

## Orientaciones para la implementación del ensayo RT-PCR multiplex de influenza y SARS-CoV-2 en la vigilancia integrada de influenza y COVID-19

19 de abril de 2021

Como parte del Sistema Mundial de Vigilancia y Respuesta a la Influenza (GISRS) de la OMS, los Centros Nacionales de Influenza (NIC) y los Laboratorios Nacionales de Salud Pública en las Américas llevan muchos años realizando la detección y el diagnóstico molecular de influenza. Con la aparición de la COVID-19 a principios de 2020, la OPS aprovechó esta sólida y bien establecida red de laboratorios para introducir rápidamente un protocolo de detección molecular para el SARS-CoV-2 en toda la Región.

A pesar de la baja circulación y detección del virus influenza desde marzo de 2020, la OPS ha recomendado garantizar la vigilancia de influenza y mantener el algoritmo de confirmación de laboratorio para la vigilancia centinela de enfermedades tipo influenza (ETI) e infecciones respiratorias agudas graves (IRAG), así como casos inusuales de enfermedades respiratorias. Si se sospecha de un caso de influenza, deben realizarse pruebas rutinarias para influenza (incluidos subtipificación o genotipificación) y debe continuarse la notificación.

La amenaza de epidemias y posibles pandemias por influenza persiste. Es imperativo que el GISRS mantenga una vigilancia significativa de la influenza en todo el mundo y que los países permanezcan vigilantes mientras se adaptan para cumplir los objetivos de vigilancia de la COVID-19<sup>1</sup>.

El Centro Colaborador (CC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la vigilancia, epidemiología y control de influenza en los Centros para el Control y la Prevención y de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos (EUA) desarrollaron en 2020 un ensayo molecular multiplex<sup>2</sup> para detectar simultáneamente el virus influenza (tipos A y B) y el SARS-CoV-2, que ahora está disponible por medio del *International Reagent Resources* (IRR).

Este documento tiene como objeto resumir las consideraciones operativas para la implementación del ensayo de RT-PCR multiplex de influenza y SARS-CoV-2 en el contexto de una vigilancia integrada de influenza y COVID-19. Estas consideraciones no reemplazan las recomendaciones ya existentes del GISRS para la vigilancia rutinaria de influenza, sino para respaldar los sistemas nacionales y subnacionales de vigilancia de influenza existentes, a la luz de la aplicación del ensayo multiplex.

### Consideración operativa para la vigilancia centinela de IRAG/ETI

En el contexto de la implementación del ensayo multiplex de influenza y SARS-CoV-2 en la vigilancia rutinaria de influenza y COVID-19, deben contemplarse las siguientes consideraciones operativas:

- Los kits multiplex para influenza y SARS-CoV-2 de CDC-EUA disponibles pueden/deben **priorizarse para la vigilancia centinela de IRAG/ETI** teniendo en cuenta que:

- En cualquier caso, muestras adecuadas deben estar disponibles para subtipificación de influenza A y genotipificación de influenza B.
  - Es requerido que los NICs envíen oportunamente muestras de influenza a uno de los CC-OMS del GISRS para caracterización adicional que permita generar la información necesaria en la toma de decisiones durante las reuniones bianuales para recomendación de la composición de vacuna de influenza.
  - El algoritmo de laboratorio debe adaptarse para incorporar las pruebas multiplex.
- Actualmente, el ensayo multiplex **no** está destinado a la vigilancia universal de COVID-19, ya que el SARS-CoV-2 sigue siendo predominante:
    - En un escenario de transmisión comunitaria alta o muy alta, la confirmación de SARS-CoV-2 debe priorizarse cuando las capacidades de laboratorio están sobrecargadas.
    - Dado que la transmisión del virus influenza es baja, la importancia de la coinfección resulta irrelevante.
    - Si está presente, todavía podrá ser capturado a través de la vigilancia centinela.

