

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE
DO ADULTO**

GABRIEL PISSOLATI MATTOS BRETZ

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE LAMP PARA DIAGNÓSTICO DE
INFLUENZA E SARS-COV-2 E AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA EM UM CAMPUS
UNIVERSITÁRIO**

BELO HORIZONTE

2023

GABRIEL PISSOLATI MATTOS BRETZ

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE LAMP PARA DIAGNÓSTICO DE
INFLUENZA E SARS-COV-2 E AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA EM UM CAMPUS
UNIVERSITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges

Co-orientadoras: Dra. Fernanda Caroline Soardi

Dra. Natalia Virtude Carobin

BELO HORIZONTE

2023

Bretz, Gabriel Pissolati Mattos.
B845v Validação da Técnica de Lamp para diagnóstico de Influenza e SARS-COV-2 e avaliação epidemiológica em um Campus Universitário [recursos eletrônicos]. / Gabriel Pissolati Mattos Bretz. - - Belo Horizonte: 2023.
149f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Karina Braga Gomes Borges.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Técnicas de Amplificação de Ácido Nucleico. 2. SARS-CoV-2. 3. Virus da Influenza A. 4. Influenza Humana. 5. Dissertação Acadêmica. I. Borges, Karina Braga Gomes. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QU 25

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE LAMP PARA DIAGNÓSTICO DE INFLUENZA E SARS-COV-2 E AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA EM UM CAMPUS UNIVERSITÁRIO

GABRIEL PISSOLATI MATTOS BRETZ

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia vinte e três de maio de dois mil e vinte e três, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelas seguintes professoras doutoras:

Karina Braga Gomes Borges - Orientadora
UFMG

Fernanda Caroline Soardi - Coorientadora
LUSTOSA

Sílvia Helena Sousa Pietra Pedrosa
UFMG

Teresa Cristina de Abreu Ferrari
UFMG

Belo Horizonte, 23 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Caroline Soardi**, **Usuária Externa**, em 24/05/2023, às 15:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia Helena Sousa Pietra Pedrosa**, **Usuária Externa**, em 24/05/2023, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karina Braga Gomes Borges**, **Professora do Magistério Superior**, em 25/05/2023, às 09:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Teresa Cristina de Abreu Ferrari**, **Professora do Magistério Superior**, em 25/05/2023, às 14:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2267320** e o código CRC **24713C54**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora

Professora Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor

Professor Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Professora Isabela Almeida Pordeus

Pró-Reitor de Pesquisa

Professor Fernando Marcos dos Reis

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Coordenadora

Professora Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenadora

Professora Luciana Costa Faria

Colegiado

Professora Adriana Maria Kakehasi

Professora Claudia Alves Couto

Professora Gilda Aparecida Ferreira

Professora Karina Braga Gomes Borges

Professora Luciana Costa Faria

Professora Melissa Orlandin Premaor

Professora Teresa Cristina de Abreu Ferrari

COLABORADORES

- Mestre Adriano Basques Fernandes – Laboratório Lustosa
- Mestre Hyllo Baeta Marcello Junior – Laboratório Lustosa e Fundação Ezequiel Dias - MG
- Professor Doutor Adriano de Paula Sabino – Faculdade de Farmácia da UFMG
- Mestranda Laura Gomes Xavier – Faculdade de Farmácia da UFMG
- Doutora Gabrielle Sousa Vianna – Laboratório Codon Biotecnologia
- Mestre Carlos Abelardo dos Santos – Instituto de Ciências Biológicas da UFG
- Doutor Marcos Vinícius Ferreira Silva - Fundação Ezequiel Dias - MG

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha mãe e pai por me apoiarem nas minhas escolhas acadêmicas e profissionais e por me darem suporte para que eu focasse no meu desenvolvimento e educação.

A Rafaela, minha noiva, sempre presente comigo nos momentos de conquista e superação que fazem parte do amor que compartilhamos.

A Yasmin, irmã mais nova e mestra, que foi muitas vezes como uma orientadora e guia para os momentos de insegurança.

Ao Laboratório Lustosa, que me proporcionou as mais importantes oportunidades profissionais, desde abrir suas portas para o estágio curricular a me formar um profissional sólido. Obrigado pelo apoio para a obtenção do título de mestre. Agradeço especialmente ao Adriano Basques, sempre disponível para compartilhar seu conhecimento e visão que possibilitaram o desenvolvimento pessoal de várias habilidades através da confiança que tive para os desafios que se apresentaram. A Fernanda Soardi, coorientadora desse estudo e que diariamente soma à minha curiosidade seu conhecimento de genômica e biologia molecular. Ao João, pela humildade e ensinamentos pessoais e profissionais. Às equipes da assessoria médica, Triagem, Apoio e Laura, que graças a seus profissionalismo e competência me permitiam ausentar presencialmente do Lustosa em alguns momentos. Ao Mozart por confiar no projeto e permitir que ele se tornasse realidade.

A Karina Braga, agradeço muito por acreditar em mim, aceitar ser minha orientadora e pela forma que conduziu o estudo, com confiança, otimismo e objetividade para alcançar nossos objetivos.

A Natalia Virtude, que além de coorientadora, foi meu braço direito para a parte experimental e tornou a caminhada mais tranquila, graças a sua experiência e dedicação.

Ao professor Adriano Sabino, equipe e estrutura do LINBIO, que permitiram e estrutura para realizar a parte experimental do estudo.

A Professora Elisangela Lacerda da UFG e seu aluno de mestrado Carlos Abelardo que me receberam muito bem para o curso de LAMP, essencial para a condução desse estudo, e ensinaram seus conhecimentos desenvolvidos por anos de pesquisa.

Ao Laboratório CODON e FUNED-MG e seus profissionais que compartilharam comigo conhecimento, dados, sugestões e amostras para tornar esse estudo mais completo.

Aos orientadores prévios que tive UFMG, Hemominas, Loyola e Tulane University, obrigado por fazerem parte do profissional que sou hoje, vocês são parte dessa conquista e foram muito importantes para a caminhada.

Esse trabalho envolve momentos, pessoas e Deus, que juntos resultaram na realização deste sonho.

RESUMO

Os vírus respiratórios são uma das principais causas de mortalidade mundialmente. O SARS-CoV-2 foi relacionado a 6,8 milhões de mortes até março de 2023 e estima-se que o vírus Influenza é responsável pela morte de cerca de 50 mil pessoas por ano. O diagnóstico etiológico neste caso é importante para identificação de surtos e intervenção na transmissão dos vírus, porém a inespecificidade dos sinais clínicos é um dificultador. O diagnóstico laboratorial, rápido e acessível às diversas complexidades do sistema de saúde, pode auxiliar no combate aos impactos que os vírus respiratórios causam. Com o objetivo de realizar a avaliação epidemiológica dos vírus SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B no ano de 2022 na comunidade atendida pelo programa MONITORACOV-2 da UFMG, reações de LAMP em amostras de *swab* nasofaríngeo foram validadas e padronizadas, sendo realizadas simultaneamente em um mesmo equipamento com temperatura constante de 65°C, tempo de reação de 30 minutos e leitura visual. O estudo mostrou características analíticas comparáveis aos resultados conhecidos na RT-qPCR (padrão ouro) nas mesmas amostras. Para o SARS-CoV-2, foram testadas 50 amostras e obtido sensibilidade de 84,0%, especificidade de 100% e com índice Kappa de 0,84; já para o Influenza A foram testadas 52 amostras, resultando na sensibilidade de 85,2%, especificidade de 100%, e índice Kappa 0,85. A sensibilidade das reações de LAMP para o SARS-CoV-2 e Influenza A demonstraram ser menor em amostras com Ct > 31 na RT-qPCR. Para a reação de Influenza B foram testadas 26 amostras, sendo 25 sabidamente não detectável, uma detectável, e foi obtido 100% de concordância dos resultados. Para a avaliação epidemiológica, foram testadas 243 amostras de pacientes sintomáticos da comunidade da UFMG, equivalente a 10% do quantitativo mensal atendido pelo programa. A taxa anual de positividade para SARS-CoV-2 foi de 28,7%, para Influenza A: 1,6%, Influenza B: 0,0%. Foram encontrados resultados indeterminados para SARS-CoV-2 e Influenza A (0,8% cada), 1,2 % de resultados inválidos e 66,9% das amostras testaram negativas para os três vírus. O ensaio padronizado foi capaz de avaliar a epidemiologia dos vírus respiratórios na população estudada com resultados comparáveis aos encontrados na literatura.

Palavras-chaves: LAMP, SARS-CoV-2, INFLUENZA A, INFLUENZA B.

ABSTRACT

Respiratory viruses are a major cause of mortality worldwide. SARS-CoV-2 has been linked to 6,8 million deaths as of March 2023, and it is estimated that the Influenza virus is responsible for up to 50,000 deaths per year. The etiological diagnosis in this case is important to identify outbreaks and intervening in the transmission of viruses, but the nonspecificity of clinical signs is a complicating factor. A laboratorial diagnosis, fast and accessible to the various complexities of the health system, can help to combat the impacts of respiratory viruses. With the objective of carrying out an epidemiological evaluation of the SARS-CoV-2, Influenza A and Influenza B viruses in 2022 in the community served by the MONITORACOVID UFMG program, LAMP reactions in nasopharyngeal swab samples were validated and standardized, being performed simultaneously in the same equipment with constant temperature of 65°C, reaction time of 30 minutes and visual reading. The study showed analytical characteristics comparable to known results in RT-qPCR (gold standard) in the same samples. For SARS-CoV-2, 50 samples were tested and obtained a sensitivity of 84.0%, specificity of 100% and a Kappa index of 0.84; for Influenza A, 52 samples were tested, resulting in sensitivity of 85.2%, specificity of 100%, and Kappa index 0.85. The sensitivity of LAMP reactions for SARS-CoV-2 and Influenza A has been shown to be lower in samples with Ct > 31 in RT-qPCR. For the Influenza B reaction, 26 samples were tested, 25 of which were known to be undetectable, one detectable, and 100% concordance of the results was obtained. For the epidemiological evaluation, 243 samples of symptomatic patients from the UFMG community were tested, equivalent to 10% of the monthly number assisted by the program. The annual positivity rate for SARS-CoV-2 was 28.7%, for Influenza A: 1.6%, Influenza B: 0.0%. There were found Indeterminate results for SARS-CoV-2 and Influenza A (0.8% each), 1.2% of invalid results and 66.9% of the samples tested negative for the three viruses. The standardized assay was able to assess the epidemiology of respiratory viruses in the studied population with results comparable to those found in the literature.

Key words: LAMP, SARS-CoV-2, INFLUENZA A, INFLUENZA B

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1 : Transmissão dos vírus respiratórios por aerossol em diferentes condições ambientais	30
Quadro 2 : Comparação entre os métodos PCR e LAMP.....	48
Quadro 3 : Sequências de iniciadores utilizados para identificação do SARS-CoV-2, vírus Influenza A, Influenza B e controle endógeno por meio da técnica de LAMP	50
Quadro 4 : Estirpes testadas para o conjunto de iniciadores selecionado para a identificação do Influenza A.....	52
Quadro 5 : Protocolo de reação: SARS-CoV-2, controle endógeno (ACTB) Influenza B e Influenza A, por meio da técnica de LAMP	53
Quadro 6 : Interpretação da concordância através do índice Kappa	58
Quadro 7 : Valores para avaliação de um bom teste de acordo com as métricas analíticas	59

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 : Características analíticas do conjunto de iniciadores gene E (SARS-CoV-2)	68
Tabela 2 : Resultado da reação de LAMP para SARS-CoV-2 nas amostras com Ct maior que 31 para os alvos N1 e N2	69
Tabela 3 : Características analíticas do conjunto de iniciadores gene matriz (Influenza A)	70
Tabela 4 : Resultado da reação de LAMP para Influenza A nas amostras com Ct maior que 31	71
Tabela 5 : Número de amostras testadas por mês de acordo com o número de coleta do programa MONITORACOV-2 UFMG	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do vírion Influenza A e B.	25
Figura 2 - Esquema da replicação do vírus Influenza A.	27
Figura 3 - Organização do genoma do SARS-CoV-2 e proteínas correspondentes.	32
Figura 4 - Representação esquemática do SARS-CoV-2.	33
Figura 5 - Sinais clínicos para classificação da gravidade da COVID-19 de acordo com os critérios da OMS.	36
Figura 6 - Data do primeiro caso relatado de COVID-19 em cada país.	37
Figura 7 - Número semanal de mortes pela COVID-19 reportado por região global.	38
Figura 8 - Número semanal de casos de COVID-19 confirmados por região global.	39
Figura 9 - Recomendações de intervenções farmacêuticas para COVID-19 de acordo com sua gravidade.	41
Figura 10 - Esquema da relação de alvos e iniciadores para a técnica de LAMP. ...	45
Figura 11 - Formação de loop e amplificação na reação de LAMP.	46
Figura 12 - Esquema do processo para testagem da reação de LAMP.	55
Figura 13 - Detecção visual das reações de LAMP para IAV e IBV (63°C com volume de 25 uL).	62
Figura 14 - Detecção visual das reações de LAMP para SARS-CoV-2 e ACTB (65°C com volume de 25 uL).	63
Figura 15 - Detecção visual das reações de LAMP para IAV e IBV (63°C com volume de 15 uL).	64

Figura 16 - Detecção visual das reações de LAMP para IAV e IBV (65°C com volume de 15 uL).....	65
Figura 17 - Detecção visual das reações de LAMP para SARS-CoV-2, IAV e IBV.	66
Figura 18 - Teste da reação de LAMP para Influenza B com amostra clínica detectável para IBV pela técnica de RT-qPCR.....	72
Figura 19 - Teste de diluição do Isolado viral de Influenza B.....	72
Figura 20 - Número mensal de coletas do MONITORACOVID UFMG em 2022	73
Figura 21 - Taxa de positividade por mês dos vírus SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B através da reação de LAMP	75
Figura 22 - Taxa de positividade por mês do SARS-CoV-2 no ano de 2022 (LAMP x RT-qPCR).....	76
Figura 23 - Porcentagem anual dos resultados encontrados na reação de LAMP ..	76
Figura 24 - Detecção visual das reações de LAMP para SARS-CoV-2, IAV e ACTB com resultado indeterminado.	77

ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 : Parecer consubstanciado do CEP - número 4.963.694.....	109
Anexo 2 : Procedimento de extração do RNA com o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)	115
Anexo 3 : Certificado de participação do 54º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial – Exposição Técnico-Científica.....	118
Anexo 4 : Rascunho do manuscrito para publicação de artigo original.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrometro
µM	Micromol
ACE-2	Enzima conversora de angiotensina tipo 2
ACTB	Beta-actina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B3	Iniciador externo anti-senso
BIP	Iniciador interno anti-senso
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CoV	Coronavírus
COVID-19	Doença do coronavírus 2019
cRNPs	Ribonucleoproteínas complementares
Ct	Limiar do ciclo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Dinucleotídeos
E	Envelope
ECA	Enzima conversora de angiotensina
F3	Iniciador externo senso
FIP	Iniciador interno senso
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HA	Hemaglutinina
HCoVs	Coronavírus humanos
IAV	Vírus Influenza A
IBV	Vírus Influenza B
IC	Intervalo de confiança
IDT	<i>Empresa Integrated DNA technologies</i>
IL-1β	Interleucina 1β
IL-6	Interleucina 6
IRAs	Infecções respiratórias agudas
kg	Quilograma
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por loop
LB	Iniciador loop anti-senso
LF	Iniciador loop senso
LINBIO	Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores
M	Proteína membrana
M1	Proteína matriz
M2	Proteína de membrana M2
MERS	Síndrome respiratória do Oriente Médio
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MTV	Meio de transporte viral

N	Proteína nucleocapsídeo
NA	Neuraminidase
NASBA	Amplificação baseada em sequenciamento do ácido nucléico
NEB	<i>New england bioloabs</i>
NEP	Proteína de exportação nuclear
NGS	Sequenciamento de última geração
nm	Nanomêtro
NP	Nucleoproteína viral
NS	Não estrutural
NS1	Proteína não estrutural NS1
NS2	Proteína não estrutural NS2
NSPS	Proteínas não estruturais
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase de leitura aberta
PA	Subunidade PA da RNA polimerase
PB1	Subunidade PB1 da RNA polimerase
PB2	Subunidade PB2 da RNA polimerase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pFN	Proporção de falso negativo
pFP	Proporção de falso positivo
pfu	Unidades formadoras de placas
pH	Potencial hidrogeniônico
RBD	Domínio de ligação do receptor
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse P	Ribonuclease P
RT	Enzima Transcriptase reversa
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real
S	Espícula
S1	Proteína S1
S2	Proteína S2
SARS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 Síndrome respiratória aguda grave
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
SUS	Sistema Único de Saúde
TLR	Teste laboratorial remoto
TNF α	Interleucina TNF α
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
US\$	Dólares americanos
VOC	Variante de preocupação
vRNPs	Ribonucleoproteínas virais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 VÍRUS INFLUENZA.....	24
2.1.1 A DOENÇA.....	25
2.1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	28
2.1.3 TRANSMISSÃO	29
2.1.4 TRATAMENTO.....	30
2.1.5 VACINAS	31
2.2 SARS-CoV-2.....	32
2.2.1 A DOENÇA.....	35
2.2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	37
2.2.3 TRANSMISSÃO	39
2.2.4 TRATAMENTO.....	40
2.2.5 VACINAS.....	41
2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS.....	43
3. OBJETIVOS.....	49
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 SELEÇÃO DOS INICIADORES DE LAMP	50
4.2 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE LAMP	52
4.3 PROGRAMA MONITORACOVID UFMG.....	55
4.4 CÁLCULO DAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DA REAÇÃO	56
4.4.1 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICAS E ACURÁCIA.....	56
4.4.2 VALOR PREDITIVO POSITIVO E NEGATIVO	57

4.4.3	INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	57
4.4.4	ÍNDICE Kappa	57
4.4.5	ERROS TIPO I e II	58
4.4.6	INTERPRETAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	58
4.4.7	SARS-CoV-2 (GENE E)	59
4.4.8	INFLUENZA A (GENE DA MATRIZ)	59
4.4.9	INFLUENZA B (GENE NS).....	60
4.5	AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA EM AMOSTRAS DO MONITORACOVID UFMG.....	60
5.	RESULTADOS.....	61
5.1	VERIFICAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE LAMP	61
5.2	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DA REAÇÃO	67
5.2.1	SARS-CoV-2 (GENE E)	67
5.2.2	INFLUENZA A (GENE DA MATRIZ)	69
5.2.3	INFLUENZA B (GENE NS).....	71
5.3	AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES ATENDIDOS PELO MONITORACOVID UFMG	73
6.	DISCUSSÃO	78
7.	CONCLUSÕES	89
8.	PERSPECTIVAS	90
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
10.	ANEXOS.....	109
10.1	PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP - NÚMERO 4.963.694.....	109
10.2	PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO RNA COM O KIT <i>QIAAMP VIRAL RNA MINI KIT (QIAGEN®)</i>	115

10.3 CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO DO 54º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA MEDICINA LABORATORIAL – EXPOSIÇÃO TÉCNICO- CIENTÍFICA.....	118
10.4 RASCUNHO DO MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGO ORIGINAL	119

1. INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias agudas (IRAs) representam grande parte das causas de morbidade nos países desenvolvidos e são o principal motivo de morte de crianças em países em desenvolvimento, sendo cerca de 80% dessas infecções de etiologia viral (MAHONY; PETRICH; SMIEJA, 2011). Os principais patógenos respiratórios virais, como Influenza e vírus respiratório sincicial, são responsáveis por cerca de 300.000 mortes por ano (AZAR; LANDRY, 2018), e até 7 de março de 2023, o coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), foi relacionado a 6,8 milhões de mortes mundialmente (OMS, 2022c). Sinais clínicos associados às IRAs são inespecíficos e variam desde sintomas leves confinados à parte superior do trato respiratório e caracterizado por febre, faringite, coriza, tosse, dor de cabeça, dores musculares e fadiga, até pneumonia grave e co-infecção bacteriana secundária do trato respiratório inferior, podendo levar ao óbito (KRAMMER *et al.*, 2018).

As IRAs são um problema de saúde pública mundial, caracterizando-se por uma infecção contagiosa que ocorre sazonalmente, e afetando indivíduos de todas as idades, causando impactos sociais (PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016). Além do impacto na saúde, as IRAs refletem significativamente na economia. Estimam-se que os custos anuais com o tratamento das complicações da gripe nos Estados Unidos são de U\$40 bilhões (FENDRICK *et al.*, 2003), e superiores a U\$87 bilhões apenas com influenza (MOLINARI *et al.*, 2007). Já a pandemia de COVID-19 desencadeou a pior ressecação global desde 1945, com redução do PIB mundial em 4,3% no ano de 2020 (MALLAH *et al.*, 2021).

Desde o início do século XX, os vírus Influenza são responsáveis por pandemias, como a Gripe Espanhola em 1918, o H1N1 pandêmico em 2009, e recorrentes episódios de epidemia (WIKRAMARATNA; GUPTA, 2009). Os vírus Influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae*, e os tipos A e B, que causam doença respiratória infecciosa em humanos, apresentam genoma de RNA (ácido ribonucleico) fita simples segmentado de sentido negativo. Os vírus Influenza A

(IAV) e B (IBV) codificam proteínas com alta variabilidade antigênica, como a hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), que contribuem para a grande diversidade de subtipos virais (BUKASOV; DOSSYM; FILCHAKOVA, 2021). Os IAV circulam em humanos, mas também em animais domésticos, porcos, cavalos e em aves migratórias, enquanto os IBV são quase exclusivamente encontrados em humanos (OLSEN *et al.*, 2006; WEBSTER *et al.*, 1992). Os reservatórios animais do IAV são fonte dos genes HA e NA antigenicamente diversos, que podem ser trocados entre estirpes virais por rearranjo após co-infecção do mesmo hospedeiro, aumentando a diversidade do vírus e, em alguns casos, levando à geração de diferentes estirpes. Os vírus Influenza do subtipo A de origem zoonótica são responsáveis pela maior parte da mortalidade e morbidade em humanos (PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016).

Os coronavírus (CoV) pertencem à família *Coronaviridae* e são vírus envelopados que apresentam genoma de RNA de fita simples de sentido positivo. Os vírions são geralmente esféricos com a proteína espícula (S), do inglês *Spike*, proeminente no envelope. Os coronavírus são patógenos de vários mamíferos, como morcegos, camelos e humanos. As frequentes transmissões inter e intra espécies e a capacidade mutacional do vírus contribuem para o surgimento de novas estirpes de CoV (SU *et al.*, 2016). Em 2003, um *Betacoronavirus* da linhagem B, identificado como SARS-CoV (coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave), originado em morcegos, espalhou-se de civetas para humanos no sul da China, causando um surto de síndrome respiratória aguda grave (SRAG) (DROSTEN *et al.*, 2003). Em 2012, outro *Betacoronavirus* (da linhagem C) denominado de MERS-CoV foi identificado como causador da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS). O MERS-CoV se espalhou de camelos para humanos na Arábia Saudita, causando síndrome respiratória semelhante à SRAG (MOH ZAKI *et al.*, 2012). O último coronavírus a surgir em humanos foi descrito recentemente na cidade de Wuhan, na China Central, em dezembro de 2019 (NGUYEN; BANG; WOLFF, 2020; ZHU *et al.*, 2020) e foi identificado como SARS-CoV-2, sigla proveniente do inglês que significa Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (WU *et al.*, 2020).

Atualmente, o diagnóstico das IRAs é realizado basicamente com base nas manifestações clínicas e informações epidemiológicas. Porém, em decorrência do amplo espectro e baixa especificidade dos sintomas, curto período de incubação dos vírus e transmissão por meio de secreções contaminadas por aerossóis, gotículas ou objetos contaminados, o diagnóstico laboratorial rápido e preciso torna-se importante no sentido de distinguir o agente etiológico e contribuir para o melhor entendimento da dinâmica de transmissão desses vírus. Estima-se que durante a pandemia de 2009, mais de 280.000 mortes foram causadas pelo Influenza vírus H1N1, porém somente 18.500 foram confirmadas por exames laboratoriais (DAWOOD *et al.*, 2012).

Testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction* – PCR) e cultura viral são ensaios que permitem o diagnóstico laboratorial com alta sensibilidade e especificidade, porém são exames caros para os sistemas de saúde, pois exigem mão de obra especializada e estrutura tecnológica avançada dos laboratórios e hospitais. Tradicionalmente, as amostras utilizadas nos testes moleculares são *swab* de nasofaringe e/ou orofaringe, aspirado ou lavado nasal, já que a sensibilidade se correlaciona com a carga viral nessas amostras obtidas (KRAMMER *et al.*, 2018).

Em 2000 (NOTOMI *et al.*, 2000) foi desenvolvida uma técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (*loop-mediated isothermal amplification* – LAMP), patenteada por *Eiken Chemical Company* (número: JP2000283862, WO2002024902A1), inicialmente descrita para amplificação de DNA, que exige estrutura laboratorial menos complexa e é capaz de detectar alvos moleculares com alta especificidade, sensibilidade e menor custo do que os testes moleculares tradicionais. Ensaios de LAMP já foram desenvolvidos para a detecção de vários alvos, como bactérias, parasitas, protozoários e vírus, incluindo vírus de RNA como Influenza, SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 (KASHIR; YAQINUDDIN, 2020; SHIRATO, 2019). Dentre as vantagens desse método destacam-se a possibilidade de dispensa da extração do material genético (YOO *et al.*, 2020), e detecção e interpretação do teste a olho nu, o que tornam esse ensaio mais rápido e passível de

ser utilizado como teste laboratorial remoto (TLR), também conhecido como *point of care* (LI, Y. *et al.*, 2017; NZELU *et al.*, 2016). Outra possibilidade de detecção é o monitoramento da amplificação em tempo real com o acréscimo na reação de sonda *SYBR Green I* cuja detecção é feita por meio de um fluorímetro (LI *et al.*, 2017; SHIRATO, 2019).

Diante deste cenário, o diagnóstico molecular acessível das infecções respiratórias agudas virais torna-se essencial no controle epidemiológico de surtos pandêmicos e/ou epidêmicos, a fim de mitigar os impactos na saúde pública e economia dos países. Além disso, o conhecimento da dinâmica das infecções em nosso meio possibilita a tomada de decisão mais rápida e assertiva no seu controle através da adoção de políticas de saúde pública. Para controlar um surto pandêmico e/ou epidêmico com sucesso, o diagnóstico deve ter alta sensibilidade e especificidade, além de ser acessível a toda a população e tecnicamente aos sistemas de saúde locais. O presente estudo se justifica pela padronização e validação de ensaio de LAMP, uma técnica laboratorial mais simples e acessível, usada para avaliar a frequência dos principais vírus relacionados à IRA em indivíduos sintomáticos no ano de 2022 pertencentes à comunidade da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - VÍRUS INFLUENZA

Influenza é uma doença causada principalmente pelos vírus Influenza A e Influenza B em humanos. Os vírus Influenza pertencem à família Orthomyxoviridae, composta pelos gêneros Alphainfluenzavirus, Betainfluenzavirus, Deltainfluenzavirus, Gammainfluenzavirus, Isavirus, Quaranjavirus, Thogotovirus (ICTV, 2011).

Os vírus Influenza A e B possuem envelope lipídico e genoma RNA anti-senso de fita única segmentado. Os oito segmentos de RNA são responsáveis por produzir: subunidades da RNA polimerase - PB1, PB2 e PA, relacionados à síntese de RNA e replicação nas células infectadas; glicoproteínas virais – hemaglutinina (HA), que auxilia a penetração viral, e neuraminidase (NA), que facilita a liberação viral; nucleoproteína viral (NP), que liga o genoma RNA viral; proteína da matriz (M1), que fornece suporte a estrutura do vírion e, junto com a proteína de exportação nuclear (NEP), regula o tráfego dos segmentos de RNA viral na célula; proteína de membrana M2 (M2) - canal de íon próton necessário para a entrada e saída do vírus; e proteína não estrutural NS1 - fator de virulência que inibe as respostas antivirais do hospedeiro em células infectadas (ICTV, 2021; NODA, 2011) (**Figura 1**).

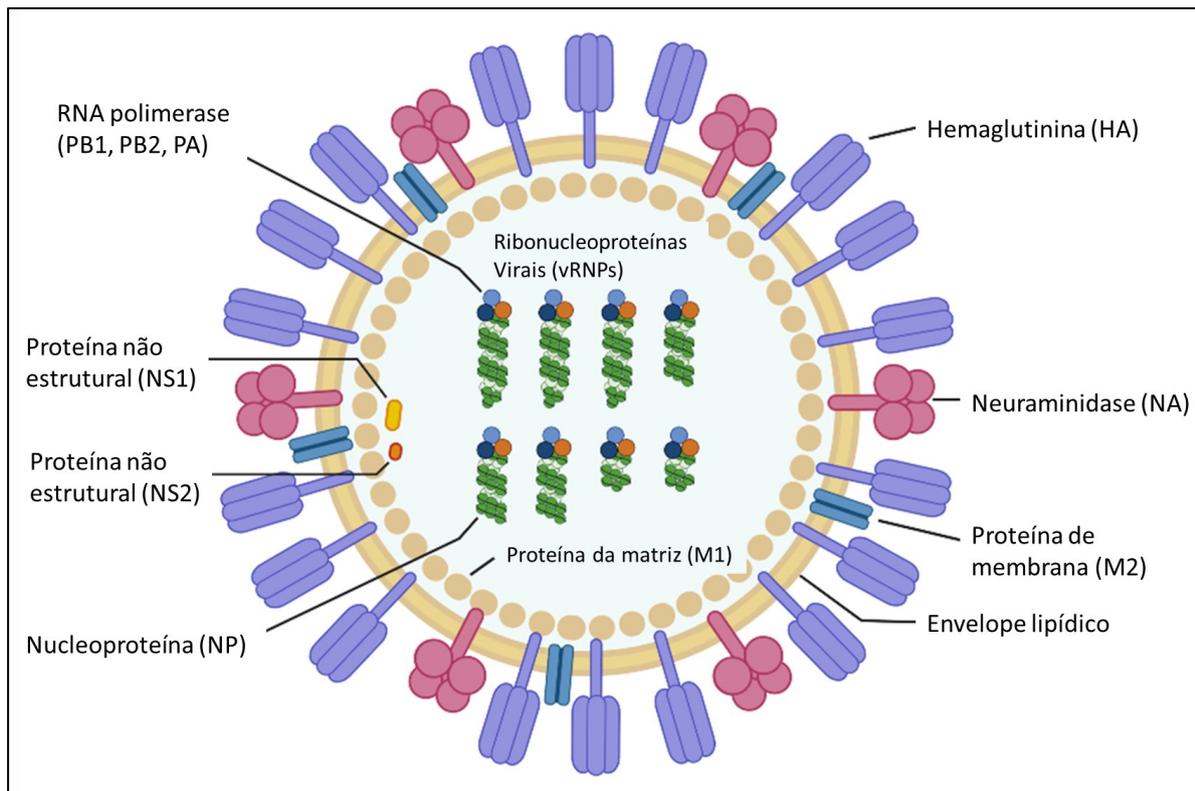


Figura 1 - Representação esquemática do vírion Influenza A e B.

O vírus Influenza possui envelope lipídico que contém as proteínas de membrana (M2), hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Dentro do envelope o genoma é dividido em 8 segmentos de RNA anti-senso que codificam as proteínas virais: HA, NA, M2, ribonucleoproteínas virais (vRNPs), RNA polimerases PB1, PB2 e PA, proteína não estrutural NS1 e NS2, nucleoproteína (NP), e proteína da matriz (M1) (Adaptado de JUNG; LEE, 2020).

2.1.1 – A DOENÇA

O vírus Influenza podem causar doenças de diferentes gravidades em indivíduos de todas as idades, variando de sintomas leves como febre, dor de garganta, coriza, tosse, dor de cabeça, dor muscular e fadiga, até pneumonia grave ou até chegar ao óbito devido a complicações da infecção viral ou bacteriana secundária do trato respiratório inferior. A pneumonia viral primária é caracterizada por altos níveis de replicação viral no trato respiratório inferior, acompanhados por fortes respostas pró-inflamatórias, conhecidas como tempestade de citocinas. Além desses, a infecção pelo vírus Influenza pode levar a sintomas e complicações não respiratórias,

afetando o coração e os rins (SELLERS et al., 2017). As complicações do sistema nervoso central podem ocorrer pelos dois vírus, mais geralmente são mais graves pelo IBV (VAN DE SANDT et al., 2015).

Várias comorbidades aumentam o risco de morte por infecção pelo vírus Influenza. A idade dos infectados é um fator de risco importante, já que indivíduos muito jovens (<1 ano de idade), que ainda não desenvolveram imunidade adquirida contra os vírus Influenza, e idosos (> 65 anos de idade), pela presença de doenças crônicas e imunossenescência, são populações mais vulneráveis (KRAMMER et al., 2018).

O vírus Influenza A e a linhagem Victoria do IBV têm como alvo os receptores de ácido siálico alfa-2,6 (carbono 6 da galactose liga-se ao carbono 2 do ácido siálico), encontrados em células epiteliais da parte superior do sistema respiratório humano (nariz, faringe, traqueia), e receptores de ácido siálico alfa -2,3, encontrados em células de intestino de aves e no sistema respiratório inferior dos humanos, enquanto a linhagem Yamagata se liga predominantemente ao receptor ácido siálico alfa-2,6 (VAN DE SANDT et al., 2015). Geralmente, os IBV possuem menor afinidade de ligação aos receptores de ácido siálico do que os IAV (MATROSOVICH et al., 1993). Os vírions penetram na célula ao reconhecer o receptor específico e seu material genético é direcionado para o núcleo para transcrição de mRNA e replicação por meio de ribonucleoproteínas complementares (cRNPs). O mRNA viral é traduzido em proteínas virais no citoplasma, e estas são montadas em novos vírions junto com as ribonucleoproteínas virais (vRNPs) recém-sintetizados (**Figura 2**).

