



GUIA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA POLIOMIELITIS POR POLIOVIRUS

DIRECCION REDES EN SALUD PÚBLICA
SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA

GRUPO DE VIROLOGIA

2019



Dirección

Martha Lucia Ospina
Directora General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

Astrid Carolina Flórez Sánchez
Directora Técnica (E)
Redes en Salud Pública

Clara del Pilar Zambrano Hernández
Subdirectora
Laboratorio Nacional de Referencia

Dioselina Peláez Carvajal
Coordinadora
Grupo de Virología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Omayda Cárdenas Bustamante
Equipo Técnico
Dirección de Redes en Salud Pública

Elaborado por:

Dioselina Peláez Carvajal
Equipo de Laboratorio de Polio/Enterovirus

Grupo de Virología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública



TABLA DE CONTENIDO

OBJETIVOS DE LA GUÍA 4

ALCANCE 4

DEFINICIONES, SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS..... 5

1. GENERALIDADES 6

 1.1 Agente etiológico..... 6

 1.2 Epidemiología de la Enfermedad 7

 1.3 Reservorio del agente viral. 7

 1.4 Incubación..... 7

 1.5 Inmunidad..... 7

 1.6 Patogénesis 8

 1.7 Diagnóstico diferencial 9

 1.8 Antecedentes e importancia de la vigilancia del evento 9

2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO 12

 2.1 Papel del Laboratorio en la eliminación y erradicación del poliovirus 12

 2.2 Tipos de muestras, recolección y transporte 12

 2.3 Documentos requeridos para el envío de muestras al INS 12

 2.4 Bioseguridad en el laboratorio 13

 2.5 Ensayos de Laboratorio asociados a la vigilancia virológica del evento 13

 2.6 Interpretación de resultados 13

 2.7 Limitaciones y/o interferencias del ensayo de aislamiento viral de polio/enterovirus. 14

 2.8 Causa de rechazo o no procesamiento de las muestras. 14

 2.9 Informe de resultados 14

3. CONTROL DE CALIDAD 15

4. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DEL EVENTO..... 15

 4.1 Instituciones Prestadoras de Servicios de Salud (IPS), Laboratorios clínicos del sector público y privado..... 15

 4.2 Funciones del Laboratorios de Salud Pública departamental –LSPD..... 15

 4.3 Funciones del laboratorio nacional de referencia (LNR) en el Instituto Nacional de Salud 16

5. INDICADORES DE EVALUACIÓN DE LA VIGILANCIA DE PFA 16

 5.1 Indicadores Epidemiológicos..... 16

 5.2 Indicadores de laboratorio 17

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 17





OBJETIVOS DE LA GUÍA

Trazar lineamientos técnicos y operativos de la vigilancia por laboratorio del evento parálisis flácida aguda en menores de 15 años con diagnóstico probable de poliomielitis por poliovirus salvaje, derivado de vacuna o asociado a vacuna oral de polio.

Precisar la organización de la red nacional de laboratorios para la vigilancia de la parálisis flácida aguda, así como describir las funciones en cada uno de los niveles.

Describir los procesos de obtención, transporte y conservación de las muestras para la vigilancia del evento.

Detallar los fundamentos técnico-científicos de los ensayos de laboratorio implementados en la vigilancia de la parálisis flácida aguda.

ALCANCE

La presente guía aplica la parálisis flácida aguda en menores de 15 años como estrategia para la erradicación del poliovirus, agente causal de la poliomielitis.

DEFINICIONES, SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- **Parálisis flácida aguda - PFA:** Pérdida de movimientos voluntarios con debilidad muscular que se instala en un tiempo menor a 10 días.
- **Poliomielitis:** Es una enfermedad viral febril aguda, cuyo patógeno afecta preferentemente las regiones de la médula espinal que controlan los movimientos. Esto puede producir, en algunos casos desfavorables, parálisis y muerte.
- **Poliovirus:** Virus humano del género *Enterovirus humanos* del grupo C, de la familia *Picornaviridae* y agente causante de la poliomielitis. Es un pequeño virus ARN de cadena lineal simple en sentido positivo, con un tamaño cercano a 30 nm de diámetro y aproximadamente 7500 nucleótidos.
- **SDS:** Secretaria Departamental de Salud.
- **PV:** Poliovirus
- **VDPV:** Virus derivado de vacuna de poliovirus.
- **VDVP-2:** Poliovirus derivado de vacuna oral de polio tipo 2
- **VIP:** Vacuna inactivada (virus muerto) de poliovirus.
- **VOP:** Vacuna oral (virus vivo atenuado) de poliovirus
- **VOP3:** Vacuna oral de polio tres dosis
- **IPS:** Institución prestadora de servicios de salud
- **LDSP:** Laboratorio departamental de Salud Pública
- **LNR:** Laboratorio Nacional de Referencia
- **Células RD:** Células derivadas de Rbdomiosarcoma humano, que expresan receptores celulares que permiten la internación de diferentes virus, entre ellos el virus polio.
- **Células L20B:** Células de ratón genéticamente modificadas para expresar el receptor humano CD155.
- **ENP:** Enterovirus no polio
- **VNE:** Virus no enterovirus
- **WPV-1** poliovirus salvaje tipo 1

1. GENERALIDADES

La poliomielitis o polio paralítica, es una enfermedad viral causada por cualquiera de los tres serotipos de virus polio y que pueden afectar la médula espinal causando debilidad muscular y parálisis flácida. La poliomielitis es más probable que ocurra en niños de 4 a 15 años, pero puede ocurrir en adultos no vacunados. Es una enfermedad muy infecciosa y en su forma aguda causa inflamación en las neuronas motoras de la médula espinal y del cerebro, lleva a la parálisis, atrofia muscular y muy a menudo deformidad. En el peor de los casos puede causar parálisis permanente o la muerte al paralizarse el diafragma.

El 14 de mayo de 1985, el director de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) propuso como meta la erradicación del poliovirus salvaje en las Américas. En septiembre de 1985, en la XXXI Reunión del Consejo Directivo de la OPS, los Gobiernos Miembros aprobaron por unanimidad la resolución en la que se establece ese objetivo. En 1994 y luego de tres años no detección de poliovirus en las Américas gracias a la vigilancia intensiva realizada por más de 21 000 centros de salud que presentaban informes semanales, y a la investigación de más de 3800 casos probables de poliomielitis, se declaró a la Región de las Américas libre de virus salvaje de polio.

