

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

SEVERINO JEFFERSON RIBEIRO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES RÁPIDAS E DE
BAIXO CUSTO PARA O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS ZIKA**

RECIFE

2019

SEVERINO JEFFERSON RIBEIRO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES RÁPIDAS E DE
BAIXO CUSTO PARA O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS ZIKA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Lindomar José Pena

Coorientadores: Dr. Keith Pardee

Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva

RECIFE

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- S586d Silva, Severino Jefferson Ribeiro da.
Desenvolvimento de ferramentas moleculares rápidas e de baixo custo para o diagnóstico do vírus zika / Severino Jefferson Ribeiro da Silva. - Recife: [s.n.], 2019.
119 p.: il., graf., tab.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
Orientador: Lindomar José Pena; coorientadores: Keith Pardee, Marcelo Henrique Santos Paiva.
1. Zika vírus. 2. Biossensores. 3. Mosquitos. 4. Diagnóstico. 5. Culicidae. 6. Custos e Análise de Custo. 7. Insetos vetores. 8. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. I. Pena, Lindomar José. II. Pardee, Keith. III. Paiva, Marcelo Henrique Santos. IV. Título.

CDU 616.921

SEVERINO JEFFERSON RIBEIRO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES RÁPIDAS E DE
BAIXO CUSTO PARA O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS ZIKA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 27/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Dr. Lindomar José Pena (Orientador)
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

Dr. Antônio Carlos de Freitas
Departamento de Genética/Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Deus, familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado até aqui e a minha gratidão por todas as bênçãos que estão acontecendo em minha vida. A Deus, toda honra e toda glória. A Deus, minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Jacinta e José Severino (*in memoriam*), por todo amor, força, carinho, dedicação, incentivo e por sempre acreditarem tanto nesse menino sonhador que saiu do interior da Paraíba em busca de crescer na vida através dos estudos. Foi tudo por vocês! E a todos os meus familiares.

Ao meu orientador, Dr. Lindomar Pena, pela confiança, apoio, incentivo, empenho e aprendizado proporcionados desde o início da minha graduação. O senhor é um espelho que irei levar pelo o resto da vida!

Aos meus co-orientadores, Dr. Marcelo Paiva e Dr. Keith Pardee, por toda atenção, confiança e aprendizado.

Aos pesquisadores, Constância Ayres e Fábio Lopes, pelo apoio e atenção.

Ao grupo de pesquisa no qual faço parte (Virology at Fiocruz), por todo o incentivo, força e momentos de alegria.

À equipe do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (Lavite) – Departamento de Virologia, por terem sido sempre tão solícitos.

Ao Departamento de Entomologia do IAM, em especial ao grupo de pesquisa da Dra. Constância Ayres e os integrantes Duchinka Guedes e Larissa Krokovsky, por todo o apoio e prontidão.

Ao grupo do Dr. Keith Pardee, em especial a Livia Guo e Seray, por todo aprendizado e atenção.

Aos amigos que fiz no Instituto Aggeu Magalhães, em especial a Renata Mendes, Jurandy Magalhães, Bárbara Nayane, Poliana Gomes, Pablo Cantalice, Carol Simões, Klarissa Miranda, Fábica Cruz, Rafael Rosa, Vanessa Portela, Janderson Lopes, Thiago Soares e Lucas Sousa, por todo o companheirismo, conselhos, incentivo, carinho, atenção e momentos de descontração.

Aos meus amigos da vida, Felipe Augusto, Jenyffer Lima, Julliana Ribeiro, Maxsuel Ferreira e Vamberto Souza, por todo amor, atenção, incentivo, companheirismo e por sempre segurarem a minha mão quando mais precisei.

Ao meu padrasto, Josemilson Ferreira, por toda a força, suporte e incentivo.

Aos órgãos de fomento, em especial ao IDRC (Canadá) e FACEPE, pela a bolsa de Pós-graduação e auxílio financeiro para a execução do trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães pela oportunidade de aprendizado.

À equipe da secretaria acadêmica do curso, por terem sido sempre solícitos.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

“O Senhor torna firme os passos do homem e aprova os seus caminhos. Ainda que caia, não ficará prostrado, porque o Senhor sustenta pela mão.” (Salmos 36:23-24)

“Mas aqueles que contam com o Senhor renovam suas forças; Ele dá-lhes asas de águia. Correm sem se cansar, vão para frente sem se fatigar.” (Isaiás 40:31)

SILVA, Severino Jefferson Ribeiro da. **Desenvolvimento de ferramentas moleculares rápidas e baixo custo para o diagnóstico do vírus Zika.** 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

