X					
Envío de resultados del panel Inteligente “SMART ONLY ARBO” (e-mail oficial / físico)							X	X				
Envío del segundo panel Inteligente algorítmico único a la RNLSP										X		
Envío de resultados del panel Inteligente “SMART ONLY ARBO” (e-mail oficial / físico)										X	X	
Supervisión a la RNLSP	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Envío de muestras para Banco de Sueros	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Envío de informe semanal de existencia de reactivos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Curso de actualización Vía Webex		X	X	X		X			X			X

Las fechas agendadas pueden cambiar con previo aviso.

## CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL DENGUE Y OTRAS ARBOVIROSIS

La liberación de cada laboratorio de la RNLSP 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:

- Obtener arriba del 99% de concordancia durante la fase de monitoreo.
- Demostrar con evidencia que se cuenta con los insumos necesarios, al menos para los siguientes 12 meses y al término del período comprobar que se cuentan con estos para el siguiente período. El cálculo de insumos necesario se debe realizar tomando como base, el gasto del año anterior.
- Demostrar con evidencia que se tiene el recurso humano capacitado en el área afín, y que cumple con el perfil técnico para la realización de la metodología.
- Demostrar con evidencia que se cumple en tiempo y forma con las fases pre-analítica, analítica y post-analítica.

- Si cumple con los criterios antes mencionados, se emitirá al LESP o institución correspondiente (Laboratorios en Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica) el oficio de liberación de la metodología correspondiente. Esta notificación también se dará a conocer al CONAVE. El InDRE tiene la atribución de suspender la realización del diagnóstico en los LESP o en la institución correspondiente en cuanto detecte alguna desviación en el proceso que impacte de manera significativa en el SiNaVE; quien informará a través de un oficio al LESP correspondiente y también se notificará al CONAVE.

Lo anterior es aplicado, como resultado de más de 20 años de compromiso con la Salud Pública por parte de la RNLSP y con mantener en el más alto nivel la Vigilancia Epidemiológica basada en Laboratorio para Arbovirus en México por parte del InDRE.

## BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE

Con el objetivo de mantener el banco de muestras de Dengue y otras Arbovirosis con material biológico, cuyo fin es realizar los paneles de evaluación, vigilancia de genotipos, obtención de controles de referencia y estudios y/o evaluaciones, se solicitará vía correo electrónico las muestras a los LESP seleccionados. La solicitud se hará cada mes a partir del segundo bimestre del 2019. En caso de ser necesario (como se realizó el 31 de julio del 2017), se emitirá oficio con indicaciones específicas para toda la RNLSP para el envío de banco de sueros. Las muestras deberán ser enviadas a partir de las siguientes dos semanas después de haber sido recibida la notificación del envío.

El envío deberá apegarse a las indicaciones que se realicen vía correo electrónico u oficio, se deberá cumplir con lo siguiente:

Usar viales de polipropileno tipo eppendorf o criotubos (estériles y libres de ARNs) que deberán rotularse con el número de folio de plataforma de ETV. La tapa externa deberá sellarse con papel Parafilm™.

- No deberán estar contaminadas, lipémicas o hemolizadas.
- El volumen mínimo será de 750  $\mu$ L.
- Para monitoreo de genotipos, las muestras positivas para virus, deben tener Cq menor o igual a 25. Estas muestras se deben enviar como máximo cinco días naturales después de haber obtenido el resultado.

- Adjuntar listado anexo únicamente con folio plataforma y todos los resultados obtenidos en el LESP. Indicar valores de Cq y de absorbancia obtenidos, para la metodología realizada según aplique.
- En el envío de muestras para banco, se debe omitir anexar la impresión del registro de plataforma.

Es necesario indicar en el oficio de envío que se trata de material biológico para el Banco de muestras de Dengue y otras Arbovirosis con los datos solicitados y debidamente requisitados. En caso de actualizar la información requerida se informará oportunamente por las vías oficiales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Halstead SB. Dengue. 2007, Lancet; 370(9599):1644-52.
2. Dussart P., Labeau B., Lagathu G., et al Evaluation of an Enzyme Immunoassay for detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. Clinical and Vaccine Immunology, 2006, p. 1185-1189.
3. Kumarasamy V., Chua S. K., et. al. Evaluating the sensitivity of a commercial DengueNS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute Dengue virus infection. Singapoure Med. J. 2007; 48(7):669.
4. Vázquez-Pichardo Mauricio, Rosales-Jiménez Claudia, Núñez-León Alma, Rivera-Osorio Pilar, Cruz-Hernández Sergio De La, Ruiz-López Adriana et al. Serotipos de Dengueen México durante 2009 y 2010. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 2011; 68(2): 103-110.
5. Brathwaite Dick, O., San Martín, J. L., Montoya, R. H., del Diego, J., Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2012). The History of Dengue Outbreaks in the Americas. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2012; 87(4): 584–593.
6. Li-Jung Chien, Tsai-Ling Liao, Pei-Yun Shu, Jyh-Hsiung Huang, Duane J. Gubler and Gwong-Jen J. Chang. Development of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays To Detect and Serotype Dengue Viruses. J Clin Microbiology. 2006; 44 (4):1295–1304.
7. Areerat Sa-ngasang, Sasitorn Wibulwattanakij, Sumalee Chanama, et al. Evaluation of RT-PCR as a tool of diagnosis of secondary Dengue virus infections. 2003. J. Infec. Dis. 56, 205-209. Emerging Infectious Diseases. PLOS Neglected Tropical Diseases; 2013, 7(7): 1-15.
8. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43(10):4977-4983.
9. Gilberto A. Santiago, Edgardo Vergne, Yashira Quiles, Joan Cosme, Jesus Vazquez, Juan F. Medina, Freddy Medina, Candimar Colón, Harold Margolis, Jorge L. Muñoz-Jordán
10. [http://www.cdc.gov/Dengue/resources/rt\\_pcr/CDCPackagelInsert.pdf](http://www.cdc.gov/Dengue/resources/rt_pcr/CDCPackagelInsert.pdf).
11. [http://www.epidemiología.salud.gob.mx/dgae/panoDengue/intd\\_Dengue.html](http://www.epidemiología.salud.gob.mx/dgae/panoDengue/intd_Dengue.html).
12. Eva Harris, T. Guy Roberts, Leila Smith, John Selle, Laura D. Kramer, Sonia Valle, Erick Sandoval, and Angel Balmaseda. Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR. J. Clin Microbiology 1998; 137 (98): 2634–2639.
13. Day-Yu Chao, Brent S. Davis, and Gwong-Jen J. Chang. Development of Multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Detecting Eight Medically Important Flaviviruses in Mosquitoes. J Clin Microbiol. 2007; 584–589.
14. Prevention Board, Seoul: International Vaccine Institute. Accelerating Progress in Dengue Control, Dengue Diagnostics in the Americas. A PDVI publication on behalf of the Americas Dengue. 2009. 1-38.
15. Instructions for collecting, preparing and mailing specimens for Dengue testing at the CDC Dengue Laboratory. 2007.

16. Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009. A joint publication of the World Health Organization (WHO) and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).
17. Scott B. Halstead, Reappearance of Chikungunya, Formerly Called Dengue, in the Americas. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(4); 557-561.
18. J. Erin Staples, Robert F. Breiman, and Ann M. Powers. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. *Clin Infect Dis.* (2009) 49 (6): 942-948.
19. Weaver, Scott C. Lecuit, Marc; Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *New England Journal of Medicine;* 2015; 372(13); 1231-1239.
20. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva, Chikungunya, abril de 2017, Washington, D.C. OPS/OMS. 2017.
21. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India. *Emerg Infect Dis.* 2006; 13(5); 764-767.
22. Díaz-Quiñonez, J. A., Ortiz-Alcántara, J., Fragoso-Fonseca, D. E., Garcés-Ayala, F., Escobar-Escamilla, N., Vázquez-Pichardo, M. Ramírez-González, J. E. (2015). Complete Genome Sequences of Chikungunya Virus Strains Isolated in Mexico: First Detection of Imported and Autochthonous Cases. *Genome Announcements,* 3(3).
23. Díaz-Quiñonez, J. A., Escobar-Escamilla Noé, Ortiz-Alcántara Joanna, Vázquez-Pichardo Mauricio, Torres-Rodríguez María de la Luz, Nuñez-León Alma, Torres-Longoria Belem, López-Martínez Irma, Ruiz-Matus Cuitláhuac, Kuri-Morales Pablo, Ramírez-González José Ernesto. Identification of Asian genotype of chikungunya virus isolated in Mexico. *Virus Genes;* 2016, 52(1); 127-129.
24. Centers for Disease Control and Prevention National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID) Division of Vector-Borne Diseases (DVBD). Zika, 7 de agosto de 2017, USA.
25. Enfermedad por el virus de Zika y sus complicaciones, Organización Mundial de la Salud, disponible en: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/es/>
26. Mlakar, Jernej Korva, MisaTul, Nataša Popović, MaraPoljšak-Prijatelj, Mateja Mraz, Jerica Kolenc, Marko Resman Rus, Katarina Vesnaver Vipotnik, Tina Fabjan Vodušek, Vesna, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. 2016; *New England Journal of Medicine;* 374(10); 951-958.
27. Díaz-Quiñonez JA, Escobar-Escamilla N, Wong-Arámbula C, Vázquez-Pichardo M, Torres-Longoria B, López-Martínez I, et al. Asian genotype Zika virus detected in traveler returning to Mexico from Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2016, 22(5); 937-939.
28. Díaz-Quiñonez JA, Peña-Alonso R, Mendieta-Condado E, Garcés-Ayala F, González-Durán E, Escobar-Escamilla N, Vázquez-Pichardo M, Torres-Rodríguez MDLL, Núñez-León A, Torres-Longoria B, López-Martínez I, Ruiz-Matus C, Kuri-Morales P, Ramírez-González JE. 2016. Complete genome sequence of Zika virus isolated in Mexico, 2016. *Genome Announc* 4(4):e00750-16.

29. Jiménez Corona ME, De la Garza Barroso AL, Rodríguez Martínez JC, Luna Guzmán NI, Ruiz Matus C, Díaz Quiñonez JA, Lopez Martínez I, Kuri Morales PA. Clinical and Epidemiological Characterization of Laboratory-Confirmed Autochthonous Cases of Zika Virus Disease in Mexico. *PLOS Currents Outbreaks*. 2016 Apr 15.
30. Miller MJ, et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. *MMWR Surveillance Summ*. 6; 61:1-102; 2012.
31. Guidelines for Biosafety Laboratory Competency. *MMWR. Supplement/Vol.* 60; 2011.
32. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014; Geneva: WHO Press; 2012.
33. Chosewood C & Wilson DE. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – 5th ed. CDC-NIH; 2009.
34. European Committee for Standardization. CWA 15793:2011 Laboratory biorisk management standard. Brussels: CEN; 2011.
35. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual – 3rd ed. Geneva: WHO Press.
36. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Actualización Epidemiológica: Fiebre amarilla, 2 de agosto de 2017, Washington, D.C. OPS/OMS. 2017.
37. González Duran E, Vázquez Pichardo M, Torres Flores JM, Garcés Ayala F, Méndez Tenorio A, et al. Genotypic variability analysis of DENV-1 in Mexico reveals the presence of a novel Mexican lineage. *Archives of Virology*. 163(9):10.1007/s00705-018-3759-0.

## ANEXOS

### Anexo I: Bioseguridad

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

La recolección y procesamiento de sangre y otras muestras para la Vigilancia de Dengue y otras Arbovirosis, colocan al personal de atención en salud en riesgo de exposición a materiales potencialmente infecciosos. Para minimizar el riesgo de infección, se deben poner en práctica las técnicas seguras de laboratorio, es decir, uso de equipo de protección personal, recipientes apropiados para la recolección y transporte de muestras, etc., según se describe en el Manual de la OMS sobre bioseguridad de laboratorio 3ra.Edición.

Es necesario el uso obligatorio de batas y guantes con el fin de evitar la contaminación de ropa personal de calle. Está prohibido el uso de prendas de laboratorio en lugares como: oficinas administrativas, salas de reuniones.

Todo material contaminado que deba salir del laboratorio para su descontaminación (por autoclave o incineración) debe ser colocado dentro de bolsas especiales debidamente cerradas y etiquetadas. Una cinta testigo deberá ser colocada como indicativo de esterilización. Disponer los residuos biológicos infecciosos según lo indica la NOM-087-SEMARNAT.

El personal de laboratorio debe contar con capacitación específica en los procedimientos que se realizan y deberá ser supervisado por personal especializados en el área. El acceso al laboratorio deberá estar restringido únicamente al personal del laboratorio. Se deben tomar precauciones extremas con objetos punzocortantes contaminados, así como con los procedimientos en los cuales se pueda crear aerosoles infecciosos o salpicaduras, los cuales deberán ser realizados en un gabinete de seguridad biológica. El personal que trabaja en el laboratorio donde se realiza la vigilancia para VDEN, VCHIK, VZIK, VON, VFA deberá estar entrenado en el manejo de estos agentes patógenos y el laboratorio deberá ser dirigido por personal experimentado, con entrenamiento específico en el área. El personal deberá contar con evidencia de la capacitación continua en bioseguridad en el laboratorio.

El jefe de laboratorio deberá designar al personal autorizado para realizar los diferentes procedimientos dentro de un laboratorio con nivel de bioseguridad 2, así como responsabilizarse de su correcta capacitación. Las personas con susceptibilidad de adquirir la infección que esta le resulte

peligrosa, no deberán recibir autorización para el manejo de este tipo de agentes infecciosos.