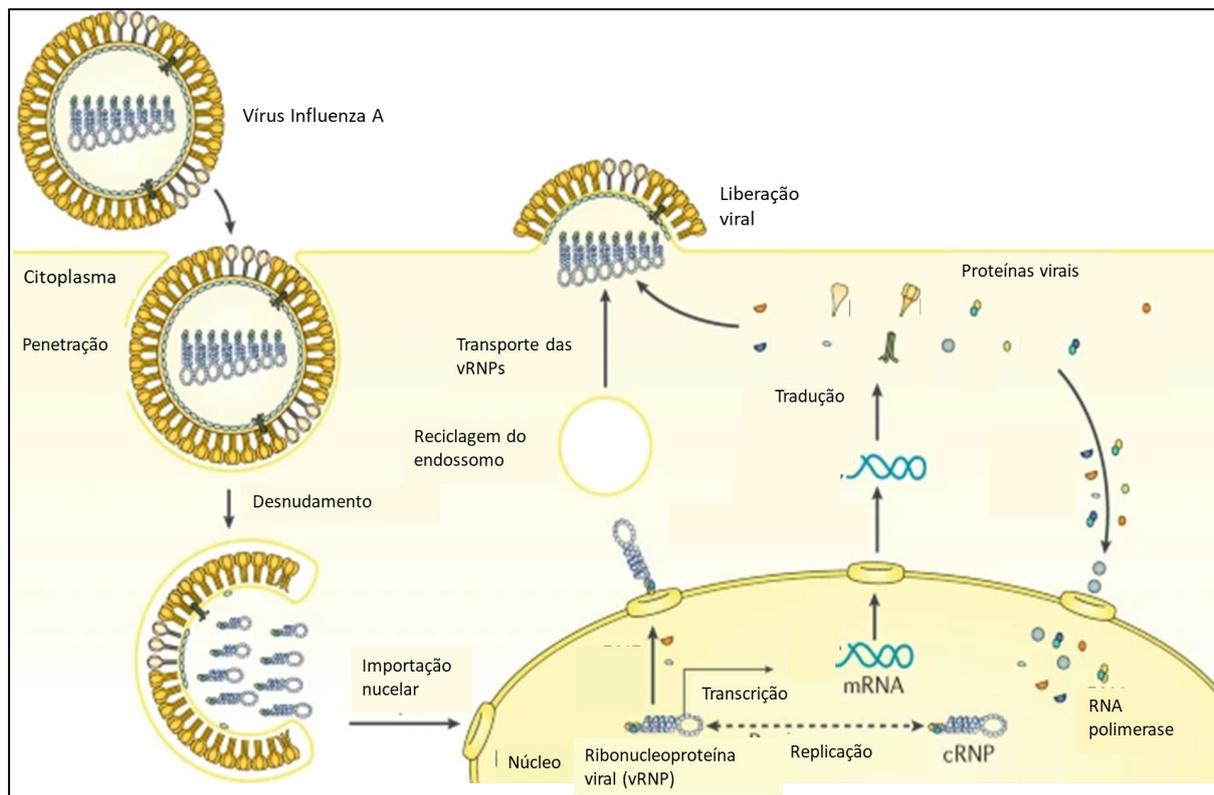


Figura 2 - Esquema da replicação do vírus Influenza A.

Depois da ligação na célula do hospedeiro, o vírus Influenza faz a penetração por endocitose e libera seu material genético (RNA anti-senso) na forma de ribonucleoproteínas virais (vRNPs), que é direcionada ao núcleo celular para transcrição do RNA mensageiro e replicação por meio do intermediário ribonucleoproteína complementar de sentido positivo (cRNP). As proteínas virais são traduzidas no citoplasma e são montadas para formação de novos vírions com os recém-sintetizados vRNPs. (Adaptada de KRAMMER, 2015).

O tempo da replicação viral do Influenza leva cerca de 6 horas. A infecção do vírion resulta em destruição celular e descamação da mucosa superficial. A extensão da destruição celular induzida pelo vírus é o principal fator que determina a ocorrência, gravidade e duração da doença clínica (KRAMMER, 2015). Após 1 a 4 dias do pico de eliminação, a carga viral diminui, em conjunto com a redução progressiva da doença.

Os vírus Influenza A circulam também em animais domésticos, porcos, cavalos e aves (WEBSTER et al., 1992) fonte dos genes HA e NA antigenicamente diversos, que podem ser trocados entre estirpes virais por rearranjo após coinfeção do mesmo hospedeiro, processo chamado de “*antigenic shift*”. Este processo aumenta

a diversidade do vírus e, em alguns casos, leva à geração de diferentes estirpes de vírus epidêmicas ou pandêmicas (BUKASOV; DOSSYM; FILCHAKOVA, 2021). Os vírus de origem zoonótica são responsáveis pela maior parte da mortalidade e morbidade em humanos (PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016). Em contraste, os IBVs são capazes de ocasionalmente infectar espécies além dos humanos, mas não há evidência de que essas espécies sejam reservatório do vírus e que possam ser transmitidas para os humanos (OLSEN et al., 2006; WEBSTER et al., 1992). Os vírus Influenza A e B realizam o processo de “*antigenic drift*”, que corresponde à ocorrência de mutações discretas (de ponto) que surgem durante a replicação viral, já que a polimerase do vírus não realiza a conferência da síntese de material genético (VAN DE SANDT et al., 2015).

2.1.2 – EPIDEMIOLOGIA

Desde o início do século XX, os vírus Influenza são responsáveis por recorrentes episódios de epidemia (WIKRAMARATNA; GUPTA, 2009). Os surtos epidêmicos de Influenza, causados pelos vírus Influenza A e B, geralmente ocorrem anualmente e sazonalmente durante o inverno de países temperados, afetando principalmente recém-nascidos, crianças e idosos, totalizando cerca de 1 bilhão de infecções, 3-5 milhões de casos graves da doença e 300 – 500 mil mortes mundialmente (KRAMMER et al., 2018).

Estirpes de origem zoonótica, geralmente aviárias ou suínas, já resultaram em quatro pandemias desde 1918 – “gripe espanhola” (1918), “gripe asiática” (1958), “gripe de Hong Kong” (1968) e “gripe suína – H1N1” (2009) tornando-se estirpes epidêmicas sazonais nos anos posteriores (VIKRAM VEMULA et al., 2016). Atualmente, as estirpes Influenza A H1N1 e H3N2 circulam sazonalmente nos humanos. A gravidade do evento depende de fatores como virulência das estirpes e os níveis de imunidade adquirida da população. Estima-se que a maior epidemia de Influenza, entre 1918 e 1919 tenha causado mais de 40 milhões de mortes (KRAMMER et al., 2018).

No Brasil, a vigilância do vírus Influenza teve início na década de 1990 com a identificação dos vírus circulantes em algumas partes do país e em situações de surto (CANTARINO; MERCHAN-HAMANN, 2016). A vigilância de Influenza tem sido capaz de identificar os vírus respiratórios circulantes, bem como sua sazonalidade e populações de alto risco.

Um estudo de vigilância brasileira de Influenza entre 2000-2010 (FREITAS, 2013), registrou 29.318.698 atendimentos no SUS (Sistema Único de Saúde), dos quais 11% (3.291.949) eram decorrentes de sintomas de gripe. Destes, 37.120 (1%) tiveram amostras de secreção nasofaríngea coletadas para pesquisa de vírus respiratórios. Dentre estas amostras, 6.421 (17%) testaram positivas, sendo 1.985 (31%) para vírus sincicial respiratório, 1.690 (26%) positivas para IAV, 742 (12%) para adenovírus, 589 (9%) para parainfluenza 3, 571 (9%) para parainfluenza 2, 567 (9%) para IBV, e 277 (4%) para parainfluenza 1. A prevalência dos vírus influenza A e B pode variar bastante de acordo com as estações e surtos (VAN DE SANDT et al., 2015).

2.1.3 – TRANSMISSÃO

Os vírus Influenza humanos são transmitidos por via respiratória, enquanto os vírus Influenza aviários são transmitidos por vias fecal-fecal, fecal-oral ou fecal-respiratória. Dependendo da rota de transmissão, o vírus tem como alvo as células epiteliais do trato respiratório ou intestinal para infecção e replicação produtiva.

Fatores climáticos como temperaturas, umidade do ar e horas de luz solar afetam as propriedades das proteínas de superfície e membrana lipídica, influenciando na viabilidade dos vírus Influenza (MARR et al., 2019; SHAMAN; KOHN, 2009) (**Quadro 1**). Além disso, diminuição da ventilação em locais fechados e aglomeração de pessoas favorecem a transmissão do vírus (MORIYAMA; HUGENTOBLE; IWASAKI, 2020; YU et al., 2013).

QUADRO 1: Transmissão dos vírus respiratórios por aerossol em diferentes condições ambientais.

Clima	Umidade absoluta do ar	Estabilidade viral	Aerossóis < 5 um	Viabilidade dos vírus respiratórios	Tipo predominante de transmissão
Tropical	Alta	Alta	Baixa	Alta	Fômites, contato indireto e direto
Temperado (Primavera, Outono)	Intermediária	Baixa	Baixa	Baixa	Fômites, contato indireto e direto, Aerossóis
Temperado (inverno)	Baixa	Alta	Alta	Alta	Aerossóis

Adaptado de MORIYAMA; HUGENTOBLER; IWASAKI, 2020.

2.1.4 – TRATAMENTO

Os medicamentos anti-influenza, que têm como alvo a NA, têm sido usados para prevenir e tratar infecções pelo vírus Influenza A e B por muitos anos. Em particular, oseltamivir, zanamivir e peramivir exercem efeitos antivirais, mas certas alterações de aminoácidos em NA dão origem a estirpes de IAV resistentes a medicamentos.

O uso eficaz de antivirais para influenza sazonal em adultos saudáveis requer o início precoce da terapia, geralmente nas primeiras 48 horas do início dos sintomas. No entanto, as decisões relativas ao tratamento devem considerar o benefício limitado e não tão claramente demonstrado em ensaios clínicos, e o baixo risco geral de complicações (DOBSON et al., 2015). Pacientes com comprometimento imunológico subjacente, aqueles com doença mais grave ou aqueles que apresentam maior risco de complicações da influenza (DUGAS; ROTHMAN, 2011), podem se beneficiar da administração de antivirais, mesmo se iniciada após 48 horas do início dos sintomas (UYEKI, 2009). A terapia antiviral é fortemente considerada se a doença estiver progredindo e os sintomas piorarem, principalmente

se o paciente continuar com o teste positivo para o vírus da gripe. De fato, a prescrição de antivirais para pacientes ambulatoriais de alto risco com doença respiratória aguda é benéfica (STEWART et al., 2018).

2.1.5 – VACINAS

A produção de vacinas para o vírus Influenza envolve o crescimento do vírus em ovos de galinha embrionados e a inativação com formalina (ou outro reagente alquilante). Após a replicação, o fluido alantóide dos ovos infectados contendo altos títulos do vírus é colhido, e o vírus é inativado, tratado para divisão de componentes virais individuais e submetido a purificação parcial para enriquecimento dos HA e NA no produto final da vacina (KRAMMER et al., 2018).

Todas as vacinas disponíveis ainda precisam de reformulações anuais, devido ao surgimento de novas estirpes e a curta duração da imunidade que a vacina confere. Já existem vacinas para Influenza tetravalentes, incorporando as duas linhagens de IBV (KRAMMER, 2015).

Para a identificação de novas estirpes de relevância global, existe um grupo de vigilância da influenza humana, com mais de 100 centros nacionais, que realizam o isolamento viral dos Influenza em circulação para sua caracterização genética e antigênica. Um comitê da OMS (Organização Mundial da Saúde) analisa os resultados semestralmente e faz recomendações sobre a composição da vacina, com base no uso de vírus antigenicamente compatíveis com aqueles que se esperam tenham alta prevalência na próxima temporada. Então, cada país toma sua própria decisão sobre quais vírus devem ser incluídos nas vacinas contra influenza licenciadas em seu país (KRAMMER et al., 2018).

2.2– SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus da família *Coronaviridae* do gênero *Betacoronavirus* que causa a COVID-19 (doença do coronavírus 2019) em humanos (ZHU et al., 2020). O vírus foi primeiramente isolado em dezembro de 2019 (WU et al., 2020) e é responsável pelo estado de pandemia declarado pela OMS em março de 2020 que dura desde então (CUCINOTTA; VANELLI, 2020). Até 07 de março de 2023, já foram confirmados 759,4 milhões de casos e 6,8 milhões de mortes mundialmente (OMS, 2022c).

O genoma do SARS-CoV-2 possui cerca de 30 kb, e contém 13 fases de leitura aberta (ORFs), do inglês *open reading frames*, e codifica 29 proteínas virais (YANG; RAO, 2021) (**Figura 3**). Os genes codificadores de proteínas não estruturais (nsp1-16) possuem papel importante no ciclo viral, como nos processos de síntese do RNA, prova de leitura, e patogênese, através da modulação do sistema imune (nsp1 e nsp2) e atividade proteolítica do vírus (KADAM et al., 2021).

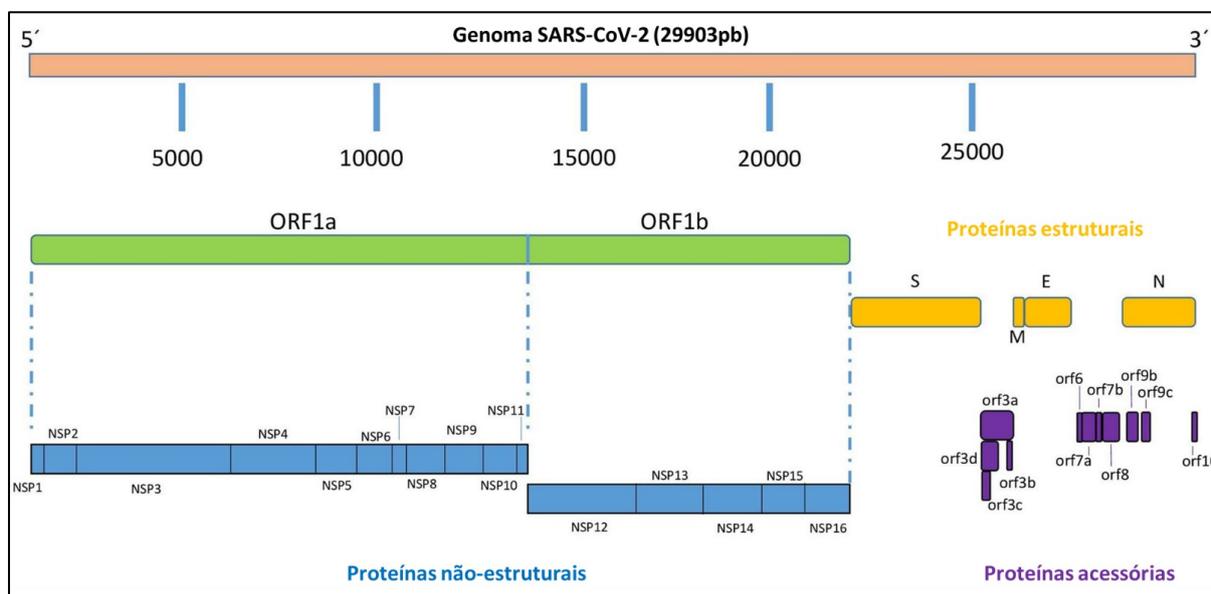


Figura 3 - Organização do genoma do SARS-CoV-2 e proteínas correspondentes.

O genoma do SARS-CoV-2 (29903pb) possui 13 fases de leitura aberta (ORFs) e codifica as proteínas estruturais nucleocapsídeo (N), proteína de membrana (M), envolpe (E) e proteína da espícula (S), proteínas não estruturais (nsp1-16) e proteínas acessórias (Adaptada de REDONDO et al., 2021).

Os coronavírus (CoVs) são uma família de vírus envelopados, do tipo RNA de fita simples de sentido positivo (WANG et al., 2020). O genoma viral é envolto pelo nucleocapsídeo (N), enquanto a proteína de membrana (M) e o envelope (E) garantem sua incorporação na partícula viral, geralmente esféricos com a proteína da espícula proeminente, do inglês *Spike* (S) (DHAMA et al., 2020) (**Figura 4**).

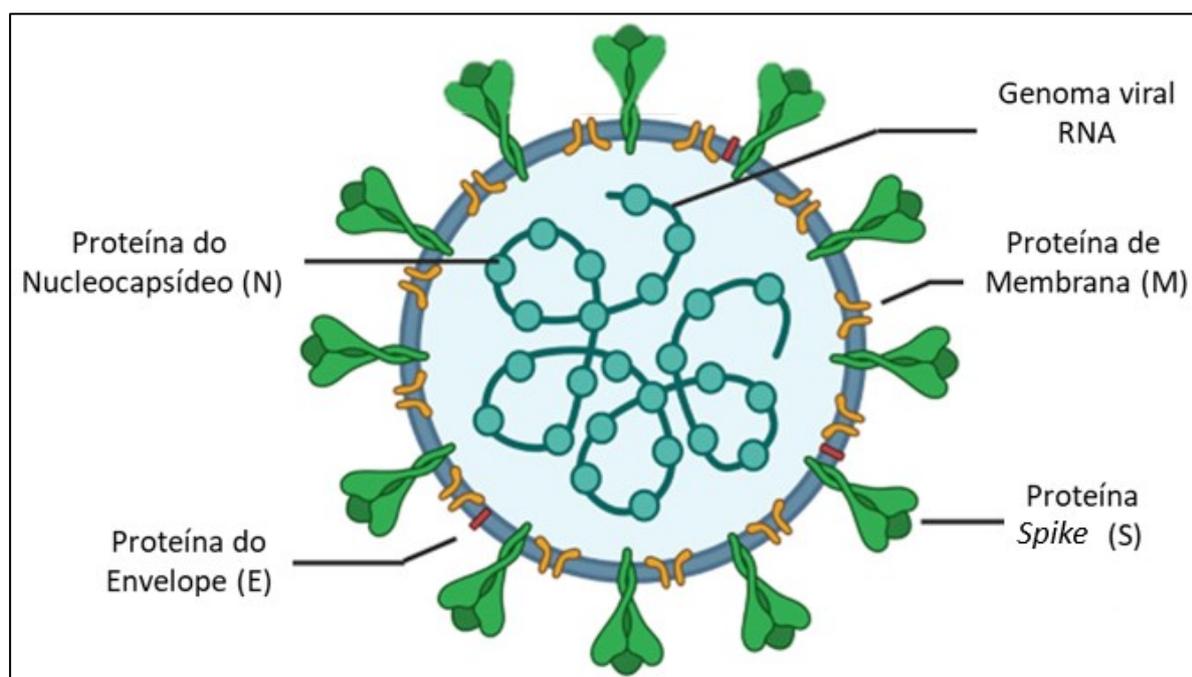


Figura 4 - - Representação esquemática do SARS-CoV-2.

O SARS-CoV-2 possui genoma RNA de fita simples de sentido positivo, envolto pelas proteínas do nucleocapsídeo (N), que codifica as proteínas do envelope (E), Spike (S) e de membrana (M) 2 (Adaptada de RANDO et al., 2021).

De todas as proteínas estruturais do SARS-CoV-2, a proteína S é a que tem chamado mais atenção, por ser responsável pela adsorção viral na célula hospedeira (KADAM et al., 2021). O domínio S1 age como um domínio de ligação ao receptor (RBD), que interage com o receptor ACE-2 (receptor da enzima conversora de angiotensina) (LAN et al., 2020), presente na membrana celular de várias células humanas, como pulmonares, cardiovasculares, renal e intestinal (KADAM et al., 2021); e o domínio S2 é responsável pela fusão da membrana celular (LU et al., 2020). O RBD da proteína S do SARS-CoV-2 difere dos outros coronavírus humanos (HCoV) e possui um papel importante na patogênese do vírus. Mutações no RBD não apenas aumentam a estabilidade estrutural da proteína S, mas também podem

enfraquecer a ligação do anticorpo criado contra outras estirpes, o que explica a maior taxa de transmissibilidade dele em comparação com os outros HCoVs (ALAOFI; SHAHID, 2021).

Os CoVs, além de infectar humanos, são patógenos de vários mamíferos, como morcegos e camelos. As frequentes transmissões inter e intra espécies e a alta capacidade mutacional do vírus contribuem para o surgimento de novas estirpes de CoV (SU et al., 2016). Sete CoVs já foram isolados em infecções humanas, sendo as estirpes 229E, OC43, NL63 e HKU1 responsáveis por 10 a 30% das infecções virais respiratórias aguda (VAN DER HOEK, 2005). No século XXI, anteriormente à pandemia atual, dois surtos relacionados a HCoVs causadores de doenças respiratórias graves em humanos haviam sido relatados. Em 2003, um *Betacoronavírus* da linhagem B, identificado como SARS-CoV, originado em morcegos, espalhou-se de civetas para humanos no sul da China, causando um surto de SRAG (DROSTEN et al., 2003). Em 2012, outro *Betacoronavírus* da linhagem C, denominado de MERS-CoV, foi identificado como causador da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS). O MERS-CoV se espalhou de camelos para humanos na Arábia Saudita, causando síndrome respiratória semelhante à SRAG (MOH ZAKI et al., 2012).

Por meio de comparação genômica, identificou-se que o SARS-CoV-2 possui 78% de similaridade com o SARS-CoV, 50% com o MERS-CoV (LU et al., 2020) e 96,1% de similaridade com coronavírus isolados de morcegos (CoV RaTG13) (ZHOU et al., 2020), levantando a hipótese de este ser o reservatório principal do vírus (GUO et al., 2020). Por outro lado, o domínio RBD do SARS-CoV-2 possui maior similaridade (98%), ao nível proteico, com o CoV isolado de pangolim malaio (SARS-CoV-P4LGuangxi-2017), que pode ter atuado como reservatório intermediário para transmissão dos vírus para os humanos (XIAO et al., 2020).

2.2.1 – A DOENÇA

Os sintomas da COVID-19 são variados, desde sinais leves na maioria dos casos, até complicações mais graves principalmente em pacientes do grupo de risco, como indivíduos com obesidade, portadores de doenças cardíacas, renais crônicas e idade avançada (GAO et al., 2021). Muitos pacientes infectados pelo vírus permanecem assintomáticos (HE et al., 2021), enquanto alguns casos podem resultar no óbito do paciente (PACHETTI et al., 2020). O aparecimento dos sintomas ocorre cerca de 5 dias após a exposição ao vírus (CEVIK et al., 2020), sendo os mais comuns: febre, tosse, dor de cabeça, fadiga, coriza, anosmia, ageusia, falta de ar, náusea e diarreia (MAO et al., 2020). Nos pacientes hospitalizados, as complicações mais comuns são pneumonia, síndrome respiratória aguda grave, lesões hepáticas, cardíacas, renais e eventos pró-tromboembólicos associados ao quadro de tempestade de citocinas que o paciente pode desenvolver em resposta do sistema imune à infecção pelo SARS-CoV-2 (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2020; WIERSINGA et al., 2020).

De acordo com as definições da OMS, a COVID-19 é classificada como crítica, quando o paciente apresenta a SRAG, sepse, choque séptico ou outras condições que exigem terapias críticas para sobrevivência, como ventilação mecânica (invasiva ou não invasiva) ou terapia vasopressora. A COVID-19 crítica é definida por sinais de pneumonia, saturação de oxigênio menor que 90% e sinais de SRAG, como frequência respiratória maior que 30 incursões respiratórias por minuto e fala entrecortada. A COVID-19 branda é caracterizada pela ausência de qualquer um dos sinais característicos da COVID-19 crítica ou grave (**Figura 5**).

Enquanto a maioria dos pacientes com COVID-19 se recuperam poucos dias após a infecção pelo SARS-CoV-2, alguns pacientes com sintomas leves ou graves podem desenvolver consequências a longo prazo (semanas, meses ou até anos), caracterizando o quadro de COVID longa. Os sintomas da COVID longa são variados e podem afetar diferentes regiões do corpo, como os sistemas respiratório,

cardiovascular, neurológico e até desencadear quadros autoimunes (CASTANARES-ZAPATERO et al., 2022; MEHANDRU; MERAD, 2022).

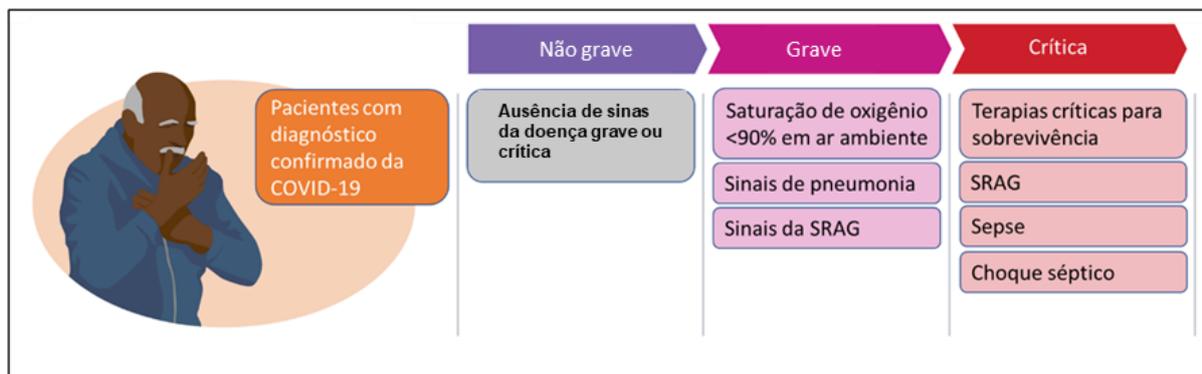


Figura 5 - Sinais clínicos para classificação da gravidade da COVID-19 de acordo com os critérios da OMS.

De acordo com a OMS, a gravidade da COVID-19 pode ser classificada em três grupos (não grave, grave e crítica) de acordo com os sinais clínicos que o paciente apresenta (Adaptada de OMS, 2022a).

O SARS-CoV-2 infecta células epiteliais do trato respiratório superior, onde se liga à proteína ACE-2, do inglês *angiotensin-converting enzyme 2*, (HOFFMANN et al., 2020; WIERSINGA et al., 2020) e desencadeia uma resposta inflamatória viral. ACE-2 é um receptor semelhante à enzima conversora de angiotensina (ECA), que participa na regulação da pressão arterial e homeostase eletrolítica através da interação com o sistema renina - angiotensina - aldosterona.

A infecção do SARS-CoV-2 leva ao recrutamento de células do sistema imune e produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL6, TNF α) com baixos níveis de interferons, e migração de células imunes inatas como neutrófilos e macrófagos ao tecido (HUSSMAN, 2020; NOROOZNEZHAD; MANSOURI, 2021), resultando em um estado inflamatório que pode causar dano tecidual múltiplo e disfunção orgânica. Esse fenômeno de maneira descontrolada e excessiva é chamado de tempestade de citocinas, do inglês *cytokine storm* (BERANGÉRE et al., 2020). Este quadro leva à ativação e consumo de fatores de coagulação, o que favorece a formação de microtrombos no tecido pulmonar inflamado e contribui para

o aumento no risco aumentado de mortalidade (TANG et al., 2020; TACHIL et al., 2020; WIERSINGA et al., 2020).

2.2.2 – EPIDEMIOLOGIA

O primeiro surto de COVID-19 identificado foi na cidade de Wuhan na China em dezembro de 2019 em pacientes internados com quadro de pneumonia no hospital municipal da cidade (ZHOU et al., 2020). O vírus se espalhou rapidamente em todo o mundo (**Figura 6**), causando o colapso de alguns serviços de saúde (CARDA et al., 2020; SILVA; PENA, 2021) e posteriormente evoluindo para algumas variantes de preocupação que causaram novos surtos (LI et al., 2021).

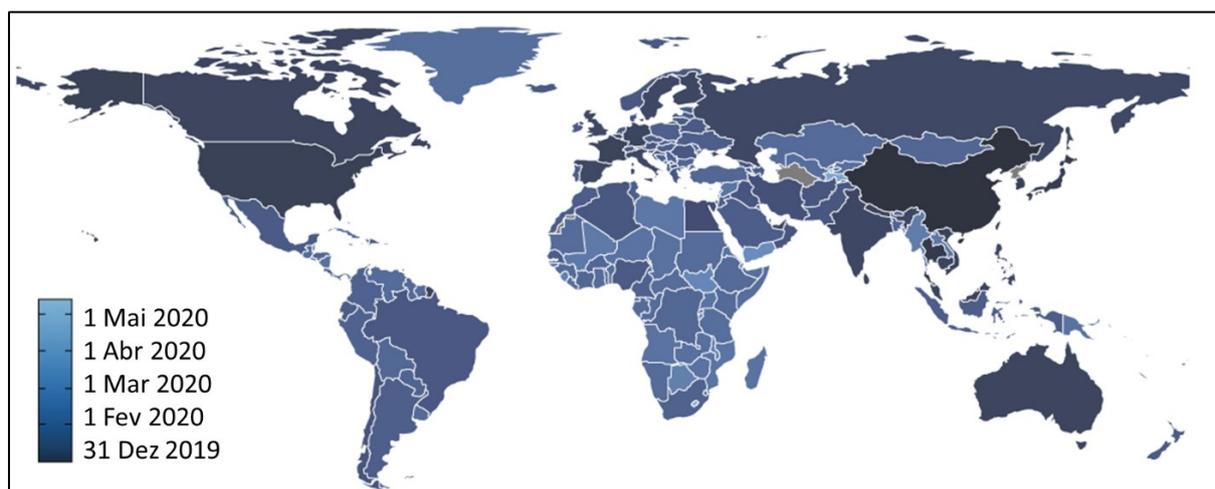


Figura 6 - Data do primeiro caso relatado de COVID-19 em cada país.

O primeiro relato da COVID-19 ocorreu na China em 31 dezembro de 2019 e rapidamente, até 1 maio de 2020, maior parte dos países de todo mundo já haviam reportado casos da doença (Adaptada de LI et al., 2021).

Após a declaração do estado de pandemia pela OMS, medidas não farmacológicas, como restrições de viagens internacionais, isolamento de casos confirmados e suspeitos, distanciamento social, uso de máscaras faciais, higiene das mãos e até fechamento de empresas e escolas, foram adotadas globalmente visando frear a disseminação do vírus (BRAUNER et al., 2021). Porém, após o relaxamento de algumas dessas medidas no fim de 2020 e o surgimento das variantes Alpha e Beta, uma nova onda de casos surgiu em vários países (FERNANDES et al., 2022; HAN et

al., 2020), sendo este o período com maior número de mortes causadas pelo SARS-CoV-2 (**Figura 7**).

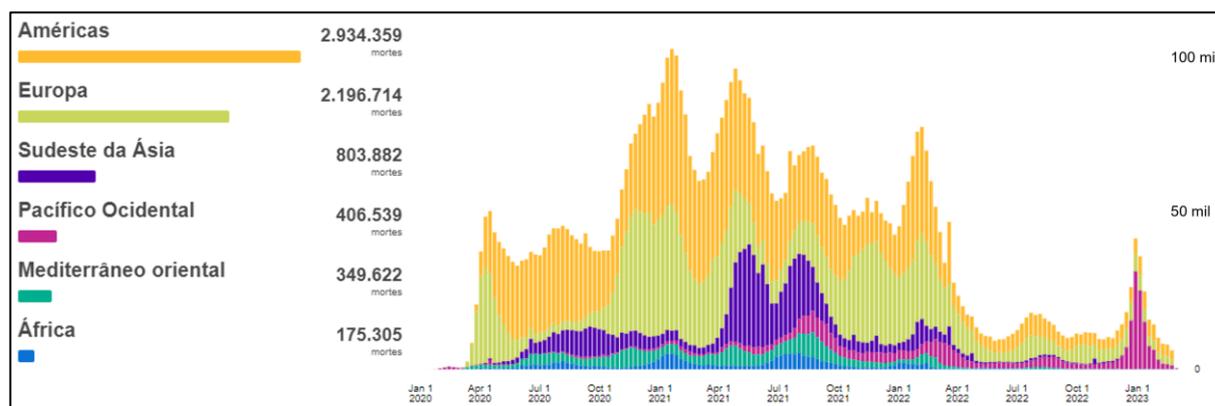


Figura 7 - Número semanal de mortes pela COVID-19 reportado por região global.

O número semanal de mortes por COVID-19 apresentou variação de acordo com os surtos de transmissão do SARS-CoV-2, com maior número de mortes nas Américas e Europa. Devido a vacinação, houve considerável diminuição no número de mortes em todas as regiões a partir de fevereiro de 2022, com exceção da região do pacífico ocidental em que houve o maior surto no início de 2023 (Adaptada de OMS, 2022b).

Até o fim do mês de fevereiro 2023, os países com maior número de casos são os Estados Unidos, China e Índia (OMS, 2022b). Os maiores picos aconteceram no início de 2022, quando a variante ômicron se tornou dominante em todo mundo com altos índices de transmissibilidade e maior índice de reinfecção (FERNANDES et al., 2022), e em janeiro de 2023, quando a China extinguiu a política de COVID-19 zero e o número de casos no país aumentou grandiosamente (LANCET REGIONAL HEALTH – WESTERN PACIFIC, 2023) (**Figura 8**). Felizmente, nesse período os níveis de vacinação contra o SARS-CoV-2 já estavam avançados, o que fez com que o número de mortes não aumentasse proporcionalmente.

As variantes virais surgem naturalmente por meio de alterações genéticas no processo de replicação (LAURING; HODCROFT, 2021). Variações que conferem vantagem com relação à replicação viral, transmissão e evasão imune são mais frequentes quanto maior a circulação do viral, levando em consideração o processo de seleção natural (KARLSSON; KWIATKOWSKI; SABETI, 2014).

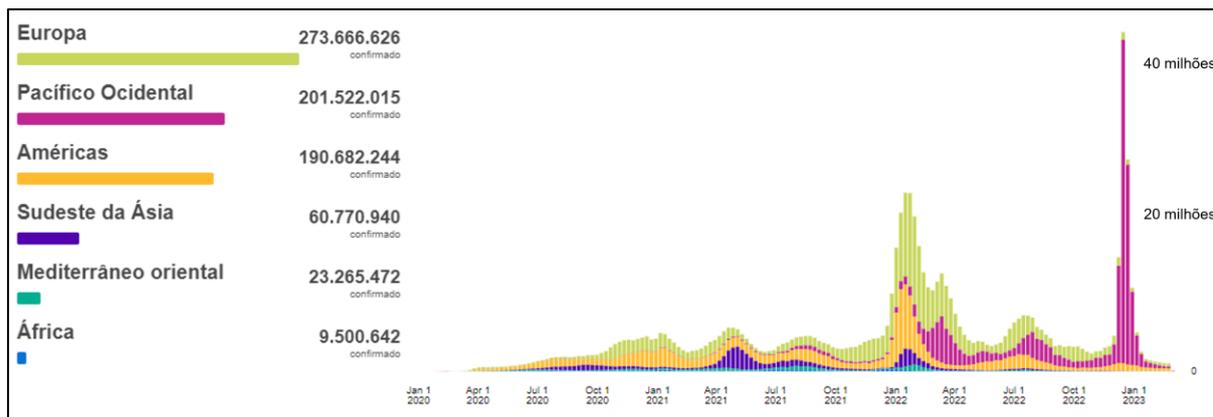


Figura 8 - Número semanal de casos de COVID-19 confirmados por região global.

O número semanal de casos de COVID-19 apresentou variação de acordo as medidas de contenção da circulação do SARS-CoV-2 e da variante predominante, com maior número de casos na Europa e pacífico ocidental (Adaptada de OMS, 2022b).

Cerca de 25 mil dos 29,8 mil nucleotídeos do SARS-CoV-2 já apresentaram variações genéticas (LI et al., 2021), e algumas dessas variações culminaram em variantes de preocupação (VOC, do inglês *variants of concern*), capaz de evadir o sistema imune mesmo de pacientes já infectados ou vacinados e com maior transmissibilidade (MARTIN et al., 2021). Desde o fim de 2020 e ao longo do ano de 2021, pelo menos cinco VOCs surgiram em diferentes partes do planeta, muitas delas evoluindo de maneira convergente (FERNANDES et al., 2022).