A rápida disseminação do vírus Zika (ZIKV) representa um problema de saúde pública global, especialmente em países onde circulam várias espécies de mosquitos vetores e apresentam condições favoráveis para a transmissão de vírus, como o Brasil. Nessas áreas, a melhoria no controle do mosquito precisa ser uma prioridade, mas a vigilância do vírus nos mosquitos ocorre de maneira ineficiente. Atualmente, a reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR) é o método padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV em amostras humanas e amostras de mosquitos. Porém, essa técnica apresenta elevado custo e inúmeras limitações para o diagnóstico *Point-of-care* (POC), o que dificulta sua aplicação e utilização para um grande número de amostras e em regiões com infraestrutura laboratorial limitada. Diante desse cenário, permanece a necessidade do desenvolvimento de novas plataformas que sejam capazes de detectar o ZIKV de forma simples e prática no campo. Neste trabalho, foi desenvolvida e validada uma plataforma de transcriptase reversa seguida de amplificação isotérmica mediada por alça (RT-LAMP) para a detecção de ZIKV em amostras de mosquitos. Quanto aos resultados, o ensaio RT-LAMP foi altamente específico para detecção do ZIKV e se mostrou até 10.000 vezes mais sensível que a qRT-PCR para a detecção do ZIKV em amostras de mosquito. A validação do ensaio foi realizada com 60 amostras de mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, incluindo mosquitos artificialmente e naturalmente infectados. O RT-LAMP apresentou sensibilidade de 100%, especificidade de 91,18% e acurácia geral de 95,24%. Quanto ao custo de cada reação (teste) do RT-LAMP, o valor foi um real (R\$ 1,00), 40 vezes mais barato do que o qRT-PCR. A disponibilização dessas ferramentas tem grande potencial de contribuir para prevenir a propagação da doença na população e estabelecer melhores estratégias de controle para combater esse patógeno devastador.

Palavras-chave: Diagnóstico. Mosquitos. ZIKV.

SILVA, Severino Jefferson Ribeiro da. **Development of fast and low cost molecular tools for Zika virus diagnosis.** 2019. Dissertation (Academic Master's Degree in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2019.

ABSTRACT

The rapid spread of Zika virus (ZIKV) represents a global public health problem, especially in countries that circulate several vector mosquito vectors and favorable conditions for virus transmission, such as Brazil. In these areas, improvement in mosquito control needs to be a top priority, but mosquito viral surveillance occurs inefficiently. Currently, the reverse transcriptase reaction followed by quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) is the gold standard for molecular diagnostic of ZIKV in human samples and mosquito samples. However, the technique presents high cost and limitations for Point-of-care (POC) diagnostics, which makes it difficult to apply and use for a large number of samples and in regions with limited laboratory infrastructure. In view of this scenario, there remains the need to develop new platforms that are capable of detecting ZIKV in a simple and practical way in the field. In this work, we developed and validated a platform reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detection of ZIKV in mosquito samples. Regarding the results, the RT-LAMP assay was highly specific for detection of ZIKV and was up to 10,000 times more sensitive than qRT-PCR for the detection of ZIKV in mosquito samples. Assay validation was performed using 60 samples from *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, including artificially and naturally infected mosquitoes. The RT-LAMP had a sensitivity of 100%, specificity of 91.18 %, and overall accuracy of 95.24%. The cost of each reaction (test) of the RT-LAMP was one Brazilian Real (R\$ 1.00). The availability of these tools has great potential to contribute to prevent the spread of the disease in the population and establish better control strategies for this devastating pathogen.

Keywords: Diagnostic. Mosquitos. ZIKV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da partícula viral e organização genômica do ZIKV.	24
Figura 2 - Histórico epidemiológico do ZIKV.	26
Figura 3 - Ciclo de transmissão do ZIKV.	29
Figura 4 - Características e achados clínicos em neonatos com a síndrome congênita do Zika.	30
Figura 5 - Representação esquemática dos ensaios sorológicos (MAC ELISA e PRNT) utilizados para o diagnóstico do ZIKV.	32
Figura 6 - Representação esquemática do método padrão-ouro (qRT-PCR) atualmente utilizado para o diagnóstico do ZIKV.	33
Figura 7 - Representação esquemática do mecanismo da reação do ensaio LAMP.	35
Figura 8 - Fluxograma para o desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico rápido do ZIKV.	42
Figura 9 - Leitor eletrônico óptico portátil.	51
Figura 10 - Layout utilizado para aplicação das amostras nos biossensores.	51
Figura 11 - Representação esquemática da metodologia utilizada para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos sob condições controladas.	53
Figura 12 - Representação esquemática da metodologia utilizada para a avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV.	54
Figura 13 - Representação esquemática da metodologia utilizada para a avaliação da sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV.	55
Figura 14 - Representação esquemática da validação do RT-LAMP para detecção do ZIKV em amostras de mosquitos.	56
Figura 15 - Otimização das concentrações dos reagentes e condições do ensaio RT-LAMP.	59
Figura 16 - Fluxograma geral do ensaio RT-LAMP.	60
Figura 17 - Detecção do ZIKV em amostras de mosquitos naturalmente infectados e macerado bruto de <i>Aedes aegypti</i> experimentalmente infectado com ZIKV.	62
Figura 18 - Especificidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos.	64
Figura 19 - Sensibilidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos.	65
Figura 20 - Limite de detecção do RT-LAMP calculado através da análise de Probit.	66
Figura 21 - Diagnóstico de amostras de mosquitos pelo RT-LAMP.	67

