

## **Avaliação epidemiológica de vírus relacionados a infecções respiratórias agudas em um *campus* universitário por meio da técnica de LAMP**

**Epidemiological evaluation of viruses related to acute respiratory infections in a university campus using the LAMP technique**

**Evaluación epidemiológica de virus relacionados con infecciones respiratorias agudas en un campus universitario utilizando la técnica de la LAMP**

Recebido: 17/12/2023 | Revisado: 22/12/2023 | Aceitado: 23/12/2023 | Publicado: 27/12/2023

**Gabriel Pissolati Mattos Bretz<sup>1</sup>**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3716-0270>

Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

E-mail: [gpissolati@gmail.com](mailto:gpissolati@gmail.com)

**Natalia Virtude Carobim<sup>2</sup>**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3830-2640>

Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

E-mail: [natyvirca@gmail.com](mailto:natyvirca@gmail.com)

**Adriano Basques Fernandes<sup>3</sup>**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-6293>

Laboratório Lustosa, Brasil

E-mail: [abasques@gmail.com](mailto:abasques@gmail.com)

**Adriano de Paula Sabino<sup>2</sup>**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8562-8689>

Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

E-mail: [adriansabin01@gmail.com](mailto:adriansabin01@gmail.com)

**Fernanda Caroline Soardi<sup>3</sup>**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7801-2974>

Laboratório Lustosa, Brasil

E-mail: [fersoardi@gmail.com](mailto:fersoardi@gmail.com)

**Karina Braga Gomes<sup>1</sup>**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6870-2063>

Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

E-mail: [karinabgb@gmail.com](mailto:karinabgb@gmail.com)

### **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, podendo ser aplicado no diagnóstico em outras populações.

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2; Influenza A vírus; Influenza B vírus.

### **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

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Saúde do Adulto, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório Lustosa, Belo Horizonte, MG, Brasil

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, and it could be applied in the diagnosis in other populations.

**Keywords:** SARS-CoV-2; Influenza A virus; Influenza B virus.

### Resumen

Objetivo: Investigación epidemiológica de SARS-CoV-2, Influenza A (IAV) e Influenza B (IBV) en la comunidad atendida por el programa MonitoraCOVID de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG) en 2022 a través de la estandarización y validación de la técnica LAMP. Método: Se utilizaron muestras de hisopado nasofaríngeo en las reacciones LAMP, realizadas simultáneamente en las mismas condiciones con lectura visual. Para investigación epidemiológica se analizó el 10% del monto mensual asistido por MonitoraCOVID. Resultados: Las reacciones LAMP demostraron una sensibilidad del 84,0% y 85,2% para SARS-CoV-2 e IAV respectivamente. La prevalencia de IBV fue baja para el análisis de los parámetros analíticos. La especificidad obtenida fue del 100% en las tres reacciones. La tasa de positividad anual encontrada fue: SARS-CoV-2 - 28,7%, IAV - 1,6%, IBV - 0,0%. Se encontraron resultados indeterminados para SARS-CoV-2 e IAV (0,8% cada uno). Conclusión: El ensayo LAMP pudo evaluar la epidemiología de los virus respiratorios y podría ser aplicado en el diagnóstico en otras poblaciones.

**Palabras clave:** SARS-CoV-2; Influenza A virus; Influenza B virus.

## 1. Introdução

As infecções respiratórias agudas (IRAs) são um problema de saúde pública mundial, afetando indivíduos de todas as idades e causando impactos sociais (Peteranderl et al., 2016). As IRAs são o principal motivo de morte de crianças em países em desenvolvimento, sendo cerca de 80% dessas infecções de etiologia viral (Mahony et al., 2011). 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 óbito (Krammer et al., 2018)

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 epidemia (Wikramaratna & Gupta, 2009). 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 (Bukasov et al., 2021).

O SARS-CoV-2, coronavírus humano descrito em 2019 na cidade de Wuhan na China (Nguyen et al., 2019; Zhuang et al., 2020), é o causador da pandemia de COVID-19, iniciada em 2020 e responsável pela morte de 6,8 milhões de pessoas (OMS, 2022). Logo após sua identificação, o SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente em todo o mundo, causando o colapso de alguns serviços de saúde (Carda et al., 2020; Silva & Pena, 2021) e posteriormente evoluindo para variantes de preocupação que causaram novos surtos (Li et al., 2021). As frequentes transmissões inter e intra espécies e a capacidade mutacional do vírus contribuem para o surgimento de novas estirpes de coronavírus (Su et al., 2016).

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 2000 (Notomi et al., 2000) 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 remoto (Hu et al., 2020; Li et al., 2017).