Por otra parte, la campaña de erradicación fortaleció notablemente los servicios de vacunación de otras enfermedades prevenibles incluidas en el Programa Ampliado de Inmunización (PAI). Para lograr la erradicación, diversos organismos públicos y privados unieron sus esfuerzos a los de la OPS, entre ellos el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID), los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), la Asociación Canadiense para la Salud Pública (CPHA) y el Club Rotario Internacional (1).

1.1 Agente etiológico

El virus polio pertenece a la familia *Picornaviridae*, grupo enterovirus. Es un virus ARN de una sola hebra, de polaridad positiva de aproximadamente 7500 pb. En su extremo 5' se une la proteína viral (VPg) y su cápside está conformada por cuatro proteínas virales VP1, VP2 y VP3 ancladas a una cuarta proteína VP4, localizada en la cara interna de la cápside viral (Figura 1). No posee envoltura lipídica, es un virus desnudo por lo que es relativamente resistente a los cambios ambientales de temperatura y pH. Su ARN se comporta como ARN mensajero que se traduce en una poliproteína que es clivada en varias proteínas importantes en la replicación viral.

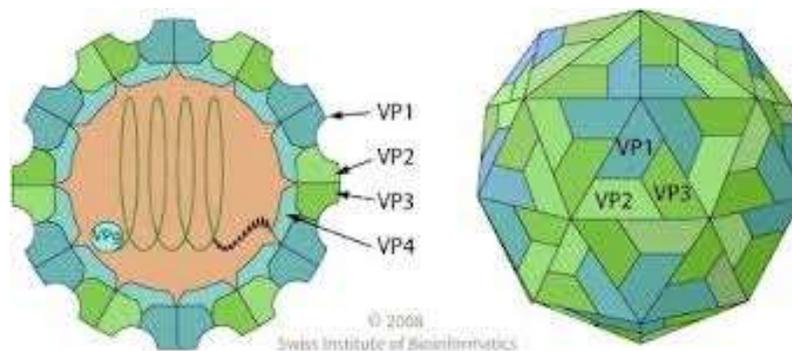


Figura 1. Estructura del virus polio. Tomado de:

https://sites.google.com/site/infomedesm/_/rsrc/1368471837185/virus-de-la-poliomilits/clasificacion-y-estructura/estructura%20polio.jpg



Existen tres tipos antigénicos del poliovirus: 1, 2 y 3; los tres pueden provocar parálisis, pero el tipo 1 lo hace con mayor frecuencia, el tipo 3 en menor medida y el tipo 2 (erradicado del mundo desde 1999) lo producía rara vez, sin embargo, es el más inestable genéticamente. La mayoría de las epidemias se deben al poliovirus de tipo 1. Los casos relacionados con la vacuna, que contiene los tres tipos de virus, generalmente son producidos por los tipos 2 ó 3 y los casos por virus derivado de vacuna oral de polio (VDVP) han sido causados principalmente por poliovirus 1 y 2 aunque 3 también puede derivar en este tipo de virus (2, 3, 4).

1.2 Epidemiología de la Enfermedad

La poliomiелitis (del griego *πολιός*, *poliós*: gris y de *μυελός*, *myelós*: *medula espinal*) es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente al sistema nervioso central. La enfermedad es producida por el virus polio siendo la enfermedad más frecuente en niños de 4 a 15 años, susceptibles a la infección es decir niños no vacunados o inmunocomprometidos. El virus se transmite de persona a persona a través de secreciones respiratorias o por la ruta fecal-oral, la excreción de partículas virales puede estar cercana a $1 \times 10^{11}/g$ de heces hacia la segunda semana de la primo-infección con el virus. La mayoría de las infecciones son asintomáticas (menos del 1% de las infecciones presenta síntomas). La vía fecal-oral es muy común en los países en desarrollo, donde el saneamiento es deficiente, mientras que la transmisión orofaríngea es frecuente en las naciones industrializadas y también durante los brotes. Una semana después del inicio de la enfermedad quedan pocos virus en la garganta; sin embargo, continúan excretándose en las heces durante seis a ocho semanas. Los casos probablemente son más infecciosos en los primeros días antes y después del inicio de los síntomas. (3, 4, 5, 7, 8, 9).

1.3 Reservorio del agente viral.

El ser humano es el único reservorio; debido al gran número de infecciones subclínicas, a veces resulta difícil encontrar la fuente de un caso. No se ha demostrado que existan portadores a largo plazo, excepto en las raras circunstancias en que el virus ha sido aislado en forma repetida y por largos períodos en personas inmunodeficientes. Aunque no ha habido evidencia de que a partir de estos casos generen brotes, no se puede descartar esta posibilidad por la alta tasa de mutación de estos virus entre cepas homologas, heterólogas y con otros enterovirus. (4, 5, 7, 8, 9).

1.4 Incubación.

En promedio, el período de incubación desde el momento de la exposición al virus hasta la aparición de parálisis, es de siete a 21 días (con un mínimo de cuatro días y un máximo de 40). El poliovirus es demostrable en las secreciones faríngeas después de 36 horas de la exposición a la infección y en las heces después de 72 horas, tanto en los casos clínicos como en los asintomáticos. A la enfermedad inicial le siguen algunos días relativamente asintomáticos, que son previos a la parálisis. (3, 4, 5, 7, 8, 9).

1.5 Inmunidad.

Toda persona no inmunizada es susceptible de contraer la poliomiелitis. Las pruebas epidemiológicas demuestran que los recién nacidos de madres con anticuerpos están protegidos en forma natural contra la enfermedad paralítica durante algunas semanas. La inmunidad se adquiere después de una infección por el virus salvaje o por vacunación. La inmunidad adquirida por la infección natural (que incluye infecciones subclínicas y leves) o por la serie completa de la vacuna de poliovirus vivo de administración oral provoca respuestas tanto humorales como localizadas en las células intestinales. Se estima que esta inmunidad es vitalicia y que puede bloquear la infección por subsiguientes virus salvajes, interrumpiendo la cadena de transmisión. La aplicación de la vacuna inactivada de poliovirus (VIP) confiere inmunidad humoral, pero la inmunidad intestinal es relativamente menor. Se cree que la inmunidad cruzada entre distintos tipos de poliovirus es escasa o nula. (3, 4, 5, 7, 8, 9).