El Comité Americano de Virus en Artrópodos (ACAV) registró 537 Arbovirus desde diciembre de 1997. En 1979, el Subcomité de Seguridad de Arbovirus en Laboratorios (SALS) de ACAV categorizó cada uno de los 424 virus luego registrados en el Catálogo de Arbovirus y otros virus de vertebrados en uno de los cuatro grupos de prácticas recomendadas, equipamiento e insumos seguros. Éstas están descritas en varias publicaciones, en las cuales se identifican los agentes etiológicos que pueden ser manipulados desde los Niveles 1-4 de Bioseguridad.

Las categorías de SALS se basan en el riesgo derivado de la información proporcionada por una encuesta mundial de 585 laboratorios que trabajan con Arbovirus. SALS recomienda trabajar con la mayoría de los Arbovirus en Nivel de Bioseguridad 2. También reconoce cinco vacunas comúnmente utilizadas, para lo cual se implementa firmemente la atenuación. Estos virus se manejan en forma segura en el Nivel de Bioseguridad 2, siempre y cuando, el personal que trabaja con ellos sea inmunizado. SALS ha clasificado todos los virus para los cuales existe insuficiente experiencia de laboratorio como el Nivel de Bioseguridad 3, y reevalúa la clasificación donde se reporta experiencia adicional. Los virus clasificados como NBS-2 incluyen a VDEN y VZIK como agentes, que se reportan como responsables de infecciones asociadas a los laboratorios, teniéndose reportados 11 para VDEN y 4 para VZIK.

Los resultados de la encuesta de SALS indican claramente que el origen sospechado de las infecciones por VDEN y VZIK asociadas en los laboratorios, no fue la exposición a aerosoles infecciosos. Esto indica que se reportan (a) infecciones asociadas a los laboratorios, (b) infecciones que resultan de exposiciones distintas al del aerosol y (c) infecciones que resultan de la exposición al aerosol. Aunque el VCHIK y VON puede estar ingresado en aquellos virus que deben manejarse en nivel de bioseguridad 3, recomendaciones de OMS/OPS/CDC, sugieren que puede ser manejado en nivel de bioseguridad 2, utilizando buenas prácticas de laboratorio. La primera indicación se basa en la presencia de altas concentraciones de cargas virales, las cuales son normalmente mayores a las infecciones por VDEN.

El uso de gabinetes de bioseguridad tipo dos deberá ser indispensable y obligatorio para cada LESP. El uso de equipo de protección personal (bata, guantes, gafas de bioseguridad, cubre boca, zapatos cerrados), son necesarios para manipular cualquier muestra sospechosa de infección por VDEN, VCHIK, VZIK y otros Arbovirus. El jefe de laboratorio deberá designar al personal autorizado para realizar los diferentes procedimientos dentro de un laboratorio con nivel de seguridad 2, así como responsabilizarse de su correcta capacitación. Las personas con susceptibilidad de adquirir la infección o que esta le resulte peligrosa, no deberán recibir autorización para el manejo de

agentes infecciosos ni de animales infectados. El laboratorio deberá contar con todas las señalizaciones necesarias para el buen desempeño de actividades con agentes virales. Desde el 2015, durante supervisiones realizadas para evaluar la competencia técnica en la RNLSP, se identificó que varios laboratorios manipulaban los sueros para análisis de anticuerpos en mesas de trabajo, motivo por el cual desde el 2016 el LNR, está exigiendo usar gabinetes de bioseguridad tipo 2 para manipular las muestras. Esta exigencia deberá ser cumplida para finales del 2019, en donde se realizó supervisión indirecta (solicitud de evidencias) para identificar que toda la RNLSP cuente con gabinetes de bioseguridad tipo 2 para manejo de muestras para la Vigilancia serológica y molecular de Arbovirus. 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 ARN 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. El personal emplea guantes libres de talco y batas desechables. Para sanitizar las áreas y superficies de trabajo, es necesario utilizar hipoclorito de sodio entre el 2-3% (3% de cloro libre por preparación w/v o v/v), agua bidestilada y etanol al 75% (siempre utilizar en ese orden para no promover vapores que se forman con el contacto de hipoclorito y etanol) o en su caso usar las soluciones correspondientes para eliminación de ARNsas y DNAsas.

#### Anexo II: Técnicas diagnósticas y preparación de reactivos.

Los procedimientos para la vigilancia de anticuerpos (serológica) y de ARN (molecular), se deben realizar como lo indican las técnicas correspondientes (insertos) para poder cumplir con la validación de cada ensayo.

Es importante indicar que las muestras a procesar por cualquiera de estas técnicas se deben manejar en estricta red fría, es decir que no deben permanecer a temperatura ambiente, para lo cual se sugiere sacar las muestras del refrigerador hasta el momento de realizar cada procedimiento y una vez terminado el uso de las mismas se deben mantener almacenadas en un rango de 2-8 °C. De ser posible, se recomienda que para el manejo de las muestras (ya sea al momento de rotularlas, usarlas en cada técnica y separar en alícuotas) se utilicen “coolers” o se coloque la gradilla sobre una cama de hielo o de refrigerantes congelados. En caso de manejar un gran número de muestras por corrida (arriba de 50), deberá hacerse en bloques de 25 o 30 muestras para asegurar la red fría y se deberán cambiar los congelantes y el

hielo durante cada bloque. En el caso de uso de “coolers”, se debe asegurar que se mantengan fríos.

El énfasis para el manejo de muestras en estrictas condiciones de red fría radica en aumentar las posibilidades de aislamiento viral (en caso de que aplique y únicamente se realiza en el LNR para análisis virales específicos o producción de antígenos) y detección de material genético, ya que los cambios de temperatura promueven la degradación de las proteínas de superficie de la partícula viral, así como para evitar la degradación del ARN (ácido ribonucleico) del virus que es altamente termolábil e inestable. Lo anterior debe ser tomado en cuenta ya que se ha evidenciado que las cargas virales para VZIK son muy baja comparadas con las de VDEN y VCHIK, lo cual puede promover falsos negativos en muestras con muy baja concentración viral.

### Serología para determinación de anticuerpos IgM

Detección de anticuerpos IgM contra VDEN mediante ELISA de captura comercial – DCSA y DG.

La técnica de ELISA avalada por el InDRE, que permite detectar en fase convaleciente (6-14 días de inicio de síntomas) la presencia de anticuerpos IgM específicos para VDEN, es una técnica de ELISA cualitativa de captura que tiene pozos sensibilizados con anti IgM los cuales reaccionarán con el anticuerpo presente en la muestra problema y las reacciones de antígeno-anticuerpo serán reveladas mediante el uso de cromógeno, previa adición de antígeno y conjugado específico. La reacción colorimétrica evidencia la presencia de anticuerpos específicos. El uso de esta ELISA está restringido en aquellos casos con clínica que define daño en el sistema hemodinámico presente exclusivamente en casos de DCSA y DG. El manejo de matriz, reactivos, tiempo y temperaturas de incubación, longitudes de onda para la lectura e interpretación de resultados, deben ser respetadas según instrucciones del kit y deberán seguirse en el orden y volúmenes indicados. Los estándares de servicio para esta metodología son de 3 días hábiles.