## Consideración operativa para laboratorios

La detección molecular del virus influenza a través de PCR de transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR) es la metodología estándar (*gold standard*) para el diagnóstico por laboratorio de influenza en todos los laboratorios del GISRS<sup>1,3</sup>. El *International Reagent Resources* (IRR) del CC-OMS para influenza de los CDC-EUA, proporciona reactivos y estuches para ensayos moleculares de influenza a los laboratorios del GISRS<sup>4</sup>.

En el caso del SARS-CoV-2, los protocolos de detección molecular se desarrollaron rápidamente después que los datos de secuenciación del SARS-CoV-2 emergente se pusieron a disposición en el sitio web<sup>5</sup> de la OMS. Desde entonces, la OPS ha estado apoyando la implementación del diagnóstico molecular para SARS-CoV-2, proporcionando entrenamientos y reactivos<sup>6</sup>.

Los ensayos moleculares son una metodología útil y potente para la detección rápida de virus en muestras respiratorias. En este sentido, los ensayos multiplex pueden permitir ahorrar tiempo y esfuerzo al detectar simultáneamente más de un patógeno en una sola reacción. El formato de ensayo rRT-PCR multiplex también resulta en un menor consumo de reactivos, consumibles y tiempo de procesamiento de muestras.

En el contexto de la implementación del ensayo multiplex de influenza y SARS-CoV-2 en la vigilancia de laboratorio de influenza y COVID-19, deben contemplarse las siguientes consideraciones operativas:

## Colecta, almacenamiento y transporte de muestras clínicas

- Muestras de las vías respiratorias superiores son adecuadas para la detección molecular de influenza y SARS-CoV-2. El hisopado nasofaríngeo y/o orofaríngeo sigue siendo el tipo de espécimen elegido para influenza y para la detección molecular SARS-CoV-2<sup>2</sup>.
- La recolección adecuada de muestras es importante para el diagnóstico de laboratorio, ya que la muestra que no se recoge correctamente puede conducir a resultados falsos o no concluyentes.
- El virus influenza debe estar viable para el envío al CC-OMS en el CDC-EUA y lograr el aislamiento de virus. Por lo tanto, es importante el volumen necesario (3 ml) y medios de transporte de muestras (medio de transporte de virus o tampón PBS) adecuados.
- Para conservar la integridad del virus, las muestras deben transportarse inmediatamente al laboratorio. La cadena de frío debe mantenerse durante todo el proceso de transporte.
- En el laboratorio, las muestras se pueden almacenar a temperatura de refrigeración (4°C) hasta por 72 horas. Después de este período, los especímenes deben mantenerse congelados a -70°C o menos.
- Las muestras no deben congelarse y descongelarse repetidamente, ya que esto resulta en degradación viral, reduciendo la capacidad de detección y viabilidad para caracterización adicional y aislamiento.

## Enfoque del ensayo multiplex

- El ensayo multiplex para influenza y SARS-CoV-2 de los CDC-EUA detecta simultáneamente, en una sola reacción, el SARS-CoV-2 y los virus influenza A y B..
- Un número limitado de kits está disponible para los laboratorios del GISRS a través del IRR de los CDC-EUA.
- Las instrucciones de uso<sup>2</sup> del ensayo multiplex para influenza y SARS-CoV-2 de los CDC-EUA y la información de las secuencias de los iniciadores y sondas<sup>7</sup> están disponibles públicamente para referencia en la página web de los CDC-EUA.
- Es importante garantizar la calidad del proceso, incluso la sensibilidad y especificidad para el virus blanco; por lo tanto, los controles positivos y negativos deben incluirse en cada realización de prueba, así como el marcador interno, RP.
- El ensayo multiplex para influenza y SARS-CoV-2 de los CDC-EUA consta de 4 marcadores moleculares: InfA, InfB, SC2 y RP, que deben ser analizados para los resultados de las pruebas.

