

## Orientações para implementação do do ensaio de RT-PCR multiplex para influenza e SARS-CoV-2 vigilância integrada de influenza e COVID-19

19 de abril de 2021

Como parte do Sistema Global de Vigilância e Resposta à Influenza (GISRS) da OMS, os Centros Nacionais de Influenza (NICs) e os Laboratórios Nacionais de Saúde Pública das Américas vêm realizando detecção e diagnóstico molecular de influenza há muitos anos. Com a aparição da COVID-19 no início de 2020, a OPAS aproveitou esta robusta e bem estabelecida rede de laboratórios para introduzir rapidamente um protocolo de detecção molecular para SARS-CoV-2 em toda a região.

Apesar da baixa circulação e detecção do vírus influenza desde março de 2020, a OPAS tem recomendado garantir a vigilância de influenza e manter o algoritmo para confirmação laboratorial para vigilância sentinela de síndromes gripais (SG) e síndromes respiratórias agudas graves (SRAG), bem como casos inusitados de doenças respiratórias. Se houver suspeita de um caso de influenza, devem ser realizados testes de rotina para influenza (incluindo subtipagem ou genotipagem) e a notificação deve ser continuada.

A ameaça de epidemias e possíveis pandemias por influenza persistem. É imperativo que o GISRS mantenha uma vigilância significativa de influenza em todo o mundo e que os países permaneçam vigilantes à medida que se adaptam para atender aos objetivos de vigilância do COVID-19<sup>1</sup>.

O Centro Colaborador (CC) da Organização Mundial da Saúde (OMS) para vigilância, epidemiologia e controle de influenza nos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (EUA) desenvolveu um ensaio molecular multiplex<sup>2</sup> em 2020 para detectar simultaneamente vírus influenza (tipos A e B) e SARS-CoV-2, que agora está disponível através do *International Reagent Resources* (IRR).

Este documento tem como objetivo compilar as considerações operacionais para a implementação do ensaio de RT-PCR multiplex para influenza e SARS-CoV-2 no contexto de uma vigilância integrada de influenza e COVID-19. Essas considerações não substituem as recomendações existentes do GISRS para a vigilância rotineira de influenza, mas sim para respaldar os sistemas de vigilância de influenza nacionais e subnacionais existentes à luz da implementação do teste multiplex.

### Consideração operacional para a vigilância sentinela SRAG/SG

No contexto da implementação do ensaio multiplex para influenza e SARS-CoV-2 na vigilância rotineira de influenza e COVID-19, devem ser contempladas as seguintes considerações operacionais:

- Os kits multiplex para influenza e SARS-CoV-2 do CDC-EUA disponíveis podem/devem ser **priorizados para a vigilância sentinela SRAG/SG** levando em consideração que:
  - De qualquer forma, amostras adequadas devem estar disponíveis para subtipagem de influenza A e genotipagem de influenza B.

- É requerido que os NICs enviem, de forma oportuna, amostras de influenza a um dos CC-OMS do GISRS para caracterização adicional que permite gerar informações necessárias para as decisões durante as reuniões bianuais para recomendação da composição da vacina contra influenza.
- O algoritmo de laboratorio deve ser adaptado para incorporar testes multiplex.
- Atualmente, o teste multiplex **não** está destinado à vigilância universal de COVID-19, uma vez que o SARS-CoV-2 permanece predominando:
  - Em um cenário de transmissão comunitária alta ou muito alta, a confirmação de SARS-CoV-2 deve ser priorizada quando as capacidades laboratoriais estão sobrecarregadas.
  - Uma vez que a transmissão do vírus influenza é baixa, a importância da coinfeção resulta irrelevante.
  - Se estiver presente, ainda pode ser capturado através da vigilância sentinela.