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.

O objetivo do presente artigo é apresentar uma investigação epidemiológica do SARS-CoV-2, vírus 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 ou Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP).

## 2. Metodologia

Trata-se de um estudo transversal, qualitativo, de análise laboratorial e epidemiológica (Pereira et al., 2018).

### 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 no Quadro 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.

**Quadro 1** – Sequências de iniciadores utilizados para identificação do SARS-CoV-2, IAV, IBV e controle endógeno por meio da técnica de LAMP.

<b>SARS-CoV-2 (Gene E)</b> (Zahang & Tanner, 2020)	
E-F3	TGAGTACGAACTTATGTACTCAT
E-B3	TTCAGATTTTTAACACGAGAGT
E-FIP	ACCACGAAAGCAAGAAAAAGAAGTTCGTTTCGGAAGAGACAG
E-BIP	TTGCTAGTTACACTAGCCATCCTTAGGTTTACAAGACTCACGT
E-LF	CGCTATTAACATTAACG
E-LB	GCGCTTCGATTGTGTGCGT
<b>IAV (Gene da matriz)</b> (Takayama et al., 2029)	
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
<b>IBV (Gene NS)</b> (Takayama et al., 2029)	
IBV-F3	GCAACCAATGCCACCATA
IBV-B3	TTCTCTCTTCAAGRGACATC
IBV-FIP	TAGTCAAGGGCYCTTTGCCACTTTGAAGCAGGAATTCTGGA
IBV-BIP	CAAGACCGCCTAAACAGACTAAACTTTTACTTTTCAGGCTCACTT
IBV-LF	TGAAAGYCTTTCATAGCAC
IBV-LB	CAAGAATAAAGACTCACAAC
<b>Controle endógeno (Gene ACTB Humano)</b> (Zahang & Tanner, 2020)	
IBV-F3	AGTACCCCATCGAGCACG
IBV-B3	AGCCTGGATAGCAACGTACA
IBV-FIP	GAGCCACACGCAGCTCATTGTATCACCAACTGGGACGACA
IBV-BIP	CTGAACCCCAAGGCCAACCGGCTGGGGTGTGAAGGTC
IBV-LF	TGTGGTGCCAGATTTTCTCCA
IBV-LB	CGAGAAGATGACCCAGATCATGT

IAV: influenza A, IBV: influenza B. Fonte: Autores.

### 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 *mastemix 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 clínicas, 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  $\leq 0,25$  (MAPA, 2015).

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

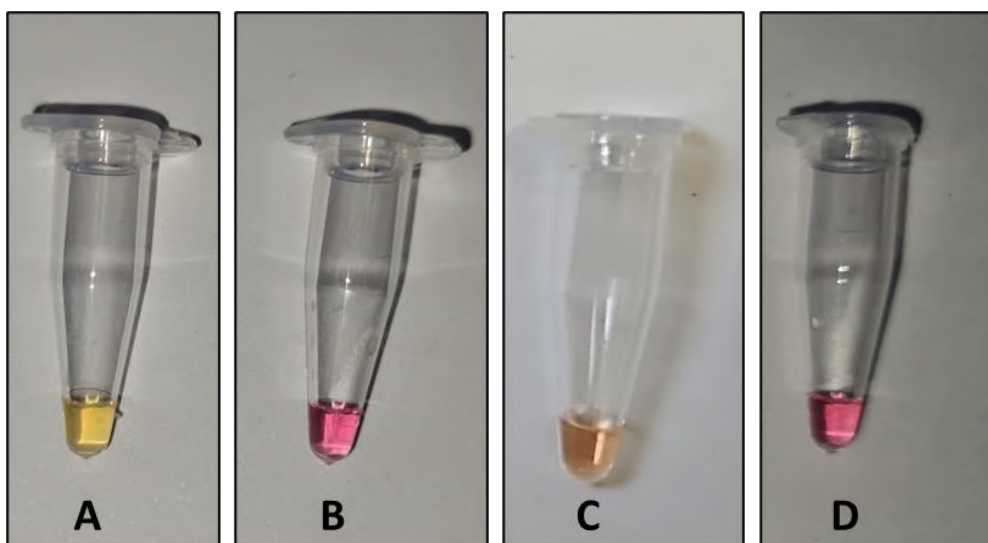
Para validação do teste, o ensaio padronizado foi aplicado a 10% do quantitativo mensal das amostras de secreção nasofaríngea de pacientes sintomáticos com suspeita clínica de infecção respiratória aguda coletados no Linbio por meio do programa MonitoraCOVID UFMG no ano de 2022.