2.2.3 – TRANSMISSÃO

A transmissão do SARS-CoV-2 depende de fatores ambientais como ventilação e distanciamento social, fatores imunológicos, como taxa de vacinação da população, e de fatores de virulência das variantes em circulação, através do contato direto de pessoa a pessoa ou de fômites contaminados (SHRESTHA et al., 2022; HARRISON; LIN; WANG, 2020). Enquanto pacientes assintomáticos podem transmitir o SARS-CoV-2, a maioria dos casos ocorre por meio do contato próximo a pacientes sintomáticos ou pré-sintomáticos (UKHSA, 2022). Aerossóis, liberados através da tosse, espirro e fala, que permanecem suspensos no ar e podem atingir longas

distâncias, são outras fontes importantes de contaminação (UMAKANTHAN et al., 2020; WIERSINGA et al., 2020).

2.2.4 – TRATAMENTO

A COVID-19 é uma doença que possui tratamento, porém o manejo depende da gravidade da doença. Segundo o protocolo da OMS, é recomendado para pacientes com COVID-19 grave ou crítica o uso de corticosteroides sistêmicos em combinação ou não de bloqueadores dos receptores da interleucina-6 (IL-6) (tocilizumabe ou sarilumabe), ou o uso de baricitinibe como alternativa aos bloqueadores dos receptores de IL-6, em combinação com corticosteroides. O uso de plasma convalescente deve ser considerado somente no contexto de ensaios clínicos (ANVISA, 2021a; LAMONTAGNE et al., 2023).

Por outro lado, em casos de pacientes com COVID-19 não grave, o uso de plasma convalescente e colchicina não são recomendados, enquanto para aqueles com maior risco de admissão hospitalar (pacientes com idade avançada, imunodeficientes e ou portadores de doenças crônicas, caso não vacinados, devem ser considerados como fator de risco adicional), o uso de nirmatrelvir e ritonavir (paxlovid) é recomendado. O remdesivir e molnupiravir são medicamentos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que demonstraram evidências de impedir a replicação viral do SARS-CoV-2 e podem ser utilizados de acordo com condições e contexto do paciente e ambiente em que ele se encontra. O paxlovid e molnupiravir devem ser administrados por via oral dentro de cinco dias desde o início dos sintomas, enquanto o remdesivir é recomendado para adultos e adolescentes (com idade igual ou superior a 12 anos e com peso corporal de, pelo menos, 40 kg) de forma intravenosa após o diagnóstico de COVID-19 e dentro de sete dias depois do aparecimento dos sintomas (ANVISA, 2022a; ANVISA, 2022b; ANVISA, 2022c; YOUNIS et al., 2021). Independentemente da gravidade da doença, não é recomendado o uso de hidroxiquina e lopinavir/ritonavir; e ivermectina, exceto no contexto de um ensaio clínico (LAMONTAGNE et al., 2023) (**Figura 9**).

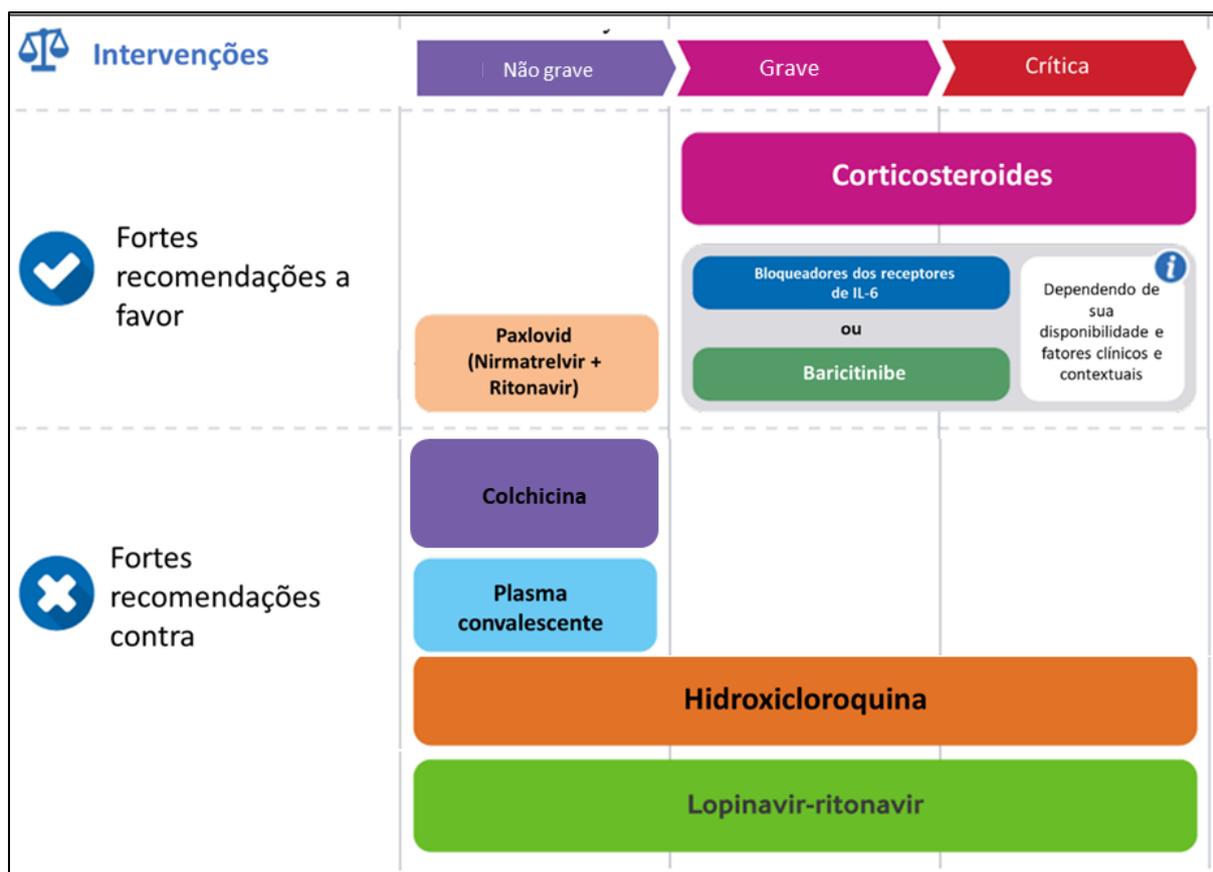


Figura 9 - Recomendações de intervenções farmacêuticas para COVID-19 de acordo com sua gravidade.

Segundo a OMS, o Paxlovid é recomendado para tratamento de casos não graves da COVID-19. Para os casos graves e críticos, o uso de corticosteroides, bloqueadores de receptores de IL-6 e Baricitinibe podem ser utilizados isolados ou em combinação. Não é recomendado o uso de colchicina e plasma convalescente para paciente não graves, e hidroxicloroquina e polinavir-ritonavir para pacientes com COVID-19, independentemente de sua gravidade (Adaptado de LAMONTAGNE et al., 2023).

2.2.5 – VACINAS

Várias vacinas foram desenvolvidas contra o SARS-CoV-2 (FIOLET et al., 2022). No Brasil, a vacinação contra o SARS-CoV-2 começou em janeiro de 2021 após a aprovação pela ANVISA da vacina CoronaVac da Sinovac Biotech®, vacina do tipo vírus inativado (ANVISA, 2022d). Posteriormente, ainda em 2021, outras 3 vacinas foram aprovadas nacionalmente, a BNT16b2 da Pfizer/BioNtech® do tipo baseada

em RNA, a AZD1222 ChAdOx1 nCov-19 da AstraZeneca®/Universidade de Oxford e Ad26.COV2.S Janssen®, essas últimas do tipo vetor viral não replicante. A vacina de Pfizer/BioNtech® e a CoronaVac são as únicas com autorização de aplicação para crianças a partir dos 6 anos de idade, enquanto a aplicação da vacina de AstraZeneca® foi suspensa em gestantes, devido a insuficiência de dados relacionados à sua segurança após suspeita de uma rara reação adversa de trombose com plaquetopenia (ANVISA, 2021b).

No Brasil, 175,83 milhões de pessoas (81,6% da população) já tomaram o esquema inicial completo da vacinação contra a COVID-19, sendo o quarto país com maior número de pessoas nessa contagem. Globalmente, 13,31 bilhões de doses de vacinas contra a COVID-19 já foram administradas, porém apenas 64,0% da população mundial e 23,3% das pessoas em países de baixa renda possuem o esquema inicial completo (RITCHIE, *et al.*, 2023).

As vacinas aprovadas pela ANVISA demonstram ser seguras e ferramentas eficazes na prevenção da COVID-19 grave, e consequente, hospitalização e morte contra todas as variantes até o momento (FIOLET *et al.*, 2022b). Além disso, as vacinas também possuem papel importante na diminuição do risco do desenvolvimento de sintomas da COVID-19 longa (AL-ALY; BOWE; XIE, 2022). Por outro lado, já foi observada uma queda na proteção contra a infecção após 6 meses da administração do esquema de vacinação completa e proteção diminuída contra as novas variantes de preocupação, como a ômicron (CHALKIAS *et al.*, 2022). Dessa forma, pelo menos uma dose de reforço é recomendada, preferencialmente com vacina diferente das aplicadas anteriormente (PEGU *et al.*, 2021). Além disso, no segundo semestre de 2022, Pfizer® e Moderna® lançaram vacinas bivalentes como dose de reforço contra a COVID-19. As vacinas bivalentes são vacinas de RNA mensageiro que codificam proteínas da primeira estripe identificada do SARS-CoV-2 e da variante e subvariantes ômicron (CHALKIAS *et al.*, 2022). A vacina bivalente da Pfizer® foi aprovada pela ANVISA em novembro de 2022 para aplicação em maiores de 12 anos de idade e começou a ser aplicada nos grupos prioritários em 27 de fevereiro de 2023, para aqueles que já possuem pelo menos duas doses de vacina,

qualquer que seja a tecnologia da vacina posteriormente aplicada, com intervalo de pelo menos 3 meses da última aplicação (ANIVSA, 2022e).

2.3– DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS

Tradicionalmente, o diagnóstico das IRAs é realizado com base nas manifestações clínicas e informações epidemiológicas, o que impossibilita a identificação do agente causador, devido ao amplo espectro e baixa especificidade dos sintomas. O diagnóstico laboratorial é peça importante na identificação molecular dos vírus, podendo contribuir no tratamento e no melhor entendimento da dinâmica de transmissão e controle efetivo dos surtos epidêmicos.

Atualmente, diversos métodos permitem o diagnóstico das infecções virais decorrentes do vírus Influenza e SARS-CoV-2, entre eles, isolamento viral, ensaios de imunofluorescência, testes moleculares e testes laboratoriais remotos, também conhecidos como testes rápidos ou imunocromatográficos. Dentre as técnicas tradicionais e padrão ouro para o diagnóstico laboratorial das IRAs, destaca-se a PCR e o cultivo viral. Tradicionalmente, as amostras utilizadas nos testes moleculares são *swab* de nasofaringe e/ou orofaringe, aspirado ou lavado nasal, já que a maior sensibilidade se correlaciona com a maior carga viral nessas amostras obtidas (KRAMMER et al., 2018).

O cultivo viral, desenvolvido em 1940, é um dos métodos mais tradicionais para o diagnóstico da influenza e atualmente utilizado principalmente em laboratórios de pesquisa científica. Nessa técnica ocorre a recuperação do vírus Influenza em amostras clínicas por replicação em células mamíferas ou ovos embrionários. Após 7–10 dias de cultivo, a confirmação do diagnóstico ocorre através do desenvolvimento de células citopáticas e coloração com anticorpos específicos, hemoadsorção com eritrócitos (hemaglutinação) ou microscopia imunofluorescente. Como desvantagem, destaca-se o maior tempo para o diagnóstico e a necessidade de altos níveis de biossegurança laboratorial.

Os testes moleculares possuem alta especificidade e sensibilidade para detecção dos vírus respiratórios e permitem sua identificação nos estágios iniciais da infecção. Os testes podem ser de amplificação, como PCR, LAMP ou amplificação baseada em sequenciamento de ácido nucleico, do inglês *Nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA); testes baseados em sequenciamento, como o pirosequenciamento, sequenciamento de última geração, do inglês *new generation sequencing* (NGS); e testes baseados em microarranjos de DNA (ácido desoxirribonucleico). No entanto, eles exigem estrutura laboratorial e mão de obra mais qualificada, o que pode ser uma limitação em regiões com recursos limitados.

O ensaio da PCR é capaz de identificar uma sequência específica de material genético por meio da utilização de um par de iniciadores, que se ligam a essa sequência em uma temperatura específica, e são amplificados com o auxílio da *Taq* DNA polimerase, dos dinucleotídeos (dNTPs) e cofatores que produzem várias cópias do alvo genético através de ciclos que se repetem. O ensaio ocorre basicamente em três etapas: extração do material genético, amplificação do alvo molecular e detecção dos produtos de PCR. Dessa maneira, as reações de PCR são capazes de amplificar pequenas quantidades de material genético e identificar um alvo específico. A velocidade de amplificação da PCR é exponencial, já que cada fita molde gera o dobro de fitas-filhas, tendo a reação tempo total cerca de 3 horas. Um avanço importante para a técnica de PCR foi a detecção da amplificação em tempo real através de sondas fluorescentes, como o SYBER GREEN ou Taqman®. Esse avanço permite também a identificação de vários alvos simultâneos, chamado de ensaios multiplex. A identificação de alvos RNA através da PCR acontece com a conversão do RNA em DNA através da reação de transcrição reversa (RT-PCR), do inglês *reverse transcription*. Os testes da PCR e cultura viral são ensaios que permitem o diagnóstico laboratorial com alta sensibilidade e especificidade, porém são exames que exigem alto investimento financeiro para sua implantação e estrutura tecnológica avançada dos laboratórios e hospitais.

Em 2000, NOTOMI et al., desenvolveram a técnica de LAMP, patenteada por *Eiken Chemical Company* (número: JP2000283862, WO2002024902A1), caracterizada

pelo uso da polimerase *Bst* que possui atividade de deslocamento da fita dupla de DNA e temperatura de atividade entre 60 e 65 °C, o que permite que a reação ocorra em temperatura constante (PARIDA et al., 2008). A amplificação dura entre 15 a 60 minutos e a detecção dos alvos podem ser realizadas em um único passo através de detecção qualitativa visual colorimétrica ou por precipitação, decorrente de produtos da amplificação de DNA, ou até quantitativa por fotometria, turbidimetria ou fluorimetria (LI, Y. et al., 2017; SHIRATO, 2019). Ensaio de LAMP já foram desenvolvidos para a detecção de vários alvos, como bactérias, parasitas, protozoários e vírus, incluindo vírus RNA como *Influenza*, SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, em ensaios que dispensam a necessidade de extração do material genético (YOO et al., 2020; KASHIR; YAQINUDDIN, 2020; SHIRATO, 2019).

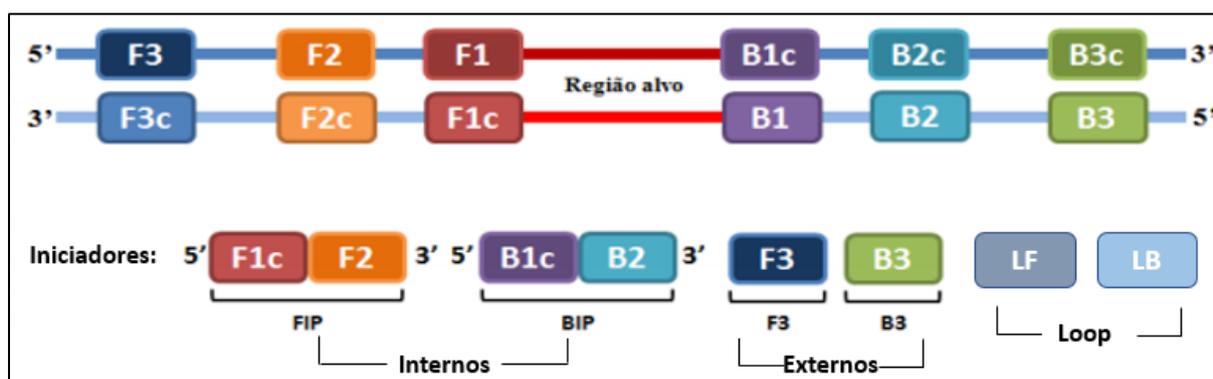


Figura 10 - Esquema da relação de alvos e iniciadores para a técnica de LAMP.

O alvo dos iniciadores da reação de LAMP pode ser dividido em 12 regiões (F1, F2, F3, B1, B2, B3 e suas partes complementares). Os iniciadores são tradicionalmente divididos em 3 pares, F3/B3 (par externo), que flanqueia a região alvo complementar, FIP/BIP (par interno), caracterizado por duas regiões em sua composição, para o FIP as regiões F1c e F2, e para BIP regiões B1c e B2, e LF/LB (par loop), que são complementares a região entre F3 e F2 para o LF e B3 e B2 para LB e se ligam quando a estrutura de loop está formada (Adaptada de: SANTOS, 2011).

A reação é constituída de 4 a 6 iniciadores, que reconhecem de 6 a 8 regiões do alvo, o que torna a amplificação bem específica (**Figura 10**). O desenho dos iniciadores é crucial para o bom funcionamento da técnica e deve obedecer a alguns parâmetros já definidos, como a distância entre os locais de hibridação, proporção guanina-citosina e temperatura de desnaturação. Alguns programas *online*, como o *Primer explorer V4/V5* (<https://primerexplorer.jp/index.html>) e *NEB LAMP Primer*

Design Tool (<https://lamp.neb.com/#/>) são comumente utilizados para o desenho desses iniciadores.

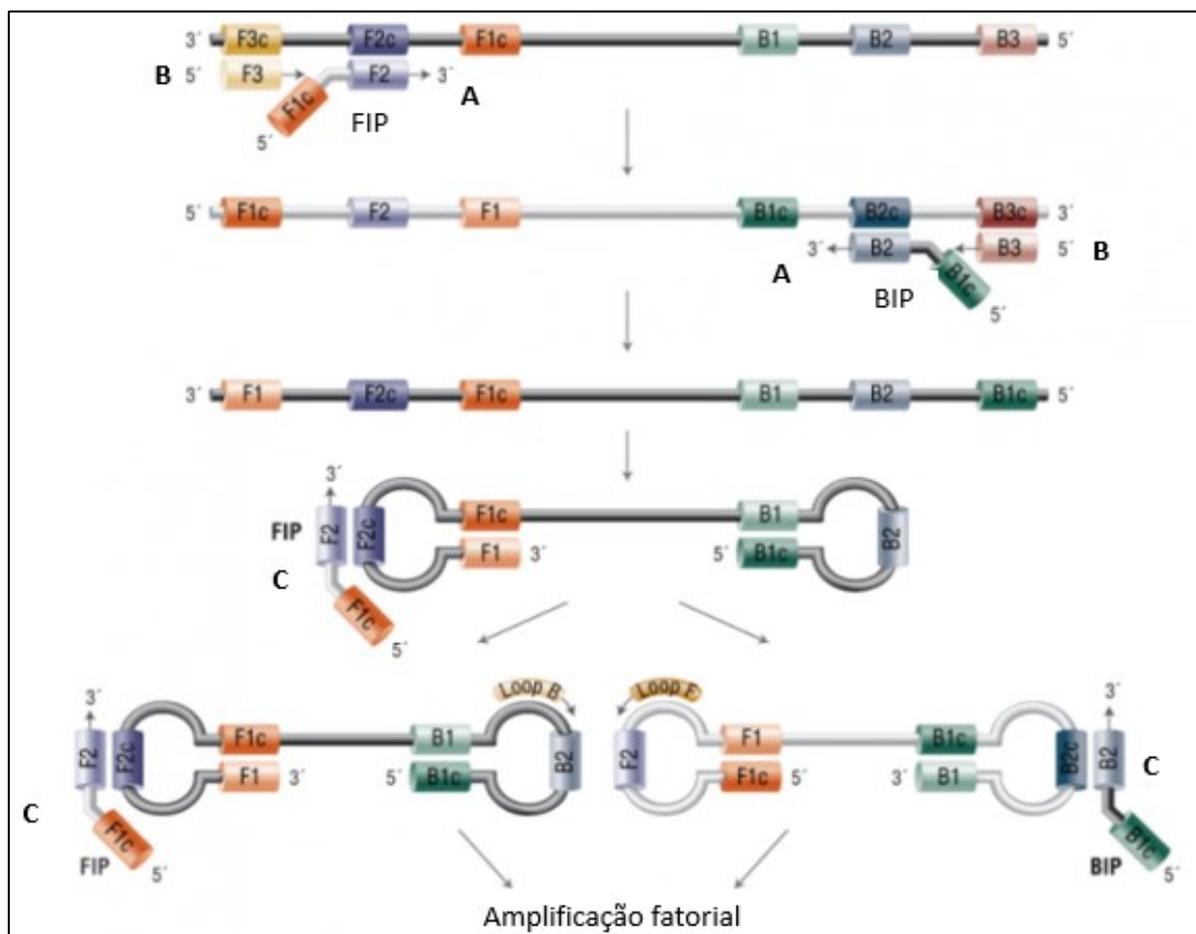


Figura 11 - Formação de loop e amplificação na reação de LAMP.

(A) A parte F2 ou B2 dos pares de iniciadores internos (FIP e BIP, respectivamente) se liga a sua região complementar alvo e a duplicação da fita alvo ocorre através da polimerase Bst. (B) As extremidades da fita alvo ficam sem parte complementar, onde os pares de iniciadores externos (F3/B3) flanqueiam e duplicam a fita alvo, fazendo com que a fita complementar amplificada pelos iniciadores internos se desnature e forme a estrutura de loop (pareamento das regiões externas com a parte mais interna da própria fita, exemplo: na extremidade 3' a região F1 se liga a região F1c). (C) Formado a estrutura de loop, os três pares de iniciadores, incluindo o par LF/LB, se ligam a sua região complementar, aumentando assim a velocidade da reação e fazendo com que a amplificação ocorra de maneira fatorial (Adaptada de: Página da New England Biolabs¹).

¹ Disponível em: <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp> Acesso em: 18 jul. 2022

Os iniciadores da reação podem ser explicados em pares, sendo um externo (F3 e B3), um interno (FIP e BIP), e um que irá se ligar na estrutura de *loop* que será formada na reação (LF e LB). O par F3 e B3 é complementar à parte mais externa da região alvo (**Figura 11; B**), assim como aqueles usados em uma PCR convencional. O par FIP e BIP é caracterizado por duas regiões em sua composição - para o FIP as regiões F1c e F2, e para BIP regiões B1c e B2. A parte F2 e B2 desse par se liga às regiões internas à região flanqueada pelo par externo (F3/B3) e as partes F1c e B1c ficam livres para posteriormente se ligarem em suas regiões complementares (**Figura 11; A**). O par externo (F3/B3) após anelamento e amplificação da fita molde, desnatura a dupla fita formada pelos iniciadores FIP e BIP, fazendo com que suas extremidades (F1c ou B1c) formem a estrutura de *loop* com a própria fita. A formação dessa estrutura é crucial para a eficácia da técnica já que ela fornece alvos para a ligação dos iniciadores e permite que a amplificação ocorra de maneira fatorial. Os iniciadores LF e LB têm como objetivo aumentar a velocidade e sensibilidade da reação, já que possuem sequências complementares à região de *loop* (**Figura 11; C**), criando assim um maior número de ligações para a síntese de DNA (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002).

Destaca-se a alta especificidade da técnica, já que a amplificação ocorre somente se os todos os alvos dos iniciadores estiverem disponíveis, e alta sensibilidade, já que a LAMP é capaz de detectar concentrações alvo de até 0,01–10 pfu (unidades formadoras de placas). Na técnica de LAMP, o número de *amplicons* pode chegar a $10^9 - 10^{10}$, já que a amplificação ocorre de maneira fatorial.

A enzima *Bst* polimerase, que possui característica desnaturante e permite que a reação de amplificação ocorra em temperatura constante (isotérmica), junto ao número de iniciadores (4 a 6) utilizados na LAMP, que amplificam o alvo genômico de maneira fatorial, diminuem o tempo de reação para 15-60 minutos, comparado com o tempo necessário da PCR, que é de 2 a 3 horas. Por outro lado, a detecção de alvos multiplex, é um desafio na LAMP e mais complexa do que na PCR, devido ao maior número de iniciadores necessários. Além disso, o fato da reação de LAMP ocorrer em temperatura constante permite que o ensaio seja realizado em

equipamentos, como termobloco ou até banho-maria que possuem custo mais acessível do que o termociclador utilizado na PCR. A dispensa de equipamentos complexos de alto custo e o fato da LAMP permitir a detecção e interpretação do teste por olho nu, tornam esse ensaio mais rápido e passível de ser utilizado como teste laboratorial remoto (LI, Y. et al., 2017; NZELU et al., 2016) (**Quadro 2**).

Tais características fazem com que a reação de LAMP possua menor custo se comparado com a PCR. Em um estudo comparando o custo da reação de LAMP e PCR para o SARS-CoV-2, o custo estimado para a detecção do vírus através da RT-qPCR foi de 14 dólares americanos (US\$) enquanto no LAMP foi de 3,12 US\$ (HU et al., 2020). Em estudo realizado pela OMS visando o diagnóstico molecular rápido para tuberculose em áreas remotas, foram comparados um ensaio comercial de LAMP, desenvolvido pela *Eiken Chemical Company*, com um de PCR, Xpert MTB/RIF (GeneXpert; Cepheid). O custo para implementação do ensaio de LAMP foi de US\$ 26.917 e US\$ 43.325 para o Xpert MTB/RIF (OMS, 2016).

QUADRO 2: Comparação entre os métodos PCR e LAMP

Critério	PCR	LAMP
Temperatura	Diferentes ciclos	Constante (60–65 °C)
Número de iniciadores	2	4 a 6
Enzima Polimerase	<i>Taq</i>	<i>Bst</i>
Tempo de reação	2-3 h	15-60 min
Capacidade multiplex	Sim	Não
Amplificação	Exponencial	Fatorial
Detecção visual	Não	Sim
Economia e facilidade de uso	Requer equipamentos caros e pessoal treinado	Econômico e protocolo simples

3. OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Padronizar a técnica de LAMP para identificação de vírus relacionados às infecções respiratórias agudas, aplicando-a em uma investigação epidemiológica na comunidade do *campus* Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e validar o diagnóstico molecular por técnica de LAMP de vírus RNA relacionados a infecções respiratórias agudas (Influenza A, Influenza B, SARS-CoV-2).
- Analisar amostras de secreção nasofaríngea de pacientes com suspeita clínica de infecção respiratória aguda atendidos pelo programa MONITORACOVID UFMG processadas no Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (LINBIO) pelo ensaio de LAMP validado.
- Realizar levantamento epidemiológico dos principais vírus relacionados a infecções respiratórias agudas nesta comunidade coletados no ano de 2022.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), sob número 4.963.694 (**Anexo 1**).

4.1 – SELEÇÃO DOS INICIADORES DE LAMP

Por meio de buscas na base PUBMED/MEDLINE, foram selecionados estudos que descreveram sequências de iniciadores para identificação do SARS-CoV-2, vírus Influenza A e Influenza B e de um controle endógeno humano por meio da reação de LAMP (**Quadro 3**).

Para o conjunto de iniciadores do alvo Gene E (SARS-CoV-2), Gene NS (Influenza B) e Gene ACTB (beta-actina) - controle endógeno humano, foram utilizados 6 pares de iniciadores, sendo um par de iniciadores externo (F3 e B3), um par de iniciadores interno (FIP e BIP), e um par de iniciadores que se liga na estrutura de loop que será formada na reação (LF e LB). Para o conjunto de iniciadores com alvo o gene da matriz (Influenza A) foram utilizados 8 pares de iniciadores, sendo dois pares F3/B3 (F3-1/B3-1; F3-2/B3-2), devido à alta variabilidade do vírus Influenza A, garantindo a detecção de várias estirpes.

QUADRO 3 – Sequências de iniciadores utilizados para identificação do SARS-CoV-2, vírus Influenza A, Influenza B e controle endógeno por meio da técnica de LAMP (TAKAYAMA et al., 2019; ZHANG et al., 2020).

SARS-CoV-2 (Gene E) (ZHANG et al., 2020)	
E-F3	TGAGTACGAACTTATGTAATCAT
E-B3	TTCAGATTTTTAACACGAGAGT
E-FIP	ACCACGAAAGCAAGAAAAAGAAGTTCGTTTCGGAAGAGACAG
E-BIP	TTGCTAGTTACACTAGCCATCCTTAGGTTTTACAAGACTCACGT
E-LF	CGCTATTAAGTATTAACG
E-LB	GCGCTTCGATTGTGTGCGT

Influenza A (Gene da matriz) (TAKAYAMA <i>et al.</i>, 2019)	
IAV-F3-1	GACTTGAAGATGTCTTTGC
IAV-F3-2	GACTGGAAAGTGTCTTTGC
IAV-B3-1	TRTTATTTGGGTCTCCATT
IAV-B3-2	TRTTGTTTGGGTCCCCATT
IAV-FIP	TTAGTCAGAGGTGACARRATTGCAGATCTTGAGGCTCTC
IAV-BIP	TTGKTTTACGCTCACCGTGTTTGGACAAAGCGTCTACG
IAV-LF	GTCTTGTCTTTAGCCA
IAV-LB	CMAGTGAGCGAGGACTG

Influenza B (Gene NS) (TAKAYAMA <i>et al.</i>, 2019)	
IBV-F3	GCAACCAATGCCACCATA
IBV-B3	TTCTCTCTTCAAGRGACATC
IBV-FIP	TAGTCAAGGGCYCTTTGCCACTTTGAAGCAGGAATTCTGGA
IBV-BIP	CAAGACCGCCTAACAGACTAACTTTTACTTTCAGGCTCACTT
IBV-LF	TGAAAGYCTTTCATAGCAC
IBV-LB	CAAGAATAAAGACTCACAAC

Controle endógeno (Gene ACTB Humano) (ZHANG <i>et al.</i>, 2020)	
IBV-F3	AGTACCCCATCGAGCACG
IBV-B3	AGCCTGGATAGCAACGTACA
IBV-FIP	GAGCCACACGCAGCTCATTGTATCACCAACTGGGACGACA
IBV-BIP	CTGAACCCCAAGGCCAACCGGCTGGGGTGTGAAAGGTC
IBV-LF	TGTGGTGCCAGATTTTCTCCA
IBV-LB	CGAGAAGATGACCCAGATCATGT

Para o SARS-CoV-2, foi selecionado conjuntos de iniciadores descritos em (ZHANG *et al.*, 2020), desenvolvido para a estirpe identificada originalmente em Wuhan. As sequências de iniciadores para o Influenza foram selecionadas no estudo (TAKAYAMA *et al.* 2019), testadas para a identificação das estirpes descritas no Quadro 4 para Influenza A e B/Massachusetts/2/2012 para Influenza B. Após seleção dos iniciadores, foi realizada conferência do alinhamento de suas sequências com o genoma viral de referência e estirpes circulantes, utilizando-se a ferramenta online BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O controle endógeno foi utilizado para garantir a presença do material genético humano, indicando conformidade no processo de coleta do material e de análise da extração do material genético.

QUADRO 4: Estirpes testadas para o conjunto de iniciadores selecionado para a identificação do Influenza A (TAKAYAMA et al., 2019)

Subtipo	Estirpe	Subtipo	Estirpe
H1N1	A/duck/Hokkaido/55/96	H5N1	A/blow fly/Kyoto/93/2004
H1N1	A/Moscow/13/1998	H5N1	A/whooper swan/Hokkaido/4/2011
H1N1	A/New Caledonia/20/1999	H5N2	A/chicken/Ibaraki/1/2005
H1N1	A/Brisbane/59/2007	H6N1	A/duck/Hong Kong/716/79
H1N1	A/duck/Alberta/35/76	H6N2	A/turkey/Massachusetts/3740/65
H1N1pdm09	A/Narita/1/2009	H7N1	A/duck/Hong Kong/301/1978
H2N3	A/duck/Germany/1215/73	H7N2	A/duck/Hong Kong/293/78
H2N9	A/duck/Hong Kong/278/78	H7N7	A/Netherlands/219/2003
H3N2	A/New York/55/2004	H7N7	A/Netherlands/33/2003
H3N2	A/Panama/2007/1999	H7N9	A/Anhui/1/2013
H3N2	A/Sydney/05/1997	H8N4	A/duck/Shizuoka/45/2011
H3N2	A/Wyoming/03/2003	H8N4	A/turkey/Ontario/6118/68
H3N2	A/Uruguay/716/2007	H9N2	A/turkey/Wisconsin/1/66
H3N8	A/duck/Ukraine/1/63	H9N5	A/duck/Hong Kong/702/79
H4N6	A/duck/Hong Kong/365/78	H10N7	A/chicken/Germany/N/49
H4N6	A/duck/Czechoslovakia/56	H10N8	A/duck/Hong Kong/560/79
H4N6	A/duck/Hyogo/1/2010	H11N6	A/duck/England/56
H5N1	A/chicken/Yamaguchi/7/04	H12N5	A/duck/Alberta/60/76
H5N1	A/Hong Kong/156/1997	H12N6	A/duck/Alberta/60/76
H5N1	A/Hong Kong/213/2003	H13N6	A/gull/Maryland/704/77
H5N1	A/Vietnam/HN30259/2004	H14N5	A/mallard/Gurjev/263/82
H5N1	A/Vietnam/HN30262/2004	H15N8	A/duck/Australia/341/83

4.2– PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE LAMP

Para a reação de LAMP, foram utilizados iniciadores dessalinizados produzidos pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT®), com rendimento mínimo de 35 nmolL, e *mastexmix WarmStart Colorimetric LAMP 2X* da New England Biolabs®. As condições das reações de LAMP, reportadas na literatura científica, foram verificadas, otimizadas e padronizadas para a identificação dos vírus SARS-CoV-2, Influenza A e B e controle endógeno humano, conforme indicado no **Quadro 5**. As reações ocorreram em um termociclador Veriti (Thermo®) em temperatura constante de 65°C com tampa a 105°C.