1.6 Patogénesis

La boca es el punto de entrada común. El virus se multiplica primero en los ganglios linfáticos de la faringe y del sistema gastrointestinal, y por lo general está presente en la faringe y en las heces antes del inicio de la enfermedad paralítica. Una vez en el interior del organismo, el virus penetra en el tejido linfóide local, ingresa al torrente sanguíneo y puede invadir ciertos tipos de células nerviosas, en cuyo interior se multiplica, dañándolas o destruyéndolas por completo. Muchos individuos infectados por el poliovirus salvaje presentan enfermedades leves que no pueden distinguirse clínicamente de padecimientos asociados a otras causas. Los síntomas relacionados con estas enfermedades son fiebre leve, dolores musculares, cefalea, náuseas, vómitos, rigidez del cuello y de la espalda y, con menor frecuencia, signos de meningitis aséptica-no bacteriana (Figura 2).

Cuando se produce parálisis por poliomyelitis se pueden presentar las siguientes características: flacidez (los músculos no presentan rigidez ni espasmos), dificultad para permanecer de pie y caminar, preceden comúnmente síntomas de una enfermedad leve, como dolor de garganta, cefalea, dolor de espalda, fiebre, vómitos, etc.; se presenta muy pronto, por lo general en menos de cuatro días, su inicio regularmente va acompañado de fiebre, la mayoría de los pacientes experimenta escasa o nula pérdida sensorial por ejemplo, sí siente un pinchazo (este signo puede ser difícil de determinar en los niños), por lo común, las piernas se ven más afectadas que los brazos y los grupos de músculos grandes corren más riesgo que los pequeños; los músculos proximales de las extremidades tienden a sufrir más daño que los distales; es generalmente asimétrica (aunque puede producirse parálisis de cualquier combinación de extremidades) lo más común es que se vea afectada solo una pierna y, con menor frecuencia, un brazo únicamente, la cuadriplejía es rara en los lactantes, las secuelas suelen persistir más de 60 días después del inicio de síntomas. (3, 4, 5, 7, 8, 9).

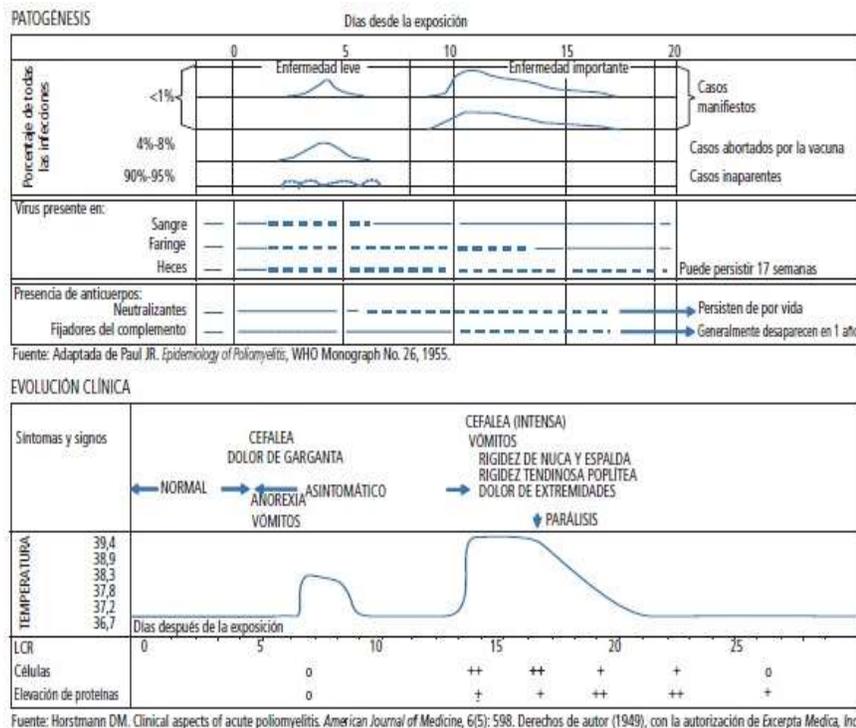


Figura 2. Patogénesis y evolución clínica de la Poliomyelitis aguda



1.7 Diagnóstico diferencial

Es necesario investigar todos los casos de PFA en menores de 15 años que no se deban evidentemente a traumatismos graves. Si hay una firme presunción de poliomielitis en personas mayores de 15 años, estos casos también deberán investigarse en forma exhaustiva. Es difícil confirmar la poliomielitis paralítica en la fase aguda sobre la base de los signos y síntomas clínicos solamente, ya que muchas otras enfermedades y trastornos pueden causar síntomas similares. Por lo tanto, la confirmación del laboratorio es indispensable para el diagnóstico definitivo. Las dos enfermedades que se confunden más a menudo con poliomielitis son el síndrome de Guillain-Barré (SGB) y la mielitis transversa (3, 9, 15).

Otras afecciones que podrían presentar síntomas similares a los de la poliomielitis paralítica son la neuritis traumática, ciertos tumores y con menos frecuencia, la meningitis/encefalitis y las enfermedades producidas por diversas toxinas. La diferencia más importante entre la poliomielitis y las demás causas de PFA es que en la primera las secuelas paralíticas suelen ser graves y permanentes, mientras que en las demás causas la PFA tiende a resolverse o mejorar 60 días después de iniciada. La única neuropatía periférica que es pertinente para los diagnósticos diferenciales de la poliomielitis es la que se produce como efecto secundario de la ingestión de *Karwinskia calderonii* o *Humboldtiana*, baya venenosa que se encuentra en algunas zonas de México y América Central en ciertas estaciones del año. La mortalidad puede llegar al 20% de los casos si no se brinda adecuado respaldo respiratorio. Otras neuropatías periféricas de la niñez, como la metabólica (diabética), la tóxica (solventes de plomo y lípidos) o hereditarias (Charcot-Marie-Tooth) carecen de importancia a los efectos del diagnóstico diferencial de la poliomielitis, pues todas ellas siguen una trayectoria crónica (3, 4, 9).