## 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. Fonte: Autores.

### 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 teste (Fonseca et al., 2015). 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 para o SARS-CoV-2 e 0,85 para IAV, que significa ótima concordância (Landis & Koch, 1977) com relação ao ensaio de referência (RT-PCR) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Características analíticas do conjunto de iniciadores para SARS-CoV-2 e IAV.

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

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,

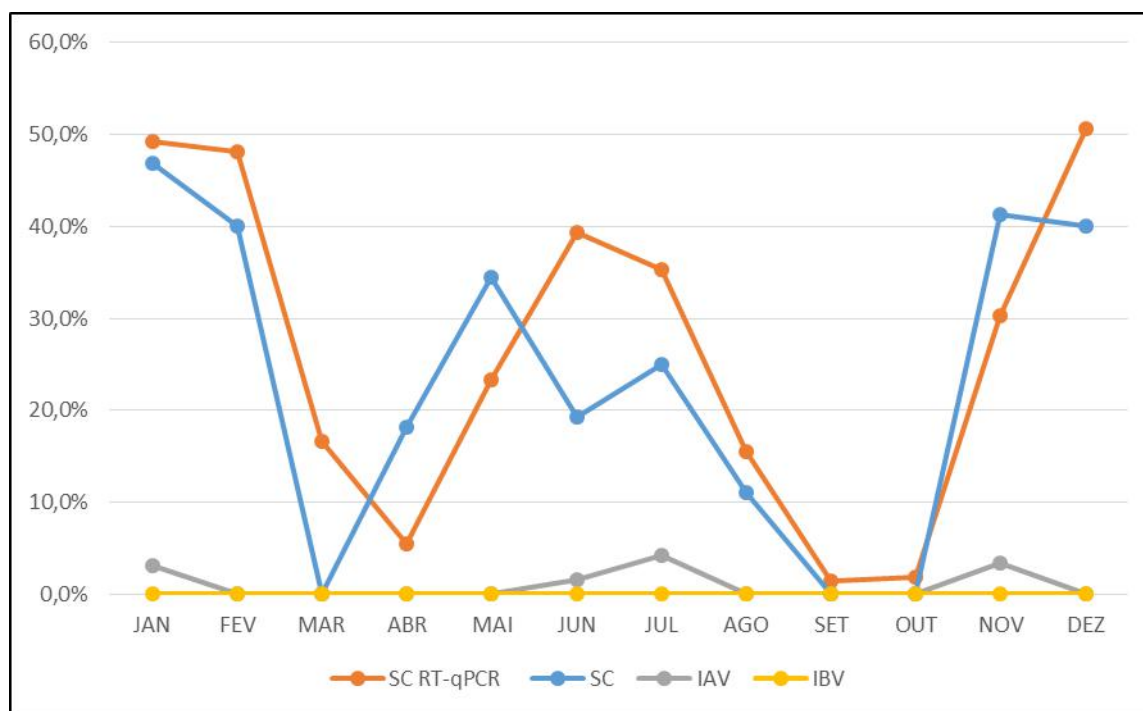
congestão nasal, dor de cabeça, dor no corpo, distúrbios olfativos, distúrbios gustativos, tosse, dor de garganta, febre, dispneia, fraqueza e diarreia.

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. Fonte: Autores.

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 qualificado (Krishna & Cunnion, 2012). 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 minutos (Li et al., 2017). 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) e IAV (0,85) demonstram ótima concordância da reação com relação ao ensaio de referência (RT-PCR) e próximo aos observados na literatura (Aoki et al., 2021; Nakauchi et al., 2011). 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 (2019), os quais utilizaram o mesmo conjunto de iniciadores para IAV e IBV em 113 amostras do trato respiratório (aspirados, secreções e *swabs*). 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 arbovírus. 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 (Nakauchi et al., 2011; Mandu et al., 2021). 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 (Takayama et al., 2019; Aoki et al., 2021; Alves et al., 2021). 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 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. 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 LAMP (Zhang & Tanner. 2020).

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-19 (Chow et al., 2022; Eisen et al., 2021), 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%<sup>17</sup>.

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 coleta (Wilson-Davies et al., 2021). 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 paciente (Dudley et al., 2020).

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 paciente (Pawlowski et al., 2022), 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 estudos (Zahang & Tanner, 2020; Takayama et al., 2029), 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.

## 5. Considerações Finais

O ensaio de LAMP padronizado foi capaz de avaliar a epidemiologia dos vírus respiratórios em uma amostragem da população de um campus universitário, podendo ser aplicado no diagnóstico em outras populações.

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.