**QUADRO 5 – Protocolo de reação: SARS-CoV-2, controle endógeno (ACTB)
Influenza B e Influenza A, por meio da técnica de LAMP**

SARS-CoV-2 (Gene E)

Reagente	Concentração (uM)		Volume (uL)
	Inicial	Final	Reação
<i>WarmStart Color MasterMix 2x</i>	2x	1x	7,50
F3 (µM)	10	0,2	0,30
B3 (µM)	10	0,2	0,30
FIP (µM)	100	1,6	0,24
BIP (µM)	100	1,6	0,24
LF (µM)	100	0,8	0,12
LB (U/µL)	100	0,8	0,12
H2O (µL)			4,68
Amostra			1,50
Volume Final (µL)			15,00

Controle endógeno (Gene ACTB Humano)

Reagente	Concentração (uM)		Volume (uL)
	Inicial	Final	Reação
<i>WarmStart Color MasterMix 2x</i>	2x	1x	7,50
F3 (µM)	10	0,2	0,30
B3 (µM)	10	0,2	0,30
FIP (µM)	100	1,6	0,24
BIP (µM)	100	1,6	0,24
LF (µM)	100	0,8	0,12
LB (U/µL)	100	0,8	0,12
H2O (µL)			4,68
Amostra			1,50
Volume Final (µL)			15,00

Influenza B (Gene NS)

Reagente	Concentração (uM)		Volume (uL)
	Inicial	Final	Reação
<i>WarmStart Color MasterMix 2x</i>	2x	1x	7,50
F3 (µM)	10	0,2	0,30
B3 (µM)	10	0,2	0,30
FIP (µM)	100	1,6	0,24
BIP (µM)	100	1,6	0,24
LF (µM)	100	0,8	0,12
LB (U/µL)	100	0,8	0,12
H2O (µL)			3,18
Amostra			3,00
Volume Final (µL)			15,00

Influenza A (Gene da matriz)			
Reagente	Concentração (uM)		Volume (uL)
	Inicial	Final	Reação
<i>WarmStart Color MasterMix 2x</i>	2x	1x	7,50
F3-1 (µM)	10	0,1	0,15
F3-2 (µM)	10	0,1	0,15
B3-1 (µM)	10	0,1	0,15
B3-2 (µM)	10	0,1	0,15
FIP (µM)	100	1,6	0,24
BIP (µM)	100	1,6	0,24
LF (µM)	100	0,8	0,12
LB (U/µL)	100	0,8	0,12
H2O (µL)			3,18
Amostra			3,00
Volume Final (µL)			15,00

Para a padronização da reação de LAMP, foram utilizadas amostras de secreção nasofaríngea coletadas por *swab* de pacientes sintomáticos para infecção respiratória aguda, que realizaram a coleta por meio do programa MonitoraCovid UFMG, com resultado conhecido pela técnica de RT-qPCR para o vírus SARS-CoV-2. Como controle positivo para o conjunto de iniciadores dos alvos Influenza A e B, foram utilizados isolados virais desses vírus provenientes da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Os tempos das reações foi variável e os resultados foram monitorados em intervalos constantes a partir de 12 minutos de amplificação.

A detecção da reação é realizada de maneira visual, sendo amarelo a cor correspondente ao resultado reagente/detectável, rosa ao resultado não reagente/não detectável e laranja indeterminado/inconclusivo. A mudança de cor da reação ocorre por mudança de pH, que é indicado pelo reagente vermelho de fenol (C₁₉H₁₄O₅S) presente no *mastermix* WarmStart Colorimetric LAMP 2X *Master Mix* (New England Biolabs – M1800) utilizado no estudo. A amplificação de material genético produz íons H⁺, que ao se acumularem, diminuem o pH da reação fazendo com que o indicador passe da cor rosa para amarela (**Figura 12**).

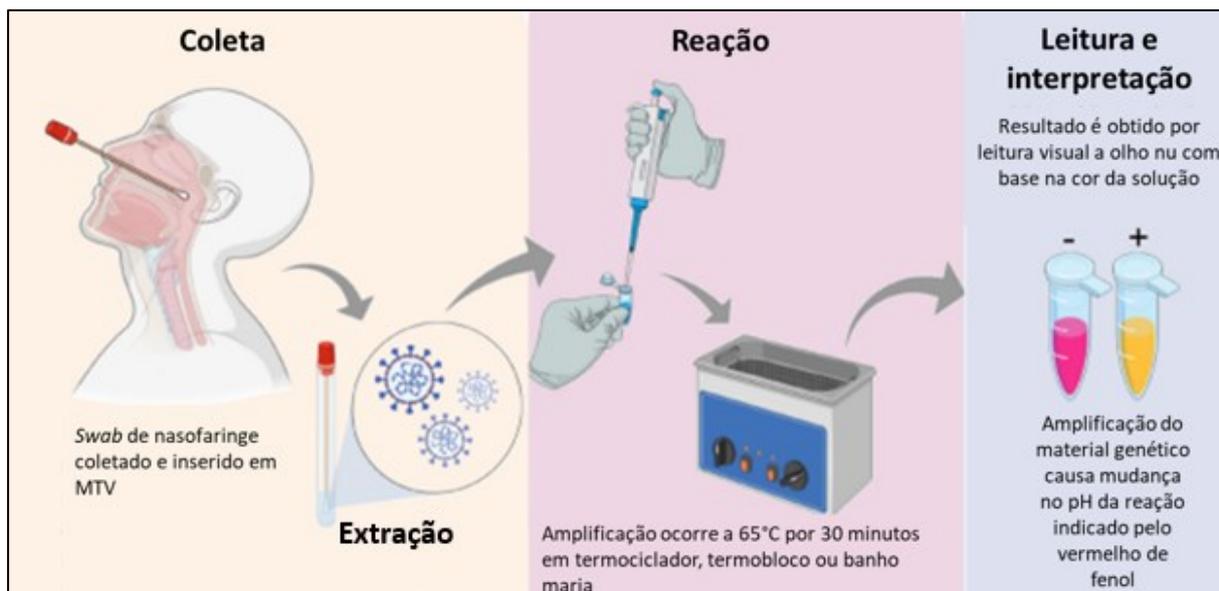


Figura 12 - Esquema do processo para testagem da reação de LAMP.

Após coleta do material de swab de nasofaringe em meio de transporte viral (MTV), o material genético do material é extraído para a realização da reação de LAMP, que ocorre a 65° C por 30 minutos. O resultado é obtido por leitura visual da cor da reação, sendo amarelo correspondente à amplificação do alvo genético (reagente) e rosa da não amplificação (não reagente) (Adaptado de ALVES et al., 2021).

4.3– PROGRAMA MONITORACOVID UFMG

O programa MonitoraCovid UFMG foi lançado em dezembro de 2020 e funcionou até março de 2023, com o intuito de acompanhar a comunidade universitária da UFMG em atividades presenciais e semipresenciais durante a pandemia do coronavírus. O objetivo do programa foi possibilitar a identificação precoce de casos suspeitos ou confirmados de COVID-19, de forma a evitar a circulação dessas pessoas nos espaços da UFMG, bem como instituir as medidas de controle de surtos da doença em toda a universidade, através do monitoramento por meio do questionário de auto verificação de sintomas, o qual era preenchido pelo paciente antes de comparecer às dependências da universidade. O sistema foi utilizado também para informar o estado vacinal, em caso de testes positivos para COVID-19, ou para acessar o Telecovid-19, caso os pacientes apresentassem sintomas compatíveis. Após avaliação remota do paciente por uma equipe formada por

médicos e enfermeiros do Telecovid19, e nos casos sugestivos, um atestado de afastamento das atividades presenciais era emitido e indicado o teste de RT-qPCR para o diagnóstico, quando aplicável. A coleta da amostra e o exame eram realizados no Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (Linbio-UFMG), localizado na Faculdade de Farmácia, no campus Pampulha. O resultado era então liberado na plataforma do MonitoraCovid e uma cópia enviada ao paciente para confirmar o diagnóstico e seu afastamento das atividades.

4.4– CÁLCULO DAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DA REAÇÃO

4.4.1 – SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICAS E ACURÁCIA

Para o cálculo das características analíticas das reações, foram utilizadas amostras de secreção nasofaríngea de pacientes sintomáticos para infecção respiratória aguda com resultados conhecidos através da técnica padrão ouro, RT-qPCR, que realizaram a coleta por meio do programa MonitoraCovid UFMG. O material genético foi extraído do *swab* utilizando-se o mini kit *QIAamp Viral RNA* (QIAGEN), conforme instruções do fabricante (**Anexo 2**).

Considerando a seguinte tabela de contingência:

		PADRÃO OURO - RT-qPCR	
		Positivo	Negativo
LAMP	Positivo	a (verdadeiro positivo)	b (Falso positivo)
	Negativo	c (falso negativo)	d (verdadeiro negativo)

Onde a, b, c e d corresponde ao número de testes positivos/negativos de acordo com a técnica (RT-qPCR ou LAMP), e $N = a+b+c+d$, serão calculados:

Sensibilidade (%): $a/(a+c) \times 100$; Especificidade (%): $d/(b+d) \times 100$

Acurácia (%): $(a+d)/N \times 100$

4.4.2 – VALOR PREDITIVO POSITIVO E NEGATIVO

$$\text{Valor Preditivo Positivo (VPP)} = \frac{P \times \text{sensibilidade}}{(P \times \text{sensibilidade}) + (1-P) \times (1 - \text{especificidade})} \times 100$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo (VPN)} = \frac{(1-P) \times \text{especificidade}}{(1-P) \times \text{especificidade} + P \times (1 - \text{sensibilidade})} \times 100$$

Em ambos os cálculos, a letra P representa a prevalência da doença na população em que o teste é aplicado.

4.4.3 – INTERVALO DE CONFIANÇA 95%

Intervalo de confiança de 95% de probabilidade para o verdadeiro valor encontrado de sensibilidade, especificidade e acurácia:

	IC (95%) para o verdadeiro valor de p
$10\% < \hat{p} < 90\%$	$\hat{p} - 2\sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}} \leq p \leq \hat{p} + 2\sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}}$
$\hat{p} \geq 90\%$	$\hat{p} - 2\sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}} \leq p \leq 1,00$

Sendo, $n=N$ ou $a+c$ ou $b+d$, respectivamente, para \hat{p} = Acurácia, ou \hat{p} = Sensibilidade, \hat{p} = Especificidade.

4.4.4 – ÍNDICE Kappa

Já o índice Kappa, que expressa a confiabilidade de um teste por meio de um indicador de concordância ajustada, será assim calculado (**Quadro 6**):

$K = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$, sendo:

- 1) P_o = Proporção de concordâncias observadas

$$Po = (a+d)/N$$

2) P_e = Proporção de concordâncias esperadas acima daquelas ocorridas pelo acaso

$$P_e = [(a + b) (a + c)] + [(c + d) (b + d)] / (N)^2$$

QUADRO 6: Interpretação da concordância através do índice Kappa (LANDIS; KOCH, 1977).

Kappa	Concordância
<0,00	Nenhuma
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1	Perfeita

4.4.5 – ERROS TIPO I e II

Erro tipo I: proporção de resultados falso positivos (pFP) = 1 - especificidade

Erro tipo II: proporção de resultados falso negativos (pFN) = 1 – sensibilidade

4.4.6 – INTERPRETAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Foram consideradas as seguintes métricas para avaliação das características analíticas dos testes padronizados, considerando que o teste deve ser reavaliado quando pelo menos um dos índices de bom teste não é cumprido:

QUADRO 7: Valores para avaliação de um bom teste de acordo com as métricas analíticas.

Métricas	Bom teste
Especificidade	> 95%
Sensibilidade	> 80%
Erro tipo I	≤ 0,05
Erro tipo II	< 0,20
Erro tipo I + II	≤ 0,25

(Adaptado de FONSECA et al, 2015).

4.4.7 – SARS-CoV-2 (GENE E)

Para o conjunto de iniciadores para o SARS-CoV-2, foram testadas amostras com resultados conhecidos por meio da técnica RT-qPCR, por meio do ensaio multiplex (Invitrogen®; Genes N e controle interno (RNase P).

Foram testadas:

- 1) 25 amostras de pacientes sintomáticos não detectáveis para SARS-CoV-2, dentre elas 4 detectáveis por RT-qPCR para o vírus Influenza A e 1 para para Influenza B;
- 2) 25 amostras de pacientes sintomáticos detectáveis para SARS-CoV-2, com o Ct (limiar do ciclo, do inglês *cycle threshold* na RT-qPCR) para os alvos N1 e N2 entre 13 e 37, sendo 2 amostras de coinfeção com o Influenza A.

4.4.8 – INFLUENZA A (GENE DA MATRIZ)

Para o conjunto de iniciadores para o Influenza A, foram testadas amostras com resultados conhecidos para Influenza A por meio da técnica RT-qPCR, através do ensaio multiplex Kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos®, alvo do IAV gene M e controle interno RNase P. Foram testadas:

- 1) 25 amostras de pacientes sintomáticos não detectáveis para Influenza A, dentre elas 8 detectáveis por RT-qPCR para o vírus SARS-CoV-2 e 1 para Influenza B;

- 2) 27 amostras de pacientes sintomáticos detectáveis para Influenza A, com o Ct para entre 13 e 33, sendo 2 amostras de coinfeção com o SARS-CoV-2.
- 3) Um isolado viral de Influenza A foi testado como controle positivo da reação.

4.4.9 – INFLUENZA B (GENE NS)

Para o conjunto de iniciadores para o Influenza B, foram testadas amostras com resultados conhecidos para Influenza B por meio da técnica RT-qPCR, através do ensaio multiplex Kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos®, alvo do IBV gene NS1 e controle interno RNase P. Foram testadas:

- 1) 25 amostras de pacientes sintomáticos não detectáveis para Influenza B, dentre elas 2 amostras de coinfeção de SARS-CoV-2 e Influenza A, 6 detectáveis para SARS-CoV-2, e 2 detectáveis para Influenza A
- 2) 1 amostra de paciente sintomático detectável para Influenza B
- 3) Um isolado viral de Influenza B nas diluições 1:8, 1:64, 1:256 e 1:512.

4.5– AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA EM AMOSTRAS DO MONITORACOVID UFMG

Após padronização e validação da técnica de LAMP para os vírus SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, e controle endógeno (ACTB), o ensaio foi aplicado em 10% do quantitativo mensal das amostras de secreção nasofaríngea de pacientes sintomáticos com suspeita clínica de infecção respiratória aguda coletados no LINBIO através do MONITORACOVID UFMG no ano de 2022, quando do retorno presencial às atividades acadêmicas, para levantamento epidemiológico desses vírus.

5. RESULTADOS

5.1– VERIFICAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE LAMP

As **Figuras 13 e 14** representam as condições de reação descritas abaixo. Para as reações de IAV e IBV, estão apresentados os resultados de um isolado viral de cada vírus e uma amostra sabidamente não detectável por RT-qPCR para ambos os vírus, nas condições reportadas no artigo original: temperatura de amplificação (63°C); volume total de reação: 25 uL; volume de amostra: 5 uL; concentração dos iniciadores: 0,2 uM (F3/B3), 1,6 uM (FIP/BIP) e 0,8 uM (F3/B3). Para a reação de IAV, em que foram utilizados iniciadores F3-1, F3-2, B3-1, F3-2, a concentração total dos quatro iniciadores também foi de 0,2 uL (TAKAYAMA et al., 2019).

O artigo selecionado para as reações do SARS-CoV-2 e ACTB não reportou as concentrações dos iniciadores utilizados. Dessa maneira, foram testadas 4 amostras clínicas de *swab* de nasofaringe com resultado conhecido pela RT-qPCR, sendo 2 detectáveis e 2 não detectáveis para SARS-CoV-2 nas mesmas concentrações de iniciadores utilizadas nas reações de Influenza, porém com a temperatura de amplificação de 65°C. As amostras testaram de acordo com o esperado pela RT-qPCR - reagente/detectável (amarelo), não detectável/não reagente (rosa) (**Figura 14**).

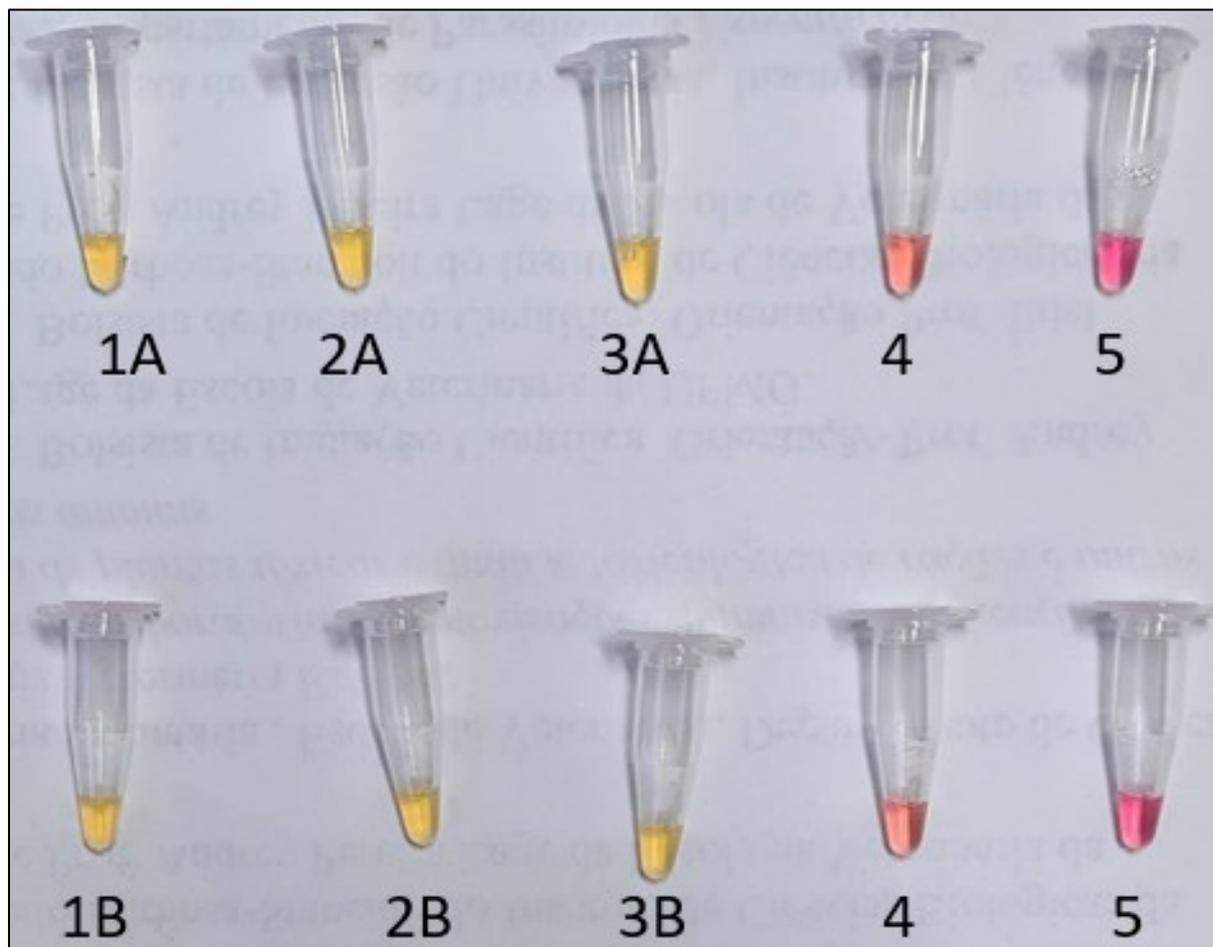


Figura 13 - Detecção visual das reações de LAMP para IAV e IBV (63°C com volume de 25 uL).

Reações de LAMP para IAV (1ª linha) e IBV (2ª linha) realizadas simultaneamente. Foto tirada com 25 minutos de reação. Amostra 1A-3A: isolado viral para IAV, sem diluir, diluído 1:8, diluído 1:64, respectivamente (reagente), 1B-3B: isolado viral para IBV, sem diluir, diluído 1:8, diluído 1:64, respectivamente (reagente), 4: amostra controle não detectável para IAV e IBV (não reagentes), 5: Branco (não reagente). Amostras com resultado confirmado pela técnica de RT-qPCR.

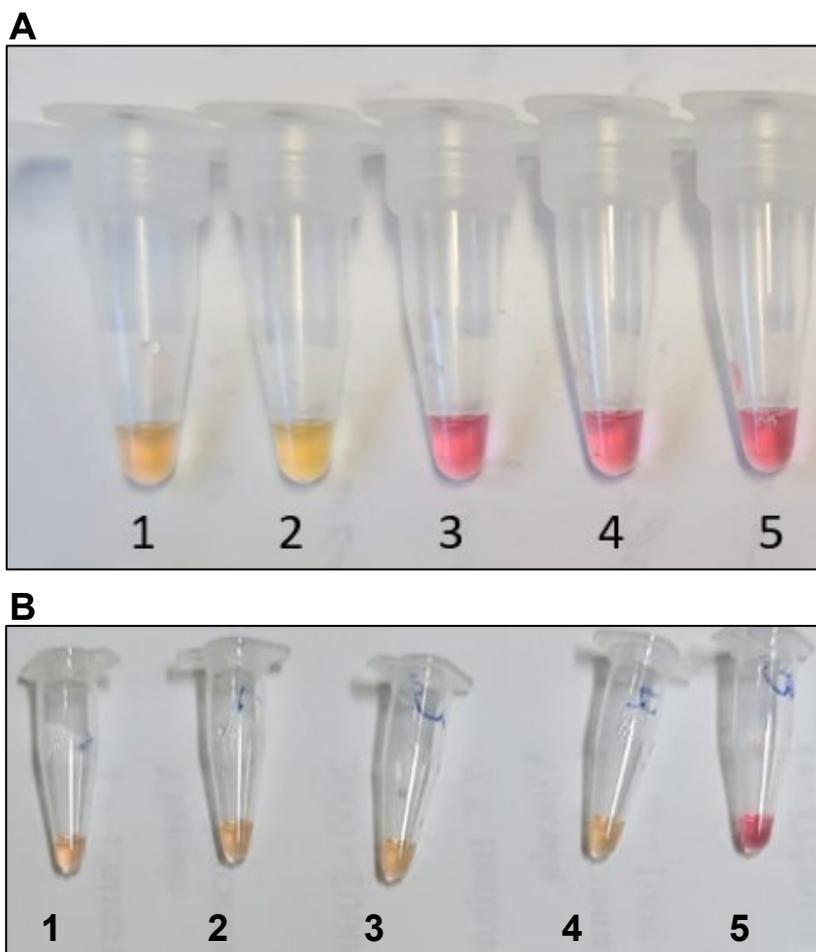


Figura 14 - Detecção visual das reações de LAMP para SARS-CoV-2 e ACTB (65°C com volume de 25 uL).

Reações de LAMP para SARS-CoV-2 (A) e ACTB (B) realizadas simultaneamente a 65°C. Foto tirada com 24 minutos de reação. Amostras 1 e 2 sabidamente detectáveis para SARS-CoV-2; 3 e 4 sabidamente não detectáveis; e 5 Branco, conhecidas pela técnica de RT-qPCR. Interpretação de leitura da reação de LAMP para SARS-CoV-2: Amostra 1 e 2 reagentes, amostras 3, 4 e 5 não reagentes; reação para ACTB: Amostra 1-4 reagentes, amostra 5 não reagente.

Para otimização do volume de mastermix utilizado, as reações de IAV e IBV foram testadas com as mesmas amostras e condições, porém com o volume total da reação de 15 uL. A amplificação ocorreu conforme observada na **Figura 15**.

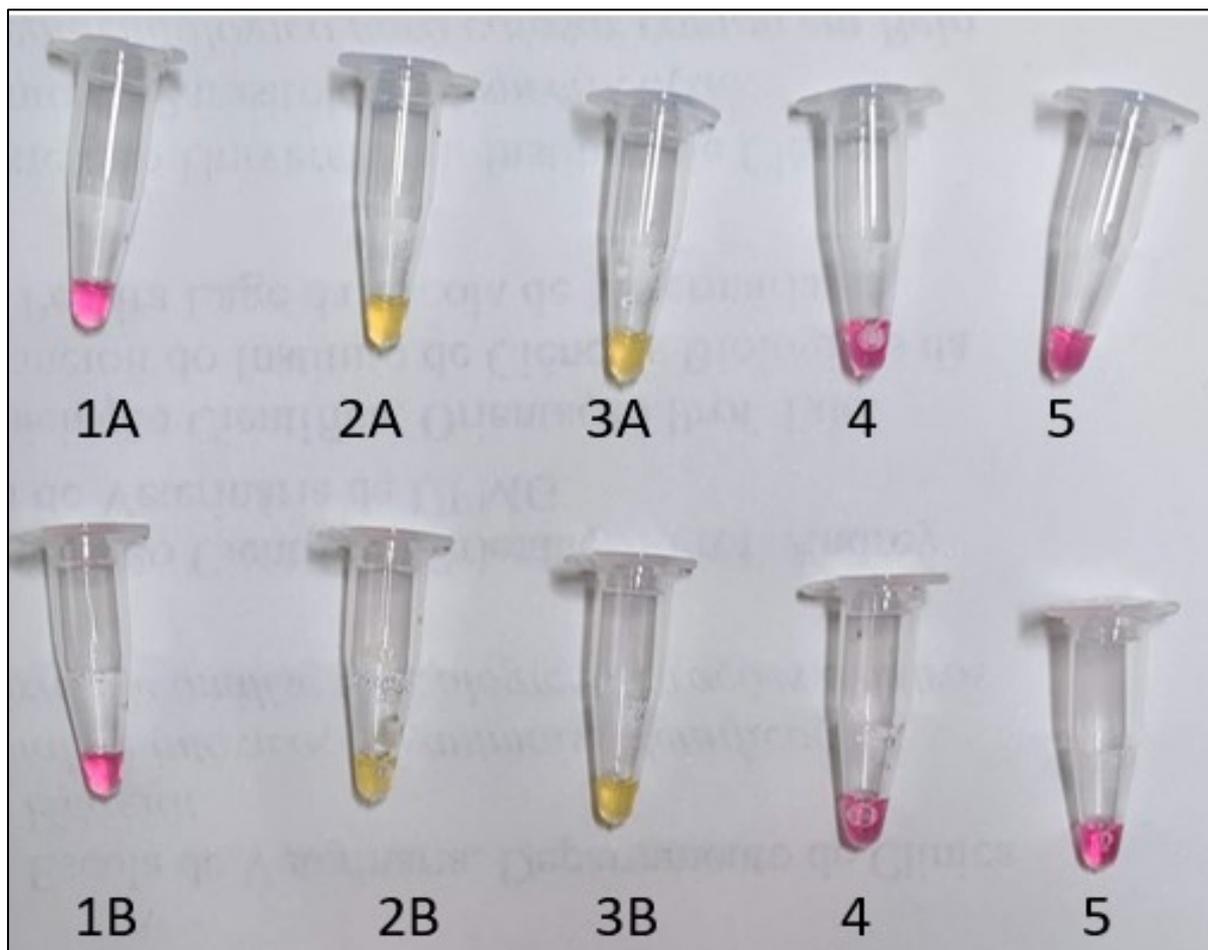


Figura 15 - Detecção visual das reações de LAMP para IAV e IBV (63°C com volume de 15 μ L).

Reações de LAMP para IAV (1ª linha) e IBV (2ª linha) realizadas simultaneamente. Foto tirada com 25 minutos de reação. Amostra 1A: isolado viral para IBV (não reagente), 2A e 3A: isolado viral para IAV, sem diluir e diluído 1:64, respectivamente (reagente); 1B: isolado viral para IAV (não reagente), 2B e 3B: isolado viral para IBV, sem diluir e diluído 1:64, respectivamente (reagente); 4: amostra não detectável para IAV e IBV (não reagente), 5: Branco (não reagente). Amostras com resultado conhecido pela técnica de RT-qPCR.

Para otimização e padronização dos protocolos (Influenza e SARS-CoV-2) em uma única condição, as reações para Influenza foram testadas na temperatura de amplificação de 65°C com as mesmas amostras e a reação ocorreu com sucesso (Figura 16).

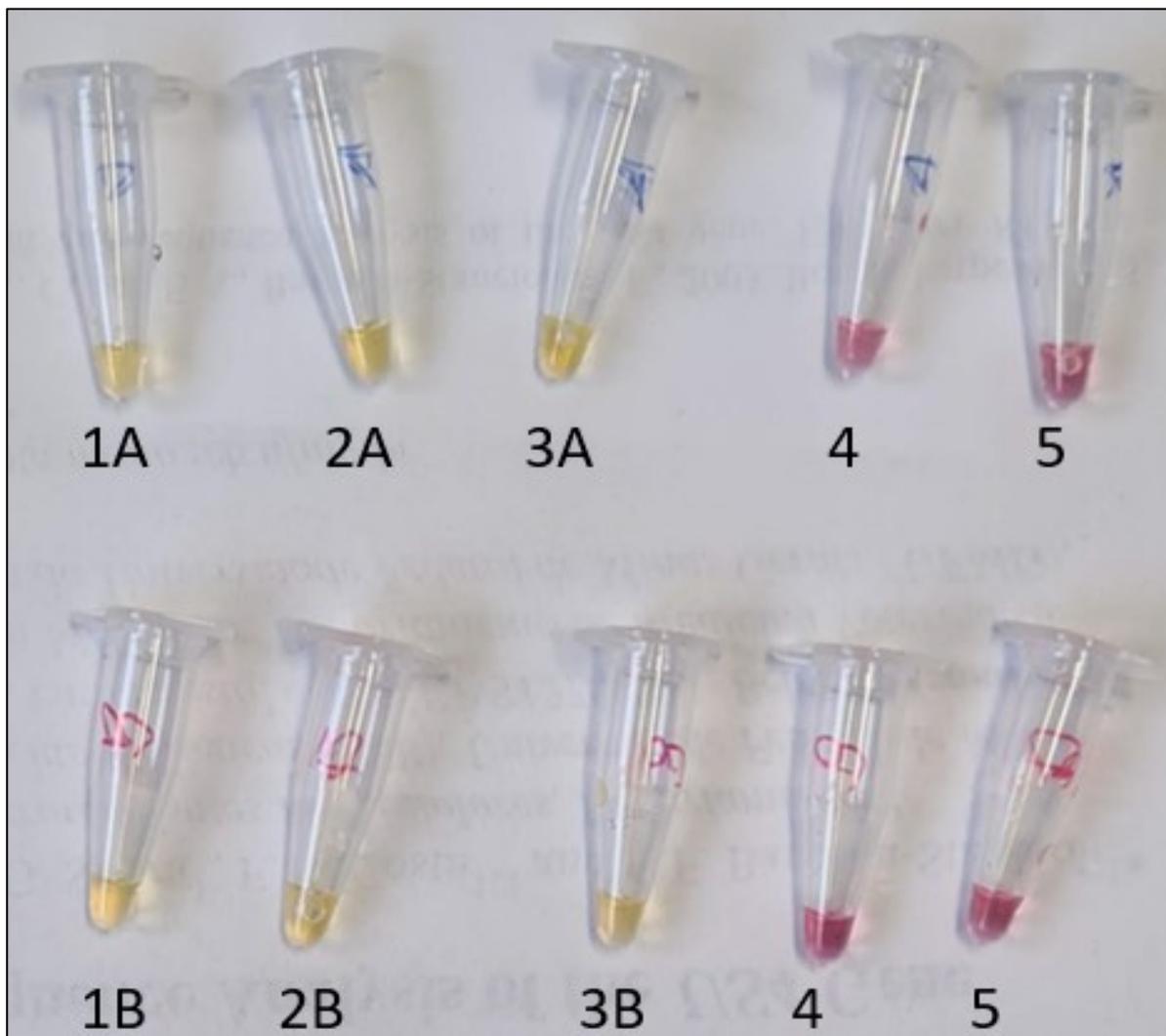


Figura 16 - Detecção visual das reações de LAMP para IAV e IBV (65°C com volume de 15 uL).

Reações de LAMP para IAV (1ª linha) e IBV (2ª linha) realizadas simultaneamente. Foto tirada com 24 minutos de reação. Amostra 1A-3A: isolado viral para IAV, sem diluir, diluído 1:8, diluído 1:64, respectivamente (reagente), 1B-3B: isolado viral para IBV, sem diluir, diluído 1:8, diluído 1:64, respectivamente (reagente), 4: amostra não detectável para IAV e IBV (não reagente), 5: Branco (não reagente). Amostras com resultado conhecido pela técnica de RT-qPCR.

Portanto, as quatro reações foram realizadas com o mesmo volume total de amostra, concentração de iniciadores e temperatura de amplificação (**Figura 17**).

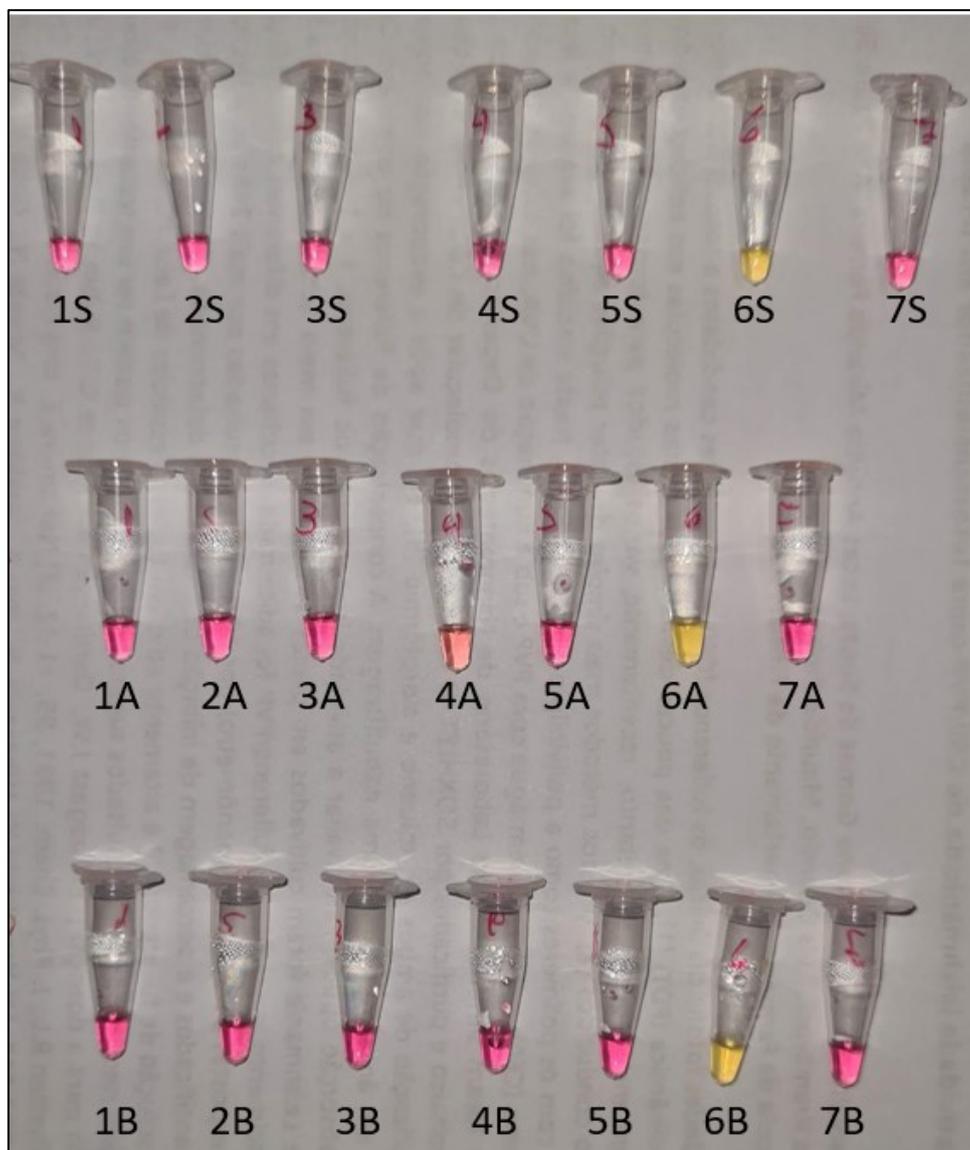


Figura 17 - Detecção visual das reações de LAMP para SARS-CoV-2, IAV e IBV.