1.8 Antecedentes e importancia de la vigilancia del evento

Campaña de Erradicación mundial del poliovirus salvaje

En mayo de 1988, la 41ª Asamblea Mundial de la Salud comprometió los estados miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para que tomaran la iniciativa de la erradicación mundial de la poliomielitis para el año 2000 (resolución WHA41.28). La resolución especificaba que esta iniciativa debería perseguir el fortalecimiento del Programa Ampliado de Inmunización (PAI). En 1989, la 42ª asamblea de la OMS aprobó un plan general de acción para la Erradicación Mundial de la Poliomielitis, teniendo como estrategias la vacunación con vacuna oral de polio (VOP3) de todos los menores de cinco años, la detección de virus en muestras de materia fecal de todos los casos con Parálisis Flácida Aguda (PFA) en menores de 15 años y la búsqueda activa e investigación de casos de PFA tanto en instituciones hospitalarias como en comunidad (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

La campaña mundial para erradicar la poliomielitis es la iniciativa de salud pública más grande en la historia con un extraordinario progreso alcanzando en 1998 la reducción del 99% de los casos en solo 10 años. En 1988, esta enfermedad existía en más de 125 países de los cinco continentes y más de 350.000 niños quedaron paralizados en ese año. En 1994 se certificó la desaparición del poliovirus salvaje de la región de las Américas, pero en 2000-2001, se presentó un brote en Haití y República Dominicana, causado por poliovirus tipo 2 derivado de vacuna, controlado por aumento en las coberturas de VOP3 en los dos países (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

A finales de 2002, más de 180 países y territorios estaban libres de poliomielitis, el número de países afectados por la poliomielitis se había reducido a siete, eliminándose de tres continentes: americano, pacífico occidental y europeo, confirmándose 1900 casos. En mayo de 2013 se notificó un brote en Somalia que a diciembre había causado parálisis de 194 niños y 62 casos en tres países del Cuerno de África (Somalia, Kenia y Etiopía). Todos los casos fueron causados por poliovirus salvaje tipo 1 (WPV-1). En 2014, se notificaron 359 casos de WPV-1 en nueve países del mundo y 160 muestras ambientales fueron también positivas para WPV-1. Aunque los casos reportados de poliovirus salvaje aumentaron en

Pakistán y Afganistán, los casos en Nigeria disminuyeron sustancialmente en 2014 y se produjo un progreso alentador hacia la interrupción de la transmisión de poliovirus salvaje en el mundo.

En el 2015, 74 casos de poliovirus salvaje fueron reportados en dos países (Afganistán y Pakistán), una disminución de 79% con respecto a los reportados en 2014 en nueve países y 37 casos fueron reportados en 2016. En este mismo año, Nigeria notificó 4 casos de PFA y nuevamente adquirió el estatus de país endémico que no había tenido durante el 2015 y septiembre de 2016. En 2017, ocho casos de la poliomiélitis parálitica por polio tipo 1 (WPV-1) se presentaron en Pakistán, en comparación con 20 en 2016. En Afganistán, se reportaron 14 casos, en comparación con 13 en 2016. En 2018 se notificaron 15 casos de WPV-1 de PFA, 12 de ellos en Pakistán y 3 en Afganistán, lo que contrasta con el número de casos ya en 2019, 73 en total, 58 detectados en Pakistán y 15 en Afganistán. En 2018 la vigilancia ambiental identificó 224 muestras positivas para WPV-1 mientras que ya se han identificado 221 en 2019, cerca del 87% detectadas en Pakistán. Actualmente hay circulación endémica del virus salvaje en tres países: Afganistán, Pakistán y Nigeria. Afganistán y Pakistán continuaron siendo tratados como un solo bloque epidemiológico. Ver resumen de casos de poliovirus salvaje en el mundo en Figura 3.

Global Wild Poliovirus 2014 - 2019

Country or territory ³	Wild virus type 1 confirmed cases								Wild virus type 1 reported from other sources ²							
	Full year total					01 Jan - 24 Sep ²		Date of most recent case	Full year total					01 Jan - 24 Sep ²		Date of most recent virus
	2014	2015	2016	2017	2018	2018	2019		2014	2015	2016	2017	2018	2018	2019	
Pakistan	306	54	20	8	12	4	66	28-Aug-19	127	84	62	110	141	66	224	05-Sep-19
Afghanistan	28	20	13	14	21	14	16	02-Aug-19	17	20	2	42	83	36	36	29-Aug-19
Nigeria	6	0	4	0	0	0	0	21-Aug-16	1	1 ⁶						27-Sep-16
Iran	0	0	0	0		0		NA							3	20-May-19
Israel ⁴	0	0	0	0	0	0	0	NA	14							30-Mar-14
West Bank and Gaza	0	0	0	0	0	0	0	NA	1							05-Jan-14
Somalia	5	0	0	0	0	0	0	11-Aug-14								
Cameroon	5	0	0	0	0	0	0	09-Jul-14								
Equatorial Guinea	5	0	0	0	0	0	0	03-May-14								
Iraq	2	0	0	0	0	0	0	07-Apr-14								
Syrian Arab Republic	1	0	0	0	0	0	0	21-Jan-14								
Ethiopia	1	0	0	0	0	0	0	05-Jan-14								
Total	359	74	37	22	33	18	82		160	104	65	152	224	102	263	
Total wild virus type 1	359	74	37	22	33	18	82									
Total wild virus type 3	0	0	0	0	0	0	0									
Tot. in endemic countries	340	74	37	22	33	18	82									
Tot. in non-end countries	19	0	0	0	0	0	0									
No. of countries (infected)	9	2	3	2	2	1	0									
No. of countries (endemic)	3	2 ⁵	2 ⁵	3	3	1	0									

Countries in yellow are endemic. ¹Data reported to WHO HQ on 25 Sep 2018 for 2018 data and 24 Sep 2019 for 2019 data. ²Wild viruses from environmental samples, selected contacts, healthy children and other sources. Last WPV type 3 had its onset on 10 November 2012. ³In March 2014, a serotype 1 wild poliovirus was detected in an environment specimen from Brazil, further investigation indicates this is an isolated event without evidence of circulation. ⁴Results are based on L20B positive culture. Prior to reporting week 16, 2014, results were based on a combination of direct qRT-PCR on RNA from concentrated sewage and L20B positive culture. ⁵Between 27 Sep 2015 and 27 Sep 2016, Nigeria was not classified as endemic. NA - Most recent case had onset prior to 1999. ⁶Exceptionally reporting case-contact of a positive index case given the date of collection is later than the onset date of the most recent WPV.

Data in WHO HQ as of 24 Sep. 2019

Figura 3. Circulación mundial de Polio salvaje, 2014- 2019. Tomado de: <http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/08/weekly-polio-global-update-03Sep19.pdf>

Además del poliovirus salvaje como agente causante de enfermedad paralítica, se ha registrado un importante número de casos asociados a vacuna oral de polio tipo Sabin (VOP) – casos de origen postvacunal, causados generalmente por los tipos 2 ó 3, en menor frecuencia por PV-1 asociados generalmente a las dos primeras dosis de VOP, pero también a la tercera e inclusive a individuos contactos de vacunados (3, 4, 9, 12).

