

GUÍA DE CRITERIOS ESTANDARIZADOS PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS PARA LOS SITIOS CENTINELA

1. OBJETIVO:

Establecer los criterios para la estandarización de toma, resguardo y envío de muestras por parte los sitios centinela al Centro Nacional de Influenza (NIC) en la Dirección del Laboratorio Nacional de Salud (DLNS) para continuar con la vigilancia de la influenza estacional y apoyar las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la composición de la vacuna anual y dar respuesta a posibles epidemias y pandemias de influenza y otros virus respiratorios.

2. VIGILANCIA CENTINELA

La vigilancia centinela es la manera más eficaz de recopilar datos oportunos y de buena calidad. Se lleva a cabo normalmente con la vigilancia basada en indicadores.

En Guatemala la vigilancia centinela de influenza se realiza desde dos enfoques: la vigilancia centinela de Enfermedad Tipo Influenza (ETI), que se centra en las manifestaciones leves de influenza en pacientes ambulatorios y la vigilancia centinela de Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG), para el monitoreo de casos con síntomas severos que requieren asistencia hospitalaria.

3. SECUENCIACIÓN GENÓMICA

La secuenciación genómica de virus respiratorios, como la influenza y el SARS-CoV-2, desempeña un papel fundamental en la vigilancia epidemiológica y el control de enfermedades infecciosas. Este proceso permite determinar el orden de los nucleótidos en los genes virales, lo cual es esencial para identificar variaciones genéticas que pueden influir en la estructura del virus. A través de la caracterización genética, es posible identificar mutaciones asociadas a una mayor transmisibilidad, virulencia y evaluar la efectividad de las vacunas existentes. Estos datos son esenciales para actualizar las evaluaciones de riesgo, guiar las decisiones en salud pública y fortalecer el desarrollo de protocolos de diagnóstico, vacunas y estrategias terapéuticas. Además, mantener la capacidad instalada para la vigilancia genómica permite anticipar cambios en los patrones evolutivos y responder con mayor eficacia a posibles amenazas emergentes.

La generación de datos genómicos confiables depende en gran medida de la calidad de las muestras clínicas utilizadas. Factores como el adecuado almacenamiento y transporte, el tiempo transcurrido desde la recolección de la muestra, la carga viral y la ausencia de contaminantes son determinantes clave para obtener secuencias completas y de alta calidad. Por ello, es fundamental implementar criterios para la selección y manejo de muestras, especialmente en el contexto de vigilancia centinela y análisis de brotes.

Los genomas obtenidos se cargan y se comparten en la base de datos de GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*) que permite llevar una vigilancia epidemiológica a nivel mundial, estos datos se analizan bianualmente por un grupo de asesores expertos convocados por el Programa Mundial contra la Gripe de la Organización Mundial de la Salud que utilizan la información recopilada para el desarrollo anual de la vacuna contra el virus de la Influenza.

GUÍA DE CRITERIOS ESTANDARIZADOS PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS PARA LOS SITIOS CENTINELA

4. IDENTIFICACIÓN DE CASOS

Los encargados de seleccionar las muestras que serán destinadas a la vigilancia centinela son los epidemiólogos de cada sitio con base a la definición de caso de ETI e IRAG.

Nota: Se recomienda enviar muestras de pacientes con un período de 3 a 7 días desde la fecha de inicio de síntomas a la fecha de toma de muestra, para asegurar la calidad de la muestra y los resultados.

La identificación de casos sospechosos o inusitados será responsabilidad de la Unidad de Epidemiología del sitio centinela, y éstos deberán ser notificados al NIC para el procesamiento de la muestra.

5. FICHAS EPIDEMIOLÓGICAS

Correcto llenado de toda la *FICHA EPIDEMIOLÓGICA VIGILANCIA VIRUS RESPIRATORIOS (Actualización 2021)*, indispensablemente los siguientes ítems:

- Datos del paciente,
- Síntomas,
- Fecha de inicio de síntomas,
- Fecha de toma de muestra,
- Fecha de nacimiento y edad,
- Vigilancia epidemiológica: Especificar si es Enfermedad Tipo Influenza (ETI) o Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG),
- Evolución del paciente: paciente fue hospitalizado o no (aplica para sitios centinela ubicados en hospitales).