Reações de LAMP para SARS-CoV-2, IAV e IBV realizadas simultaneamente a 65°C. Foto tirada com 22 minutos de reação. 1ª linha: Reação de LAMP para SARS-CoV-2: Amostras 1S-4S: Detectáveis para IAV (Não reagente), 5S: detectável para IBV (Não reagente), 6S: detectável para SARS-CoV-2 (Reagente), 7S: Branco (Não reagente); 2ª linha: Reação de LAMP para IAV: Amostras 1A-5A: Detectáveis para SARS-CoV-2 (Não reagente), 6A: detectável para IAV (Reagente), 7A: Branco (Não reagente); 3ª linha: Reação de LAMP para IBV: Amostras 1B-3B: Detectáveis para SARS-CoV-2 (Não reagente), 4B-5B: detectável para IAV (Não reagente), 6B: detectável para IBV (Reagente), 7A: Branco (Não reagente). Amostras com resultado conhecido pela técnica de RT-qPCR.

O volume de amostra testado nas reações difere entre elas, sendo necessário 3 uL para a reação de Influenza, e 1,5 uL para as reações do SARS-CoV-2 e ACTB. Tempo de detecção da reação para os quatro alvos foi de 30 minutos, sendo que não foram observados resultados falsos positivos.

5.2- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DA REAÇÃO

5.2.1 - SARS-CoV-2 (GENE E)

Foram incluídas 50 amostras com resultado prévio obtido pela técnica de RT-qPCR em tempo real para o vírus SARS-CoV-2 (Invitrogen®; Genes N e controle interno (RNase P), sendo 25 com resultado detectável, 25 não detectável e um isolado clínico de Influenza B.

Dentre as 25 amostras com resultado não detectável para o SARS-CoV-2, foram testadas 4 amostras clínicas detectáveis pela técnica de RT-qPCR multiplex (INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos®) em tempo real para Influenza A, e uma amostra detectável para Influenza B para verificar reação cruzada da técnica. Não houve amplificação inespecífica em nenhuma amostra, incluindo as amostras detectáveis para Influenza A e B. Dentre as 25 amostras com resultado detectável para o SARS-CoV-2 pela RT-qPCR, houve amplificação de 21 amostras na reação de LAMP.

Foram calculadas especificidade e sensibilidade com intervalo de confiança 95% (IC 95%) do teste utilizando a planilha 2x2 *Contingency Calculator Westegard* (Tabela 1).

TABELA 1: Características analíticas do conjunto de iniciadores gene E (SARS-CoV-2)

	LAMP	RT-qPCR (Referência)		Total
		Reagente (+)	Não reagente (-)	
Candidato (Teste)	Reagente (+)	21	0	21
	Não reagente (-)	4	25	29
	Total	25	25	50

	%	IC (95%) Inferior	Limite Superior
Sensibilidade	84,0	65,3	93,6
Especificidade	100,0	86,7	100,0
Acurácia diagnóstica	92,0	81,2	96,8
Prevalência	17,6%		
Valor preditivo positivo (VPP)	100,00	51,2	100,00
Valor preditivo negativo (VPN)	96,7	92,1	98,7

Índice Kappa	0,84	0,69	0,98
Erro tipo I (pFP)	0,0 %		
Erro tipo II (pFN)	16,0 %		
pFP + pFN	16,0 %		

A reação de LAMP para a identificação do SARS-CoV-2 apresentou, com relação ao ensaio de referência, sensibilidade de 84,0% (IC 95%: 65,3% – 93,6%), e especificidade de 100,0% (IC 95%: 86,7% – 100,0%), com acurácia diagnóstica de 92,0% (IC 95%: 81,2% – 96,8%). Considerando a prevalência de 17,6% do vírus SARS-CoV-2 nos testes moleculares realizados pela FUNED-MG em 2022 (dados não publicados), o VPP calculado foi 100,0%, (IC 95%: 51,2% – 100,0%) e o VPN foi 96,7% (IC 95%: 92,1% – 98,7%). O índice Kappa encontrado foi de 0,84 (IC 95%: 0,69-0,98), que significa ótima concordância e o Erro tipo I (pFP) foi de 0,0 % e o erro tipo II (pFN) 16,0%, que indicam que o ensaio padronizado é um bom teste.

No total, 7 amostras com o Ct > 31 para o gene N do SARS-CoV-2 foram testadas e houve amplificação de somente 3 delas pelo LAMP, quatro amostras que testaram não reagente (resultado falso negativo) (**Tabela 2**). Essas amostras foram retestadas no ensaio de LAMP em 2 dias diferentes e através do Kit Molecular

INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos® (RT-qPCR), o qual confirmou os resultados primeiramente obtidos.

TABELA 2: Resultado da reação de LAMP para SARS-CoV-2 nas amostras com Ct na RT-qPCR maior que 31 para os alvos N1 e N2.

Amostra	Ct (N1)	Ct (N2)	Ct (RNase P)	Resultado LAMP
1	31.9	34.3	28.3	Não reagente
2	32.4	35.4	27.6	Não reagente
3	32.4	33.8	33.8	Reagente
4	32.8	34.6	28.8	Reagente
5	33.8	37.1	29.5	Não reagente
6	34.9	35.0	27.9	Reagente
7	36.9	35.9	24.3	Não reagente

Para o cálculo das características analíticas da reação de LAMP para SARS-CoV-2, 7 amostras com Ct maior que 31 para os alvos N1 e N2 através da RT-qPCR foram testadas, sendo que 4 tiveram resultado falso negativo e 3 testaram reagente no LAMP.

5.2.2 INFLUENZA A (GENE DA MATRIZ)

Foram incluídas 52 amostras com resultado prévio obtido pela técnica de PCR-qRT multiplex em tempo real para o vírus Influenza A através do ensaio multiplex Kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos®, sendo 27 com resultado detectável, 25 não detectável e um isolado clínico de Influenza B.

Dentre as 25 amostras com resultado não detectável para o Influenza A, foram testadas 8 amostras detectáveis por RT-qPCR para o vírus SARS-CoV-2 e uma amostra detectável para Influenza B para verificar reação cruzada da técnica. Não houve amplificação inespecífica em nenhuma amostra, incluindo as amostras detectáveis para SARS-CoV-2 e o isolado para Influenza B. Dentre as 27 amostras com resultado detectável para o Influenza A, houve amplificação de 23 amostras na reação de LAMP.

Foram calculadas especificidade e sensibilidade com intervalo de confiança 95% (IC 95%) do teste utilizando a planilha *2x2 Contingency Calculator Westegard* (Tabela 3).

TABELA 3: Características analíticas do conjunto de iniciadores gene matriz (Influenza A)

Candidato (Teste)	LAMP	RT-qPCR (Referência)		Total
		Reagente (+)	Não reagente (-)	
	Reagente (+)	23	0	23
	Não reagente (-)	4	25	29
	Total	27	25	52
	%	IC (95%) Limite		
		Inferior	Superior	
Sensibilidade	85,2	67,5	94,1	
Especificidade	100,0	86,7	100,0	
Acurácia diagnóstica	92,3	81,8	97,0	
Prevalência	1,7%			
Valor preditivo positivo (VPP)	100,0	8,1	100,0	
Valor preditivo negativo (VPN)	99,7	99,4	99,9	
Índice Kappa		0,85	0,70	0,98
Erro tipo I (pFP)		0,0 %		
Erro tipo II (pFN)		15,0 %		
pFP + pFN		15,0 %		

A reação de LAMP para a identificação do Influenza A apresentou, com relação ao ensaio de referência, sensibilidade de 85,2% (IC 95%: 67,5% – 94,1%), e especificidade de 100,0% (IC 95%: 86,7% – 100,0%), com acurácia diagnóstica de 92,3% (IC 95%: 81,8% – 97,0%). Considerando a prevalência de 1,7% do vírus Influenza A nos testes moleculares realizados pela FUNED-MG em 2022 (dados não publicados), o VPP calculado foi 100,0%, (IC 95%: 8,1% – 100,0%) e o VPN foi 99,7% (IC 95%: 99,4% – 99,9%). O índice Kappa encontrado foi de 0,85 (IC 95%: 0,70-0,98), que significa ótima concordância. O Erro tipo I (pFP) foi de 0,0% e o erro tipo II (pFN) 15,0% indicando que o ensaio padronizado é um bom teste.

No total, 5 amostras com o Ct > 31 para o Influenza A (gene M) foram testadas e houve amplificação de somente 1 delas, as quatro demais testaram não reagente (resultado falso negativo) (**Tabela 4**). Essas amostras foram retestadas no ensaio de LAMP em 2 dias diferentes após nova extração da amostra clínica e os resultados primeiramente obtidos foram confirmados.

TABELA 4: Resultado da reação de LAMP para Influenza A nas amostras com Ct maior que 31

Amostra	Ct (M)	Ct (RNAse P)	Resultado LAMP
1	31,0	25,7	Não reagente
2	32,0	27,2	Não reagente
3	32,4	28,1	Não reagente
4	32,4	27,4	Não reagente
5	33,0	25,7	Reagente

5.2.3 - INFLUENZA B (GENE NS)

Foram incluídas 25 amostras não detectáveis pela técnica de PCR-qRT multiplex em tempo real para o vírus Influenza B através do ensaio multiplex Kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos®, sendo 2 amostras de coinfeção de SARS-CoV-2 e Influenza A, 6 detectáveis para SARS-CoV-2, e 2 detectáveis para Influenza A. Todas as 25 amostras não detectáveis para Influenza B, incluindo as amostras detectáveis para SARS-CoV-2 e Influenza A e de coinfeção testaram não reagente na técnica de LAMP.

Devido à baixa prevalência de infecções pelo Influenza B na população nos anos de 2021 e 2022, foi possível obter somente uma amostra detectável por RT-qPCR para o Influenza B (**FIGURA 18**).



Figura 18 - Teste da reação de LAMP para Influenza B com amostra clínica detectável para IBV pela técnica de RT-qPCR.

Amostra 1: amostra clínica detectável para IBV (Reagente), Amostra 2: Isolado viral para Influenza B (Reagente), 3: Controle negativo (Não reagente), 4: Branco (Não reagente). Amostras com resultado conhecido pela técnica de RT-qPCR. Foto tirada ao final da reação de 30 minutos.

Uma vez que apenas uma amostra clínica positiva para Influenza B foi utilizada para a validação, o isolado viral para Influenza B foi testado nas diluições 1:8, 1:64, 1:256 e 1:512 para verificar a sensibilidade da reação e todas as diluições testaram reagente (**Figura 19**).

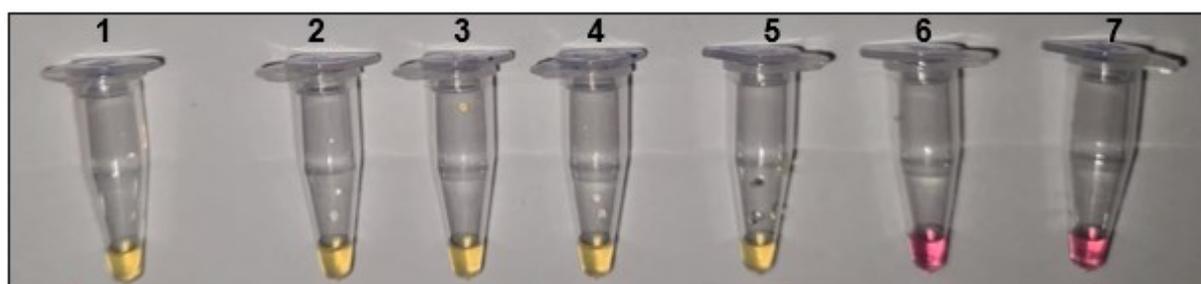


Figura 19 - Teste de diluição do Isolado viral de Influenza B.

Reação de LAMP para IBV. Foto tirada ao final da reação de 30 minutos. Amostra 1-5: Isolado viral sem diluir, 1:8, 1:64, 1:256, 1:512, respectivamente (Reagente), 6: Controle negativo (Não reagente), 7: Branco (Não reagente). Amostras com resultado conhecido pela técnica de RT-qPCR.

5.3 AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES ATENDIDOS PELO MONITORACOVID UFMG

No ano de 2022 o programa MONITORACOVID UFMG possibilitou a coleta de amostras de secreção nasofaríngea no LINBIO de 2.426 pacientes sintomáticos para infecção respiratória aguda. A distribuição dessas coletas dentre os meses de 2022 foi variável, sendo maior no mês de julho, seguido de janeiro e maio, e menor nos meses de outubro, março e setembro (**Figura 20**).

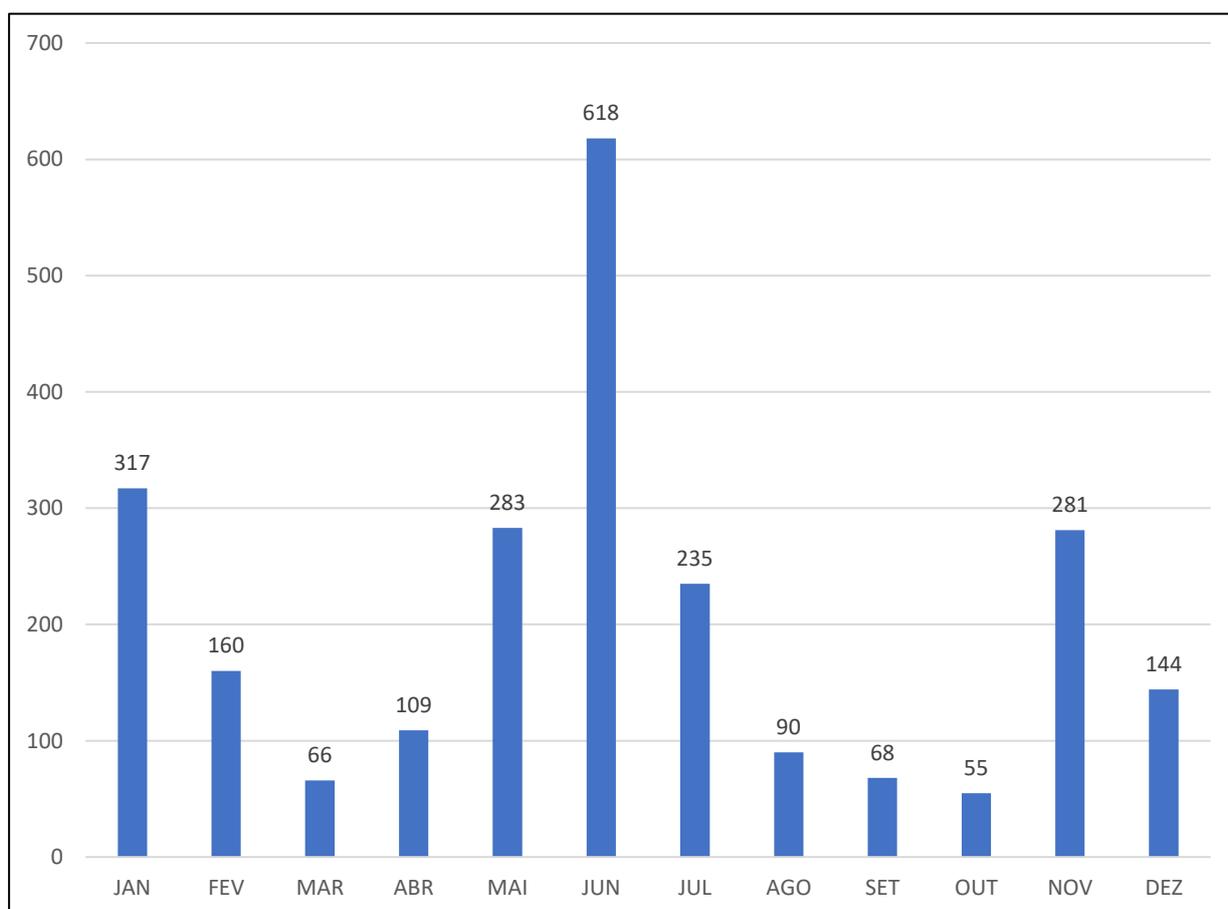


Figura 20 - Número mensal de coletas do MONITORACOVID UFMG em 2022

No total, foi testada no presente estudo uma amostragem de 243 pacientes para a avaliação epidemiológica, correspondente ao quantitativo de 10% dos testes realizados em cada mês (**Tabela 5**). A seleção dos pacientes (10%) baseou-se na disponibilidade de amostra armazenada.

TABELA 5: Número de amostras testadas por mês de acordo com o número de coletas do programa MONITORACOVID UFMG

Mês	N. ° coleta Monitora	Amostras testadas
Janeiro	317	32
Fevereiro	160	20
Março	66	7
Abril	109	11
Mai	283	29
Junho	618	62
Julho	235	24
Agosto	90	9
Setembro	68	7
Outubro	55	6
Novembro	281	29
Dezembro	144	15
Total	2426	251

A média de idade da população testada no presente estudo foi de 34,3 (22,9;45,7) anos, sendo 158 amostras (65%) de pacientes do sexo feminino e 85 (35%) masculino. Dentre os pacientes testados, 62% (151) reportaram nunca terem o diagnóstico da COVID-19, 31% (76) relataram já terem sido diagnosticados anteriormente com COVID-19 e 7% (16) não informaram. Os sintomas reportados pelos pacientes atendidos foram: coriza, congestão nasal, dor de cabeça, dor no corpo, distúrbios olfativos, distúrbios gustativos, tosse, dor de garganta, febre, dispneia, fraqueza e diarreia.

Janeiro foi o mês com maior taxa de positividade (46,9%) para o SARS-CoV-2, seguido de novembro (41,4%), dezembro e fevereiro (40,0% cada). O SARS-CoV-2 não foi detectado nas amostras testadas dos meses de março, setembro e outubro. Para o Influenza A, foi detectada uma amostra positiva nos meses de janeiro, junho, julho e novembro, representando uma taxa de positividade de 3,1%, 1,6%, 4,2% e

3,4% respectivamente. Não foram identificadas amostras positivas para Influenza B (Figura 21).

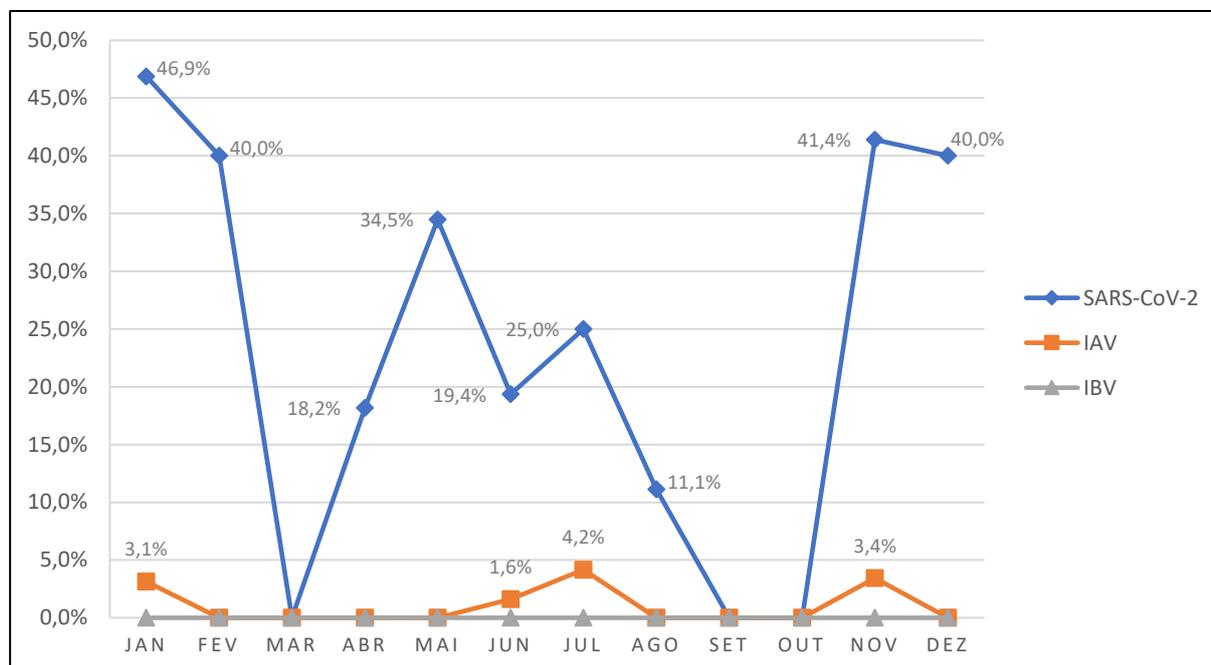


Figura 21 - Taxa de positividade por mês dos vírus SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B através da reação de LAMP

A taxa de positividade para o SARS-CoV-2 no programa MONITORACOV-2 UFMG foi maior nos meses de dezembro (50,7%) e janeiro (49,2%) e menor em setembro (1,5%) e outubro (1,8%), seguido de abril com 5,5% (Figura 22), resultados comparáveis ao encontrados através da reação de LAMP.

A taxa anual de positividade para o SARS-CoV-2 foi de 28,7%, para o Influenza A de 1,6%, para o Influenza B, 0,0% (nenhuma das amostras testadas teve o resultado detectável) e não foram encontrados resultados de coinfeção entre os vírus pesquisados. A média anual de amostras negativas foi de 66,9%. 1,2% das amostras testadas tiveram o resultado da reação invalidado, pois não houve amplificação do gene ACTB, controle endógeno (Figura 23).

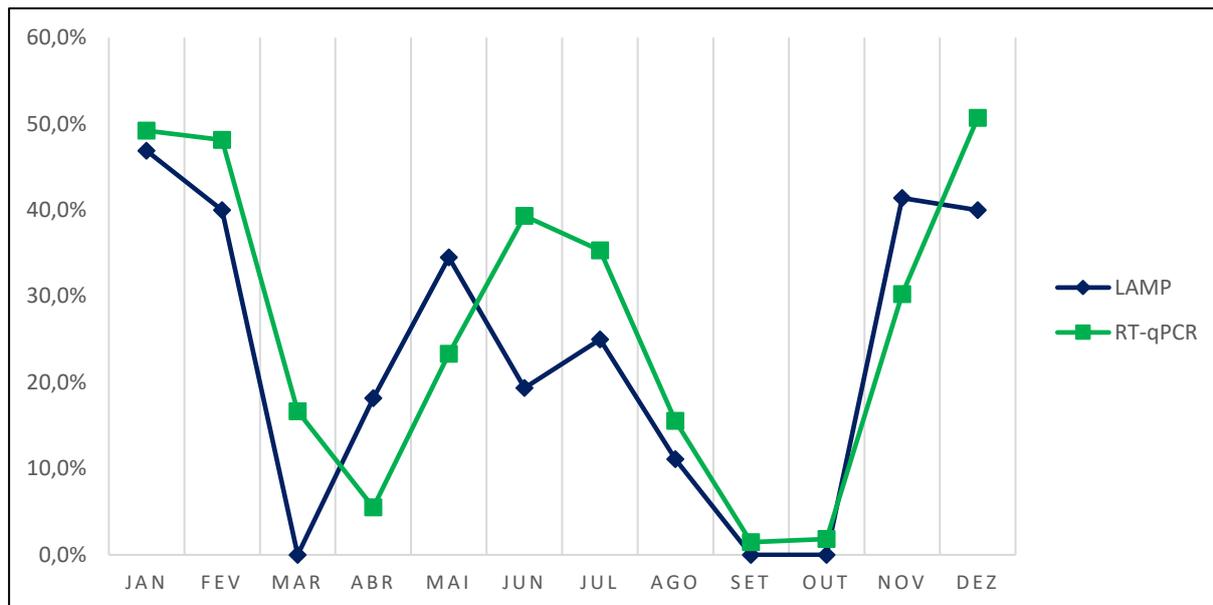


Figura 22 - Taxa de positividade por mês do SARS-CoV-2 no ano de 2022 (LAMP x RT-qPCR).

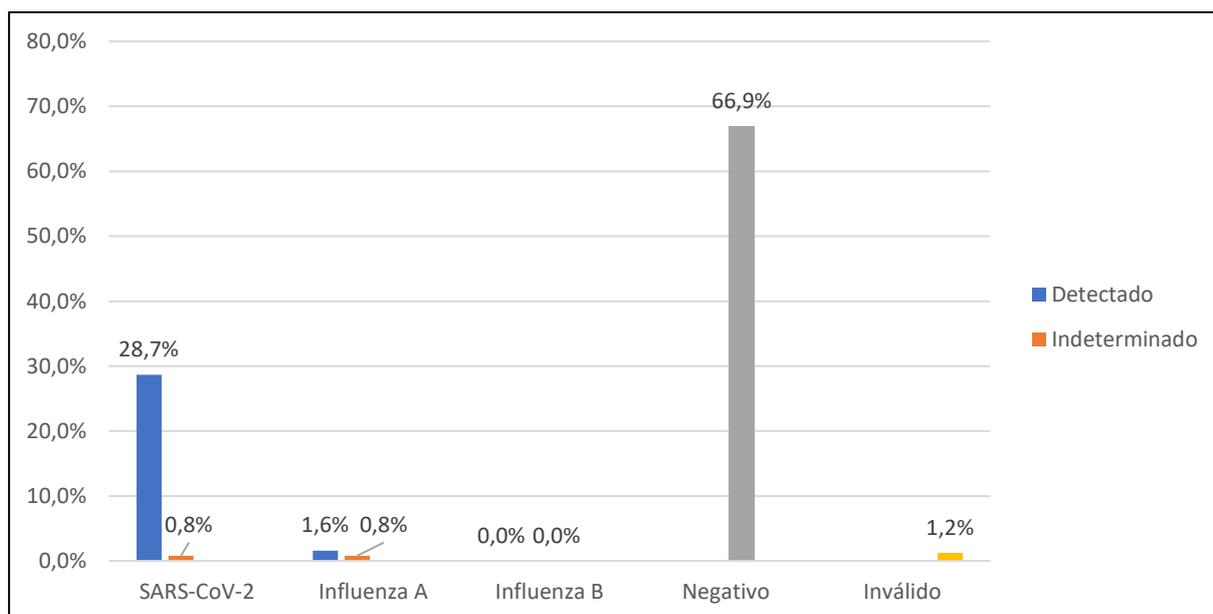


Figura 23 - Porcentagem anual dos resultados encontrados na reação de LAMP

Teste realizado em amostras do programa MONITORACOVVID UFMG. Para a reação de LAMP foi testado 10% do quantitativo mensal correspondente ao número de amostras testadas através de RT-qPCR no LINBIO (Dados LINBIO/UFMG não publicados).

Dentre as reações realizadas, foram obtidos 0,8% de resultados indeterminados para SARS-CoV-2 e Influenza A cada, 1,2% de resultados inválidos, em que o controle endógeno (gene ACTB) testou negativo (**Figura 24**).

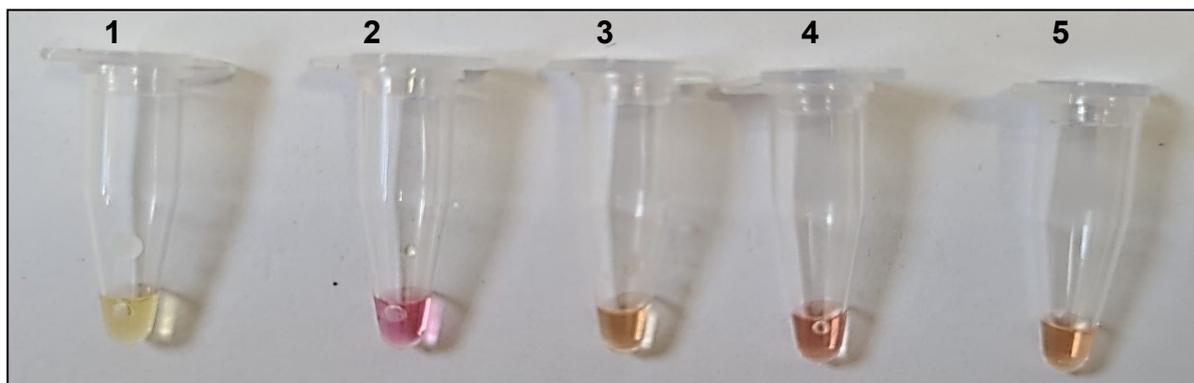


Figura 24 - Detecção visual das reações de LAMP para SARS-CoV-2, IAV e ACTB com resultado indeterminado.

Amostras 1-3: reação para o SARS-CoV-2. Amostra 1: controle positivo (reagente), amostra 2 controle negativo (não reagente), amostra 3: amostra clínica (indeterminada). Amostra 4: reação para o controle endógeno (ACTB), amostra clínica com resultado indeterminado. Amostra 5: reação para Influenza A, amostra clínica com resultado indeterminado. Reações de LAMP realizadas simultaneamente a 65°C. Foto tirada com 30 minutos de reação.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico molecular de vírus respiratórios é uma importante ferramenta no combate da transmissão dos vírus e contenção dos surtos epidemiológicos que possuem importantes impactos à saúde e economia mundial. Entretanto, esse tipo de teste laboratorial usualmente exige estrutura sofisticada, equipamentos de alto custo e pessoal qualificado (KRISHNA; CUNNION, 2012). A técnica de LAMP pode ser uma alternativa a essas barreiras, pois permite que a reação seja realizada em um tempo menor de reação, em até 30 minutos, em ambiente ambulatorial ou remotamente com equipamentos comuns de laboratórios, como banho maria ou termobloco (LI, Y. et al., 2017; NZELU et al., 2016). A técnica de LAMP pode ser utilizada em diferentes cenários para testagem em massa, como em ambientes residenciais, ambulatoriais, empresariais, escolas e até em pontos de imigração (SONG et al., 2021; BOKELMANN et al., 2021; CHOW et al., 2020; DUDLEY et al., 2020).

Com o objetivo de realizar a avaliação epidemiológica dos vírus RNA relacionados a infecções respiratórias agudas na comunidade do *campus* Pampulha da UFMG, reações de LAMP para a detecção dos vírus SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B e controle endógeno ACTB em amostras de *swab* de nasofaringe foram padronizadas no presente estudo. As reações podem ser realizadas simultaneamente em um mesmo equipamento em temperatura constante de 65°C com tempo de detecção de 30 minutos. Este ensaio padronizado permite que o diagnóstico laboratorial desses vírus seja realizado de maneira mais rápida e menos onerosa.

As características analíticas das reações para SARS-CoV-2 foram obtidas em comparação com o resultado conhecido de amostras de *swab* de nasofaringe pela técnica de RT-qPCR (**Tabela 1**). O ensaio de LAMP para SARS-CoV-2 obteve valores das métricas analíticas de acordo com o que é considerado um bom teste (**Quadro 7**), e o índice Kappa foi de 0,84 (IC 95%: 0,69-0,98), que representa ótima concordância do método com relação ao ensaio de referência. A sensibilidade do

ensaio encontrada foi de 84,0% (IC95%: 65,3 – 93,6%) e o erro tipo II, proporção de resultados falso negativos, foi de 16%. Considerando a prevalência de 17,6% do SARS-CoV-2 nos testes realizados pela FUNED-MG em 2022, o valor preditivo negativo do teste, ou seja, a chance de amostras com resultado não reagente serem de fato negativas é de 96,7% (IC95%: 92,1 – 98,7%).

Quatro das 25 amostras com resultado detectável tiveram resultado falso negativo na técnica de LAMP, todas essas com os Cts > 31 para os alvos do SARS-CoV-2. Essas amostras foram retestadas através de um segundo ensaio de RT-qPCR e novamente na reação de LAMP padronizada, que confirmou os resultados primeiramente obtidos (detectável no RT-qPCR e não detectável no LAMP). O estudo testou no total 7 amostras com Ct > 31 e para essas amostras foi observada menor sensibilidade, de 42,85%, em comparação com a técnica de RT-qPCR. A menor sensibilidade em amostras com Ct mais altos na RT-qPCR já foi evidenciada em outros estudos realizados anteriormente (ALVES et al., 2021; AOKI et al., 2021; SCHERMER et al., 2020). Nas amostras com Ct < 31, a concordância analítica do ensaio foi de 100%.

Todas as 25 amostras com resultado não detectável para SARS-CoV-2 pela técnica de RT-qPCR testaram não reagente no ensaio de LAMP, o que significa uma especificidade entre 86,7 e 100,0%, considerando intervalo de confiança de 95%, em concordância com outros estudos reportados na literatura (AOKI et al., 2021; CHOW et al., 2020; NAWATTANAPAIBOON et al., 2021). Nenhuma das amostras testadas, incluindo amostras com resultado detectável para os vírus Influenza A e B, tiveram resultado falso positivo. Alves e colaboradores demonstraram também que o ensaio de LAMP padronizado em seu estudo para SARS-CoV-2 não apresentou resultado falso positivo com amostras de vírus sincicial respiratório e arbovírus (ALVES et al., 2021). Esses dados demonstram que a reação possui um alto valor preditivo positivo, ou seja, que amostras com resultado reagente possuem probabilidade entre 51,2% e 100% de serem realmente reagentes. O erro tipo I, proporção de resultados falso positivos, foi 0,0%.

Em estudo conduzido por Baba e colaboradores, entre outubro de 2020 e fevereiro de 2021, em quatro países africanos e na Itália com amostras de *swab* faríngeo, os resultados das métricas analíticas foram semelhantes ao do presente estudo. O estudo testou 1292 amostras e encontrou sensibilidade de 87,0%, especificidade de 98,0%, VPN de 70,0% e VPP de 99,0% (MANDU BABA et al., 2021). A maior sensibilidade encontrada pode ser relacionada pelo fato do estudo ter utilizado kit comercial *SARS-CoV-2 Rapid Colorimetric LAMP Assay Kit* (New England Biolabs #E2019S), que além de utilizar os mesmos iniciadores para o gene E do SARS-CoV-2 (viés de incorporação), pesquisa também o gene N através de outro conjunto de iniciadores e possui o reagente Hidrocloro de Guanidina, que já foi demonstrado que pode aumentar a sensibilidade dos ensaios de LAMP (ZHANG et al., 2020).

As características analíticas das reações para Influenza A foram obtidas em comparação com o resultado conhecido de amostras de *swab* de nasofaringe pela técnica de RT-qPCR (**Tabela 3**). O ensaio de LAMP para o Influenza A obteve valores das métricas analíticas de acordo com o que é considerado um bom teste (**Quadro 7**), e o índice Kappa foi de 0,85 (IC 95%: 0,70-0,98), que representa ótima concordância do método com relação ao ensaio de referência. A sensibilidade de 85,2% (IC95%: 67,5 – 94,1%) e o erro tipo II, proporção de resultados falso negativos foi 15,0%. Considerando a prevalência de 1,7% do Influenza A nos testes realizados pela FUNED-MG em 2022, o valor preditivo negativo do teste, ou seja, a chance de amostras com resultado não reagente serem de fato negativas é de 99,7% (IC95%: 99,4 – 99,9%). A sensibilidade encontrada para o conjunto de iniciadores utilizada para Influenza A no presente estudo vai de acordo com a encontrada na literatura, que varia de 89,7 a 96,3% (NAKAUCHI et al., 2011; TAKAYAMA et al., 2019).