Un tercer tipo de poliovirus son los poliovirus derivado de la vacuna tipo Sabin o VDPV, que han causado brotes en Egipto, Filipinas, Haití, Madagascar, República Dominicana, India, China, Nigeria, Pakistán, entre otros. Estos virus han mutado en más de 1% respecto de la cepa original Sabin para los tipos 1 y 3 y >0,6% para polio tipo 2, revirtiendo su neurovirulencia. Se conocen tres tipos de poliovirus derivados de la vacuna: el iVDPV (i de inmunocomprometido), aislado en personas con deficiencia inmunitaria, el cVDPV (c de circulante en comunidad), que ha sido aislado en brotes y ha mostrado tener las mismas características epidemiológicas y biológicas de los virus salvajes y al aVDPV (ambiente o ambiguo) encontrado en muestras ambientales y en casos inmunocompetentes sin casos de PFA en la comunidad. Sorprendentemente en septiembre 19 de 2019, Filipinas notificó dos casos de PFA por VDPV-2, igualmente identificó cuatro muestras ambientales por VDPV-1 y dos por VDPV-2, eventos ocurridos por las bajas coberturas de vacunación de los últimos dos años en el país. Debido a la alta inestabilidad genética del poliovirus tipo 2, la gran mayoría de cepas VDPV detectadas en el mundo, corresponde a este serotipo. Ver comportamiento de la circulación de cepas de VDPV en Figura 4.

Global Circulating Vaccine-derived Poliovirus (cVDPV)^{1,2,3} 

Country	AFP cases (Paralysis onset between 2000-2019)					Onset of most recent case	Other sources (Human) ¹ (collection between 2015-2019)					most recent collection date	Other sources (Environment) (collection between 2015-2019)					most recent collection date
	cVDPV1																	
	2015	2016	2017	2018	2019		2015	2016	2017	2018	2019		2015	2016	2017	2018	2019	
Myanmar				1	6	29 Aug 19					12	18 Jun 19						18 Jun 19
Indonesia				1		27 Nov 18					2	13 Feb 19						13 Feb 19
PHG				25		18 Oct 18				7		20 Sep 18				7		06 Nov 18
Levi	8	3				11 Jan 16	6	5				09 Feb 16						
Madagascar	10					22 Aug 15	1					01 Aug 15						
Ukraine	2					07 Jul 15												
Mozambique						02 Jun 11												
China						11 Nov 04												
Philippines						26 Jul 01												
DOR/Haiti						12 Jul 01												
Total type 1	20	3	0	27	6		7	5	0	7	14		0	0	0	7	0	
cVDPV2																		
Country	2015	2016	2017	2018	2019	Onset of most recent case	2015	2016	2017	2018	2019	most recent collection date	2015	2016	2017	2018	2019	most recent collection date
Nigeria	1	1		34	16	08 Aug 19		2		53	19	24 Jul 19	2	1		44	55	27 Aug 19
Philippines					6	30 Jul 19					31	22 Aug 19					2	22 Aug 19
Central African Republic					19	15 Aug 19					14	30 Jul 19					5	21 Aug 19
Angola				22	20	26 Jul 19			19	15	16	14 Aug 19						
DR Congo					1	23 Jul 19												
Ghana					2	22 Jul 19					3	28 May 19					2	13 Aug 19
Ethiopia					1	30 Jun 19												
Benin					1	25 Apr 19					1	14 Jun 19				1		18 Apr 18
China				6	3	08 May 19				3	2	25 May 19			2	19		11 Oct 18
Somalia					1	12 Aug 13					6	16 Mar 19					1	20 Apr 19
Cameroun				10	1	03 Apr 19				4	6	16 Mar 19						
Niger				1		21 Oct 18				2		17 Dec 18						
Mozambique						29 Aug 12									1			21 Mar 18
Kenya						21 Sep 17			1	66		12 Sep 17						28 Dec 16
Syria	2	1	74			17 Dec 16							7	4				
Pakistan	7					14 Dec 15												
Guinea	2					05 Oct 15												
Myanmar						12 Sep 14												
South Sudan						12 May 13												
Chad						13 Mar 13												
Afghanistan						05 Oct 11												
Yemen						18 Jan 10												
India						13 Jul 05												
Madagascar																		
Total type 2	12	2	96	71	80		0	3	85	77	92		9	5	2	63	63	
cVDPV3																		
Country	2015	2016	2017	2018	2019	Onset of most recent case	2015	2016	2017	2018	2019	most recent collection date	2015	2016	2017	2018	2019	most recent collection date
Somalia				7		07 Sep 18					2	29 Jun 18						23 Aug 18
Yemen						12 Jul 13												
Ethiopia						17 May 10												
Cambodia						15 Jan 06												
Total type 3	0	0	0	7	0		0	0	0	2	0		0	0	0	12	0	

Figura 4. Circulación de Polio virus derivado de vacuna tipo 1, 2, y 3, 2000- 2019. Tomado de: <http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/this-week/circulating-vaccine-derived-poliovirus/>

2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

2.1 Papel del Laboratorio en la eliminación y erradicación del poliovirus

Dado que algunas otras patologías pueden mostrar síntomas neurológicos idénticos a los causados por virus polio y algunos agentes diferentes a poliovirus pueden también causar parálisis flácida aguda, el laboratorio ha sido y es crucial para garantizar que la iniciativa cumpla con sus objetivos. La mayoría de las infecciones por poliovirus son asintomáticas, con síntomas clínicos que se observan en sólo 0,1 a 1% de las infecciones, razón por la cual, es esencial el estudio virológico y sistemático de todos los casos de PFA notificados, un solo caso positivo de poliovirus salvaje perdido, puede significar que un millar de infecciones se han perdido también. En países como Colombia, donde la transmisión del poliovirus salvaje cesó desde comienzos de los años 90s, el papel del laboratorio es proporcionar información oportuna y precisa sobre los poliovirus salvajes importados de países donde la poliomielitis sigue siendo endémica, los casos de PFA asociados a vacuna y la identificación inmediata de cepas neurovirulentas derivadas de vacuna oral (VDPV) y poner a disposición pruebas virológicas que permitan la identificación oportuna y confiable de los diferentes virus de polio. En todo caso, el laboratorio debe trabajar en estrecha colaboración con el equipo nacional de vigilancia, respondiendo a sus necesidades de información precisa y oportuna para el diagnóstico por laboratorio de los casos probables de polio (15).