Estudos futuros devem ser conduzidos a fim de verificar possíveis variações nos resultados a depender do tempo de sintomas e gravidade da doença.

## Agradecimentos

Laboratório Lustosa e Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (Linbio) da UFMG pelo apoio financeiro e fornecimento de amostras.

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).

KBG agradece ao CNPq/Brasil pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa.

## Referências

- Alves, P. A., de Oliveira, E. G., Franco-Luiz, A. P. M., Almeida, L. T., Gonçalves, A. B., Borges, I. A., Richa, F. S., Rocha, R. P., Bezerra, M. F., Miranda, P., Capanema, F. D., Martins, H. R., Weber, G., Teixeira, S. M., Wallau, G. L., & Monte-Neto, R. L. (2021). 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*, 12:3172.
- Aoki, M. N., de Oliveira Coelho, B., Góes, L. G. B., Minoprio, P., Durigon, E. L., Morello, L. G., Marchini, F. K., Riediger, I. N., Debur, M. C., Nakaya, H. I., & Blandes, L. (2021). Colorimetric RT-LAMP SARS-CoV-2 diagnostic sensitivity relies on color interpretation and viral load. *Scientific Reports*, 11(1):1–10.
- Bukasov, R., Dossym, D., & Filchakova, O. (2021). Detection of RNA viruses from influenza and HIV to Ebola and SARS-CoV-2: a review. *Analytical Methods*, 13: 34-55.
- Carda, S., Invernizzi, M., Bavikatte, G., Bensmaïl, D., Bianchi, F., Deltombe, T., Draulans, N., Esquenazi, A., Francisco, G. E., Gross, R., Jacinto, L. J., Pérez, S. M., W O'dell, M. W., Reebye, R., Verduzco-Gutierrez, M., Wissel, J., & Molteni, F. (2020). Covid-19 pandemic. What should physical and rehabilitation Medicine specialists do? A clinician's perspective. *Eur J Phys Rehabil Med*, 56(4):515–24.
- Chow, E. J., Uyeki, T. M., & Chu, H. Y. (2022). The effects of the COVID-19 pandemic on community respiratory virus activity. *Nature Reviews Microbiology*, 21:3.
- Dudley, D. M., Newman, C. M., Weiler, A. M., Ramuta, M. D., Shortreed, C. G., Heffron, A. S., Accola, M. A., Rehrauner, W. M., Friedrich, T., & O'Connor, D. H. (2020). Optimizing direct RT-LAMP to detect transmissible SARS-CoV-2 from primary nasopharyngeal swab samples. *PLoS One*, 15(12), e0244882.
- Eisen, A. K. A., Gularte, J. S., Demoliner, M., de Abreu Goés Pereira, V. M., Heldt, F. H., Filippi, M., Almeida, P. R., Hansen, A. W., Fleck, J. D., & Spilki, F. R. (2021). 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*, 93(7):4392–8.
- Hu, X., Deng, Q., Li, J., Chen, J., Wang, Z., Zhang, X., Fang, Z., Li, H., Zhao, Y., Yu, P., Li, W., Wang, X., Li, S., Zhang, L., & Hou, T (2020). Development and Clinical Application of a Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for SARS-CoV-2 Infection. *mSphere*, 5(4): e00808-20.
- Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M., Treanor, J., Webster, R., & Garcia-Sastre, A. (2018). Influenza [Internet]. Vol. 4, Nature Reviews Disease Primers. Nature Publishing Group, p. 1–21.