## Detección de anticuerpos IgM contra VCHIK mediante ELISA de captura comercial.

La técnica de ELISA avalada por el InDRE, que permite detectar en fase convaleciente (6-12 días de inicio de síntomas) la presencia de anticuerpos IgM específicos para VCHIK, es una técnica de ELISA cualitativa de captura que tiene pozos sensibilizados con anti IgM, los cuales reaccionarán con el anticuerpo presente en la muestra problema y las reacciones de antígeno-anticuerpo serán reveladas mediante el uso de cromógeno, previa adición de antígeno y conjugado específico. La reacción colorimétrica evidencia la presencia de anticuerpos específicos. El manejo de matriz, reactivos, tiempo y temperaturas de incubación, longitudes de onda para la lectura e interpretación de resultados, deben ser respetadas según instrucciones del kit y deberán seguirse en el orden y volúmenes indicados. Los estándares de servicio para esta metodología son de 3 días hábiles.

## Detección de anticuerpos IgM contra VZIK mediante ELISA de captura comercial.

La técnica de ELISA avalada por el InDRE, que se utiliza en el algoritmo para seguimiento a embarazadas y neonatos, que no tuvieron toma de muestra durante la fase aguda de la enfermedad; permite detectar en fase convaleciente (6-30 días de inicio de síntomas) la presencia de anticuerpos IgM específicos para VZIK. Esta técnica es una nueva ELISA de captura con formato diseñado por los CDC que cuenta con pozos sensibilizados con anticuerpos policlonales para captura de anticuerpos IgM humanos, los cuales se unen a los anticuerpos específicos para VZIK. Los anticuerpos IgM específicos contra VZIK se unen después de la adición de antígeno de la glicoproteína de envoltura de VZIK, reacción que es revelada mediante el uso de conjugado y cromógeno. La reacción colorimétrica evidencia la presencia de anticuerpos específicos. Esta ELISA permite definir la presencia de anticuerpos específicos contra VZIK, pero además permite definir la presencia de anticuerpos contra otros flavivirus. El manejo de reactivos, tiempo y temperaturas de incubación, longitudes de onda para la lectura e interpretación de resultados, deben ser respetadas según instrucciones del estuche y deben seguirse en el orden y volúmenes indicados. Los estándares de servicio para esta metodología en conjunto con la inmunofluorescencia son de 3 días hábiles.

## Biología molecular para la detección de virus.

### Detección e identificación de VDEN, VCHIK y VZIK mediante RT-PCR en tiempo real (TRIPLEX)

La RT-PCR en tiempo real, es un ensayo que tiene la capacidad de monitorear en cada ciclo el progreso de la amplificación de material genético. Los datos son colectados desde el primer ciclo de reacción hasta el último, permitiendo realizar cuantificación relativa y absoluta de la carga viral presente en la muestra. La detección de la amplificación de una secuencia específica es monitoreada mediante la captación de señales de fluorescencia emitida durante los ciclos de la PCR. La presencia de altas concentraciones de ARN o de número de copias de material genético evidenciará un incremento en la fluorescencia en los primeros ciclos de la reacción. Por el contrario, bajas concentraciones de ARN permitirán obtener un incremento de fluorescencia en los últimos ciclos de la reacción.

VDEN, VCHIK y VZIK, se encuentran en circulación en concentraciones detectables durante la fase aguda de la enfermedad (0-5 días) y esta característica hace que este ensayo molecular sea utilizado únicamente durante esta fase, o en su caso en muestras de tejidos post-mortem.

### Tipo de muestras que se pueden usar.

Debe usarse únicamente en muestras de suero, fluidos libres de células, sobrenadantes de macerado de tejidos, otra muestra diferente deberá ser evaluada, así como su ensayo de extracción específico y se deberán apegar rigurosamente a las especificaciones e interpretaciones emitidas por el productor (CDC o algún otro estuche comercial). Actualmente muestras de mosquitos (clarificado de mosquitos) pueden ser utilizadas para la vigilancia entomo-virologica. El uso de sangre completa u otro tipo de muestra no ha sido establecido aún para su análisis. El envío de ARN de los LESP al InDRE quedará sujeto a evaluación por el Laboratorio de Arbovirus según necesidades identificadas; lo anterior a falta de matriz principal como suero, mosquitos y otros.

Las metodologías comerciales TRIPLEX para detección de ARN avaladas por el InDRE, contemplan el mismo principio. El manejo de tipos de muestras, reactivos, tiempo y protocolos de amplificación, canales de detección e interpretación de resultados, deben ser respetadas según instrucciones del estuche y deben seguirse en el orden y volúmenes indicados. Los estándares de servicio para cualquier metodología molecular TRIPLEX son de 3 días hábiles.

Para los LESP que no dispongan de algún kit para la detección simultánea de VDEN, VCHIK y VZIK, la vigilancia virológica debe realizarse mediante el uso de RT-qPCR individual con protocolos avalados y deberán respetar los valores de corte indicados para su interpretación para cada metodología.

#### Para tipificación de virus dengue.

Para la identificación del tipo de VDEN que se presenta en muestras positivas, identificadas mediante el uso del "kit TRIPLEX" (de CDC o estuche comercial), se debe seleccionar el 100% de muestras positivas de Dengue Grave y Dengue con Signos de Alarma, el 10% para muestras positivas de Dengue no Grave. Este último porcentaje quedará sujeto a la incidencia de la enfermedad en el estado. En estados con mayor incidencia, el porcentaje debe ser ajustado promoviendo que sea menor al 10% y el estado con menor incidencia el porcentaje deberá ser respetado. Esto último queda sujeto a observaciones y especificaciones que la Dirección General de Epidemiología y epidemiología estatal indiquen, con base en el abasto de insumos en los LESP o LAVE, únicamente se solicita notificar oficialmente por escrito del cambio realizado.

Para los LESP que no dispongan de algún kit para la detección de los cuatro serotipos de VDEN, la vigilancia virológica de serotipos debe realizarse mediante el uso de RT-PCR en tiempo real que este avalado por el LNR. En el caso de actualización de iniciadores, el LNR lo indicara con al menos seis meses de anticipación para que la RNLSP realice la compra y transición a las nuevas secuencias para su inmediata aplicación.

#### Para detección de otro Arbovirus.

Las técnicas diagnósticas para determinación de otros Arbovirus (virus del Oeste del Nilo, virus de la Fiebre amarilla, virus Mayaro), quedan sujetas para referencia únicamente en el LNR. Una vez que se valore la posibilidad de incrementar la capacidad diagnóstica en la RNLSP y que se cumpla con la oportunidad de la vigilancia de Dengue, Chikungunya y Zika; se emitirá información para indicar que protocolos de diagnóstico molecular y serológico se implementarán. Lo anterior estará sujeto también al desempeño demostrado en los últimos dos años en el LESP.