6. DOCUMENTOS PARA SOLICITUD DE ANÁLISIS

Se debe enviar la ficha epidemiológica Vigilancia Virus Respiratorios (Actualización 2021) en original o copia legible, que será utilizada en la Unidad de Virus Respiratorios y una copia que se devolverá con sello de recibido de Ventanilla de Recepción de Muestras para la Vigilancia Epidemiológica (Ventanilla 1) de la Dirección del Laboratorio Nacional de Salud. Además de las fichas deberán adjuntar el formato de solicitud según sea el caso:

6.1. Muestras para vigilancia de Influenza y Otros Virus Respiratorios:

- Formato "UVR-F-005 Envío de muestras de vigilancia centinela de Influenza y Otros Virus Respiratorios".
 - Ver **Anexo 1**: "UVR-G-009 Guía rápida llenado correcto de formato de envío de muestras de vigilancia centinela de Influenza y Otros Virus Respiratorios".

6.2. Muestras de vigilancia para control de calidad de virus respiratorios:

- Formato "UVR-F-002 Envío de muestras para control de calidad de Virus Respiratorios".
- Este formato se utilizará para verificación de resultados obtenidos y para el envío del control de calidad indirecto a la DLNS.

GUÍA DE CRITERIOS ESTANDARIZADOS PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS PARA LOS SITIOS CENTINELA

- Ver **Anexo 2**: "UVR-G-008 Guía para el llenado correcto de formato de envío de muestras para control de calidad de Virus Respiratorios".

6.3. Muestras de vigilancia de casos sospechosos o inusitados

- Formato "UVR-F-005 Envío de muestras de vigilancia centinela de Influenza y Otros Virus Respiratorios".
 - Ver **Anexo 1**: "UVR-G-009 Guía rápida llenado correcto de formato de envío de muestras de vigilancia centinela de Influenza y Otros Virus Respiratorios".
- El sitio centinela deberá comunicarse con el NIC para notificar el caso y proceder a enviar la muestra a la DLNS para su procesamiento.

7. ENVÍO DE MUESTRAS RUTINARIO PARA VIGILANCIA

Cada sitio centinela ETI e IRAG debe enviar al Centro Nacional de Influenza en la DLNS un total de 10 muestras por semana que cumplan con la definición de caso. Los sitios centinela con capacidad de procesamiento deberán priorizar el envío de las muestras positivas para los siguientes virus: Influenza A, Influenza B, SARS-CoV-2, Virus Sincitial Respiratorio, Metapneumovirus, Rinovirus y Parainfluenza III, debido a su relevancia para la salud pública en el país. En cuanto a las muestras positivas para virus distintos a los mencionados, no es obligatorio enviarlas a la DLNS, pero deberán ser reportadas en la plataforma PAHO Flu.

8. SITIOS CENTINELA -IRAG- CON CAPACIDAD DE PROCESAMIENTO

8.1. METODOLOGÍA:

Todos los sitios centinela deberán procesar las muestras para vigilancia por medio de la metodología de Reacción en Cadena de la Polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) en tiempo real abierta, ya que es la prueba de referencia recomendada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

Los sitios centinela que tengan la tipificación de Influenza A e Influenza B con otro tipo de metodología molecular deberán ser incluidas dentro del envío de muestras para realizar el análisis de la identificación del subtipo por metodología RT-PCR abierto en el NIC.

8.2. CONTROL DE CALIDAD INDIRECTO - SITIOS IRAG QUE PROCESAN MUESTRAS

Cada sitio centinela debe enviar a la DLNS todas las muestras positivas y el 10 % de las muestras negativas obtenidas durante los tres meses previos al envío de este control de calidad indirecto. Estas muestras pueden corresponder a alguno de los siguientes virus: Adenovirus, Enterovirus, Coronavirus 229E, Coronavirus OC43, Coronavirus NL63, Coronavirus HKU1, y Parainfluenza tipos I, II y IV. Las fechas serán establecidas por el NIC, que serán informadas vía correo electrónico con anticipación:

GUÍA DE CRITERIOS ESTANDARIZADOS PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS PARA LOS SITIOS CENTINELA

SITIO CENTINELA	FECHA
Hospital General San Juan de Dios	Mínimo una vez al año
Hospital Nacional de San Marcos	Mínimo una vez al año
Hospital Regional de Cobán	Mínimo una vez al año

Nota: La fecha puede acoplarse al envío rutinario de muestras para vigilancia dentro del mes establecido.