- Krishna, N. K., & Cunnion, K. M. (2012). Role of molecular diagnostics in the management of infectious disease emergencies. *Med Clin North Am*, 96(6):1067–78.
- Landis, J. R. & Koch, G. G (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 33 (1): 159.
- Li, J, Lai, S, Gao, G. F., & Shi, W. (2021). The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. *Nature*, 600(7889):408–18.
- Li, Y., Fan, P, Zhou, S., & Zhang, L. (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb Pathog*, 107:54-61.
- Mahony, J. B., Petrich, A., & Smieja, M. (2011). Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 48:217–49.
- Mandu Baba, M., Bitew, M., Fokam, J., Lelo, E. A., Ahidjo, A., Asmamaw, K., Beloumou, G. A., Bulimo, W. D., Buratti, E., Chenwi, C., Dadi, H., D’Agaro, P., Conti, L., Fainguem, N., Gadzama, G., Maiuri, P., Majanaja, J., Meshack, W., Ndjolo, A., Nkenfou, C., Oderinde, B. S., Opanda, S. M., Segat, L., Stuan, C., Symekher, S., Takou, D., Tesfaye, K., Triolo, G., Tuki, K., Zacchigna, S., & Marcello, A (2021). Diagnostic performance of a colorimetric RT -LAMP for the identification of SARS-CoV-2: A multicenter prospective clinical evaluation in sub-Saharan Africa. *EClinicalMedicine*, 40:101101.
- Ministério da Adricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2015). Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infeciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. MAPA/ACS, Brasília. 57p, 2015.
- Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, M., Tashiro, M., & Kageyama, T (2011). Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *J Med Virol*, 83(1):10–5.
- Nguyen, T., Bang, D. D., & Wolff, A. (2019) Novel coronavirus disease (COVID-19): Paving the road for rapid detection and point-of-care diagnostics. *Micromachines* (Basel), 11(3):1–7.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(12).
- 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.
- Pawlowski, C., Silvert, E., O’Horo, J. C., Lenehan, P. J., Challener, D., Gnass, E., Murugadoss, K., Ross, J., Speicher, L., Geyer, H., Venkatakrishnan, A. J., Badley, A. D., & Soundararajan, V. (2022). SARS-CoV-2 and influenza coinfection throughout the COVID-19 pandemic: an assessment of coinfection rates, cohort characteristics, and clinical outcomes. *PNAS*, 1(3): pgac071.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [free e-book]. Santa Maria/RS. Ed. UAB/NTE/UFSM.
- Peteranderl, C., Herold, S., & Schmoldt, C. (2016). Human Influenza Virus Infections. *Semin Respir Crit Care Med*, 37(4):487-500.
- Rhoads, D., Peaper, D. R., She, R. C., Nolte, F. S., Wojewoda, C. M., Anderson, N. W., & Pritt, B. (2021). College of American Pathologists (CAP) Microbiology Committee Perspective: Caution Must Be Used in Interpreting the Cycle Threshold (Ct) Value. *Clinical Infectious Diseases*, 72(10):e685–6.
- Silva, S. J. R., & Pena, L. (2021). 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*, 13:100287.
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol*, 24(6):490-502.
- Takayama, I., Nakauchi, M., Takahashi, H., Oba, K., Semba, S., Kaida, A., Kubo, H., Saito, S., Nagata, S., Odagiri, T., & Kageyama, T. (2019) Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus. *J Virol Methods*, 267:53-58.
- Wikramaratna, O. S., & Gupta, S (2009). Influenza outbreaks. *Cell Microbiol*, 11(7):1016–24.
- Wilson-Davies, E. S. W., Mahanama, A. I. K., Samaraweera, B., Ahmed, N., Friar, S., & Pelosi, E. (2021). 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*, 82(2):282–327.
- Zhang, Y., & Tanner, N. A. (2020). Development of Multiplexed RT-LAMP for Detection of SARS-CoV-2 and Influenza Viral RNA doi: medRxiv preprint. medRxiv, 2020.10.26.20219972.
- Zhuang, J., Yin, J., Lv, S., Wang, B., & Mu, Y. (2020). Advanced “lab-on-a-chip” to detect viruses – Current challenges and future perspectives. *Biosens Bioelectron*. 1:163:112291.

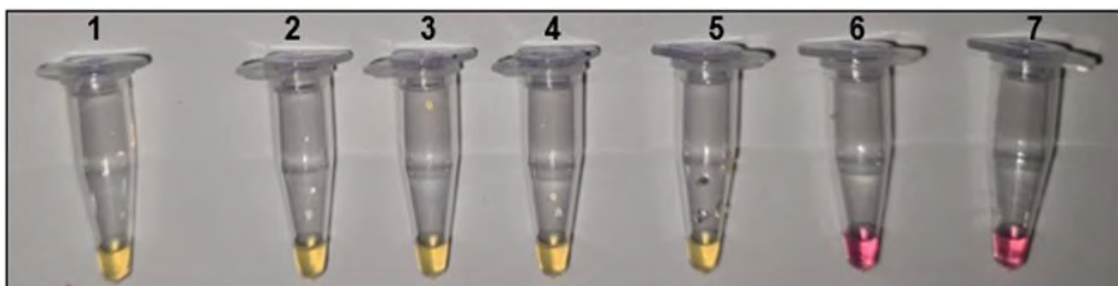
**MATERIAL SUPLEMENTAR**

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

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

Fonte: Autores.

**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. Fonte: Autores.

**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
Mai	283	29
Junho	618	62
Julho	235	24
Agosto	90	9
Setembro	68	7
Outubro	55	6
Novembro	281	29
Dezembro	144	15
<b>Total</b>	<b>2426</b>	<b>251</b>

Fonte: Autores.