- La interpretación y los resultados deben ser los siguientes<sup>2</sup>:

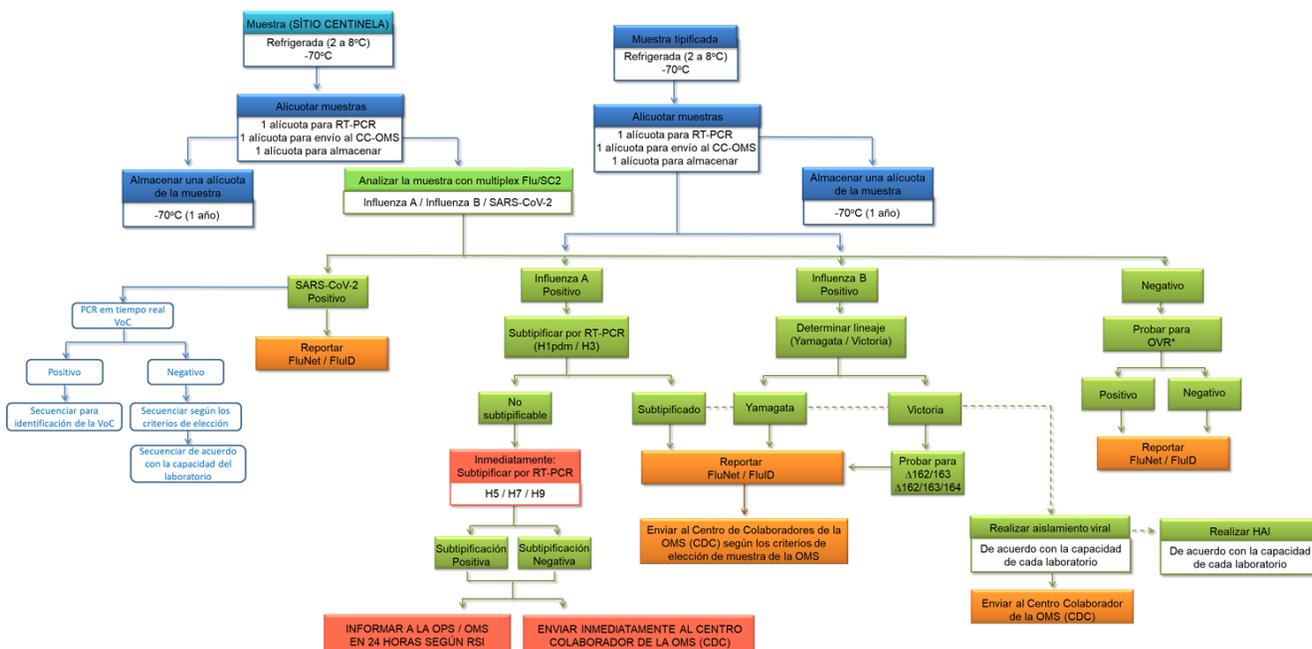
marcador				Interpretación	Resultado
InfA	InfB	SC2	RP		
+	-	-	+ o -	Detección de ARN de influenza A	Positivo para la gripe A
-	+	-	+ o -	Detección de ARN de influenza B	Positivo para la gripe B
-	-	+	+ o -	Detección de ARN de SARS-CoV-2	Positivo para COVID-19
-	-	-	+	Sin detección de ARN de influenza/SARS-CoV-2	Negativo
-	-	-	-	Resultados no válidos	No válido

\* Si más de un marcador para SARS-CoV-2 o influenza A y B son positivos, es indicativo de coinfección.