2.2 Tipos de muestras, recolección y transporte

El aislamiento e identificación de cualquier serotipo de poliovirus salvaje o de una cepa neurovirulenta derivada de vacuna a partir de las heces del caso o de sus contactos (cuando haya sido necesario recolectarlos), es el criterio único para la confirmación de casos. Las muestras deben ser recolectadas dentro de los primeros 14 días luego del inicio de la parálisis, utilizando envases plásticos con tapa ancha de rosca y cierre hermético. La cantidad requerida es de 4-5 gramos (tamaño del dedo gordo) y remitidas al nivel central, INS, dentro de los 4 días siguientes a la recolección. Si no es posible enviarlas el mismo día, deberán ser refrigeradas por un tiempo no mayor a 48 horas (2 - 8° C), de lo contrario deben ser congeladas a -20° C. Se debe asegurar cadena de frío desde la toma hasta la llegada al INS, no serán procesadas muestras que lleguen con > 8° C pues no se ha asegurado su viabilidad.

Para el **diagnostico por laboratorio de la poliomielitis solo se procesarán muestras fecales**; las muestras de escobillado faríngeo o rectal y LCR no son aptas para este ensayo. Sin embargo, todos los casos deberán tener un estudio citoquímico completo de LCR y los resultados deberán estar consignados en la historia clínica allegada al laboratorio. La detección de anticuerpos antipolio no tiene ningún valor diagnóstico, por tanto, no se recomienda la toma de suero de manera rutinaria (3, 9,15). Si el paciente ha fallecido, se deben hacer cortes de cerebro, cerebelo, cuerpo caloso, medula e intestino, ponerlas en solución salina estéril identificando el tipo de tejido y remitirlas al INS para el estudio viral. Estas se manejan en condiciones de temperatura idénticas a las muestras de heces. Adicionalmente, se debe también remitir cortes en solución tamponada de formol al 10% para el estudio histopatológico, estos últimos no deben ser congelados en ningún momento (3, 9).

2.3 Documentos requeridos para el envío de muestras al INS

Las muestras deben ser remitidas al INS acompañada de un oficio de remisión, resumen de historia clínica del paciente y ficha de notificación del evento y con todos los campos diligenciados, especialmente fechas de inicio de parálisis, de recolección de muestra y de envío al INS.

2.4 Bioseguridad en el laboratorio

Toda muestra biológica debe ser embalada y transportada según normas IATA: **Sustancia biológica, Categoría B, UN 3373**. Debe estar identificada de manera inequívoca, escrita en forma clara y en tinta indeleble, con nombre del paciente, tipo de muestra, tipo de análisis y fecha de la recolección de la muestra (16, 17).

2.5 Ensayos de Laboratorio asociados a la vigilancia virológica del evento

Aislamiento viral en líneas celulares RD y L20B: Este método de ensayo consiste en la inoculación de las muestras de materia fecal en células RD y L20B las cuales son sensibles a la infección por enterovirus (EV) y especialmente las células L20B han sido modificadas para la expresión del receptor humano del poliovirus en células epiteliales: CD155. La detección de crecimiento de virus se evalúa por presencia de efecto citopático – ECP. Entre el 85%-93% de las muestras procesadas no exhiben ECP luego de 10 días cultivo en células. Aquellas muestras que exhiben ECP en ambas líneas celulares, deben ser procesadas para caracterización intratípica de virus polio y tamizaje de virus derivado de vacuna (VDPV) por RT-PCR en tiempo real. Aproximadamente el 90% de los aislamientos obtenidos corresponde a enterovirus humanos no polio (ENP) y para efectos del programa de polio, NO es de interés la identificación del serotipo de los ENP aislados.

Identificación de cepas de Polio: La clasificación intratípica de cepas de poliovirus y tamizaje de cepas VDPVs se realiza por RT-PCR en tiempo real. Las muestras con ECP positivos son congeladas y descongeladas con el fin de lisar las células para liberar la mayor cantidad de partículas virales posibles, para posteriormente amplificar por rRT-PCR. En la reacción de rRT-PCR, el RNA viral es convertido a DNA complementario (cDNA) mediante una reacción de transcripción reversa y el cDNA es amplificado en una reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) por la enzima Taq polimerasa. Los productos de PCR son detectados e identificados por hibridización con una sonda tipo Taqman® específica. Tanto la síntesis de cDNA como las reacciones de PCR utilizan sets de primer de oligonucleótidos (algunos de ellos son primers degenerados) los cuales al igual que las sondas Taqman® tienen diferentes especificidades. Esta combinación de primers permitirá en la identificación, diferenciación intratípica y tamizaje de VDPV.

Identificación de Enterovirus Humano: Existen aproximadamente 15 especies de serotipos de EV diferentes (18). Los EV humanos A, B, C y D y los Rhinovirus humanos A, B, y C afectan de manera frecuente a los seres humanos, especialmente a niños menores de un año y a adultos mayores de 65 años. La mayoría de estos han sido asociados a patologías que incluyen: poliomielitis (EVH-C), meningitis aséptica, encefalitis, enfermedad perinatal por enterovirus, miocarditis, pericarditis, pleurodinia, enfermedad respiratoria, enfermedad febril por enterovirus, exantema viral, enantema, conjuntivitis no específica, conjuntivitis hemorrágica aguda, uveitis, gastroenteritis, hepatitis, artritis, pancreatitis, infección crónica en pacientes inmuno-comprometidos, infección urinaria y orquitis.

Para efectos de apoyo a la investigación de brotes por enfermedad enteroviral, se procesan muestras de LCR, lavado ocular, líquido pericárdico, tejido de pulmón, hígado o cerebro cuando se sospechen cuadros clínicos cuya etiología sea enterovirus no polio. En estos casos la identificación del serotipo tiene interés epidemiológico el cual en la mayoría de las veces se realizará por secuenciación de la región VP1 del virus.

2.6 Interpretación de resultados

- A. Si una muestra (suspensión fecal, homogenizado de tejido o LCR) inoculada en células susceptibles a infección por polio/enterovirus, durante 10 días en monocapas celulares nuevas y

viales, no exhibe ECP luego de 10 días de cultivo, se informará: *“Aislamiento viral de polio/enterovirus: NEGATIVO”*.