#### Controles positivos certificados

- VDEN

Cada una de las cepas tipo de los cuatro diferentes serotipos del virus Dengue; VDEN-1 (HAWÁII), VDEN-2 (NUEVA GUINEA), VDEN-3 (H-87 o PR-6) y VDEN-4 (H-241) se inocularon en monocapa confluente al 90% de células C6-36 (donadas por el CDC, Dengue Branch, de San Juan, Puerto Rico). El medio de cultivo MEM (Medio Mínimo Esencial) para mantenimiento es suplementado con 1% de vitaminas, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de L-glutamina y 2% de suero fetal de ternera (SFT). Las cepas son cosechadas a los 6-7 días para VDEN-2 y VDEN-3 y a los 9 días para VDEN-1 y VDEN-4. Son enriquecidas con 10% de SFT para criopreservar y posteriormente son almacenadas a -80 °C, hasta su uso. Los controles pueden ser propagados en otras líneas celulares, las cuales tendrán trazabilidad de producción. Cada vez que lo soliciten, estas cepas (inactivadas) son enviadas a los LESP que realizan la vigilancia virológica para ser usados como controles positivos en sus ensayos, las cuales serán debidamente inactivadas en solución de lisis utilizada en cualquiera de los estuches de extracción de material genético. Actualmente ya existen casas comerciales que fabrican controles cuantificables y que sirven como controles internos de proceso de extracción y de amplificación, estos serán recomendados por el InDRE únicamente previa evaluación. En caso de producción de controles positivos sintéticos de VDEN producido mediante clonación, se hará de conocimiento a la RNLSP para que realicen su solicitud de envío. Se hará de conocimiento a la RNLSP que estuches y reactivos están avalados para la vigilancia por laboratorio.

- **VCHIK**

Los controles positivos que actualmente se envían a la RNLSP para la detección de VCHIK, mediante RT-PCR en tiempo real, contemplan un aislado de cepa autóctona inactivada en solución de lisis y un plásmido de la misma cepa. Esta cepa cuenta con registro en el GenBank (KP795107.1).

- **VZIK**

Los controles positivos que actualmente se envían a la RNLSP para la detección de VZIK, mediante RT-PCR en tiempo real, contemplan un aislado de cepa autóctona inactivada en solución de lisis y un plásmido de la misma cepa. Esta cepa cuenta con registro en el GenBank (KU686218.1).

- **VFA**

El control positivo de Fiebre amarilla, quedan sujetos únicamente para el envío a los LESP con capacidad de respuesta y ante estrategia para la vigilancia molecular mediante RT-PCR en tiempo real, contempla un aislado de cepa vacunal 17D inactivada en solución de lisis.

- **VON**

El control positivo de virus del Oeste del Nilo, quedará sujeto únicamente para el envío a los LESP con capacidad de respuesta y ante estrategia para la vigilancia molecular mediante RT-PCR en tiempo real, contempla un aislado autóctono inactivado en solución de lisis.

De no contar con los controles de referencia que envía el InDRE, se deben utilizar muestras positivas autóctonas identificadas durante los últimos seis meses. Lo anterior debe ser reportado al laboratorio de Arbovirus y virus hemorrágicos y deberá enviar evidencia del gráfico de amplificación en formato original que emite el termociclador. Existen controles comerciales certificados y avalados por el LNR, los cuales pueden ser utilizados para validar las corridas, además de poder ser usados como controles de tercera opinión.

En cuanto a los controles negativos, en las metodologías para biología molecular se recomienda incluir un control negativo de reactivo (NRT) y/o un control negativo de muestra (NTC) un ARN negativo para la metodología según aplique.

### **Plataformas automatizadas de extracción de ácidos nucleicos**

Las plataformas de extracción avaladas para la vigilancia molecular de Arbovirus son informadas vía la CRNLSP y deberán ser utilizadas para responder los paneles de evaluación externa del desempeño. Los resultados obtenidos con el uso de cualquier otra plataforma no avalada por el InDRE, no serán aceptados.

### **Plataformas de amplificación**

Las plataformas de amplificación validadas para realizar la vigilancia molecular de Arbovirus son informadas vía la CRNLSP y deberán ser utilizadas para responder los paneles de evaluación externa del desempeño. Los resultados obtenidos con el uso de cualquier otra plataforma no avalada por el InDRE, no serán aceptados.

El uso de otra plataforma de extracción y amplificación, debe ser informada al laboratorio de Arbovirus y virus hemorrágicos vía correo electrónico y debe enviar la evidencia de implementación, verificación y no se deben emitir resultados hasta no recibir el aval del InDRE.

### **Conservación de las muestras**

- Las muestras de fase aguda y convaleciente de pacientes con sintomatología compatible a Dengue, Chikungunya, Zika y otros Arbovirus, además de los clarificados de mosquitos, se deberán conservar en

refrigeración (2-8 °C) desde la toma o colecta hasta el envío y recepción a los LESP o al LNR. Las muestras de mosquitos de ser posible deben congelarse inmediatamente se colecten para evitar la degradación de material genético.

- Los clarificados de muestras postmortem se obtendrán del macerado de 1-2 cm<sup>3</sup> de tejido postmortem y de mosquitos\* a partir de máximo 30 especímenes (*Aedes*) y de 15 especímenes (*Culex*), con mortero o macerador semiautomático o automático. Los tejidos y mosquitos deben ser macerados en 1.5 mL de medio MEM enriquecido con Suero Fetal de Ternera (SFT) al 5% y 0.1% de penicilina/estreptomicina. Esta última especificación se realizará en caso de que se requiera aislamiento del virus identificado. En caso de no contar con el medio antes especificado, se puede realizar el macerado de moscos en medio de transporte viral o en PBS esteril suplementado con 10% de SFT o albúmina bovina.

\*Los mosquitos capturados deberán ser enviados al laboratorio de entomología para la correspondiente clasificación y entrega al laboratorio para detección viral.

- El producto del macerado deberá centrifugarse a 2700 rpm, durante 10 minutos a 4 °C para obtener un clarificado, el cual será utilizado para extracción de ARN.
- El clarificado restante deberá separarse en alícuotas de 500 µL que se almacenan a -70 °C.
- A los clarificados se les realizará extracción de ARN mediante el método manual (QIAGEN) o automatizado (ROCHE MagNA Pure LC 2.0). Una vez extraído y purificado el ARN, se almacenará a -20 °C y se debe amplificar inmediatamente para cumplir con los estándares de servicio. Las alícuotas que no se utilicen deben almacenarse a -70 °C.