## Consideração operacional para laboratórios

A detecção molecular do vírus influenza por meio de PCR de transcrição reversa em tempo real (rRT-PCR) é a metodologia padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial de influenza em todos os laboratórios do GISRS<sup>1,3</sup>. O *International Reagent Resources* (IRR) do CC-OMS para influenza do CDC-EUA fornece reagentes e kits para ensaios moleculares para influenza molecular aos laboratórios do GISRS<sup>4</sup>.

No caso do SARS-CoV-2, os protocolos para detecção molecular foram rapidamente desenvolvidos após os dados de sequenciamento do SARS-COV-2 emergente ser disponibilizados no site da OMS<sup>5</sup>. Desde então, a OPAS tem apoiado a implementação de diagnósticos moleculares para SARS-CoV-2, fornecendo treinamento e reagentes desde o desenvolvimento e liberação do primeiro ensaio molecular para detecção de SARS-CoV-2<sup>6</sup>.

Os ensaios moleculares são uma metodologia útil e poderosa para detecção rápida de vírus em amostras respiratórias. Nesse sentido, os ensaios multiplex podem economizar tempo e esforço detectando simultaneamente mais de um patógeno em uma única reação. O formato de teste rRT-PCR multiplex também resulta em menor consumo de reagentes, consumíveis e tempo de processamento de amostras.

No contexto da implementação do ensaio multiplex para influenza e SARS-CoV-2 na vigilância laboratorial de influenza e COVID-19, devem ser consideradas as seguintes considerações operacionais:

## Coleta, armazenamento e transporte de amostras clínicas

- Amostras dos tratos respiratórios superiores são adequados para detecção molecular de influenza e SARS-CoV-2. Swabs nasofaríngeos e/ou orofaríngeos continuam sendo o tipo de espécime de escolha para a detecção molecular de influenza e SARS-CoV-2<sup>2</sup>.

- A coleta adequada da amostra é importante para o diagnóstico laboratorial, uma vez que uma amostra não coletada corretamente pode levar a resultados falsos ou inconclusivos.
- O vírus influenza deve ser viável para envio ao CC-OMS no CDC-EUA e para isolamento viral. Por isso, é importante o uso do volume necessário (3 ml) e dos meios de transporte de amostras (meios de transporte viral ou tampão PBS) adequados.
- Para preservar a integridade do vírus, as amostras devem ser transportadas imediatamente para o laboratório. A cadeia fria deve ser mantida durante todo o processo de transporte das amostras.
- No laboratório, as amostras podem ser armazenadas à temperatura refrigerada (4°C) por até 72 horas. Após esse período, os espécimes devem ser mantidos congelados a -70°C ou menos.
- As amostras não devem ser repetidamente congeladas e descongeladas, pois isso resulta em degradação viral, reduzindo a capacidade de detecção e viabilidade para caracterização adicional e isolamento.

### Abordagem do ensaio multiplex

- O ensaio multiplex para influenza e SARS-CoV-2 do CDC-EUA detecta simultaneamente, em uma só reação, os vírus SARS-CoV-2 e influenza A e B em uma única reação.
- Um número limitado de kits está disponível para laboratórios do GISRS através do CDC-EUA.
- As instruções de uso<sup>2</sup> do ensaio multiplex para influenza e SARS-CoV-2 do CDC-EUA e a informação das sequências para iniciadores e sondas<sup>7</sup> estão disponíveis publicamente para referência no site do CDC-EUA.
- É importante garantir a qualidade do processo, incluindo a sensibilidade e especificidade para o vírus alvo; portanto, controles positivos e negativos devem ser incluídos em cada teste, bem como o marcador interno RP.
- O ensaio multiplex para influenza e SARS-CoV-2 do CDC-EUA consiste em 4 marcadores moleculares: InfA, InfB, SC2 e RP, que devem ser analisados para os resultados do teste.
- A interpretação e os resultados devem ser os seguintes<sup>2</sup>:

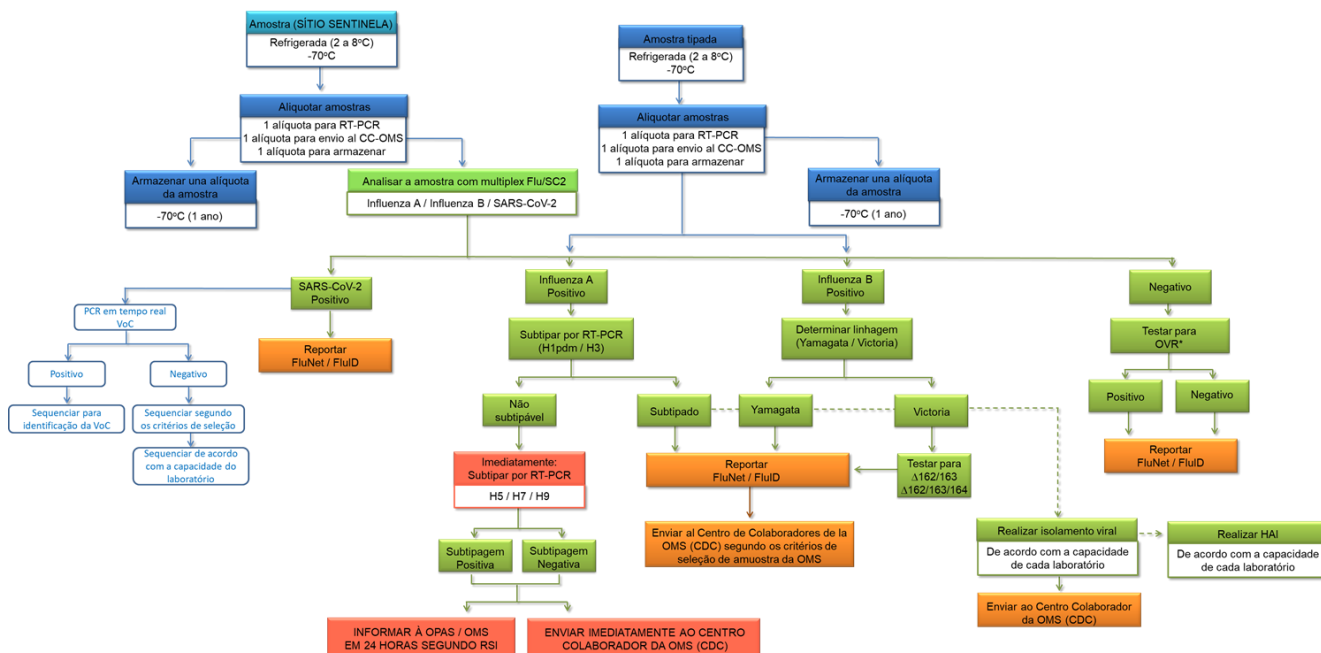
Marcador				Interpretação	Resultado
InfA	InfB	SC2	RP		
+	-	-	+ ou -	Detecção de RNA de influenza A	Positivo para influenza A
-	+	-	+ ou -	Detecção de RNA de influenza B	Positivo para influenza B
-	-	+	+ ou -	Detecção de RNA de SARS-CoV-2	Positivo para COVID-19
-	-	-	+	Sem detecção de RNA de influenza/SARS-CoV-2	Negativo
-	-	-	-	Resultados inválidos	Inválido

\* Se mais de um marcador para SARS-CoV-2 ou influenza A e B forem positivos, é indicativo de coinfeção.