- B. Si una muestra (suspensión fecal, homogenizado de tejido o LCR) inoculada en células susceptibles a infección por polio/enterovirus, exhibe ECP típico de virus lítico solo en células RD, en el 99% de los casos corresponderá a un enterovirus no polio. Eventualmente un virus no-polio o virus no enterovirus, puede crecer en L20B, sin embargo, siempre deberá confirmarse como ENP por RT-PCR o RT-PCR en tiempo real y se informará así. *“SE AISLÓ ENTEROVIRUS NO POLIO”*. Dependiendo del caso o si se trata de un brote de enfermedad enteroviral, se requiere caracterización viral por RT-PCR con primers específicos o secuenciación parcial de genoma (región VP1) del virus y uno de los posibles resultados puede ser: *“SE AISLÓ ECHOVIRUS 30”*
- C. Si una muestra (suspensión fecal, homogenizado de tejido o LCR) inoculada en células susceptibles a infección por enterovirus, exhibe ECP típico de virus lítico en ambas líneas celulares RD y en L20B, requiere identificación por rRT-PCR y tamizaje para VDPV. Las opciones de resultados pueden ser:
“SE IDENTIFICÓ POLIOVIRUS 1 DE TIPO VACUNAL SABIN-LIKE”
“SE IDENTIFICÓ POLIOVIRUS DERIVADO DE VACUNA TIPO 2 (VDPV- 2)”
“SE AISLO VIRUS NO ENTEROVIRUS”.

2.7 Limitaciones y/o interferencias del ensayo de aislamiento viral de polio/enterovirus.

El éxito del aislamiento viral de polio/enterovirus en células depende de la cepa de virus, de la cantidad de virus excretado en heces, de la integridad del virus y de su capacidad de multiplicación en las células. Existe pérdida de partículas virales debido a la proliferación bacteriana y de hongos por el almacenamiento prolongado de las muestras durante la fase de envío (más 5 días a temperatura no adecuada > 8 °C). Muestras recolectadas fuera del tiempo de excreción viral (más de 14 días luego de la presentación de los síntomas en PFA o más de 5 días en otras enfermedades enterovirales como meningitis) disminuyen la probabilidad de recuperación viral.

2.8 Causa de rechazo o no procesamiento de las muestras.

Toda muestra biológica debe ser embalada y transportada según normas IATA en triple embalaje, si no llega en estas condiciones asegurando las normas de bioseguridad y cadena de frío será rechazada. La identificación de la muestra debe ser inequívoca, escrita en forma clara y en tinta indeleble, con nombre del paciente, tipo de muestra, tipo de análisis y fecha de la recolección de la muestra, si hay dudas en el nombre o número de identificación del paciente, la muestra será rechazada. Las muestras deberán venir acompañadas de un oficio de remisión, resumen de historia clínica del paciente y ficha de notificación del evento con TODOS los campos diligenciados. Las muestras de materia fecal deberán ser recolectadas oportunamente (dentro de los primeros 14 días luego de la parálisis), en cantidad NO menor a 1 gr, en frascos plásticos, de tapa rosca con cierre hermético y correctamente embaladas. Se vienen en estado de descomposición (con hongos, secas), en frascos de vidrio y tapones de caucho, no serán procesadas en el laboratorio de polio/EV del INS.

2.9 Informe de resultados

Según los lineamientos internacionales para el programa de vigilancia de parálisis flácida aguda (PFA), la emisión de los resultados se da dentro de los 14 días posteriores a la llegada de la muestra al laboratorio de Polio /EV del INS. Se suman 7 días calendario cuando el aislamiento viral es positivo y se requieren ensayos adicionales para su caracterización final, sin embargo, al día 14 de recibida la muestra se debe informar a cliente (remite de la muestra para el análisis) un resultado preliminar, para no perder la oportunidad de respuesta.

3. CONTROL DE CALIDAD

Aseguramiento de la calidad: Desde comienzos de la campaña de erradicación y creación de la red de laboratorios de polio, existe un programa de evaluación externa directa del desempeño - PEEDD de los laboratorios de la red mundial de polio, liderado por dos laboratorios de referencia, el cual consiste en:

- A. Panel anual de proficiencia para aislamiento viral de polio/EV en líneas celulares: se reciben 10 muestras fecales enviadas por el National Institute for Public Health and Environment de Holanda. Su calificación mínima es 90%, en los últimos 10 años el promedio de calificación del INS ha sido 100%.
- B. Panel de proficiencia en la caracterización intratípica de virus polio y tamizaje de cepas derivadas de vacuna – VDPV (por rRT-PCR) enviado anualmente por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de USA. Su calificación mínima es 90%, sin embargo, cada día es más exigente y su tendencia es a aprobar con una calificación cercana a 100%.
- C. Panel de secuenciación de virus polio: en este panel el INS no participa.
- D. Programa Nacional de Evaluación Externa del Desempeño (PEEI, PEED): No aplica, el laboratorio de Polio/EV del Grupo de Virología del INS, pues es el único laboratorio que realiza este diagnóstico en el país.

4. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DEL EVENTO.

4.1 Instituciones Prestadoras de Servicios de Salud (IPS), Laboratorios clínicos del sector público y privado.

La búsqueda de virus polio en muestras fecales de los casos notificados al sistema de vigilancia epidemiológica –Sivigila- se realiza exclusivamente en el Laboratorio Nacional de Referencia - LNR del INS (laboratorio de polio/EV del grupo de Virología). Las IPS públicas o privadas de II o III nivel captan los pacientes que se ajustan a la definición de caso de PFA según el protocolo de vigilancia de Parálisis Flácida Aguda del país, recolectan las muestras fecales, diligencian las fichas de notificación de evento, notifican al Sivigila y remiten la documentación y las muestras biológicas a su respectivo Laboratorio de Salud Pública Departamental. En la ciudad de Bogotá, no se requiere enviar estas muestras a la Secretaría de Salud Distrital (SSD), las IPS pueden enviar directamente las muestras al Laboratorio de Polio/EV del grupo de Virología del INS. Los resultados son enviados por correo electrónico a los LSPD y eventualmente a las SSD y al referente de vigilancia del evento del grupo de inmunoprevenibles de la Dirección de Vigilancia y Análisis de riesgo en Salud Pública del INS.

Adicionalmente, el laboratorio de la institución municipal de salud público o privado (IPS), de acuerdo a su complejidad, es responsable de los exámenes paraclínicos requeridos para el diagnóstico del evento. Deberá remitir al paciente a una IPS de mayor complejidad, si así lo requiere y proceder a la autorización de exámenes de laboratorio (CH, fisicoquímico de LCR, estudio viral de polio/EV) y neurológicos (EMG, velocidad de conducción, RMN, valoración neurológica) para su diagnóstico y seguimiento.

4.2 Funciones del Laboratorios de Salud Pública departamental –LSPD

Los LSPD deben recibir las muestras biológicas provenientes de las IPS y remitirlas dentro de los cuatro días siguientes al Laboratorio Nacional de Referencia del INS con la información y documentación requerida en el protocolo de vigilancia de las PFA siguiendo las instrucciones de embalaje de muestras

infecciosas Clase 6.2 tipo B UN 3373. Ver *Manual para obtención y envío de muestras para análisis de eventos de interés en salud pública*.