Los estuches que se pueden utilizar en la vigilancia virológica serán comunicados en informes enviados por la CRNLSP y podrán ser utilizadas para responder los paneles de evaluación externa del desempeño. Los resultados obtenidos con el uso de cualquier otro estuche de amplificación no avalado por el InDRE, no serán aceptados.

#### Notas:

1. En el caso de aquellos LESP que por alguna emergencia no cuenten con algún kit TRIPLEX, la detección por separado de cada Arbovirus debe ser analizada con los fluoróforos correspondientes. Los fluoróforos pueden ser cambiados por otros, siempre y cuando se encuentren en el mismo canal de adquisición. Esto dependerá de la disponibilidad en la síntesis de cada empresa.

2. Desde abril del 2016 se gestionó la distribución de un kit elaborado por CDC de Atlanta, GA., el cual contempla los insumos necesarios para amplificar los cuatro serotipos de VDEN. El rendimiento de este kit es de 200 amplificaciones. La siguiente dirección electrónica contiene toda la información para la implementación y especificaciones de cada iniciador y sonda utilizada.

[http://www.cdc.gov/Dengue/resources/rt\\_pcr/CDCPackageInsert.pdf](http://www.cdc.gov/Dengue/resources/rt_pcr/CDCPackageInsert.pdf). Dicha distribución de los estuches de CDC está sujeta a existencias en el LNR.

Los laboratorios de la Red, que cuenten con este kit, deben utilizarlo. Desde agosto del 2016 se comenzó a gestionar la distribución de un nuevo kit para la detección simultánea de los tres agentes etiológicos de mayor importancia epidemiológica en la actualidad (VDEN, VCHIK y VZIK-CDC). El estuche es conocido como TRIOPLEX-CDC y tiene un rendimiento para 500 amplificaciones. Este estuche cuenta con la determinación de VDEN pero no logra identificar el serotipo y deberá ser utilizado en conjunto con el kit o protocolo de RT-PCR correspondiente para tipificación de VDEN en aquellas muestras positivas para Dengue.

Una vez que se autorice la utilización de este kit (TRIOPLEX-CDC) en la Red, se realizará la notificación pertinente. Dicha distribución de los estuches de CDC está sujeta a existencias en el LNR.

En la siguiente dirección electrónica se puede encontrar la información técnica para la implementación:

<https://www.cdc.gov/zika/pdfs/spanish/trioplex-real-time-rt-pcr-assay-instructions-for-use-sp.pdf>

En caso de realizar la vigilancia de serotipos de VDEN mediante el uso de RT-PCR que no sea un kit, debe ser indicado en el informe semanal.

En los LESP que no cuenten con un kit TRIPLEX pueden realizar la identificación por separado, realizando las siguientes interpretaciones:

**Interpretación para VDEN mediante el uso de RT-PCR por separado (que no sea kit):**

- Muestras con valor de Cq menor o igual a 37 son positivas.
- Muestras con valor de Cq mayor a 37 son negativas.
- Muestras con Cq menor o igual a 37, pero con curvas NO sigmoides, no deben reportarse y deben repetirse por duplicado, (realizando nuevamente la extracción y repitiendo la amplificación de los dos amplificados).
- Muestras con más de un serotipo identificado, se deben repetir desde la extracción de ARN. Esto para descartar posible contaminación.

- El protocolo de identificación deben manejar los colores siguientes (para gráficos): verde fluorescente para identificar VDEN-1, rojo para identificar VDEN-2, azul para identificar VDEN-3 y negro para identificar VDEN-4. Las especificaciones anteriores aplican también para el estuche de CDC o estuches comerciales, esto para evitar confusión en la interpretación.

**Interpretación para VCHIK mediante el uso de RT-PCR en tiempo real por separado (que no sea kit):**

- Muestras con valor de Cq menor o igual a 36 son positivas.
- Muestras con valor de Cq mayor a 36 son negativas.
- Muestras con Cq menor o igual a 36, pero con curvas NO sigmoides, no deben reportarse y deben repetirse por duplicado.
- El protocolo de identificación debe manejar el color morado (gráficos).

**Interpretación para VZIK mediante el uso de RT-PCR en tiempo real por separado (que no sea kit):**

- Muestras con valor de Cq menor o igual a 39 son positivas.
- Muestras con valor de Cq mayor a 39 son negativas.
- Muestras con Cq menor o igual a 39, pero con curvas NO sigmoides, no deben reportarse y deben repetirse por duplicado. Se debe tener en cuenta, que las cargas virales bajas en Zika, pueden promover falsos negativos en caso de no manipular las muestras en estricta red fría.
- El protocolo de amplificación deben manejar el color rosa (graficos).

**Notas:**

- En caso de incorporar un control interno se deben seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los estuches TRIPLEX comerciales ya incluyen sus propios controles positivos y el control interno análogo al RP. En las muestras que resulten positivas a VDEN por una metodología TRIPLEX en donde se incluya RP, para realizar la tipificación viral por la metodología individual avalada ya no será necesario incluir el RP.
- Deberán utilizarse controles internos (RP o análogos) para monitorear el proceso de extracción y deberá aplicar para cualquiera de los RT-PCR para la vigilancia de VDEN, VCHIK, VZIK y otros Arbovirus.
- Los controles positivos y negativos sirven para monitorear alguna falla en alguno de los reactivos para validar el ensayo. Deberán utilizarse diluidos para obtener Cq mayor a 27. Lo anterior es con el objetivo de evitar contaminaciones por el manejo de altas concentraciones de material genético de referencia, específicamente en los controles sintéticos.
- El ensayo se debe repetir si alguno de los controles positivos no amplifica o si estuvieran fuera del rango esperado o si el control negativo muestra amplificación.

- En las muestras que no amplifique el marcador específico y el control interno (RP), deberán ser repetidas por duplicado, comenzando con una nueva extracción, amplificando el nuevo y viejo extracto, esta indicación aplica para cualquier RT-PCR en tiempo real.

Durante los procesos antes mencionados se deberán seguir las siguientes prácticas de laboratorio:

- Manejo adecuado de reactivos. Asegurarse que los reactivos se usen y manejen siguiendo las buenas prácticas de laboratorio para biología molecular. Mantenerlos en red fría durante su uso. Evitar ciclos de congelamiento y descongelamiento prolongados.
- Manejo adecuado del equipo. Usar adecuadamente el equipo siguiendo las instrucciones de uso descritas en los manuales de operación del mismo.
- Áreas de trabajo. Se debe contar con áreas separadas para extracción, preparación de mezcla maestra de reacción, adición de los ARN problema y adición de controles positivos. Al finalizar el trabajo en cada área se deberá descontaminar el área de trabajo. Se sacará y desechará todo el material sucio, de no hacerlo se puede promover contaminación.
- Capital humano. Asegurar que se cuente con personal capacitado para el adecuado desarrollo del método e interpretación de resultados.
- Asegurar la limpieza y descontaminación del área, para asegurar eliminar cualquier traza de ADN que se pueda generar durante el proceso, por lo que se recomienda desechar las placas/tubos en el contenedor de biológico-infeccioso en otra área diferente. Si se requiere almacenar el ADN para realizar análisis posterior a la amplificación se recomienda hacerlo en otra área independiente. Los controles enviados que son plasmidos representan un riesgo de contaminación cuando no se aplican las buenas prácticas del laboratorio. Por tal motivo estas prácticas deben ser reforzadas en todo el proceso de amplificación.