Quatro das 27 amostras com resultado detectável na técnica de RT-qPCR, tiveram resultado falso negativo na técnica de LAMP, todas essas com os Ct > 31 para o gene M do Influenza A. Essas amostras foram testadas no ensaio de LAMP em 2 dias diferentes após nova extração da amostra clínica e o resultado não detectável foi confirmado no LAMP, porém essas amostras não foram testadas em um ensaio

diferente de RT-qPCR para reforçar que o resultado obtido no LAMP tenha sido discordante (falso negativo) com relação ao padrão ouro. O manual do kit de RT-qPCR não descreve com quais estirpes os iniciadores foram testados, porém caso esse kit seja capaz de identificar mais estirpes do Influenza A do que aquelas descritas no **Quadro 4**, seria uma hipótese que poderia explicar as discordâncias encontradas entre os ensaios. Por outro lado, as reações de LAMP e RT-qPCR utilizam o mesmo gene como alvo genômico para identificação do Influenza A, porém não é possível precisar se a região utilizada do gene M é a mesma, pois a sequência dos iniciadores não é informada no manual do kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos®.

É sabido que o valor de Ct da qPCR pode ter relação direta com a carga viral da amostra, pois quanto menor o Ct maior é a quantidade do alvo molecular presente na amostra analisada. Por outro lado, é importante entender que o Ct das amostras pode ter grande variação de acordo com o kit diagnóstico e alvo de amplificação, e com a forma de coleta, já que não é possível garantir a quantidade exata de material através da coleta de *swab* de nasofaringe (RHOADS *et al.*, 2021). Além disso, fatores pré-analíticos, como temperatura de transporte e do processamento da amostra podem interferir em sua estabilidade e degradar o alvo molecular.

O estudo testou no total 5 amostras com Ct > 31 e para essas amostras foi observada menor sensibilidade, de 20,0%, em comparação com a técnica de RT-qPCR. A diminuição da sensibilidade da reação de LAMP já foi observada em outro estudo que utilizou o mesmo conjunto de iniciadores (TAKAYAMA *et al.*, 2019). Nas amostras com Ct < 31, a concordância clínica do ensaio foi de 100%.

Todas as 25 amostras com resultado não detectável para Influenza A pela técnica de RT-qPCR testaram não reagente no ensaio de LAMP, o que significa uma especificidade de 100%, em concordância com o estudo realizado por Takayama e colaboradores em 2019 que utilizou o mesmo conjunto de iniciadores em 113 amostras do trato respiratório (aspirados, secreções e *swabs*) (TAKAYAMA *et al.*, 2019).

Por outro lado, Nakauchi e colaboradores, que testaram 45 amostras de *swab* nasal pelo kit comercial da *Eiken Chemical Company (Influenza Type A RT-LAMP)*, que possui conjunto de iniciadores semelhante ao utilizado no estudo, encontraram especificidade de 88,9%. No estudo, os autores coletavam 2 *swabs* para cada paciente, testando um na técnica de LAMP e outro na RT-qPCR. Para um paciente, o ensaio de LAMP testou positivo enquanto o da RT-qPCR testou negativo, porém devido a discordância dos resultados, o mesmo *swab* testado na LAMP também foi testado na RT-qPCR, que confirmou o resultado detectável (NAKAUCHI et al., 2011). Nenhuma das amostras testadas, incluindo amostras com resultado detectável para os vírus SARS-CoV-2 e Influenza B, tiveram resultado falso positivo. Outros estudos reforçam que a sequência do conjunto de iniciadores utilizados no ensaio de LAMP padronizado para Influenza A não apresentou reação cruzada para amostras de Influenza B (NAKAUCHI et al., 2011; TAKAYAMA et al., 2019). Apesar disso, considerando índice de confiança de 95%, o valor preditivo positivo variou de 8,1 a 100,0%, por ter sido a amostra pequena, houve imprecisão da estimativa. O erro tipo I, proporção de resultados falso positivos, foi 0,0%.

As características analíticas das reações para Influenza B foram obtidas em comparação com o resultado conhecido de amostras de *swab* de nasofaringe pela técnica de RT-qPCR, de uma amostra clínica detectável e 25 não detectável, incluindo 2 amostras de coinfeção de SARS-CoV-2 e Influenza A, 6 detectáveis para SARS-CoV-2, e 2 detectáveis para Influenza A.

Serviços de vigilância de Influenza B demonstram que a circulação do vírus diminuiu a níveis muito baixos desde a adoção de medidas de isolamento em 2020 devido a pandemia de COVID-19 (CHOW; UYEKI; CHU, 2022; EISEN et al., 2021), o que é reforçado pelos resultados encontrados no levantamento epidemiológico realizado (taxa de positividade de 0,0% para o Influenza B em 2022). A baixa circulação do Influenza B é uma limitação para este estudo, já que não foi possível testar 25 amostras para o cálculo das características analíticas da reação de LAMP padronizada. Por outro lado, a reação foi capaz de detectar o vírus na única amostra

clínica detectável por RT-qPCR e no isolado viral concentrado nas diluições de 1:8, 1:64, 1:256 e 1:512, o que indica que o ensaio pode ter também boa sensibilidade. Takayama e colaboradores testaram 113 amostras do trato respiratório com o mesmo conjunto de iniciadores de LAMP para identificação do IBV e atingiram uma sensibilidade de 90,9% para detectar o Influenza B (TAKAYAMA et al., 2019).

Todas as 25 amostras com resultado não detectável para Influenza B pela técnica de RT-qPCR, incluindo amostras detectáveis para SARS-CoV-2 e Influenza A testaram não reagente no ensaio de LAMP, o que representa uma especificidade de 100%, em concordância com outros estudos reportados na literatura (CHEN et al., 2021; TAKAYAMA et al., 2019; MAHONY et al., 2013).

Para o ensaio padronizado, foi utilizado o alvo ACTB como controle endógeno da reação. O alvo ACTB foi escolhido para a reação por ser um gene constitutivo, ou seja, um gene parte do metabolismo básico e processos essenciais para a sobrevivência das células; de baixa variabilidade gênica. O uso de um controle interno tem papel importante nas reações de LAMP, especialmente em amostras do trato respiratório, pois ele controla processos prévios à etapa de amplificação e permite avaliar se o processo de coleta foi realizado de maneira adequada. Além disso, a amplificação do controle interno indica eficiência do processo de extração do material genético, evitando resultados falsos negativos por erros no processo de extração dos ácidos nucleicos. Uma eventual falha na amplificação do controle endógeno pode ocorrer por fatores que podem interferir individualmente em cada reação, como substâncias inibidoras das amostras, meio de transporte inadequado ou dificuldades de coleta (WILSON-DAVIES et al., 2021).

A testagem de amostras de coinfeção de SARS-CoV-2 com Influenza A e de amostras detectáveis para outros vírus respiratórios diferentes do alvo do ensaio, é importante para avaliar se a reação pode ser inibida ou amplificar de maneira inespecífica pela presença de outros vírus que causam manifestações clínicas semelhantes. As reações de LAMP padronizadas e validadas neste estudo não apresentaram resultado falso positivo para amostras detectáveis para outros vírus

respiratórios e não foram inibidas quando testadas em amostras de coinfeção viral (SARS-CoV-2 e Influenza A). Em 2022, vários pacientes foram diagnosticados com “Flurona”, quando o diagnóstico laboratorial identifica a presença do Influenza e SARS-CoV-2 na mesma amostra do paciente (PAWLOWSKI et al., 2022), reforçando a necessidade de um ensaio que não sofra interferência com a coinfeção.

Durante os experimentos, foi observado que o tempo de reação de 30 minutos, a 65 °C, é fator crucial para a especificidade da técnica LAMP, uma vez que, caso as amostras permaneçam tempo maior nessa temperatura, é possível que ocorra amplificação inespecífica na reação e o resultado seja interpretado de maneira incorreta. Após encerramento da reação pela diminuição da temperatura, a amplificação da LAMP é interrompida imediatamente.

Zhang e colaboradores demonstraram que a adição de 40-50mM de hidrocloreto de guanidina diminuiu o tempo de detecção de amostras positivas em 40% e aumentou a sensibilidade dos ensaios de LAMP em aproximadamente quatro vezes com relação ao limite de detecção da técnica, sem diminuir a especificidade do teste. O mecanismo de ação ainda não foi esclarecido, porém os autores especulam que o reagente aumenta o emparelhamento de bases entre os iniciadores e suas sequências-alvo (ZHANG et al., 2022).

É importante ressaltar que o VPP e o VPN dependem da prevalência do vírus na população e do número de amostras utilizadas. Não existem testes laboratoriais que apresentem 100% de sensibilidade e especificidade. Em decorrência disso, resultados falso-negativos/positivos, ou discrepantes entre testes distintos podem ocorrer. As características analíticas dos ensaios laboratoriais dependem também de fatores pré-analíticos, como o tipo de material de análise, forma de coleta, transporte e armazenamento da amostra, forma de extração da amostra e até sintomas e dias de sintomas do paciente (DUDLEY et al., 2020; NAWATTANAPAIBOON et al., 2021).

O alvo dos iniciadores é um fator importante para se considerar com relação a sensibilidade dos ensaios moleculares. Para a pesquisa do SARS-CoV-2, o gene N é o alvo mais frequentemente escolhido e que apresenta o melhor desempenho analítico em ensaios de LAMP (ALVES et al., 2021; GANGULI et al., 2020; ZHANG et al., 2020b). Além disso, o uso de mais de um alvo (teste multiplex) para o SARS-CoV-2 na mesma reação tem demonstrado maior sensibilidade (ALVES et al., 2021; KIM et al., 2019; MAUTNER et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Para o Influenza A e B, a seleção do alvo genômico também é importante, já que os genes HA e NA possuem alta variabilidade genética, e podem, portanto, apresentar variabilidade em regiões alvo dos iniciadores, diminuindo a sensibilidade da reação.

A implementação dos ensaios de LAMP padronizados no presente estudo em um laboratório clínico depende ainda de testes adicionais, como por exemplo os testes de repetibilidade e reprodutibilidade. A repetibilidade avalia a capacidade de concordância de um método entre resultados conduzidos pelo mesmo operador, considerando o mesmo ambiente, tratamento das amostras e mesma corrida, enquanto a reprodutibilidade é uma medida de concordância entre resultados de uma mesma amostra processada por analistas ou em corridas diferentes (FONSECA *et al*, 2015). O ensaio de LAMP padronizado não foi testado em outros ambientes ou equipamentos de amplificação e as reações foram conduzidas somente pelo autor deste estudo, portanto os testes de repetibilidade e reprodutibilidade são essenciais antes de uma eventual implantação do ensaio para o diagnóstico clínico.

Com relação às condições de reação de LAMP já reportadas nos artigos selecionados (TAKAYAMA et al., 2019; ZHANG et al., 2020), houve comparativamente diminuição no volume de reagente mastermix consumido e do tempo de reação. Além disso, observou-se que as reações para os 4 alvos podem ser realizadas simultaneamente no mesmo equipamento, beneficiando o paciente por realizar a pesquisa de mais de um alvo viral que possui manifestações clínicas semelhantes e por otimizar custo e tempo de reação no laboratório.

Em comparação com a técnica de RT-qPCR, a reação padronizada no presente estudo demonstrou ter menor tempo de amplificação, o que possibilita um diagnóstico laboratorial mais rápido. Por outro lado, a reação demonstrou ter menor sensibilidade comparativamente, especialmente em amostras com Ct na RT-qPCR maior que 31, sendo assim, um resultado negativo através da técnica de LAMP não exclui o diagnóstico dos vírus respiratórios avaliados, sendo necessário também a avaliação epidemiológica e clínica do paciente.

O presente estudo testou 243 amostras, correspondente a 10% da coleta mensal do programa MONITORACOVID UFMG em 2022 para a avaliação epidemiológica dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A e B. A taxa de positividade anual para o SARS-CoV-2 foi de 28,7%, próxima a taxa encontrada pelo LINBIO (33,6%), nas amostras do programa MONITORACOVID UFMG (Dados não publicados – LINBIO/UFMG).

Os resultados encontrados demonstram que a taxa de positividade para o SARS-CoV-2 variou bastante no decorrer dos meses do ano de 2022, com os picos nos 2 primeiros e últimos meses do ano e os vales entre março e abril, e agosto e outubro, em concordância com os dados do LINBIO.

O presente estudo não detectou amostras para IBV na avaliação epidemiológica de 2022 (taxa de positividade 0,0%) e detectou uma amostra de IAV nos meses de janeiro (3,1%), junho (1,6%), julho (4,2%) e novembro (3,4%), em concordância com um estudo realizado no LINBIO com amostras do primeiro semestre de 2022 do programa MONITORACOVID UFMG, que não encontrou amostras detectáveis para IBV e encontrou amostras detectáveis para IAV nos meses de janeiro (24 amostras; 8,2%), fevereiro (1 amostra; 0,6%) e junho (1 amostra; 0,2%) (Dados não publicados – LINBIO/UFMG). A taxa anual de positividade para IAV encontrada no presente estudo foi de 1,6%, bem próxima à taxa de 1,7%, encontrada pela FUNED-MG em amostras de 2022 (dados não publicados – FUNED/MG).

O número de amostras testadas nos meses em que a procura pelo programa MONITORACOVID UFMG foi menor é um limitante do estudo e influencia na taxa de

positividade dos vírus pesquisados. Nos meses de março, setembro e outubro por exemplo, nenhuma amostra testou detectável para nenhum dos vírus pesquisados, porém considerando 10% do quantitativo total de amostras do MONITORACOVID UFMG, foram testadas somente 7 amostras em setembro e março e 6 em outubro (**Tabela 5**).

Outro limitante do estudo é que a avaliação epidemiológica não levou em consideração as semanas epidemiológicas, forma que os estudos epidemiológicos tradicionalmente dividem o ano, mas sim a frequência de procura pelo programa, o qual sofre influência do período letivo. Dessa forma, a comparação com dados já publicados é difícil, pois a divisão dos períodos de testagens é diferente. O estudo não dividiu a avaliação epidemiológica em semanas pois caso fizesse de maneira igual para todas as 52 semanas de 2022, seriam testadas apenas 4-5 amostras por semanas, influenciando diretamente no cálculo da taxa de positividade.

Durante o levantamento epidemiológico, o estudo encontrou 5 amostras com resultados indeterminados (2 para SARS-CoV-2, 2 para Influenza A e 1 para o controle endógeno ACTB). Isso ocorre, pois a interpretação do ensaio de LAMP padronizado é realizada de forma visual, através da cor da solução, rosa (não reagente), amarelo (reagente) e laranja (indeterminado). Em um contexto de uso da técnica para o diagnóstico da etiologia viral, o mesmo material genético extraído, ou resultante de uma nova extração, pode ser utilizado para uma nova corrida de LAMP e confirmação do resultado. Nesses casos, é importante entender a clínica do paciente e o tempo de sintomas quando realizada a coleta para avaliar a necessidade de realizar nova coleta.

No caso de resultados indeterminados para o controle endógeno, é importante avaliar nova extração do material coletado e, caso o resultado persista, avaliar coleta de nova amostra, já que um resultado indeterminado para o controle endógeno indica quantidade insuficiente do material coletado, o que diminui a sensibilidade do teste e prejudica na pesquisa dos vírus respiratórios. Fatores pré-analíticos como temperatura, transporte e tempo para processamento das amostras podem também

interferir na obtenção de resultados indeterminados. O estudo encontrou 2 amostras negativas para o controle endógeno ACTB, invalidando a reação. Essas amostras não foram testadas em nova corrida e não foi realizada nova extração do material de coleta, por insuficiência de material. Esse resultado pode ter ocorrido pelo fato de ter sido coletada quantidade insuficiente de amostra no *swab* nasofaríngeo ou pelo fato do material genético extraído ter perdido sua estabilidade. O estudo utilizou o material genético armazenado de pacientes do programa MONITORACOVID, que foram também utilizados para outros estudos do LINBIO, o que pode ter feito com que o material tenha perdido sua estabilidade por ter passado por alguns ciclos de descongelamento.

Por fim, os resultados deste estudo podem beneficiar laboratórios que não possuem estrutura de diagnóstico molecular já estabelecida, especialmente em ambientes hospitalares, em que a necessidade da identificação da etiologia viral é mais urgente devido ao direcionamento da conduta clínica para tratamento dos pacientes. A maior disseminação do diagnóstico molecular de maneira rápida e eficaz pode contribuir para o combate efetivo dos surtos e minimização dos impactos à saúde e econômicos.

7. CONCLUSÕES

A técnica de LAMP foi capaz de identificar vírus relacionados à síndrome respiratória aguda (SARS-CoV-2, Influenza A e B) e do gene ACTB (controle endógeno da reação) com características analíticas mínimas para utilização na rotina laboratorial. O ensaio padronizado, realizado em temperatura constante de 65°C com tempo de reação de 30 minutos e detecção visual, foi capaz de avaliar a epidemiologia dos vírus respiratórios na comunidade da UFMG, atendida pelo programa MonitoraCovid, com resultados comparáveis aos encontrados na literatura.

8. PERSPECTIVAS

- a) Ampliação da testagem em amostras do MonitoraCovid a fim de melhor conhecer a epidemiologia das doenças respiratórias nesta comunidade.
- b) Aplicação da técnica de LAMP em outras populações para validação interpopulacional.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2021a. NOTA TÉCNICA Nº 33/2021/SEI/GSTCO/DIRE1/ANVISA, 22 abri. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/sangue-tecidos-celulas-e-orgaos/notas-tecnicas/2021/nota-tecnica-33-2021-gstco>. Acesso em: 02 set 2022

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2021b. COMUNICADO GGMON 006/2021 - Vacinas contra a COVID-19. 28 jun. 2021. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-propoe-restricao-de-uso-de-vacinas-que-utilizam-vetor-adenoviral-em-gestantes/comunicado_ggmon_006_2021_atualizada-1.pdf Acesso em: 02 set 2022

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2022a. Medicamentos para Covid-19: Paxlovid (nirmatrelvir + ritonavir). 07 abri. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos/paxlovid-nirmatrelvir-ritonavir> Acesso em: 02 set 2022

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2022b. Medicamentos para Covid-19: Molnupiravir. 05 mai. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos/molnupiravir> Acesso em: 02 set 2022

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2022c. Medicamentos para Covid-19: Rendesivir. 26 mai. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos/rendesivir> Acesso em: 02 set 2022

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2022d. COVID-19: Anvisa aprova por unanimidade uso emergencial das vacinas. 27 jul. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias->

[anvisa/2021/anvisa-aprova-por-unanimidade-uso-emergencial-das-vacinas](#) Acesso em: 02 set 2022

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2022e. INFORMAÇÕES SOBRE VACINAS: COMIRNATY BIVALENTE (PFIZER), 13 dez. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas/comirnaty-bivalente-pfizer>. Acesso em: 25 fev 2023

AL-ALY, Z.; BOWE, B.; XIE, Y. Long COVID after breakthrough SARS-CoV-2 infection. *Nature Medicine* 2022 28:7, v. 28, n. 7, p. 1461–1467, 25 maio 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41591-022-01840-0>>. Acesso em: 24 fev. 2023.

ALAOFI, A. L.; SHAHID, M. Mutations of SARS-CoV-2 RBD may alter its molecular structure to improve its infection efficiency. *Biomolecules*, v. 11, n. 9, 1 set. 2021. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC8466379/](#)>. Acesso em: 25 jun. 2022.

ALVES, P. A. et al. Optimization and Clinical Validation of Colorimetric Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification, a Fast, Highly Sensitive and Specific COVID-19 Molecular Diagnostic Tool That Is Robust to Detect SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 3172, 18 nov. 2021. Acesso em: 12 ago. 2022.

AOKI, M. N. et al. Colorimetric RT-LAMP SARS-CoV-2 diagnostic sensitivity relies on color interpretation and viral load. *Scientific Reports* 2021 11:1, v. 11, n. 1, p. 1–10, 27 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-88506-y>>. Acesso em: 19 ago. 2022.

AZAR, M. M.; LANDRY, M. L. Detection of Influenza A and B Viruses and Respiratory Syncytial Virus by Use of Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA)-Waived Point-of-Care Assays: a Paradigm Shift to Molecular Tests. 2018.

BELO HORIZONTE, SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. Boletim Epidemiológico COVID-19 N° 523/2022. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de->

[governo/saude/2022/boletim_epidemiologico_523_COVID-19_29-07-22.pdf](#) Acesso em 26 ago. 2022

BOKELMANN, L. et al. Point-of-care bulk testing for SARS-CoV-2 by combining hybridization capture with improved colorimetric LAMP. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-021-21627-0>>.

BRAUNER, J. M. et al. Inferring the effectiveness of government interventions against COVID-19. *Science (New York, N.Y.)*, v. 371, n. 6531, 19 fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33323424/>>. Acesso em: 13 jun. 2022.

BUKASOV, R.; DOSSYM, D.; FILCHAKOVA, O. Detection of RNA viruses from influenza and HIV to Ebola and SARS-CoV-2: a review. *Analytical Methods*. [S.l: s.n.], 2021

CANTARINO, L.; MERCHAN-HAMANN, E. Regional Review Influenza in Brazil: surveillance pathways. *J Infect Dev Ctries*, v. 10, n. 1, p. 13–023, 2016.

CASTANARES-ZAPATERO, D. et al. Pathophysiology and mechanism of long COVID: a comprehensive review. *Annals of medicine*, v. 54, n. 1, p. 1473–1487, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35594336/>>. Acesso em: 24 fev. 2023.

CARDA, S. et al. coVid-19 pandemic. What should physical and rehabilitation Medicine specialists do? a clinician's perspective. *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*, v. 56, n. 4, p. 515–524, 2020. Acesso em: 13 jun. 2022.

CEVIK, M. et al. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*, v. 371, 23 out. 2020. Disponível em: <<https://www.bmj.com/content/371/bmj.m3862>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

CHALKIAS, S. et al. A Bivalent Omicron-Containing Booster Vaccine against Covid-19. *New England Journal of Medicine*, v. 387, n. 14, p. 1279–1291, 6 out. 2022. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2208343>>. Acesso em: 24 fev. 2023.

CHEN, N. et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of six common respiratory viruses. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, v. 40, n. 12, p. 2525–2532, 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34264402/>>. Acesso em: 8 mar. 2023.

CHOW, E. J.; UYEKI, T. M.; CHU, H. Y. The effects of the COVID-19 pandemic on community respiratory virus activity. *Nature Reviews Microbiology* 2022 21:3, v. 21, n. 3, p. 195–210, 17 out. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-022-00807-9>>. Acesso em: 8 mar. 2023.

CHOW, F. W. N. et al. A Rapid, Simple, Inexpensive, and Mobile Colorimetric Assay COVID-19-LAMP for Mass On-Site Screening of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 5380, v. 21, n. 15, p. 5380, 29 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5380/htm>>. Acesso em: 19 ago. 2022.

CUCINOTTA, D.; VANELLI, M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis*, v. 91, n. 1, p. 157, 2020. Disponível em: <</pmc/articles/PMC7569573/>>. Acesso em: 25 jun. 2022.

DAWOOD, F. S. et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: A modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 12, n. 9, p. 687–695, set. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22738893/>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

DHAMA, K. et al. Coronavirus Disease 2019-COVID-19. *Clinical microbiology reviews*, v. 33, n. 4, p. 1–48, 1 out. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32580969/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

DOBSON, J. et al. Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials. *The Lancet*, v. 385, n. 9979, p. 1729–1737, 2 maio 2015. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673614624491/fulltext>>. Acesso em: 20 ago. 2021.

DROSTEN, C. et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 20, p. 1967–1976, 15 maio 2003.

DUDLEY, D. M. et al. Optimizing direct RT-LAMP to detect transmissible SARS-CoV-2 from primary nasopharyngeal swab samples. *PLOS ONE*, v. 15, n. 12, p. e0244882, 1 dez. 2020. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0244882>>. Acesso em: 19 ago. 2022.

DUGAS, A. F.; ROTHMAN, R. E. *INFECTIOUS DISEASE/CDC UPDATE Update on Emerging Infections: News From the Centers for Disease Control and Prevention*. YMEM. [S.l: s.n.], 2011.

EISEN, A. K. A. et al. Low circulation of Influenza A and coinfection with SARS-CoV-2 among other respiratory viruses during the COVID-19 pandemic in a region of southern Brazil. *Journal of medical virology*, v. 93, n. 7, p. 4392–4398, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33829531/>>. Acesso em: 8 mar. 2023

FENDRICK, A. M. et al. The Economic Burden of Non-Influenza-Related Viral Respiratory Tract Infection in the United States. . [S.l: s.n.], 2003. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

FERNANDES, Q. et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2031274>, v. 54, n. 1, p. 524–540, 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07853890.2022.2031274>>. Acesso em: 14 jun. 2022.

FIOLET, T. et al. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 28, n. 2, p. 202–221, 1 fev. 2022.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34715347/>>. Acesso em: 12 ago. 2022.

FONSECA, A. et al. Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. MAPA/ACS, Brasília. 57p, 2015. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/arquivos-publicacoes-laboratorio/biomol_final_baixa.pdf

FREITAS, F. T. DE M. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000-2010. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 62–68, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/bjid/a/brMWKtC4GkZYHPD6gMqgtmC/?lang=en>>. Acesso em: 20 ago. 2021.

GANGULI, A. et al. Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 37, p. 22727–22735, 15 set. 2020. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2014739117>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

GAO, Y. DONG et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy*, v. 76, n. 2, p. 428–455, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33185910/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

GUO, Y. R. et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Military Medical Research*, v. 7, n. 1, 13 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32169119/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

HAN, E. et al. Lessons learnt from easing COVID-19 restrictions: an analysis of countries and regions in Asia Pacific and Europe. *Lancet (London, England)*, v. 396, n. 10261, p. 1525–1534, 7 nov. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32979936/>>. Acesso em: 14 jun. 2022.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in immunology*, v. 41, n. 12, p. 1100–1115, 1 dez. 2020.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33132005/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

HE, J. et al. Proportion of asymptomatic coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. *Journal of Medical Virology*, v. 93, n. 2, p. 820–830, 1 fev. 2021. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7404334/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33132005/)>. Acesso em: 11 jun. 2022.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, [S.L.], v. 181, n. 2, p. 271-280, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.

HU, X. et al. Development and Clinical Application of a Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for SARS-CoV-2 Infection. *mSphere*, v. 5, n. 4, 26 ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mSphere.00808-20.>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

HUSSMAN, J. P. Cellular and Molecular Pathways of COVID-19 and Potential Points of Therapeutic Intervention. *Frontiers in pharmacology*, v. 11, 29 jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32848776/>>. Acesso em: 25 jun. 2022.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV Ninth Report; 2009, Family: Orthomyxoviridae Disponível em: https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Orthomyxoviridae Acesso em 11 mar. 2023

JOLY, Bérangère S.; SIGURET, Virginie; VEYRADIÈRE, Agnès. Understanding pathophysiology of hemostasis disorders in critically ill patients with COVID-19. *Intensive Care Medicine*, [S.L.], v. 46, n. 8, p. 1603-1606, 15 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-020-06088-1>.

JUNG, H. E.; LEE, H. K. Host Protective Immune Responses against Influenza A Virus Infection. *Viruses* 2020, Vol. 12, Page 504, v. 12, n. 5, p. 504, 3 maio 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/5/504/htm>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

KADAM, S. B. et al. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology*, v. 61, n. 3, p. 180–202, 1 mar.

2021. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jobm.202000537>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

KARLSSON, E. K.; KWIATKOWSKI, D. P.; SABETI, P. C. Natural selection and infectious disease in human populations. *Nature reviews. Genetics*, v. 15, n. 6, p. 379–393, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24776769/>>. Acesso em: 14 jun. 2022.

KASHIR, J.; YAQINUDDIN, A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Medical Hypotheses*, v. 141, 1 ago. 2020.

KIM, J. H. et al. A Simple and Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of SARS-CoV. *Biochip Journal*, v. 13, n. 4, p. 341–351, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13206-019-3404-3>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

KRAMMER, F. Emerging influenza viruses and the prospect of a universal influenza virus vaccine. *Biotechnology Journal*, v. 10, n. 5, p. 690–701, 1 maio 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/biot.201400393>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

KRAMMER, F. et al. Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing. 1 dez. 2018 Group. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29955068/>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

KRISHNA, N. K.; CUNNION, K. M. Role of molecular diagnostics in the management of infectious disease emergencies. *The Medical clinics of North America*, v. 96, n. 6, p. 1067–1078, nov. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23102477/>>. Acesso em: 12 ago. 2022.

LAMONTAGNE, F. et al. RAPID RECOMMENDATIONS A living WHO guideline on drugs for covid-19. [2023]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.m3379>>. Acesso em: 24 fev. 2023

LAN, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, v. 581, n. 7807, p. 215–220, 14 maio 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32225176/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

LANCET REGIONAL HEALTH – WESTERN PACIFIC, T. The end of zero-COVID-19 policy is not the end of COVID-19 for China. *The Lancet Regional Health - Western Pacific*, v. 30, p. 100702, 2023. Disponível em: <www.thelancet.com>. Acesso em: 8 mar. 2023.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159, mar. 1977. Acesso em: 17 ago. 2022.

LAURING, A. S.; HODCROFT, E. B. Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean? *JAMA*, v. 325, n. 6, p. 529–531, 9 fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33404586/>>. Acesso em: 14 jun. 2022.

LI, J. et al. The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. *Nature* 2021 600:7889, v. 600, n. 7889, p. 408–418, 8 dez. 2021a. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-021-04188-6>>. Acesso em: 13 jun. 2022.

LI, Y. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microbial Pathogenesis*. [S.l.]: Academic Press. , 1 jun. 2017

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 22 fev. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32007145/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

MAHONY, J. et al. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, v. 58, n. 1, p. 127–131, set. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23827787/>>. Acesso em: 8 mar. 2023.

MAHONY, J. B.; PETRICH, A.; SMIEJA, M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v. 48, p. 217–249, 2011.

MALLAH, S. I. et al. COVID-19: breaking down a global health crisis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2021 20:1, v. 20, n. 1, p. 1–36, 18 maio 2021. Disponível em: <<https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-021-00438-7>>. Acesso em: 24 fev. 2023.

MANDU BABA, M. et al. Diagnostic performance of a colorimetric RT -LAMP for the identification of SARS-CoV-2: A multicenter prospective clinical evaluation in sub-Saharan Africa. *EClinicalMedicine*, v. 40, p. 101101, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101101>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

MAO, R. et al. Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, v. 5, n. 7, p. 667–678, 1 jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32405603/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

MARR, L. C. et al. Mechanistic insights into the effect of humidity on airborne influenza virus survival, transmission and incidence. 2019.

MARTIN, D. P. et al. The emergence and ongoing convergent evolution of the N501Y lineages coincides with a major global shift in the SARS-CoV-2 selective landscape. *medRxiv : the preprint server for health sciences*, 5 mar. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33688681/>>. Acesso em: 14 jun. 2022.

MATROSOVICH, M. N. et al. Probing of the receptor-binding sites of the H1 and H3 influenza A and influenza B virus hemagglutinins by synthetic and natural sialosides. *Virology*, v. 196, n. 1, p. 111–121, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8356788/>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

MAUTNER, L. et al. Rapid point-of-care detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP).

MEHANDRU, S.; MERAD, M. Pathological sequelae of long-haul COVID. *Nature immunology*, v. 23, n. 2, p. 194–202, 1 fev. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35105985/>>. Acesso em: 24 fev. 2023.

MOH ZAKI, A. et al. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *NEJM.org. N Engl J Med*, v. 367, p. 1814–1834, 2012.

MOLINARI, N. A. M. et al. The annual impact of seasonal influenza in the US: Measuring disease burden and costs. *Vaccine*, v. 25, n. 27, p. 5086–5096, 28 jun. 2007.

MORIYAMA, M.; HUGENTOBLER, W. J.; IWASAKI, A. Annual Review of Virology Seasonality of Respiratory Viral Infections. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-012420->>. Acesso em: 20 jan. 2021.

NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, v. 16, n. 3, p. 223–229, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12144774/>>. Acesso em: 12 ago. 2022.

NAKAUCHI, M. et al. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *Journal of Medical Virology*, v. 83, n. 1, p. 10–15, 1 jan. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.21934>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

NAWATTANAPAIBOON, K. et al. Colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a visual diagnostic platform for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2. *Analyst*, v. 146, n. 2, p. 471–477, 25 jan. 2021. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/an/d0an01775b>>. Acesso em: 19 ago. 2022.

NGUYEN, T.; BANG, D. D.; WOLFF, A. 2019 Novel coronavirus disease (COVID-19): Paving the road for rapid detection and point-of-care diagnostics.

NODA, T. Native Morphology of Influenza Virions. *Frontiers in Microbiology*, v. 2, n. JAN, 2011. Disponível em: </pmc/articles/PMC3249889/>. Acesso em: 12 ago. 2021.

NOROOZNEZHAD, A. H.; MANSOURI, K. Endothelial cell dysfunction, coagulation, and angiogenesis in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Microvascular research*, v. 137, 1 set. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34022205/>. Acesso em: 25 jun. 2022.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, v. 28, n. 12, 2000.

NZELU, C. O. et al. A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool. *Acta Tropica*, v. 153, p. 116–119, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.013>. Acesso em: 24 jan. 2021.

OLSEN, B. et al. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*. 2006: American Association for the Advancement of Science. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/>. Acesso em: 21 jan. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2022a. Terapêutica e COVID-19: orientação viva. OMS, 21 abr. 2022. Disponível em: <https://app.magicapp.org/#/guideline/6290>. Acesso em: 26 jun. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2022b. Painel de controle Coronavirus(COVID-19). OMS, 29 jun. 2022. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 09 mar. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2022c. Painel de controle Coronavirus(COVID-19). OMS, 29 jun. 2022. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 09 mar. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2016. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis POLICY GUIDANCE. 2016. Acesso em: 25 fev. 2023.

PACHETTI, M. et al. Impact of lockdown on Covid-19 case fatality rate and viral mutations spread in 7 countries in Europe and North America. *Journal of translational medicine*, v. 18, n. 1, 2 set. 2020. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32878627/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

PARIDA, M. M. et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology*, v. 18, n. 6, p. 407–421, nov. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18716992/>>. Acesso em: 29 ago. 2022.

PAWLOWSKI, C. et al. SARS-CoV-2 and influenza coinfection throughout the COVID-19 pandemic: an assessment of coinfection rates, cohort characteristics, and clinical outcomes. *PNAS nexus*, v. 1, n. 3, 1 jul. 2022. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35860600/>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

PEGU, A. et al. Durability of mRNA-1273 vaccine-induced antibodies against SARS-CoV-2 variants. *Science*, v. 373, n. 6561, p. 1372–1377, 17 set. 2021. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abj4176>>. Acesso em: 25 jun. 2022.

PETERANDERL, C.; HEROLD, S.; SCHMOLDT, C. Human Influenza Virus Infections. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

RANDO, H. M. et al. Pathogenesis, Symptomatology, and Transmission of SARS-CoV-2 through Analysis of Viral Genomics and Structure. *mSystems*, v. 6, n. 5, 26 out. 2021. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/msystems.00095-21>>. Acesso em: 12 ago. 2022.