8.3. CONTROL DE CALIDAD EXTERNO – SITIOS IRAG QUE PROCESAN MUESTRAS POR RT-PCR EN TIEMPO REAL CON METODOLOGÍA ABIERTA

Cada sitio centinela recibirá 10 muestras para Control de Calidad Externo que será enviado por el NIC. Estas muestras deben ser procesadas según sus procedimientos para detección de virus respiratorios en un tiempo oportuno, teniendo un mes desde la recepción de las muestras para reportar los resultados obtenidos en la base de datos que será compartida por el NIC.

El control de calidad será enviado mínimo una vez al año. Se notificará vía correo electrónico a los sitios centinela correspondientes, previo al envío.

Asimismo, se adjuntará la Guía de Participación de Control de Calidad de Influenza y Otros Virus Respiratorios, *UVR-G-006*, en dónde encontrará las instrucciones a seguir.

9. TIPO DE ANÁLISIS PARA LA VIGILANCIA CENTINELA

9.1. Muestras para vigilancia de Influenza y Otros Virus Respiratorios (panel actual)

Detección por RT-PCR en tiempo real abierta de los siguientes virus respiratorios:

- Influenza A,
- Influenza B,
- Virus Sincitial Respiratorio,
- SARS-CoV-2,
- Metapneumovirus Humano,
- Rinovirus,
- Parainfluenza III.
- Utilizar el formato de envío "UVR-F-005 Envío de muestras de vigilancia centinela de Influenza y Otros Virus Respiratorios".

Nota: Las muestras positivas de influenza que cumplen con los criterios de buena calidad se seleccionan para la secuenciación genómica local o para su envío el CDC (*Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades*). Las muestras positivas de SARS-CoV-2 que cumplen con estos criterios se seleccionan para la secuenciación genómica local.

GUÍA DE CRITERIOS ESTANDARIZADOS PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS PARA LOS SITIOS CENTINELA

9.2. Otras muestras para confirmación de virus respiratorios

- Si el sitio centinela con capacidad de detección requiriera la confirmación de resultados obtenidos en su laboratorio, podrá enviar dicha(s) muestra(s) al NIC para su procesamiento; ésta(s) será(n) procesada(s) para detectar el/los virus reportado(s) y el panel actual mencionado en el inciso 8.1.
- Muestras con un umbral de ciclo (CT) menor o igual a 38 (si cuentan con RT-PCR abierto).
- Utilizar el formato de envío "UVR-F-002 Envío de muestras para control de calidad de Virus Respiratorios"

10. NORMAS PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS A LA DLNS

Tipo de muestra	Volumen de muestra	Medio de transporte para el envío de muestra	Conservación previa al envío	Condiciones de transporte	Período de inicio de síntomas a fecha toma de muestra
Hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo	Volumen mínimo 1.5 mL.	Medio de transporte Viral (MTV), con hisopos de poliéster o dacrón*	<ul style="list-style-type: none"> • Envío de muestras en lapso menor a 72 horas: las muestras deberán ser almacenadas a temperatura de refrigeración (2-8°C). • Envío de muestras en un lapso mayor a 72 horas: las muestras deberán ser almacenadas a temperatura de congelación (-20°C). • Evitar ciclos de congelación y descongelación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Correcta identificación de la muestra. • Muestras transportadas en triple embalaje y no derramadas. • Cumplir con cadena de frío (2-8°C). 	<p>ETI e IRAG: Las muestras deben ser tomadas dentro de los primeros 10 días desde el inicio de síntomas. Para asegurar la calidad de las muestras, se recomienda recolectarlas dentro de los primeros 3 a 7 días.</p> <p>Período de toma de muestra a la fecha de ingreso a la DLNS No mayor a 10 días si cuentan con capacidad de almacenamiento -20°C. No mayor a 3 días si cuentan con capacidad de almacenamiento a temperatura de refrigeración (2-8°C).</p>
Aspirado bronquial	Aspirado bronquial 1mL				

***Nota 1:** No se aceptarán otros medios como Medio de transporte Universal (UTM) y/o Medio de Transporte Molecular (MTM), debido a que inhiben el crecimiento en los cultivos virales de las muestras que se envían a *Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC)*.