### Interpretación de resultados

- **Negativo:** No existe presencia de ARN viral o existe carga viral extremadamente baja la cual esta relacionada con la sensibilidad del método. Este resultado aplica siempre y cuando el RP de las muestras este presente, en caso contrario de no identificar el RP, la muestra se reporta Negativa con la observación de muestra inadecuada. La ausencia de RP evidencia la calidad de la muestra y promueve la degradación del ARN.
- **Positivo:** Es indicativo de infección reciente y presencia de ARN viral de cualquiera de los Arbovirus identificados.

### Anexo III: Vigilancia entomo-virológica mediante RT-PCR en tiempo real

Esta nueva metodología de vigilancia es consecuencia de las necesidades y a las exigencias que plantea la situación epidemiológica de las Arbovirosis, y son el efecto de la implementación de la Inteligencia Epidemiológica basada en laboratorio que permite coadyuvar con el programa de vectores para lograr una verdadera vigilancia epidemiológica oportuna y preventiva.

La Vigilancia entomo-virológica fue diseñada desde sus inicios para una búsqueda intencionada de Arbovirus en campo, con la finalidad de detectar los virus circulantes en una región poco habitada (selva) en donde se encontraban principalmente reservorios primates.

Una de las necesidades actuales de cualquier programa, es el desarrollo de la vigilancia anticipatoria (activa) para ampliar la capacidad de predecir la transmisión de las enfermedades donde se involucran a los vectores, y a su vez proporcionar una herramienta para la implementación de medidas de control.

La evolución de la vigilancia entomo-virológica ha permitido demostrar a México a nivel mundial sus beneficios cuando se aplica de manera oportuna, sostenida y controlada. Los Laboratorios de Entomología y Arbovirus y Virus Hemorrágicos han colaborado para integrar la experiencia de los dos componentes: entomológico y virológico.

Desde el año 2009 mediante el apoyo de CONACyT y ante la propuesta de iniciar a desarrollar investigación operativa, se diseñó la implementación de este tipo de vigilancia (activa), obteniendo resultados que han promovido la aplicación oportuna de acciones por parte del Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). Esta vigilancia en México está incluida dentro de la Estrategia de Gestión Integral de Dengue (EGI-Dengue). En 2017 el LNR fue nombrado coordinador de la Vigilancia entomo-virológica en las Américas y en noviembre de 2018 el InDRE organizó un Taller-Curso Internacional de seguimiento e implementación de la Vigilancia entomo-virológica.

La co-circulación de varios Arbovirus, la vacunación contra Fiebre Amarilla, la posible introducción de una vacuna para Dengue en la región de las Américas y la emergencia de VCHIK y VZIK, plantea un escenario de alta complejidad para el diagnóstico etiológico y serológico por la presencia de reacciones cruzadas de la enfermedad, que debe ser tomado en cuenta para las actividades de investigación de los equipos nacionales.

A partir del 2011, el InDRE, ha brindado capacitación para la implementación de la vigilancia en los Laboratorios Estatales de Salud Pública, haciendo cumplir lo establecido en EGI-Dengue y otras Arbovirosis. Actualmente México ha sido reconocido por la Organización Mundial de la Salud como líder en este tipo de vigilancia, la cual se encuentra ya implementada en parte de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP).

En este anexo se promueve los detalles a seguir para el monitoreo de mosquitos adultos con fines de vigilancia de circulación viral, que resultan en la transmisión sostenida. El muestreo aplicará principalmente para especímenes de mosquitos de los principales géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* y otros de importancia médica que el laboratorio de entomología del InDRE y el Centro Nacional de Prevención y Control de Enfermedades (CENAPRECE) consideren. El componente enteramente entomológico (diseño de captura, clasificación, manejo y envío al laboratorio de Arbovirus y virus hemorrágicos para la detección molecular, se encuentra específicamente en el anexo de vigilancia entomo-virológica de los lineamientos del laboratorio de entomología). La detección virológica se realiza mediante métodos moleculares (RT-PCR en tiempo real), avalados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC). Aunque VDEN, VCHIK, VZIK, son los principales agentes etiológicos a monitorear, la detección de otros agentes estará sujeta a las necesidades que demande la epidemiología actual, en donde el CENAPRECE juega un papel importante para involucrar también la detección de VON, VFA, Virus Mayaro (VMAY), virus de la Encefalitis de San Luis (VESL), virus de la encefalitis de Venezuela (VEEV), virus de la Encefalitis equina del Este (VEEE), virus de la encefalitis equina del Oeste (VEEO), el diagnóstico de estos últimos seis agentes etiológicos se realizan actualmente en InDRE y bajo solicitud específica. La detección de VDEN, VCHIK y VZIK se deben realizar en los LESP. La búsqueda de otros Arbovirus se realizará en el LNR.

Durante 2011 se capacitaron los LESP de Oaxaca, Morelos, San Luis Potosí, Nuevo León, Guerrero, Chiapas, Guanajuato y Zacatecas, los cuales fueron seleccionados por contar con los componentes entomológicos y virológicos. En el caso de que algún otro LESP, haga saber al InDRE que cuenta con los dos componentes, este será seleccionado para la capacitación de vigilancia entomo-virológica. En julio de 2012 se realizó una capacitación vía Webex a toda la RNLSP para la implementación de este tipo de técnica. En 2016 se han realizado capacitaciones vía webex y se ha compartido información a la RNLSP.

En marzo de 2017 se capacitó al LESP de Nayarit. Desde 2009 y durante las Reuniones Nacionales de Vectores, se han realizado capacitaciones a los entomólogos jurisdiccionales y estatales para poder vincular efectivamente todas las actividades. Toda muestra enviada para su análisis debe tener menos de 15 días naturales de tránsito (desde la colecta hasta la recepción al LESP o LNR).

En caso de cualquier desviación a los criterios de inclusión, las muestras serán rechazadas.

1. Esta vigilancia debe realizarse por aquellos LESP que tengan liberada la metodología de RT-qPCR y que cuenten con la contraparte entomológica, los cuales se harán cargo de la captura y clasificación de los especímenes (laboratorio de entomología), estos deben ser entregados en congelación, red fría o vivos, según sea el caso, al área responsable de la vigilancia virológica y está podrá llevar a cabo el macerado y clarificado de los especímenes para su posterior detección por RT-PCR en tiempo real.