REDONDO, N. et al. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 2698, 7 jul. 2021. Acesso em: 11 jun. 2022.

RHOADS, D. et al. College of American Pathologists (CAP) Microbiology Committee Perspective: Caution Must Be Used in Interpreting the Cycle Threshold (Ct) Value. *Clinical Infectious Diseases*, v. 72, n. 10, p. e685–e686, 18 maio 2021. Disponível

em: <<https://academic.oup.com/cid/article/72/10/e685/5891762>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

RITCHIE, H. et al., Coronavirus Pandemic (COVID-19). 2023. Disponível em: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations> Acesso em: 25 fev. 2023.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel medicine and infectious disease*, v. 34, 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32179124/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

SANTOS, M. A. F. Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de *Theileria annulata*. Orientador: João Inácio. 2011. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética Molecular e Biomedicina, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Online, 2011. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10362/6271>. Acesso em: 2 set. 2022.

SCHERMER, B. et al. Rapid SARS-CoV-2 testing in primary material based on a novel multiplex RT-LAMP assay. *PLOS ONE*, v. 15, n. 11, p. e0238612, 1 nov. 2020. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0238612>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

SELLERS, S. A. et al. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. 2017.

SHAMAN, J.; KOHN, M. Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality. *PNAS* March. [S.l.: s.n.], 2009. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0806852106>.

SHIRATO, K. Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification. *Microbiology and Immunology*. [S.l.]: Blackwell Publishing Asia. , 1 out. 2019

SHRESTHA, L. B. et al. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: Implications for immune escape and transmission. *Reviews in Medical Virology*, v. 32, n. 5, p. e2381, 1 set. 2022. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/rmv.2381>>. Acesso em: 28 mar. 2023.

SILVA, S. J. R. DA; PENA, L. Collapse of the public health system and the emergence of new variants during the second wave of the COVID-19 pandemic in Brazil. *One Health*, v. 13, p. 100287, 1 dez. 2021. Acesso em: 13 jun. 2022.

SONG, J. et al. Single- And Two-Stage, Closed-Tube, Point-of-Care, Molecular Detection of SARS-CoV-2. *Analytical Chemistry*, v. 93, n. 38, p. 13063–13071, 28 set. 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8482318/>. Acesso em: 19 ago. 2022.

STEWART, R. J. et al. Influenza Antiviral Prescribing for Outpatients With an Acute Respiratory Illness and at High Risk for Influenza-Associated Complications During 5 Influenza Seasons-United States, 2011-2016. *Clinical Infectious Diseases Outpatient Influenza Antiviral Treatment*, p. 1035, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/66/7/1035/4562548>>.

SU, S. et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. 2016.

THACHIL, J. et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 1023-1026, 27 abr. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jth.14810>.

TAKAYAMA, I. et al. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.02.010>>. Acesso em: 29 jul. 2022.

TANG, Y. et al. Laboratory Diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. *Journal Of Clinical Microbiology*, [S.L.], v. 58, n. 6, p. 1-9, 26 maio 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00512-20>.

UKHSA. COVID-19 Greenbook chapter 14a. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.uk/government/publications/investigation-of->>. Acesso em: 11 jun. 2022.

UMAKANTHAN S, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J.* 96(1142):753-758. Dez 2020. Disponível em: <doi: 10.1136/postgradmedj-2020-138234.> UYEKI, T. Antiviral Treatment for Patients Hospitalized with 2009 Pandemic Influenza A (H1N1). <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMopv0910738>, v. 361, n. 23, p. E10, 16 dez. 2009. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMopv0910738>>. Acesso em: 20 ago. 2021.

VAN DER HOEK, L. Human Coronaviruses: What Do They Cause?: <https://doi.org/10.1177/135965350701200S01.1>, v. 12, n. 4 B, p. 651–658, 1 jan. 2005. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/135965350701200S01.1>>. Acesso em: 25 jun. 2022.

VAN DE SANDT, C. E. et al. Influenza B viruses: not to be discounted. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.15.65>, v. 10, n. 9, p. 1447–1465, 11 set. 2015. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.15.65>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

VIKRAM VEMULA, S. et al. viruses Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. 2016. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/viruses>.

VIROLOGY JOURNAL, v. 17, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2020. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-020-01435-6>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

WANG, M. Y. et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 10, 25 nov. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33324574/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

WEBSTER, R. G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews.* 1992: American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: <[/pmc/articles/PMC372859/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11111111/)>. Acesso em: 21 jan. 2021.

WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*, v. 324, n. 8, p. 782–

793, 25 ago. 2020. Disponível em:

<<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2768391>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

WIKRAMARATNA, P. S.; GUPTA, S. Influenza outbreaks. *Cellular Microbiology*, v. 11, n. 7, p. 1016–1024, 1 jul. 2009. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2009.01320.x>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

WILSON-DAVIES, E. S. W. et al. Concerns regarding the sensitivity of the OptiGene direct SARS-CoV-2 LAMP assay and its suitability for use in at-risk groups and hospital staff. *Journal of Infection*, v. 82, n. 2, p. 282–327, 1 fev. 2021. Disponível em: <<http://www.journalofinfection.com/article/S0163445321000360/fulltext>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32015508/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

WU, Y. et al. SARS-CoV-2 is an appropriate name for the new coronavirus. *The Lancet*, v. 395, p. 949–950, 2020.

XIAO, K. et al. Isolation and Characterization of 2019-nCoV-like Coronavirus from Malayan Pangolins. *bioRxiv*, p. 2020.02.17.951335, 20 fev. 2020. Disponível em:

<<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.17.951335v1>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

YANG, H.; RAO, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nature reviews | Microbiology*, p. 685–700, 2021.

Disponível em: <www.nature.com/nrmicro>.

YOO, H. J. et al. Integrated microsystems for the: In situ genetic detection of dengue virus in whole blood using direct sample preparation and isothermal amplification.

Analyst, v. 145, n. 6, p. 2405–2411, 21 mar. 2020.

YOUNIS, N. K. et al. COVID-19: potential therapeutics for pediatric patients.

Pharmacological Reports, v. 73, n. 6, p. 1520–1538, 1 dez. 2021. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s43440-021-00316-1>>. Acesso em: 25 jun. 2022.

YU, H. et al. Characterization of Regional Influenza Seasonality Patterns in China and Implications for Vaccination Strategies: Spatio-Temporal Modeling of Surveillance Data. 2013. Disponível em: <www.plosmedicine.org>.

ZHANG, Y. et al. Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride. *BioTechniques*, v. 69, n. 3, p. 179–185, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://www.future-science.com/doi/10.2144/btn-2020-0078>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020 579:7798, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 3 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2012-7>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2001017>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

10. ANEXOS

10.1 PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP - NÚMERO 4.963.694.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da prevalência de vírus relacionados a infecções respiratórias agudas na região metropolitana de Belo Horizonte por meio da técnica de LAMP

Pesquisador: Karina Braga Gomes Borges

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51151421.8.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: PATOLOGIA CLINICA DR GERALDO LUSTOSA CABRAL LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.963.694

Apresentação do Projeto:

Conforme os autores:

A identificação molecular dos patógenos causadores das infecções respiratórias virais é importante para o controle epidemiológico, impactando diretamente no controle das infecções, bem como no planejamento e gastos em saúde pública dos estados. Para controlar um surto pandêmico e/ou epidêmico com sucesso, o diagnóstico deve ter alta sensibilidade e especificidade, além de ser acessível a toda a população e peculiaridades técnicas dos sistemas de saúde locais. Dessa forma, o presente estudo visa desenvolver um ensaio diagnóstico molecular com essas características para levantamento da prevalência dos vírus relacionados a infecções respiratórias agudas na região metropolitana de Belo Horizonte.

Será padronizado um ensaio molecular para a identificação dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza por meio da técnica de amplificação isotérmica mediada por loop com transcriptase reversa (RT-LAMP). Na amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), o DNA é amplificado por quatro primers específicos (F3, FIP, BIP e B3) que se ligam a 6 regiões alvo. A reação ocorre em temperatura constante de 60-65°C por uma hora pela adição da DNA polimerase Bst que possui alta atividade de desnaturação do DNA. A RT-LAMP consiste em uma reação de amplificação que é capaz de detectar RNA como material alvo. Os princípios da reação de LAMP estão descritos no

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.953.694

website <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html> (EIKEN, 2005). O ensaio será validado com amostras conhecidamente positivas pelo método de RTPCR (padrão-ouro) para os vírus SARS-CoV-2 e Influenza, disponibilizadas pelo Laboratório Geraldo Lustosa, e utilizando controles positivos fornecidos pela Fundação Ezequiel Dias. Os resultados obtidos pelo ensaio de RT-LAMP serão comparados com os de RT-PCR para verificação da reprodutibilidade. Serão calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e valor Kappa, todos com índice de confiança de 95%. O ensaio padronizado e validado será utilizado para avaliar a prevalência dos vírus relacionados às infecções respiratórias agudas na região metropolitana de Belo Horizonte. Serão analisadas 200 amostras obtidas por swab da orofaringe coletadas de pacientes do laboratório Geraldo Lustosa residentes da região metropolitana de Belo Horizonte, cujo material genético viral encontra-se armazenado no mesmo Laboratório.

Critério de Inclusão:

Amostras de pacientes submetidas à identificação do RNA do SARS-COV-2 com suspeita de infecção respiratória.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Diferente prevalência dos vírus causadores de infecções respiratórias agudas na região metropolitana de Belo Horizonte.

Objetivo Primário:

Avaliar a prevalência dos vírus relacionados a infecções respiratórias humanas agudas na região metropolitana de Belo Horizonte por meio da padronização da técnica de LAMP.

Objetivo Secundário:

Padronizar e validar o diagnóstico molecular por LAMP de vírus RNA relacionados a infecções respiratórias agudas (Influenza A, Influenza B e SARS-CoV-2).

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar Sala 2005 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@proq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 4.953.694

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos previstos para os pacientes, uma vez que, para a execução do estudo, não há intervenção clínica ou qualquer alteração/influência no cuidado recebido pelo paciente, e dessa forma, sem adição de riscos ou prejuízos ao bem-estar dos sujeitos da pesquisa. Além disso, as amostras utilizadas no presente estudo tratam-se de excedente de diagnóstico, ou seja, material já analisado e cujo resultado já foi disponibilizado ao paciente. Tais amostras, caso não sejam utilizadas em pesquisas, têm como único destino o descarte após o tempo previsto para armazenamento seguindo recomendações da Vigilância Sanitária.

Benefícios:

Como benefícios estão os resultados do estudo, que indicarão a prevalência dos vírus relacionados a infecções respiratórias agudas na região metropolitana de Belo Horizonte, de modo a orientar medidas de vigilância epidemiológica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto para o desenvolvimento de LAMP para diagnóstico de covid-19 e influenza como dissertação de mestrado. O projeto utilizará amostras de conveniência depositadas na Funded e Laboratório Geraldo Lustosa. Por isso, os pesquisadores solicitam dispensa de TCLE, uma vez que as coletas das amostras já foram realizadas e os exames pelo laboratório já foram realizados e os laudos fornecidos aos pacientes. Além disso, os pesquisadores argumentam que utilizaram dados anonimizados do sistema SIL (Sistema Informatizado Laboratorial), de onde extrairão região de domicílio e o diagnóstico, sem dados pessoais.

O Laboratórios Geraldo Lustosa aplica um TCLE aos seus pacientes quando da coleta de material pedindo anuência para o uso da amostra para pesquisa. Tal TCLE foi apresentado.

A folha de rosto apresenta preenchimento incompleto sem a datação e sem informações do responsável institucional.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar Sala 2005 Campus Pampulha
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.983.694

Folha de rosto – assinada, mas com preenchimento incompleto.

Projeto completo – Adequado

TCUD - Adequado

Parecer consubstanciado do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia aprovando o projeto

CV do PI

Anuência do Laboratório Geraldo Lustosa

TCLE do Laboratório Geraldo Lustosa

Anuência da Funed

Conforme o Manual de Pendências da Conep (2015): "O material biológico obtido com fins assistenciais pode ser utilizado em pesquisa, desde que devidamente autorizado pelo participante, por meio de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico da pesquisa (ou, quando devidamente justificado, a obtenção de aprovação da dispensa do Termo pelo Comitê de Ética em Pesquisa). Adicionalmente, tais bancos podem solicitar seu registro, como biobanco na Conep, por meio da apresentação de um Protocolo de Desenvolvimento, que será avaliado segundo as normativas vigentes para biobancos."

Recomendações:

Para evitar atrasos no projeto, recomendo a aprovação do projeto com a recomendação de que os pesquisadores deverão submeter emenda com atualização da Folha de Rosto fornecendo todas as informações pertinentes na mesma.

Esse CEP informa que o documento de anuência para coleta de material para o diagnóstico Molecular para SARS-CoV-2, RT-qPCR, de autoria do Laboratório participante da pesquisa, não configura o TCLE para pesquisa, com requisitos da Res 466/12 e 441/11 do sistema CEP/CONEP. Nesse sentido, recomenda-se à pesquisadora levar ao Laboratório a sugestão de solicitar seu registro como biobanco na Conep, por meio da apresentação de um Protocolo de Desenvolvimento e TCLE condizente, que serão avaliados segundo as normativas vigentes para biobancos.

Este parecer considerou que se trata de material biológico obtido com fins assistenciais, caso haja constituição de biorrepositório com estas amostras para análise da pesquisa, deve-se incluir o

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 4.983.694

Termo e fazer as adequações em próxima emenda (vide: <https://www.ufmg.br/bioetica/coep/tale/biorrepositorio/>)

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Smj, somos favoráveis à aprovação do projeto desde que os pesquisadores se atentem as orientações do campo de recomendações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1743990.pdf	25/08/2021 15:22:05		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TermoUtilizacao.pdf	25/08/2021 15:19:59	Karina Braga Gomes Borges	Aceito
Folha de Rosto	Assinaturas.pdf	25/08/2021 14:50:07	Karina Braga Gomes Borges	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecerlamp.pdf	17/07/2021 15:58:04	Karina Braga Gomes Borges	Aceito
Outros	Termolustosa.pdf	15/07/2021 19:33:02	Karina Braga Gomes Borges	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Lustosa.pdf	15/07/2021 19:31:46	Karina Braga Gomes Borges	Aceito
Declaração de Pesquisadores	funed.pdf	15/07/2021 19:31:30	Karina Braga Gomes Borges	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	10/05/2021 12:07:28	Karina Braga Gomes Borges	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	Dispensa.pdf	10/05/2021 12:06:41	Karina Braga Gomes Borges	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.993.694

Ausência	Dispensa.pdf	10/05/2021 12:06:41	Karina Braga Gomes Borges	Aceito
----------	--------------	------------------------	------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 10 de Setembro de 2021

Assinado por:
Críssia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 - 2º. Andar - Sala 2005 - Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

10.2 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO RNA COM O KIT QIAAMP VIRAL RNA MINI KIT (QIAGEN®)

Protocolo proveniente do Procedimento Operacional Padrão do LINBIO (POP.LINBIO.02) – Faculdade De Farmácia - UFMG

1 Preparo dos reagentes do kit

1.1 Tampão AW1 (*AW1 Buffer*): adicionar 130 ml de etanol (96-100%) ao frasco do tampão AW1. A estabilidade da solução a temperatura ambiente é de 1 (um) ano;

1.2 Tampão AW2 (*AW2 Buffer*): adicionar 160 ml de etanol (96-100%) ao frasco do tampão AW2. A estabilidade da solução a temperatura ambiente é de 1 (um) ano;

1.3 RNA carreador (*Carrier RNA*): adicionar 1500 µL do tampão de eluição (AVE) no frasco do RNA carreador. Dissolver o *RNA carreador* completamente. Aliquotar em tubo de 0,5 µL (aproximadamente 300 µL). Armazenar as alíquotas a -20°C e não realizar mais do que três ciclos de congelamento e descongelamento.

1.4 Verificar se houve formação de precipitado no tampão de lise viral (AVL). Se necessário, incubar em banho-maria a 35°C até dissolver todo o precipitado;

2 Preparo do mix de Lise (Tampão de Lise/RNA carreador)

2.1 Preparar a mistura de RNA carreador e tampão AVL na quantidade necessária para processar o número desejado de amostras. Esta mistura deve ser preparada simultaneamente usando a seguinte fórmula

$$n \times 0.56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 10 \text{ µl/ml} = z \text{ µl}$$

Em que: n = número de amostras a serem processadas simultaneamente; y = volume calculado de AVL; z = volume calculado de solução de RNA carreador diluído em tampão AVE

3 Protocolo de extração de RNA

3.1 Guardar o RNA carreador diluído em tampão AVE no freezer (descongelar apenas três vezes);

3.2 Adicionar 560 µl da solução RNA carreador e AVL a um tubo de microcentrifuga (1,5 ml);

- 3.3 Adicionar 140 µl da amostra clínica à mistura tampão de lise-RNA carreador. Homogenizar suavemente com auxílio de uma pipeta. Importante: Garantir a homogeneização completa da amostra clínica no tampão de lise;
- 3.4 Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos;
- 3.5 Adicionar 560 µl de etanol (96-100%) à amostra. Homogeneizar suavemente com a pipeta.
- 3.6 Adicionar gentilmente 560 µl da mistura obtida acima a uma coluna de extração (inclusa no kit) inserida em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml;
- 3.7 Centrifugar a coluna de extração a 8.000 rpm por 1 (um) minuto;
- 3.8 Colocar a coluna em um novo tubo coletor de microcentrifuga de 2 ml e descartar o tubo antigo juntamente com o filtrado. Gentilmente adicionar os 700 µl restantes da mistura a esta coluna;
- 3.9 Centrifugar novamente a coluna de extração a 8.000 rpm por 1 (um) minuto. Colocar a coluna em um novo tubo coletor e descartar o tubo antigo juntamente com o filtrado;
- 3.10 Adicionar 500 microlitros do tampão de lavagem 1 (AW1) à coluna. Centrifugar na velocidade máxima (8.000 rpm) por 1 minuto;
- 3.11 Inserir as colunas em novos tubos coletores e adicionar 500 microlitros do tampão de lavagem 2 (AW2) à coluna. Centrifugar na velocidade máxima (14.000 rpm) por 3 minutos.
- 3.12 Colocar a coluna em um novo tubo coletor e descartar o tubo antigo juntamente com o filtrado. Centrifugar novamente a coluna de extração a 14.000 rpm por 1 (um) minuto;
- 3.13 Transferir a coluna para um tubo novo de microcentrifuga de 1,5 ml (não fornecido pelo kit) e descartar o tubo antigo juntamente com o filtrado;
- 3.14 Adicionar 60 microlitros do AVE em temperatura ambiente à coluna de extração. Incubar a temperatura ambiente por 1 (um) minuto;
- 3.15 Centrifugar a coluna de extração juntamente com o tubo a 8.000 rpm por 1 (um) minuto;
- 3.16 Descartar a coluna de extração no descarte específico dentro da capela de fluxo laminar;

3.17 Encaminhar as amostras refrigeradas para processamento imediato ou armazenar o RNA viral purificado a -80°C (nesta temperatura o RNA permanece estável por até um ano).

Bibliografia QIAamp® Viral RNA Mini Handbook: For purification of viral RNA from plasma, serum, cell-free body fluids, and culture supernatants.

10.3 CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO DO 54º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA MEDICINA LABORATORIAL – EXPOSIÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA.

A PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL COMO PROTAGONISTA NO APOIO À DECISÃO NO DIAGNÓSTICO

4 a 7 de outubro 2022 • FLORIANÓPOLIS • SC



54º
CONGRESSO BRASILEIRO
DE PATOLOGIA CLÍNICA
MEDICINA LABORATORIAL
• EXPOSIÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA •

CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO

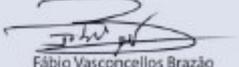
Gabriel Pissolati Mattos Bretz

Participou na qualidade de autor responsável do tema livre:
**Validação e Padronização da Técnica de LAMP para
Detecção do SARS-CoV-2**
tendo como co-autores:

**Natália Virtude Carobin; Adriano Basques
Fernandes; Fernanda Caroline Soardi; Karina Braga Gomes
Borges**


Marlene Dalla Valle Martino
Presidente do 54º Congresso Brasileiro de
Patologia Clínica/Medicina Laboratorial


Leonardo Vasconcellos
Coordenador da Comissão Científica do 54º Congresso
Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial


Fábio Vasconcellos Brazão
Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia
Clínica/Medicina Laboratorial - Biênio 2022/2023

REALIZAÇÃO  APLIAÇÃO   

10.4 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO ORIGINAL**ARTIGO ORIGINAL****VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE LAMP PARA DIAGNÓSTICO DE INFLUENZA E
SARS-COV-2 E AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA EM UM CAMPUS
UNIVERSITÁRIO**

*LAMP TECHNIQUE VALIDATION FOR INFLUENZA AND SARS-COV-2 DIAGNOSIS AND
EPIDEMIOLOGICAL EVALUATION IN A UNIVERSITY CAMPUS*

*VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE LAMP PARA EL DIAGNÓSTICO Y EVALUACIÓN
EPIDEMIOLÓGICA DE INFLUENZA Y SARS-COV-2 EN UN CAMPUS UNIVERSITARIO*

Título resumido: Validação da técnica de LAMP para epidemiologia de vírus respiratórios

Gabriel Pissolati Mattos Bretz ¹ – ORCID: 0000-0003-3716-0270, gpissolati@gmail.com

Natalia Virtude Carobim ² – ORCID: 0000-0002-3830-2640, natyvirca@gmail.com

Adriano Basques Fernandes ³ – ORCID e email

Adriano de Paula Sabino ² - ORCID: 0000-0001-8562-8689, adriansabin01@gmail.com

Fernanda Caroline Soardi ³ – ORCID: 0000-0001-7801-2974 e e-mail fersoardi@gmail.com

Karina Braga Gomes ¹ – ORCID: 0000-0002-6870-2063, karinabgb@gmail.com

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Saúde do Adulto, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

² Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

³ Laboratório Lustosa, Belo Horizonte, MG, Brasil

Autor para Correspondência:

Karina Braga Gomes

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Tel: 55 31 98482-0894. Email: karinabgb@gmail.com

Suporte: Laboratório Lustosa e Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (Linbio) da UFMG.

RESUMO

Objetivo: Investigação epidemiológica do SARS-CoV-2, Influenza A (IAV) e Influenza B (IBV) na comunidade atendida pelo programa MonitoraCOVID da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em 2022 por meio da padronização e validação da técnica de LAMP.

Métodos: Foram utilizadas amostras de *swab* nasofaríngeo nas reações de LAMP, realizadas simultaneamente nas mesmas condições com leitura visual. Para investigação epidemiológica, foram testados 10% do quantitativo mensal atendido pelo MonitoraCOVID. **Resultados:** As reações de LAMP demonstraram sensibilidade de 84,0% e 85,2% para o SARS-CoV-2 e IAV respectivamente. A prevalência de IBV foi baixa para análise dos parâmetros analíticos. A especificidade obtida foi de 100% nas três reações. A taxa anual de positividade encontrada foi: SARS-CoV-2 - 28,7%, IAV - 1,6%, IBV - 0,0%. Foram encontrados resultados indeterminados para SARS-CoV-2 e IAV (0,8% cada). **Conclusão:** O ensaio de LAMP foi capaz de avaliar a epidemiologia dos vírus respiratórios na comunidade da UFMG.

Palavras-chave: LAMP, SARS-CoV-2, INFLUENZA A, INFLUENZA B.

ABSTRACT

Objective: SARS-CoV-2, Influenza A (IAV) and Influenza B (IBV) epidemiological investigation in the community served by the MonitoraCOVID program of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) in 2022 through the standardization and validation of the LAMP technique. **Method:** Nasopharyngeal swab samples were used in the LAMP reactions, performed simultaneously under the same conditions with visual reading. For epidemiological investigation, 10% of the monthly amount assisted by MonitoraCOVID were tested. **Results:** LAMP reactions demonstrated sensitivity of 84.0% and 85.2% for SARS-CoV-2 and IAV respectively. The prevalence of IBV was low for analysis of analytical parameters. The specificity obtained was 100% in the three reactions. The annual positivity rate found was: SARS-CoV-2 - 28.7%, IAV - 1.6%, IBV - 0.0%. Indeterminate results were found for SARS-CoV-2 and IAV (0.8% each). **Conclusion:** The LAMP assay was able to assess the epidemiology of respiratory viruses in the UFMG community.

Keywords: LAMP, SARS-CoV-2, INFLUENZA A, INFLUENZA B.

1. INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias agudas (IRAs) são um problema de saúde pública mundial, afetando indivíduos de todas as idades e causando impactos sociais¹. As IRAs são o principal motivo de morte de crianças em países em desenvolvimento, sendo cerca de 80% dessas infecções de etiologia viral². Os principais patógenos respiratórios virais, como Influenza e SARS-CoV-2 possuem sinais clínicos inespecíficos associados que variam desde sintomas leves confinados à parte superior do trato respiratório e caracterizado por febre, coriza, tosse, dor de cabeça e dores musculares, até pneumonia grave e co-infecção bacteriana secundária do trato respiratório inferior, podendo levar ao óbito³.

Os vírus Influenza A (IAV) já foram responsáveis por pandemias, como a Gripe Espanhola (1918), o H1N1 pandêmico (2009), e junto ao Influenza B (IBV) causam recorrentes episódios de epidemia⁴. O genoma de RNA (ácido ribonucleico) segmentado e circulação do IAV em animais, como aves migratórias e porcos, contribuem para a formação de subtipos virais diversos através do processo de “*antigenic shift*”. Este processo permite que as proteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), de alta variabilidade antigênica, possam ser trocadas entre estirpes virais por rearranjo após coinfecção do mesmo hospedeiro^{1,5}.

O SARS-CoV-2, coronavírus humano descrito em 2019 na cidade de Wuhan na China⁶⁻⁷, é o causador da pandemia de COVID-19, iniciada em 2020 e responsável pela morte de 6,8 milhões de pessoas⁸. Logo após sua identificação, o SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente em todo o mundo, causando o colapso de alguns serviços de saúde⁹⁻¹⁰ e posteriormente evoluindo para variantes de preocupação que causaram novos surtos¹¹. As frequentes transmissões inter e intra espécies e a capacidade mutacional do vírus contribuem para o surgimento de novas estirpes de coronavírus¹².

Tradicionalmente o diagnóstico das IRAs é realizado com base nos sinais clínicos e informações epidemiológicas. Porém, em decorrência do amplo espectro e baixa especificidade dos sintomas, curto período de incubação dos vírus e transmissão por meio de secreções contaminadas por aerossóis, gotículas ou objetos contaminados, o diagnóstico laboratorial rápido e preciso torna-se importante no sentido de distinguir o agente etiológico e contribuir para o melhor entendimento da dinâmica de transmissão desses vírus. Testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction* – PCR), permitem o diagnóstico laboratorial com alta sensibilidade e especificidade, porém são caros para os sistemas de saúde, pois exigem mão de obra especializada e estrutura tecnológica. Em 2000¹³ foi desenvolvida a técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (*loop-mediated isothermal amplification* – LAMP), que exige estrutura laboratorial menos complexa e é capaz de detectar alvos moleculares com alta especificidade, sensibilidade e menor custo do que os testes moleculares tradicionais. A enzima *Bst* polimerase, que possui característica desnaturante, permite que a reação de amplificação ocorra em temperatura constante e seja realizada em equipamentos de menor complexidade como termoblocos e banho-maria. A isotermia da reação junto ao número de iniciadores (4 a 6) utilizados na LAMP, que amplificam o alvo genômico de maneira fatorial, e a possibilidade de detecção e interpretação do teste por olho nu, explicam o menor custo e tempo de reação quando comparado com a PCR e tornam esse ensaio passível de ser utilizado como teste laboratorial remoto¹⁴⁻¹⁵.

Diante deste cenário, o diagnóstico molecular das infecções respiratórias agudas virais acessível torna-se essencial no controle epidemiológico de surtos pandêmicos e/ou epidêmicos, a fim de mitigar impactos na saúde pública e economia dos países. Além disso, o conhecimento da dinâmica das infecções em nosso meio possibilita a tomada de decisão mais

rápida e assertiva no seu controle através da adoção de políticas de saúde pública. Para controlar surtos com sucesso, o diagnóstico deve ter alta sensibilidade e especificidade, e estar disponível à toda população e tecnicamente aos sistemas de saúde locais. Neste estudo foi validado e padronizado o ensaio LAMP para avaliar a frequência dos principais vírus relacionados à IRA em indivíduos sintomáticos no ano de 2022 pertencentes à comunidade da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. PROGRAMA MONITORACOVID UFMG E AMOSTRAS UTILIZADAS

O programa MonitoraCOVID da UFMG teve o objetivo de identificar precocemente casos suspeitos ou confirmados de COVID-19 na comunidade da UFMG para evitar sua circulação, bem como instituir medidas de controle de surtos da doença na universidade, através do monitoramento por meio do questionário de auto verificação de sintomas, preenchido pela comunidade antes de comparecer às dependências da universidade. O sistema deu suporte ao Telecovid-19, o qual realizava a avaliação remota do paciente e indicação, se necessário, do teste de RT-qPCR para o diagnóstico do SARS-CoV-2. A coleta das amostras por meio de swab nasofaríngeo e os exames eram realizados no Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (Linbio-UFMG), localizado na Faculdade de Farmácia, UFMG. O resultado era então liberado na plataforma do MonitoraCOVID e uma cópia enviada ao paciente para confirmar o diagnóstico e seu afastamento das atividades.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, sob número 4.963.694.

2.2. SELEÇÃO DOS INICIADORES DE LAMP

Os iniciadores utilizados para a identificação do SARS-CoV-2, IAV, IBV e controle endógeno humano por meio do LAMP são mostrados na **Tabela 1**. Foi realizada conferência do alinhamento de suas sequências com o genoma viral de referência e estirpes circulantes, utilizando-se a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O controle endógeno foi utilizado para garantir a presença do material genético humano, indicando conformidade no processo de coleta do material e de análise da extração do material genético.

TABELA 1 – Sequências de iniciadores utilizados para identificação do SARS-CoV-2, IAV, IBV e controle endógeno por meio da técnica de LAMP¹⁶⁻¹⁷.

SARS-CoV-2 (Gene E)¹⁶	
E-F3	TGAGTACGAACTTATGTACTCAT
E-B3	TTCAGATTTTTAACACGAGAGT
E-FIP	ACCACGAAAGCAAGAAAAAGAAGTTCGTTTCGGAAGAGACAG
E-BIP	TTGCTAGTTACACTAGCCATCCTTAGGTTTTACAAGACTCACGT
E-LF	CGCTATTA ACTATTAACG
E-LB	GCGCTTCGATTGTGTGCGT
IAV (Gene da matriz)¹⁷	
IAV-F3-1	GACTTGAAGATGTCTTTGC
IAV-F3-2	GACTGGAAAGTGTCTTTGC
IAV-B3-1	TRTTATTTGGGTCTCCATT
IAV-B3-2	TRTTGTTTGGGTCCCCATT
IAV-FIP	TTAGTCAGAGGTGACARRATTGCAGATCTTGAGGCTCTC
IAV-BIP	TTGKTTTCACGCTCACCGTGTGGACAAAGCGTCTACG
IAV-LF	GTCTTGTCTTTAGCCA
IAV-LB	CMAGTGAGCGAGGACTG
IBV (Gene NS)¹⁷	
IBV-F3	GCAACCAATGCCACCATA
IBV-B3	TTCTCTCTTCAAGRGACATC
IBV-FIP	TAGTCAAGGGCYCTTTGCCACTTTGAAGCAGGAATTCTGGA
IBV-BIP	CAAGACCGCCTAAACAGACTAACTTTTACTTTCAGGCTCACTT
IBV-LF	TGAAAGYCTTTCATAGCAC
IBV-LB	CAAGAATAAAGACTCACAAC
Controle endógeno (Gene ACTB Humano)¹⁶	
IBV-F3	AGTACCCCATCGAGCACG
IBV-B3	AGCCTGGATAGCAACGTACA
IBV-FIP	GAGCCACACGCAGCTCATTGTATCACCAACTGGGACGACA
IBV-BIP	CTGAACCCCAAGGCCAACCGGCTGGGGTGTGTAAGGTC
IBV-LF	TGTGGTGCCAGATTTTCTCCA
IBV-LB	CGAGAAGATGACCCAGATCATGT

IAV: influenza A, IBV: influenza B.

2.3. PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE LAMP

Para a reação de LAMP, foram utilizados iniciadores dessalinizados (IDT®) descritos na

Tabela 1, com rendimento mínimo de 35 nmoL, e *mastexmix WarmStart Colorimetric LAMP*

2X da New England Biolabs®. As condições das reações de LAMP, otimizadas e padronizadas para a identificação do SARS-CoV-2, IAV e IBV e controle endógeno humano, estão no **Material Suplementar 1**.

As reações ocorreram em um termociclador Veriti (Thermo®) com variações na temperatura (de 63° a 65°C) e tempo de reação (de 20 a 35 minutos). Foram utilizadas amostras de secreção nasofaríngea coletadas por *swab* de pacientes sintomáticos para infecção respiratória aguda, que realizaram a coleta através do MonitoraCOVID UFMG, com resultado conhecido pela técnica padrão-ouro de RT-qPCR. O RNA viral foi extraído do *swab* utilizando-se o mini kit *QIAamp Viral RNA* (QIAGEN), conforme protocolo do fabricante.

2.4. CÁLCULO DAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DA REAÇÃO

Para os ensaios padronizados, foram calculados a sensibilidade e especificidade analíticas, acurácia, valor preditivo negativo (VPN) e positivo (VPP), índice Kappa, erros tipo I e II intervalo de confiança de 95%. Foram considerados as seguintes métricas para avaliação das características analíticas para obtenção de um bom teste: Especificidade >95%, Sensibilidade >80%, Erro tipo I $\leq 0,05$, Erro tipo II $< 0,20$, Erro tipo I + II $\leq 0,25$ ¹⁸.

Para o conjunto de iniciadores do SARS-CoV-2, foram testadas 50 amostras com resultado conhecido por RT-qPCR (Invitrogen®; alvos Genes N e controle interno RNase P) sendo 25 com resultado detectável e 25 não detectável (4 dentre essas amostras clínicas detectáveis para IAV e uma detectável para IBV). Para o conjunto de iniciadores do IAV, foram testadas 52 amostras com resultados conhecidos por RT-qPCR (INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos®, alvo gene M do IAV), sendo 27 com resultado detectável, 25 não detectável (8 dentre essas amostras clínicas detectáveis para SARS-CoV-2 e uma detectável para IBV). Já para o conjunto de iniciadores do IBV, foram testadas 26 amostras com resultados conhecidos por RT-qPCR (INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos®, alvo gene NS1 do IBV), sendo 1 com

resultado detectável e 25 não detectável (2 amostras de coinfeção de SARS-CoV-2 e IAV, 6 detectáveis para SARS-CoV-2, e 2 detectáveis para IAV). Foi testado um isolado viral em cultura de IBV nas diluições 1:8, 1:64, 1:256 e 1:512 fornecido pela Fundação Ezequiel Dias-MG.