4.3 Funciones del laboratorio nacional de referencia (LNR) en el Instituto Nacional de Salud

El Laboratorio de Polio/EV del Grupo de Virología del INS, es uno de los 46 laboratorios acreditados por OPS/OMS para la detección, identificación y caracterización de virus polio. Dentro de la estrategia de vigilancia enmarcada para la vigilancia por laboratorio del evento se encuentran:

- Realizar el diagnóstico de las muestras fecales de todos los casos probables de polio reportados en el sistema de vigilancia (Sivigila).
- Implementar las metodologías estandarizadas por los laboratorios internacionales de referencia según lineamientos de la Organización Panamericana de la Salud -OPS y la Organización Mundial de la Salud -OMS, en apoyo a la campaña de erradicación de la poliomielitis por poliovirus salvaje en el mundo.
- Apoyar en el procesamiento de muestras a otros países de la región como Ecuador y Costa Rica.
- Remitir al CDC de Atlanta todos los aislamientos de poliovirus salvaje y VDPV, para análisis genómico de con el fin de hacer el rastreo epidemiológico molecular.
- Asegurar la contención del material potencialmente infectado con virus polio en los laboratorios de Colombia.
- Actualizar anualmente el Informe de actividades bajo los lineamientos GAPIII para la contención de virus polio y remitir el informe a la Comisión Nacional para a certificación de la erradicación de polio.
- El laboratorio nacional de referencia debe notificar todo aislamiento de poliovirus (PV salvaje, PV-2 y VDPV) de conformidad con el RSI, ya sea de casos de PFA, contactos o de vigilancia ambiental, (si aplicara) a la Dirección de vigilancia y control de riesgo del INS y este deberá notificar al CNE del Ministerio de Salud dentro de las 24 horas posteriores a su identificación.

5. INDICADORES DE EVALUACIÓN DE LA VIGILANCIA DE PFA

Desde 1992 se definieron indicadores para la vigilancia de las parálisis flácidas agudas que evalúan la gestión epidemiológica y de laboratorio dentro del Plan de Erradicación de Poliomielitis por poliovirus salvaje en el mundo.

5.1 Indicadores Epidemiológicos

Deben cumplirse por lo menos en un 80% para poder asegurar la certificación de erradicación de poliovirus salvaje y la no circulación de cepas neurovirulentas derivadas de vacuna VDPVs. Estos son:

- Porcentaje (%) de muestras recolectadas dentro de los 14 días luego del inicio de la PFA.
- Porcentaje (%) de Unidades Notificadoras: Mediante la ley 100 de 1993 se convierte a cada Institución Prestadora de Salud -IPS, sean públicas o privadas, en unidades notificadoras que tienen la obligación de informar el registro positivo o negativo de enfermedades de notificación obligatoria como la PFA.
- Porcentaje (%) casos investigados dentro de las 48 horas siguientes a su detección.
- Tasa de Parálisis Flácida Aguda: este indicador no debe estar por debajo de 1/100.000 menores de 15 años.

5.2 Indicadores de laboratorio

Deben cumplirse por lo menos en un 80% para asegurar la no circulación de cepas de poliovirus salvaje y/o cepas neurovirulentas derivadas de vacuna:

- Porcentaje (%) muestras de buena calidad: cantidad 1 a 5 g, temperatura de llegada al INS: 4-8°C, envase plástico, boca ancha, tapa rosca y cierre hermético.
- Porcentaje (%) de muestras que llegan oportunamente al INS: (< 5 días luego de la recolección).
- Porcentaje (%) de resultados oportunos: <14 días.
- Control de calidad externo > 90%

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Erradicación de la poliomielitis. Guía práctica
http://www1.paho.org/spanish/ad/fch/im/guiapractica_polio.pdf
2. Parálisis Flácida Aguda. En línea:
https://es.wikipedia.org/wiki/Par%C3%A1lisis_fl%C3%A1cida
3. Acute Flaccid Paralysis. Government Health and Wellness. 2005. Public Health Notifiable Disease Management Guidelines.
4. Instituto Nacional de Salud, Colombia. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. PRO-R02.028 Versión 01 2014 – Abr – 10 Página 1 de 33. En línea: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/PRO%20Paralisis%20flacida%20aguda.pdf>
5. Poliomielitis. En línea: <http://es.wikipedia.org/wiki/Poliomielitis>.
6. Director announces campaign to eradicate poliomyelitis from the Americas by 1990. Bulletin PanAmerican Health Organization. 1985; 19:213-215.
7. Polio eradication initiative. Global Polio Eradication Initiative. En línea:
<http://www.polioeradication.org/Polioandprevention/Thevirus.aspx>
8. Vaccine-derived polioviruses (VDPV). En línea:
<http://www.polioeradication.org/Polioandprevention/Thevirus/Vaccinederivedpoliovirus.aspx>
9. Erradicación de la poliomielitis. Guía práctica. Tercera edición. Publicación Científica y Técnica No. 607. Organización Panamericana de la Salud. 2005
Librería en línea: <http://publications.paho.org/product.php?productid=833>
10. Historia de la campaña de erradicación de poliovirus salvaje. En línea:
<http://www.polioeradication.org/Polioandprevention/Historyofpolio.aspx>
11. Monitoreo de casos de Polio mielitis. En línea:
<http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek.aspx>
12. Andrus J, Strebel P, de Quadros C, Olivé J. Risk of vaccine-associated paralytic poliomyelitis in Latin America, 1989-91. Bull World Health Organ. 1995; 73(1):33-40.
13. Vaccine-derived poliovirus (VDPV). En línea:
<http://www.polioeradication.org/Polioandprevention/Thevirus/Vaccinederivedpoliovirus.aspx>
14. Polio News. En polio global eradication initiative. En línea:
<http://www.polioeradication.org/Mediaram/NewsletterPolioNews.aspx>.
15. Polio Laboratory Manual. Immunization, Vaccines and Biologicals. World Health Organization. 4th Edition. 2004.
16. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2017–2018. WHO/WHE/CPI/2017.8
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254788/WHO-WHE-CPI-2017.8-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
17. Manual para obtención y envío de muestras para análisis de eventos de interés en salud Pública. Instituto Nacional de Salud. En línea:
https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/DocumentosdeInteresSRNL/Manual_tomaenvio_muestras_INS-2019.pdf
18. <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>