### Algoritmo de testeo utilizando el ensayo multiplex para influenza y SARS-CoV-2

- **Muestras de los sitios centinelas IRAG/ETI no analizadas aun para virus influenza y SARS-CoV-2** pueden analizarse utilizando el ensayo multiplex para influenza y SARS-CoV-2 (Figura 1). Muestras positivas para influenza A deben ser subtipificadas y muestras positivas para influenza B deben ser genotipificadas siguiendo el algoritmo establecido para teste de influenza.
- **Muestras de los sitios centinelas IRAG/ETI previamente analizadas para virus influenza y SARS-CoV-2, no** deben volver a probarse utilizando el ensayo multiplex para influenza y SARS-CoV-2. En este caso, el testeo debe ir directamente a la subtipificación de muestras positivas de influenza A y genotipificación de muestras positivas de influenza B (Figura 1) y seguir los pasos rutinarios en el algoritmo de teste para influenza.
- **Muestras analizadas previamente para el SARS-CoV-2 no** deben volver a probarse con el ensayo multiplex para influenza y SARS-CoV-2. La estrategia *singleplex* debe utilizarse para este fin.
- **Muestras inusuales de IRAG** que den negativo para influenza y SARS-CoV-2 se deben analizar para otros virus respiratorios. Los casos inusuales deben notificarse a través del Reglamento Sanitario Internacional.

Figura 1: Algoritmo de teste para influenza utilizando el ensayo multiplex para influenza y SARS-CoV-2 de los CDC-EUA.



## Reporte de datos de vigilancia de influenza y COVID-19

- El reporte semanal de FluNet es parte de los términos de referencia<sup>8</sup> de los Centros Nacionales de Influenza y se debe continuar a través de la plataforma regional existente.
- Para el reporte de la vigilancia centinela, la OPS/OMS solicita a los Estados Miembros que informen a través de las bases de datos FluNet (datos virológicos) y FluID (datos epidemiológicos) semanalmente a [flu@paho.org](mailto:flu@paho.org)
- Datos de testeo para influenza: seguir reportando semanalmente datos agregados de vigilancia influenza al nivel regional. Como mínimo, este debe ser el número de muestras de todas las fuentes procesadas para testeo de influenza, el número de muestras positivas para influenza y el número de muestras analizadas y/o muestras negativas para influenza. Siempre que sea posible, estos datos deben desagregarse por fuente (centinela y no centinela).
- Datos de testeo para COVID-19: se pide a los países que informen los resultados agregados semanalmente del COVID-19 en el mismo formato y frecuencia que han estado informando los datos de vigilancia de influenza. Los datos virológicos (como el número de muestras que dan positivo y negativo para COVID-19) de los casos con muestras en los sistemas de vigilancia centinela y no centinela o sindrómica existentes deben notificarse semanalmente al nivel regional.

- La OPS seguirá incluyendo los datos reportados a la plataforma regional y mundial FluMart de la OMS y coordinará el intercambio de datos notificados con la sede de la OMS. Por lo tanto, el reporte oportuno y completo a la OPS garantiza el cumplimiento de lo que espera la OMS.

## Referencias

- 1 – Organización Mundial de la Salud (OMS). Mantenimiento de la vigilancia de la gripe y seguimiento del SARS-CoV-2: adaptación del Sistema Mundial de Vigilancia y Respuesta a la Gripe (SMVRG) y de los sistemas centinela durante la pandemia de COVID-19: orientaciones provisionales, 8 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340623>.
- 2 - Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/139743/download>.
- 3 - Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1).
- 4 - International Reagent Resource (IRR). International Reagent Resource (IRR). Disponible en: <http://www.influenzareagentresource.org/>.
- 5 - Organización Mundial de la Salud (OMS). Diagnostic testing for SARS-CoV-2. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334254/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-eng.pdf>.
- 6 - Organización Panamericana de la Salud (OPS). Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus responsable de la COVID-19. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/directrices-laboratorio-para-deteccion-diagnostico-infeccion-con-virus-covid-19>.
- 7 - Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Research Use Only CDC Influenza SARS-CoV-2 (FluSC2) Multiplex Assay Real-Time RT-PCR Primers and Probes. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/multiplex-primer-probes.html>.
- 8 - Organización Mundial de la Salud (OMS). Términos de Referencia de los Centros Nacionales de Gripe del Sistema Global de Vigilancia y Respuesta a la Gripe. 2017. Disponible en: [https://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/national\\_influenza\\_centres/ToR\\_NIC\\_ES.pdf?ua=1](https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/national_influenza_centres/ToR_NIC_ES.pdf?ua=1).