2.5. AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA EM AMOSTRAS DO MONITORACOVID UFMG E VALIDAÇÃO DO LAMP

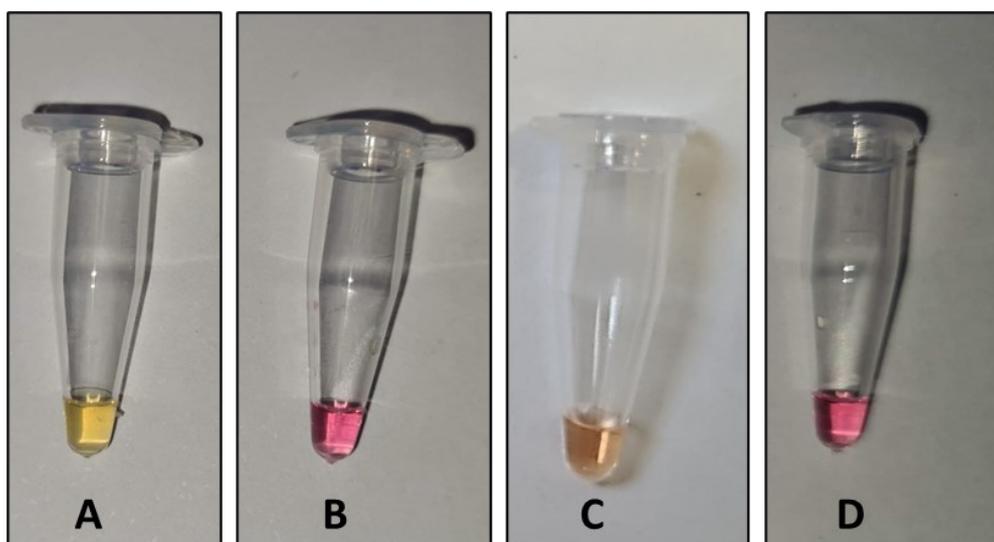
Para validação do teste, o ensaio padronizado foi aplicado a 10% do quantitativo mensal das amostras de secreção nasofaríngea de pacientes sintomáticos com suspeita clínica de infecção respiratória aguda coletados no Linbio por meio do programa MonitoraCOVID UFMG no ano de 2022.

3. RESULTADOS

3.1. PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE LAMP

As reações para detecção de SARS-CoV-2, IAV e IB foram padronizadas nas mesmas condições: temperatura de 65°C, com tempo de amplificação de 30 minutos (**Figura 1**), condições cruciais para a especificidade da técnica LAMP, evitando reações inespecíficas.

Figura 1: Detecção visual da reação de LAMP para SARS-CoV-2



Amostra A: controle positivo (reagente), amostra B: controle negativo (não reagente), amostra C: amostra clínica (indeterminada), amostra D: branco (não reagente). Foto tirada ao final da reação de 30 minutos.

3.2. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO ENSAIO DE LAMP PADRONIZADO

As características analíticas obtidas para as reações de LAMP padronizadas para SARS-CoV-2 e IAV estão dentro das métricas consideradas para a obtenção de um bom teste¹⁸. Não foi possível determinar estas métricas para o IBV em função da baixa positividade nas amostras utilizadas para a padronização e baixa prevalência na população em geral. O índice Kappa encontrado foi de 0,84 (IC 95%: 0,69-0,98) para o SARS-CoV-2 e 0,85 (IC 95%: 0,70-0,98)

para IAV, que significa ótima concordância¹⁹ com relação ao ensaio de referência (RT-PCR) (Tabela 2).

TABELA 2: Características analíticas do conjunto de iniciadores para SARS-CoV-2 e IAV.

	SARS-CoV-2		IAV	
	%	IC (95%) Limite	%	IC (95%) Limite
Sensibilidade	84,0	(65,3 - 93,6)	85,2	(67,5 - 94,1)
Especificidade	100	(86,7 - 100)	100	(86,7 - 100)
Acurácia diagnóstica	92,0	(81,2 - 96,8)	92,3	(81,8 - 97,0)
Prevalência		17,6*		1,7*
Valor preditivo positivo	100	(51,2 - 100)	100	(8,1 - 100)
Valor preditivo negativo	96,7	(92,1 - 98,7)	99,7	(99,4 - 100)
<hr/>				
Índice Kappa	0,84 (0,69 – 0,98)		0,85 (0,70 – 0,98)	
Erro tipo I (pFP)	0,00		0,00	
Erro tipo II (pFN)	0,16		0,15	
pFP + pFN	0,16		0,15	

* Prevalência na população de Minas Gerais segundo FUNED-MG em 2022 (dados não publicados). pFP: probabilidade de falso-positivo; pFN: probabilidade de falso-negativo.

Dentre as amostras testadas para a padronização dos ensaios de SARS-CoV-2 e IAV, foram obtidos 4 resultados falso-negativos para cada teste. Os resultados foram confirmados pela técnica de LAMP em 2 dias diferentes e ainda através do Kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos® (RT-qPCR). Todas essas amostras com resultado falso negativo apresentaram Ct (*Cycle threshold*) >31 para o seu respectivo alvo na reação de RT-qPCR.

Todas as 26 amostras testadas para o IBV mostraram concordância com o resultado da PCR-qRT, porém em decorrência da disponibilidade de somente uma amostra sabidamente detectável, o cálculo das métricas analíticas não foi realizado. Para complementar este resultado, o isolado viral para IBV foi diluído nas concentrações 1:8, 1:64, 1:256 e 1:512 para verificar a sensibilidade da reação, a qual confirmou a positividade em todas as diluições

Material Suplementar 2.

3.3. AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES ATENDIDOS PELO MONITORACOVID UFMG E VALIDAÇÃO DO LAMP

No ano de 2022, o programa MonitoraCOVID UFMG realizou a coleta de amostras nasofaríngeas de 2.426 pacientes sintomáticos para IRAs para fins e detecção do SARS-Cov-2. O ensaio de LAMP padronizado foi aplicado a uma amostragem de 243 pacientes para a avaliação epidemiológica, correspondente a 10% dos testes realizados em cada mês (**Material Suplementar 3**). A distribuição dessas coletas foi variável entre os meses de 2022, sendo maior no mês de julho, seguido de janeiro e maio, e menor nos meses de outubro, março e setembro.

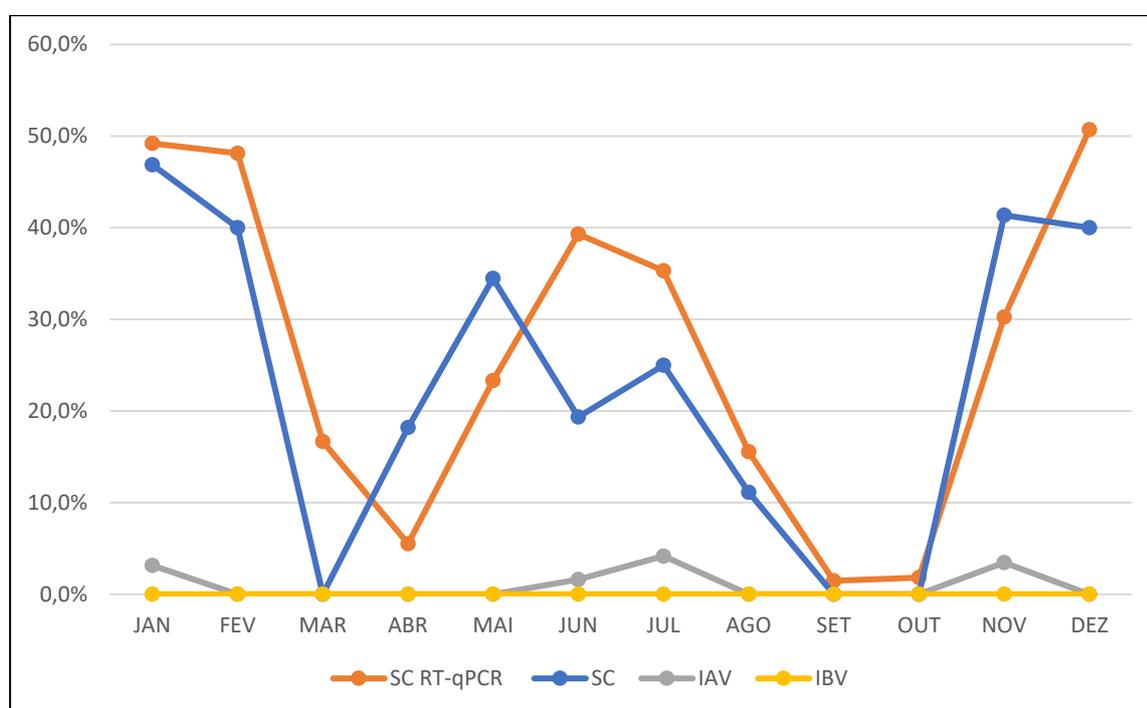
A média de idade da população testada foi de 34,3 anos, sendo 158 amostras (65%) de pacientes do sexo feminino e 85 (35%) masculino, dentre os quais 151 (62%) reportaram nunca terem o diagnóstico da COVID-19, 76 (31%) relataram já terem sido diagnosticados anteriormente e 16 (7%) não informaram. Os sintomas reportados pelos pacientes foram: coriza, congestão nasal, dor de cabeça, dor no corpo, distúrbios olfativos, distúrbios gustativos, tosse, dor de garganta, febre, dispneia, fraqueza e diarreia.

A taxa de positividade encontrada pela LAMP para o SARS-CoV-2 foi de 28,7%, para o IAV de 1,6%, e para o IBV 0,0%. Não foram encontrados resultados de coinfeção entre as amostras testadas.

Janeiro foi o mês com maior taxa de positividade (46,9%) para o SARS-CoV-2, seguido de novembro (41,4%), dezembro e fevereiro (40,0% cada). O SARS-CoV-2 não foi detectado nas amostras testadas dos meses de março, setembro e outubro. Para o IAV, foi detectada uma amostra positiva nos meses de janeiro, junho, julho e novembro, representando taxa de positividade de 3,1%, 1,6%, 4,2% e 3,4% respectivamente. A taxa anual de amostras negativas foi de 66,9%.

A taxa de positividade para o SARS-CoV-2 encontrada por RT-qPCR no programa MonitoraCOVID UFMG foi maior nos meses de dezembro (50,7%) e janeiro (49,2%) e menor em setembro (1,5%) e outubro (1,8%), seguido de abril com 5,5% (**Figura 2**), resultados comparáveis ao encontrados através da reação de LAMP.

FIGURA 2: Taxa de positividade por mês dos vírus SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B em amostras do programa MonitoraCOVID UFMG.



SC RT-qPCR: SARS-CoV-2 testado pela técnica de RT-qPCR no total de amostras do programa MonitoraCOVID UFMG. SC: SARS-CoV-2 testado por LAMP; IAV: Influenza A testado por LAMP; IBV: Influenza B testado por LAMP. Para a reação de LAMP foi testado 10% do quantitativo mensal correspondente ao número de amostras testadas através de RT-qPCR.

Dentre as reações realizadas, foram obtidos 0,8% de resultados indeterminados para SARS-CoV-2 e IAV cada e 1,2% de resultados inválidos, em que o controle endógeno (gene ACTB) não foi amplificado durante a reação.

4. DISCUSSÃO

O diagnóstico molecular de vírus respiratórios é uma importante ferramenta no combate da transmissão dos vírus e contenção dos surtos epidemiológicos. Entretanto, o diagnóstico laboratorial usualmente exige estrutura sofisticada, equipamentos de alto custo e pessoal qualificado²⁰. A técnica de LAMP pode ser uma alternativa a essas barreiras, pois permite que a reação seja realizada em ambiente ambulatorial ou em equipamentos comuns de laboratórios, como banho maria ou termobloco em um tempo menor de reação de até 30 minutos¹⁵. No presente estudo, reações de LAMP para a detecção dos vírus SARS-CoV-2, IAV e IBV em amostras de *swab* de nasofaringe foram padronizadas. As reações podem ser realizadas simultaneamente em um mesmo equipamento em temperatura constante de 65°C com tempo de detecção de apenas 30 minutos.

O índice Kappa encontrado nos ensaios de LAMP para SARS-CoV-2 (0,84- IC 95%: 0,69-0,98) e IAV (0,85 - IC 95%: 0,70-0,98) demonstram ótima concordância da reação com relação ao ensaio de referência (RT-PCR) e próximo aos observados na literatura^{17, 21-22}. Nenhuma das amostras testadas sabidamente não detectáveis, incluindo amostras detectáveis para os outros vírus respiratórios, tiveram resultado falso positivo, em concordância com o estudo realizado por Takayama e colaboradores em 2019, os quais utilizaram o mesmo conjunto de iniciadores para IAV e IBV em 113 amostras do trato respiratório (aspirados, secreções e *swabs*)¹⁷. Alves e colaboradores (2021) demonstraram também que o ensaio de LAMP para SARS-CoV-2 não apresentou resultado falso positivo com amostras de vírus sincicial respiratório e arbovírus²³. O erro tipo I (pFP) de 0,00 e especificidade e VPP de 100% obtidos neste estudo reforçam a confiabilidade dos resultados positivos nas reações padronizadas de LAMP.

Com relação às métricas de sensibilidade, foram obtidos resultados satisfatórios, 84,0% (SARS-CoV-2) e 85,2% (IAV), e concordantes com a literatura^{17, 22, 24}. As reações padronizadas demonstraram ter sensibilidade diminuída em amostras com o $Ct > 31$ na RT-qPCR, o que já foi evidenciado em outros estudos realizados anteriormente^{17, 21, 23}. O Ct é o número do ciclo em que a fluorescência emitida pela amplificação da qPCR ultrapassa o *threshold* (nível arbitrário de fluorescência). Dessa forma é possível correlacionar o valor de Ct da qPCR com a carga viral da amostra, pois quanto menor o Ct maior é a quantidade do alvo molecular presente na amostra analisada. Por outro lado, é importante entender que o Ct das amostras pode ter grande variação de acordo com o kit diagnóstico, alvo de amplificação e forma de coleta, já que não é possível garantir a quantidade exata de material coletado através do *swab* de nasofaringe²⁵. Além disso, fatores pré-analíticos, como temperatura de transporte e do processamento da amostra podem interferir em sua estabilidade e degradar o alvo molecular. A utilização de mais de um alvo para o mesmo vírus, como a pesquisa dos genes E e N para o SARS-CoV-2 e adição de hidrocloreto de guanidina são estratégias já utilizadas que podem aumentar a sensibilidade dos ensaios de LAMP¹⁶.

Os cálculos para obtenção das características analíticas para a reação padronizada para o IBV não foram realizados em decorrência da disponibilidade de somente uma amostra sabidamente detectável. Serviços de vigilância de IBV demonstram baixos níveis de circulação do vírus desde a adoção de medidas de isolamento em 2020 devido à pandemia de COVID-19²⁶⁻²⁷, o que é reforçado pelos resultados encontrados no levantamento epidemiológico realizado (taxa de positividade de 0% para o IBV em 2022). A reação de LAMP foi capaz de detectar o vírus na única amostra clínica detectável por RT-qPCR e no isolado viral concentrado e nas diluições de 1:8, 1:64, 1:256 e 1:512, o que sugere que o ensaio pode ter também boa

sensibilidade. A sensibilidade reportada na literatura para esse mesmo conjunto de iniciadores foi de 90,9%¹⁷.

O alvo ACTB foi escolhido como controle endógeno da reação por ser um gene constitutivo, ou seja, parte do metabolismo básico e processos essenciais para a sobrevivência das células e de baixa variabilidade gênica. O uso do controle interno tem papel importante nas reações que utilizam amostras do trato respiratório, pois ele controla processos prévios à etapa de amplificação, como a extração do material genético, e permite avaliar se o processo de coleta foi realizado de maneira adequada, evitando resultados falsos negativos. Uma eventual falha na amplificação do controle endógeno pode ocorrer por fatores que podem interferir individualmente em cada reação, como substâncias inibidoras das amostras, meio de transporte inadequado ou dificuldades de coleta²⁸. O estudo obteve 3 amostras (1,2%) com resultado indeterminado/negativo para o controle endógeno ACTB.

É importante ressaltar que o VPP e o VPN dependem da prevalência do vírus na população e do número de amostras utilizadas. Não existem testes laboratoriais que apresentem 100% de sensibilidade e especificidade, assim resultados discrepantes entre testes distintos podem ocorrer. As características analíticas dos ensaios laboratoriais dependem também de fatores pré-analíticos, como o tipo de material de análise, forma de coleta, transporte e armazenamento da amostra, forma de extração da amostra e até sintomas e dias de sintomas do paciente²⁹.

A testagem de amostras de coinfeção de SARS-CoV-2 com IAV e de amostras detectáveis para outros vírus respiratórios, diferentes do alvo do ensaio, é importante para avaliar se a reação pode ser inibida ou amplificar de maneira inespecífica pela presença de outros vírus que causam manifestações clínicas semelhantes. As reações de LAMP não demonstraram serem inibidas pela presença de outros vírus diferente do alvo pesquisado. Em 2022, vários

pacientes foram diagnosticados com “Flurona”, quando o diagnóstico laboratorial identifica a presença do Influenza e SARS-CoV-2 na mesma amostra do paciente³⁰, reforçando a necessidade de um ensaio que não sofra interferência com a coinfeção.

Com relação às condições de reação de LAMP já reportadas em outros estudos¹⁶⁻¹⁷, houve comparativamente diminuição no volume dos reagentes consumidos e do tempo de reação. Além disso, observou-se que as reações para os 4 alvos podem ser realizadas simultaneamente no mesmo equipamento e nas mesmas condições, beneficiando o paciente por realizar a pesquisa de mais de um alvo viral que possui manifestações clínicas semelhantes e por otimizar custo e tempo de reação no laboratório. Em comparação com a técnica de RT-qPCR, a reação padronizada demonstrou ter menor tempo de amplificação, o que possibilita um diagnóstico laboratorial mais rápido. Por outro lado, os resultados encontrados demonstram que um resultado negativo através da técnica de LAMP não exclui o diagnóstico dos vírus respiratórios avaliados, sendo necessário também a avaliação epidemiológica e clínica do paciente.

O estudo encontrou, dentro as 243 amostras testadas, taxa de positividade para o SARS-CoV-2 de 28,7%, próxima a taxa encontrada pelo LINBIO (33,6%) nas amostras do programa MonitoraCOVID UFMG (Dados não publicados – LINBIO/UFMG). Os resultados encontrados demonstram variação da positividade para o SARS-CoV-2 no ano de 2022, com as maiores taxas nos 2 primeiros e últimos meses do ano e menores entre março e abril, e agosto e outubro. Não foram encontradas amostras detectáveis para o IBV na avaliação epidemiológica realizada, assim como no estudo realizado no LINBIO com amostras do primeiro semestre de 2022 do programa MonitoraCOVID UFMG (Dados não publicados – LINBIO/UFMG). A taxa anual de positividade para IAV encontrada no estudo foi de 1,6%,

bem próxima à taxa de 1,7%, encontrada pela FUNED-MG em amostras de 2022 (dados não publicados – FUNED/MG).

O número de amostras testadas nos meses em que a procura pelo programa MonitoraCOVID UFMG foi menor é um limitante do estudo e influencia na taxa de positividade dos vírus pesquisados. Nos meses de março, setembro e outubro por exemplo, nenhuma amostra testou positiva para nenhum dos vírus pesquisados, porém considerando 10% do quantitativo total de amostras do MonitoraCOVID UFMG, foram testadas somente 7 amostras em setembro e março e 6 em outubro.

Durante o levantamento epidemiológico, o estudo encontrou 5 amostras com resultados indeterminados (2 para SARS-CoV-2, 2 para IAV e 1 para o controle endógeno ACTB). Isso ocorre porque a interpretação do ensaio de LAMP é realizada de forma visual, através da cor da solução, rosa (não reagente), amarelo (reagente) e laranja (indeterminado). Nessa condição, o mesmo material genético extraído, ou resultante de uma nova extração, deve ser utilizado para uma nova corrida de LAMP e confirmação do resultado, mas é importante entender a clínica do paciente e o tempo de sintomas, os quais podem explicar os resultados indeterminados. No caso de resultados indeterminados para o controle endógeno, é importante avaliar nova extração do material coletado e, caso o resultado persista, avaliar coleta de nova amostra, já que um resultado indeterminado para o controle endógeno indica quantidade insuficiente do material coletado, o que diminui a sensibilidade do teste e prejudica na pesquisa dos vírus respiratórios. O estudo encontrou 2 amostras negativas para o controle endógeno ACTB, invalidando a reação.

Como limitações do estudo pode-se considerar o limitado tamanho amostral incluído para a validação da técnica de LAMP padronizada, sendo necessário aplicá-la em outras populações com variações nos tempos de sintomas e gravidade da doença. No entanto, os resultados deste

estudo já podem beneficiar laboratórios que não possuem estrutura de diagnóstico molecular já estabelecida, especialmente em ambientes hospitalares, em que a necessidade da identificação da etiologia viral é mais urgente devido ao direcionamento da conduta clínica para tratamento dos pacientes. A maior disseminação do diagnóstico molecular de maneira rápida e eficaz pode contribuir para o combate efetivo dos surtos e minimização dos impactos à saúde e econômicos.

Contribuição dos autores

Gabriel Pissolati Mattos Bretz: concepção e delineamento do estudo, análise e interpretação dos resultados, redação e revisão crítica do conteúdo do manuscrito

Natalia Virtude Carobin: concepção e delineamento do estudo, análise e interpretação dos resultados, redação e revisão crítica do conteúdo do manuscrito

Adriano Basques Fernandes: concepção e delineamento do estudo

Adriano de Paula Sabino: concepção, parque de equipamentos e disponibilização de reagentes

Fernanda Caroline Soardi: concepção e delineamento do estudo, análise e interpretação dos resultados, redação e revisão crítica do conteúdo do manuscrito

Karina Braga Gomes: concepção e delineamento do estudo, análise e interpretação dos resultados, redação e revisão crítica do conteúdo do manuscrito

Agradecimentos:

Carlos Abelardo dos Santos (Instituto de Ciências Biológicas da UFG), Elisângela de Paula Silveira Lacerda Santos (Instituto de Ciências Biológicas da UFG), Hyllo Baeta Marcello Junior (Fundação Ezequiel Dias), Laura Gomes Xavier (Faculdade de Farmácia da UFMG), Gabrielle Sousa Vianna (Laboratório Codon Biotecnologia), Marcos Vinícius Ferreira Silva (Fundação Ezequiel Dias)

Contribuições do estudo

Principais resultados: Índice Kappa de 0,85 (SARS-CoV-2) e 0,86 (IAV), indicando ótima correlação clínica com RT-qPCR. Taxa de positividade em 2022 foi: SARS-CoV-2 - 28,7%, IAV - 1,6%, IBV - 0,0%. Foram encontrados resultados indeterminados para SARS-CoV-2 e IAV (0,8% cada).

Implicações para os serviços: A reação padronizada possibilita o diagnóstico molecular com menor custo e tempo, além de permitir sua utilização de maneira remota e em laboratórios sem estrutura de diagnóstico molecular.

Perspectivas: A disseminação do diagnóstico molecular rápido e acessível a diferentes complexidades do sistema de saúde é uma importante ferramenta para o combate de surtos e minimização de impactos à saúde e econômicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Peteranderl C, Herold S, Schmoldt C. Human Influenza Virus Infections. 2016 [citado 20 de janeiro de 2021]; Disponível em: <http://dx.doi.org/>
2. Mahony JB, Petrich A, Smieja M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. Crit Rev Clin Lab Sci [Internet]. 2011 [citado 19 de janeiro de 2021];48:217–49. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10408363.2011.640976>
3. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza [Internet]. Vol. 4, Nature Reviews Disease Primers. Nature Publishing Group; 2018 [citado 20 de janeiro de 2021]. p. 1–21. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29955068/>
4. Wikramaratna PS, Gupta S. Influenza outbreaks. Cell Microbiol [Internet]. 1o de julho de 2009 [citado 20 de janeiro de 2021];11(7):1016–24. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2009.01320.x>
5. Bukasov R, Dossym D, Filchakova O. Detection of RNA viruses from influenza and HIV to Ebola and SARS-CoV-2: a review. Analytical Methods. 2021;
6. Nguyen T, Bang DD, Wolff A. 2019 Novel coronavirus disease (COVID-19): Paving the road for rapid detection and point-of-care diagnostics. Micromachines (Basel) [Internet]. 14 de março de 2020 [citado 20 de janeiro de 2021];11(3):1–7. Disponível em: www.mdpi.com/journal/micromachines
7. Zhuang J, Yin J, Lv S, Wang B, Mu Y. Advanced “lab-on-a-chip” to detect viruses – Current challenges and future perspectives. 2020;(January).
8. Organização Mundial da Saúde (OMS), 2022. Painel de controle Coronavirus(COVID-19). OMS, 29 jun. 2022. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 09 mar. 2023.

9. Carda S, Invernizzi M, Bavikatte G, Bensmail D, Bianchi F, Deltombe T, et al. coVid-19 pandemic. What should physical and rehabilitation Medicine specialists do? a clinician's perspective. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2020;56(4):515–24.
10. Silva SJR da, Pena L. Collapse of the public health system and the emergence of new variants during the second wave of the COVID-19 pandemic in Brazil. *One Health*. 1o de dezembro de 2021;13:100287.
11. Li J, Lai S, Gao GF, Shi W. The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. *Nature* 2021 600:7889 [Internet]. 8 de dezembro de 2021 [citado 13 de junho de 2022];600(7889):408–18. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-04188-6>
12. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. 2016 [citado 20 de janeiro de 2021]; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
13. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 [citado 20 de janeiro de 2021];28(12). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10871386/>
14. Hu X, Deng Q, Li J, Chen J, Wang Z, Zhang X, et al. Development and Clinical Application of a Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for SARS-CoV-2 Infection. *mSphere* [Internet]. 26 de agosto de 2020 [citado 25 de fevereiro de 2023];5(4). Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00808-20>.
15. Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. 2017 [citado 17 de janeiro de 2021]; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.016>

16. Zhang Y, Tanner NA. Development of Multiplexed RT-LAMP for Detection of SARS-CoV-2 and Influenza Viral RNA doi: medRxiv preprint. medRxiv [Internet]. 2020;2020.10.26.20219972. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.10.26.20219972>
17. Takayama I, Nakauchi M, Takahashi H, Oba K, Semba S, Kaida A, et al. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus. 2019 [citado 29 de julho de 2022]; Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.02.010>
18. FONSECA, A. et al. Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. MAPA/ACS, Brasília. 57p, 2015. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/arquivos-publicacoes-laboratorio/biomol_final_baixa.pdf
19. LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159, mar. 1977. Acesso em: 17 ago. 2022.
20. Krishna NK, Cunnion KM. Role of molecular diagnostics in the management of infectious disease emergencies. *Med Clin North Am* [Internet]. novembro de 2012 [citado 12 de agosto de 2022];96(6):1067–78. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23102477/>
21. Aoki MN, de Oliveira Coelho B, Góes LGB, Minoprio P, Durigon EL, Morello LG, et al. Colorimetric RT-LAMP SARS-CoV-2 diagnostic sensitivity relies on color interpretation and viral load. *Scientific Reports* 2021 11:1 [Internet]. 27 de abril de 2021 [citado 19 de

agosto de 2022];11(1):1–10. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-88506-y>

22. Nakauchi M, Yoshikawa T, Nakai H, Sugata K, Yoshikawa A, Asano Y, et al. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *J Med Virol* [Internet]. 1o de janeiro de 2011 [citado 25 de fevereiro de 2023];83(1):10–5. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.21934>

23. Alves PA, de Oliveira EG, Franco-Luiz APM, Almeida LT, Gonçalves AB, Borges IA, et al. Optimization and Clinical Validation of Colorimetric Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification, a Fast, Highly Sensitive and Specific COVID-19 Molecular Diagnostic Tool That Is Robust to Detect SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Microbiol*. 18 de novembro de 2021;12:3172.

24. Mandu Baba M, Bitew M, Fokam J, Lelo EA, Ahidjo A, Asmamaw K, et al. Diagnostic performance of a colorimetric RT -LAMP for the identification of SARS-CoV-2: A multicenter prospective clinical evaluation in sub-Saharan Africa. *EClinicalMedicine* [Internet]. 2021 [citado 25 de fevereiro de 2023];40:101101. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101101>

25. Rhoads D, Peaper DR, She RC, Nolte FS, Wojewoda CM, Anderson NW, et al. College of American Pathologists (CAP) Microbiology Committee Perspective: Caution Must Be Used in Interpreting the Cycle Threshold (Ct) Value. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 18 de maio de 2021 [citado 20 de agosto de 2022];72(10):e685–6. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/72/10/e685/5891762>

26. Chow EJ, Uyeki TM, Chu HY. The effects of the COVID-19 pandemic on community respiratory virus activity. *Nature Reviews Microbiology* 2022 21:3 [Internet]. 17 de outubro de 2022 [citado 8 de março de 2023];21(3):195–210. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00807-9>
27. Eisen AKA, Gularte JS, Demoliner M, de Abreu Goés Pereira VM, Heldt FH, Filippi M, et al. Low circulation of Influenza A and coinfection with SARS-CoV-2 among other respiratory viruses during the COVID-19 pandemic in a region of southern Brazil. *J Med Virol* [Internet]. 1o de julho de 2021 [citado 8 de março de 2023];93(7):4392–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33829531/>
28. Wilson-Davies ESW, Mahanama AIK, Samaraweera B, Ahmed N, Friar S, Pelosi E. Concerns regarding the sensitivity of the OptiGene direct SARS-CoV-2 LAMP assay and its suitability for use in at-risk groups and hospital staff. *Journal of Infection* [Internet]. 1o de fevereiro de 2021 [citado 20 de agosto de 2022];82(2):282–327. Disponível em: <http://www.journalofinfection.com/article/S0163445321000360/fulltext>
29. Dudley DM, Newman CM, Weiler AM, Ramuta MD, Shortreed CG, Heffron AS, et al. Optimizing direct RT-LAMP to detect transmissible SARS-CoV-2 from primary nasopharyngeal swab samples. *PLoS One* [Internet]. 1o de dezembro de 2020 [citado 19 de agosto de 2022];15(12):e0244882. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0244882>
30. Pawlowski C, Silvert E, O’Horo JC, Lenehan PJ, Challener D, Gnass E, et al. SARS-CoV-2 and influenza coinfection throughout the COVID-19 pandemic: an assessment of coinfection rates, cohort characteristics, and clinical outcomes. *PNAS nexus* [Internet]. 1o de

julho de 2022 [citado 25 de fevereiro de 2023];1(3). Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35860600/>

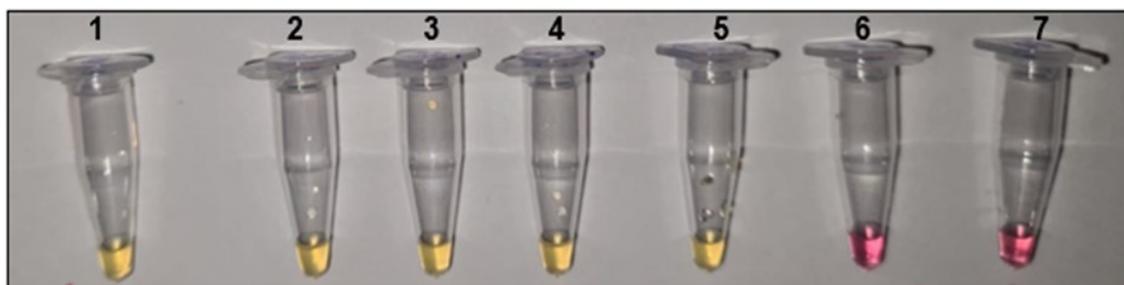
MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar 1 – Protocolo de reação: SARS-CoV-2, IBV, IAV e controle endógeno (ACTB), por meio da técnica de LAMP.

SARS-CoV-2 (Gene E)			
Reagente	Concentração (µM)		Volume (uL)
	Inicial	Final	Reação
<i>WarmStart Color MasterMix 2x</i>	2x	1x	7,50
F3 (µM)	10	0,2	0,30
B3 (µM)	10	0,2	0,30
FIP (µM)	100	1,6	0,24
BIP (µM)	100	1,6	0,24
LF (µM)	100	0,8	0,12
LB (U/µL)	100	0,8	0,12
H2O (µL)			4,68
Amostra			1,50
Volume Final (µL)			15,00
Controle endógeno (Gene ACTB Humano)			
Reagente	Concentração (µM)		Volume (uL)
	Inicial	Final	Reação
<i>WarmStart Color MasterMix 2x</i>	2x	1x	7,50
F3 (µM)	10	0,2	0,30
B3 (µM)	10	0,2	0,30
FIP (µM)	100	1,6	0,24
BIP (µM)	100	1,6	0,24
LF (µM)	100	0,8	0,12
LB (U/µL)	100	0,8	0,12
H2O (µL)			4,68
Amostra			1,50
Volume Final (µL)			15,00
IBV (Gene NS)			
Reagente	Concentração (µM)		Volume (uL)
	Inicial	Final	Reação
<i>WarmStart Color MasterMix 2x</i>	2x	1x	7,50
F3 (µM)	10	0,2	0,30
B3 (µM)	10	0,2	0,30
FIP (µM)	100	1,6	0,24
BIP (µM)	100	1,6	0,24
LF (µM)	100	0,8	0,12
LB (U/µL)	100	0,8	0,12
H2O (µL)			3,18
Amostra			3,00
Volume Final (µL)			15,00

IAV (Gene da matriz)			
Reagente	Concentração (µM)		Volume (uL)
	Inicial	Final	Reação
<i>WarmStart Color MasterMix 2x</i>	2x	1x	7,50
F3-1 (µM)	10	0,1	0,15
F3-2 (µM)	10	0,1	0,15
B3-1 (µM)	10	0,1	0,15
B3-2 (µM)	10	0,1	0,15
FIP (µM)	100	1,6	0,24
BIP (µM)	100	1,6	0,24
LF (µM)	100	0,8	0,12
LB (U/µL)	100	0,8	0,12
H2O (µL)			3,18
Amostra			3,00
Volume Final (µL)			15,00

Material suplementar 2 – Teste de diluição do Isolado viral de Influenza B.



Reação de LAMP para IBV. Foto tirada ao final da reação de 30 minutos. Amostra 1-5: Isolado viral sem diluir, 1:8, 1:64, 1:256, 1:512, respectivamente (Reagente), 6: Controle negativo (Não reagente), 7: Branco (Não reagente). Amostras com resultado conhecido pela técnica de RT-qPCR.

Material suplementar 3: Número de amostras testadas por mês de acordo com o número de coletas do programa MonitoraCOVID UFMG

Mês	N. ° coleta Monitora	Amostras testadas
Janeiro	317	32
Fevereiro	160	20
Março	66	7
Abril	109	11
Maiο	283	29
Junho	618	62
Julho	235	24
Agosto	90	9
Setembro	68	7
Outubro	55	6
Novembro	281	29
Dezembro	144	15
Total	2426	251