***Nota 2:** Si no poseen medio de transporte solicitar a la Unidad de Virus Respiratorios (ver anexo 3).

De no cumplir con estos criterios, se realizará el rechazo de las muestras.

GUÍA DE CRITERIOS ESTANDARIZADOS PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS PARA LOS SITIOS CENTINELA

11. PAHOFlu

Toda la información de los pacientes referidos a la DLNS deberá ser ingresada a la plataforma PAHOFlu **previo** al envío, para asegurar la divulgación de resultados en el tiempo establecido por la OPS.

11.1. GUÍA PARA REPORTE DE RESULTADOS EN PLATAFORMA PAHO-FLU PARA LOS SITIOS CENTINELA CON CAPACIDAD DE DETECCIÓN

11.1.1. Resultados obtenidos por PCR cerrado de Rinovirus/Enterovirus

- serán reportados por la DLNS:
- Son virus ARN relacionados y pertenecen a la familia de los *Picornaviridae*.
- Debido a sus semejanzas genéticas no se pueden diferenciar de forma fiable en algunas metodologías cerradas.
- Se debe realizar un seguimiento de los resultados positivos para Rinovirus/Enterovirus utilizando un método alternativo. Esto se debe a que, al reportar ambos virus en la plataforma, se consideraría una coinfección falsa. Por lo tanto, las muestras deben enviarse a la DLNS, donde se realizará la confirmación mediante metodología abierta de RT-PCR y los resultados serán reportados por esta institución.

11.1.2. Resultados de Influenza A y B:

- Todas las muestras de Influenza positivas deben enviarse a la DLNS para confirmación de subtipo de Influenza A o detección de linaje de Influenza B según corresponda para que puedan ser seleccionadas para análisis genómico.
- Los sitios centinela que procesan muestras mediante la metodología cerrada pueden reportar los resultados de subtipificación de Influenza A obtenidos.

Nota: Tener en cuenta que los subtipos de Influenza A circulantes son los subtipos A (H1N1) pdm09 y H3 (H3N2). Cualquier resultado diferente deberá ser reportado y enviado inmediatamente al NIC y a la vigilancia, incluyendo muestras que no se puedan subtipificar.

11.1.3. Resultados positivos a otros virus respiratorios

Cualquier resultado positivo correspondiente a virus distintos a los descritos en los numerales 10.1.1 y 10.1.2, incluyendo cualquier virus respiratorio no mencionado en el numeral 8.1, obtenido a partir del panel procesado en el laboratorio del sitio centinela, deberá ser reportado directamente por dicho sitio.

11.1.4. Resultados negativos:

A los resultados negativos obtenidos con una metodología cerrada que detecte más patógenos respiratorios, además de reportar como "negativo obligatorio" (incluye Influenza A, Influenza B, SARS-CoV-2 y Virus Sincitial Respiratorio), deberán agregar manualmente el resultado negativo de Metapneumovirus, Rinovirus y Parainfluenza III.

GUÍA DE CRITERIOS ESTANDARIZADOS PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS PARA LOS SITIOS CENTINELA

12. FLUJO DE TRABAJO

- Se procesan normalmente las 10 muestras.
- Se ingresan resultados en la plataforma PAHOflu cuando corresponda según el apartado 10.1 de esta guía.
- Se seleccionan las muestras a enviar a la DLNS priorizando las positivas a: Influenza A, Influenza B, SARS-CoV-2, Virus Sincitial Respiratorio, Metapneumovirus, Parainfluenza III y Rinovirus, respectivamente.
- Cualquier muestra positiva a los virus distintos a los enlistados en el numeral 8.1 no deberán ser enviadas a la DLNS.

LINEAMIENTOS PARA SOLICITUD DE MEDIOS DE TRANSPORTE VIRAL (MTV)

Ver **Anexo 3**.