## Algoritmo de laboratório usando ensaio multiplex para influenza e SARS-CoV-2

- **Amostras de sítios sentinelas SRAG/SG não testadas ainda para vírus influenza e SARS-CoV-2** podem ser analisadas usando o ensaio multiplex para influenza e SARS-CoV-2 (Figura 1). Amostras positivas para influenza A devem ser subtipadas e amostras positivas para influenza B devem ser genotipadas seguindo o algoritmo estabelecido para testes de influenza.
- **Amostras de sítios sentinelas SRAG/SG previamente testada para vírus influenza e SARS-CoV-2 não** devem ser testadas novamente utilizando o ensaio multiplex para influenza e SARS-CoV-2. Neste caso, os testes devem seguir diretamente para a subtipagem de amostras positivas de influenza A e genotipagem de amostras positivas de influenza B (Figura 1) e seguir os passos subjacentes rotineiros no algoritmo de teste de influenza.
- **Amostras previamente testadas para SARS-CoV-2 não devem** ser retestadas com o ensaio multiplex para diagnóstico de influenza. A estratégia singleplex deve ser usada para este fim.
- **Amostras de SRAG inusitados** que testarem negativo para influenza e SARS-CoV-2 devem ser testadas para outros vírus respiratórios. Os casos inusitados devem ser notificados através do Regulamento Sanitário Internacional.

Figura 1: Algoritmo de teste para influenza usando o ensaio multiplex para influenza e SARS-CoV-2 do CDC-EUA.



## Informe de Datos de Vigilancia de Influenza e COVID-19

- O relatório semanal de FluNet faz parte dos termos de referência dos Centros Nacionais de Influenza<sup>8</sup> e deve ser continuado através da plataforma regional existente.
- Para o relatório de vigilância sentinela, a OPAS/OMS solicita aos Estados-Membros que informem através das bases de dados FluNet (dados virológicos) e FluID (dados epidemiológicos) semanalmente a [flu@paho.org](mailto:flu@paho.org)
- Dados de teste para influenza: continuar informando os dados agregados de vigilância de influenza semanalmente ao nível regional. No mínimo, este deve ter o número de amostras de todas as fontes processadas para testes de influenza, o número de amostras positivas de influenza e o número de amostras testadas e/ou negativas de influenza. Sempre que possível, esses dados devem ser desagregados por fonte (sentinela e não sentinela).
- Dados de teste para COVID-19: Os países devem relatar resultados agregados semanais de COVID-19 no mesmo formato e frequência que os dados de vigilância de influenza. Dados virológicos (como o número de amostras que testam positivo e negativo para COVID-19) de casos com amostras em sistemas de vigilância sentinela e não sentinela ou sindrômica existentes devem ser relatados semanalmente em nível regional.
- A OPAS continuará a incluir os dados informados à plataforma FluMart regional e global da OMS; e coordenar a troca de dados relatados com a sede da OMS. Portanto, o informe oportuno e completo à OPAS garante o cumprimento do que a OMS espera.

## Referências

- 1 - Organização Mundial da Saúde (OMS). Maintaining surveillance of influenza and monitoring SARS-CoV-2: adapting Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) and sentinel systems during the COVID-19 pandemic: interim guidance, 8 November 2020. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/336689>.
- 2 - Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/139743/download>.
- 3 - Organização Mundial da Saúde (OMS). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1).
- 4 - International Reagent Resource (IRR). International Reagent Resource (IRR). Disponível em: <http://www.influenzareagentresource.org/>.

- 5 - Organização Mundial da Saúde (OMS). Diagnostic testing for SARS-CoV-2. Disponível em:  
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334254/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-eng.pdf>.
- 6 - Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Diretrizes laboratoriais para detecção e diagnóstico de infecção pelo vírus da COVID-19, 8 de julho de 2020. Disponível em:  
<https://www.paho.org/pt/documents/laboratory-guidelines-detection-and-diagnosis-covid-19-virus-infection>.
- 7 - Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Research Use Only CDC Influenza SARS-CoV-2 (FluSC2) Multiplex Assay Real-Time RT-PCR Primers and Probes. Disponível em:  
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/multiplex-primer-probes.html>.
- 8 - Organização Mundial da Saúde (OMS). Terms of Reference for National Influenza Centers of the Global Influenza Surveillance and Response System. Disponível em:  
[https://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/national\\_influenza\\_centres/tor\\_nic.pdf](https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/national_influenza_centres/tor_nic.pdf).