Este tipo de vigilancia se realizará en grupos con número de especímenes menores a 30 cuando se realiza la búsqueda en *Aedes* y cuando sea *Culex* deben ser máximo de 15 especímenes (lineamientos entomología). El número mínimo para analizar puede ser desde un solo especímen para ambas especies.

2. El tipo de muestra para la vigilancia entomo-virologica deben ser mosquitos adultos.

3. En caso de captura de huevecillos o larvas, estos deberán ser cultivados para obtener mosquitos adultos; análisis que servirá para determinar zonas con transmisión vertical. La detección directa de huevecillos no deberá realizarse por el momento hasta no tener evidencias de protocolos estandarizados en el LNR.

4. El LESP es el responsable de notificar inmediatamente al InDRE (laboratorio de entomología y al laboratorio de Arbovirus y virus hemorrágicos) y al Programa de Vectores Estatal de los resultados obtenidos, para la toma de acciones oportunas.

5. El estándar de servicio será de 5 días hábiles una vez que los especímenes clasificados sean recibidos en los LESP.

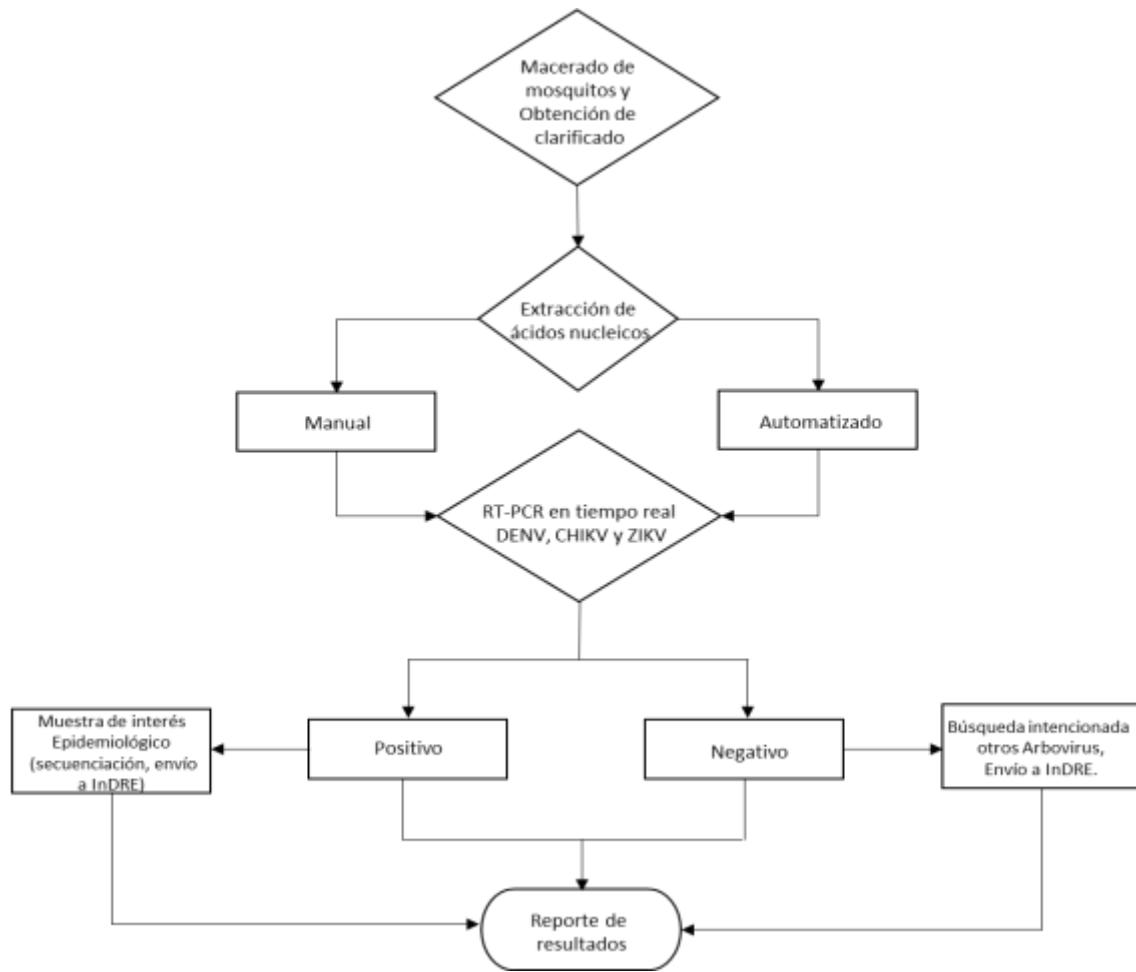
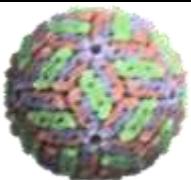
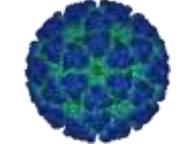
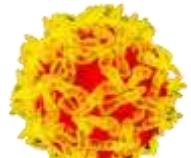


Figura 6. Algoritmo para la vigilancia entomo-virológica. Búsqueda intencionada de VDEN, VCHIK y VZIK mediante RT-PCR en tiempo real a partir de mosquitos. Para la búsqueda intencionada de otros virus se debe enviar al LNR el 10% de clarificados o ARN negativos.

#### Anexo IV: Imágenes de Portada

Imagen	Fuente
 Imagen AlV.1	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez" Fotografía de la portada propiedad de HKS Arquitectos
 Imagen AlV.2	Virus Dengue, Tomada de <a href="https://dtoepidemiología.wordpress.com/2013/10/27/identifican-un-quinto-subtipo-de-virus-dengue/">https://dtoepidemiología.wordpress.com/2013/10/27/identifican-un-quinto-subtipo-de-virus-dengue/</a> Consultada el día 05/12/2018
 Imagen AlV.3	Virus Zika, Tomada de <a href="https://www.medicalnewstoday.com/articles/323096.php">https://www.medicalnewstoday.com/articles/323096.php</a> Consultada el día 05/12/2018
 Imagen AlV.3	Virus Chikungunya, Tomada de <a href="http://spanish.people.com.cn/n/2014/0827/c92121-8775309.html">http://spanish.people.com.cn/n/2014/0827/c92121-8775309.html</a> Consultada el día 05/12/2018
 Imagen AlV.4	Virus de la fiebre amarilla, Tomada de <a href="https://721news.com/region-caribbean/fiebre-amarilla-la-ops-instala-los-estados-miembros-permanecer-vigilantes/">https://721news.com/region-caribbean/fiebre-amarilla-la-ops-instala-los-estados-miembros-permanecer-vigilantes/</a> Consultada el día 05/12/2018
 Imagen AlV.5	Virus del Oeste del Nilo Tomada de <a href="https://www.canstockphoto.es/oeste-virus-nilo-45272286.html">https://www.canstockphoto.es/oeste-virus-nilo-45272286.html</a> Consultada el día 05/12/2018

# 80

1939-2019  
ISET-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"