Contacto(s) en la Dirección del Laboratorio Nacional de Salud:

PBX 6644-0599 EXT. 214, nic.uvr@lns.gob.gt y virusrespiratorios@lns.gob.gt

GUÍA DE CRITERIOS ESTANDARIZADOS PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS PARA LOS SITIOS CENTINELA

Anexo 2

UVR-G-008: Guía rápida llenado correcto de formato de envío de muestras para Control de Calidad (UVR-F-002)

ENVIO DE MUESTRAS PARA CONTROL DE CALIDAD DE VIRUS RESPIRATORIOS

Laboratorio remitente: Marcar con una "X" el correspondiente

Hospital General San Juan de Dios Hospital Regional de Cobán Hospital Nacional de San Marcos **1**

Otro Especifique: _____

Responsable del envío: _____ Correo electrónico: _____ } **2**
Fecha del envío: _____ Total de muestras enviadas: _____

Id. Reg. (PAHO Flu)	Nombre del paciente	Fecha de inicio de síntomas	Fecha de toma de muestra	Edad	Sexo	Metodología de Análisis en Unidad Centinela	Resultado de análisis en Unidad Centinela	Valor de Ct*	Código interno DLNS
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

*CT: Umbral del ciclo por sus siglas en inglés

Fecha: _____ Hora: _____ Temperatura de las muestras en recepción DLNS: _____ °C

Firma y Sello de recepción ventanilla de la DLNS: _____ Analista responsable de recepción: _____ } **13**

Ítem	Instrucciones
1.	Marque con una X el nombre del laboratorio remitente Otro: especifique
2.	Complete información acerca de: <ul style="list-style-type: none"> Nombre del personal responsable del envío Correo electrónico del responsable de recibir resultados Fecha que se realiza el envío de las muestras Número total de muestras enviadas
3.	Código identificador brindado por plataforma PAHO Flu para cada paciente
4.	Nombre completo del paciente
5.	Fecha de inicio de síntomas
6.	Fecha de toma de muestra
7.	Edad
8.	Sexo
9.	Indicar la metodología de análisis empleada para el procesamiento de las muestras en la unidad centinela
10.	Resultado del virus obtenido en la unidad centinela
11.	Valor de Ct (umbral del ciclo) obtenido en unidad centinela
12.	Código interno designado por la DLNS
13.	Apartado exclusivo para personal de la Ventanilla 1 y analistas responsables de recepción de la DLNS

GUÍA DE CRITERIOS ESTANDARIZADOS PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS PARA LOS SITIOS CENTINELA

Anexo 3. Herramienta UVR-G-011

GUIA PARA SOLICITUD DE MEDIOS DE TRANSPORTE VIRAL (MTV)

1. Redactar un oficio dirigido al(a) Director(a) de la Dirección del Laboratorio Nacional de Salud, solicitando la cantidad de Medios de Transporte Viral (MTV) requeridos, así como el propósito de su uso. Ejemplo del encabezado:

Nombre del director(a)

Director(a)

Dirección del Laboratorio Nacional de Salud

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

2. Enviar el oficio dirigido al correo electrónico:
 - jefatura@lns.gob.gt
 - Cc: nic.uvr@lns.gob.gt ; virusrespiratorios@lns.gob.gt
3. Esperar respuesta donde se autoriza la entrega de los MTV por la misma vía.
4. Al tener la respuesta, coordinar la recepción de los medios de transporte solicitados para recogerlos por ellos a la Ventanilla 1 (Recepción de muestras de referencia para la Vigilancia Epidemiológica), presentando el oficio original que se envió a jefatura y una copia.
 - La cantidad de MTV a entregar dependerá de la disponibilidad con la que cuente la Unidad de Virus Respiratorios.
 - Enviar hielera específica para medios de transporte con gradillas y suficientes baterías congeladas para el transporte adecuado de los medios. Nota: no utilizar la misma hielera donde se transportan muestras a la DLNS. Se solicita a los pilotos que asignen el tiempo necesario, ya que el proceso de entrega puede demorarse algunos minutos.

Contacto(s) en la Dirección del Laboratorio Nacional de Salud de la Unidad de Virus Respiratorios:

PBX 6644-0599 EXT. 214, nic.uvr@lns.gob.gt y virusrespiratorios@lns.gob.gt