Figura 22 - Detecção do ZIKV pelo RT-LAMP em amostras de mosquitos que estavam no limite de detecção pela qRT-PCR.	68
Figura 23 - Eletroferograma dos produtos de RT-LAMP sequenciados pelo método de Sanger.	70
Figura 24 - Avaliação inicial dos biossensores com amostras positivas.	71
Figura 25 - Avaliação inicial dos biossensores com amostras positivas.	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estratégias baseadas no LAMP para detecção do ZIKV.....	37
Quadro 2 - Primers utilizados no ensaio do RT-LAMP para detecção do ZIKV.....	50
Quadro 3 - Arbovírus utilizados para avaliar a especificidade do ensaio RT-LAMP.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limite de detecção do ensaio RT-LAMP para detecção do ZIKV.	66
Tabela 2 - Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para detecção do ZIKV em amostras de mosquitos.....	69
Tabela 3 - Custo detalhado por cada reação (teste) através do RT-LAMP para detecção do ZIKV.....	73
Tabela 4 - Custo detalhado por cada reação (teste) através da qRT-PCR para detecção do ZIKV.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aM	Atomolar
BSA	Bovine serum albumin
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Complementary DNA
Ct	Cycle threshold
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotides
DENV	Dengue virus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
h	Hora
IgM	Imunoglobulina M
JEV	Japanese encephalitis virus
ZIKV	Zika virus
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
kb	Kilobases
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública “Dr Milton Bezerra Sobral”
LAVITE	Departamento de Virologia e Terapia Experimental
µL	Microlitro
MgSO₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
NTC	Non template control
ORF	Open reading frame
pb	Pares de base
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Pernambuco
PFU	Plaque forming unit
PRNT	Plaque reduction neutralization test
RBS	Ribosome binding site
RNA	Ribonucleic acid
RNA_m	RNA mensageiro

RT	Reverse transcription
RT-LAMP	Reverse transcription isothermal loop-mediated isothermal amplification
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real
SYBR	Sybr Green
+ssRNA	Positive sense, single-stranded RNA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UTRs	Untranslated region
UV	Ultravioleta
Vero	Células primárias de rins de macaco verde africano
WNV	West Nile virus
YFV	Yellow Fever virus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 Histórico	22
2.2 Características moleculares do ZIKV	23
2.3 Epidemiologia	25
2.4 Transmissão	27
2.5 Doença	29
2.6 Diagnóstico	30
2.6.1 Isolamento viral	31
2.6.2 Métodos sorológicos	31
2.6.3 Métodos moleculares	32
2.6.3.1 <i>qRT-PCR</i>	33
2.6.3.2 <i>RT-LAMP</i>	34
2.6.4.3 <i>Biossensores</i>	41
3 JUSTIFICATIVA	43
4 PERGUNTA CONDUTORA	44
5 HIPÓTESE	45
6 OBJETIVO GERAL	46
6.1 Objetivos específicos	46
7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	47
7.1 Células e vírus	47
7.2 Extração de RNA	48
7.2.1 Extração de RNA por Kit	48
7.2.2 Extração de RNA por Fervura	48
7.2.3 Extração de RNA por Trizol	48
7.3 RT-LAMP	48
7.4 Biossensores moleculares	50
7.5 qRT-PCR	52
7.6 Detecção do ZIKV em amostras de mosquitos sob condições controladas	52
7.7 Avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP	54
7.8 Avaliação da sensibilidade analítica do RT-LAMP	54

7.9 Validação do RT-LAMP	55
7.10 Sequenciamento dos fragmentos do RT-LAMP	56
7.11 Análise de custos	57
7.12 Considerações éticas	57
7.13 Análise estatística.....	57
8 RESULTADOS	58
8.1 Otimização dos parâmetros do ensaio RT-LAMP.....	58
8.2 Detecção do ZIKV em amostras de mosquitos sob condições controladas	60
8.3 Especificidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV.....	62
8.4 Sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV.....	64
8.5 Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para detectar o ZIKV em amostras de mosquitos.....	67
8.6 Ensaio inicial para a validação dos biossensores moleculares.....	70
8.7 Determinação dos custos para a realização de ambas as técnicas	72
9 DISCUSSÃO	74
10 CONCLUSÃO.....	78
11 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....	91
ANEXO A - Aprovação no Comitê de Ética	93
ANEXO B - Aprovação no Comitê de Ética	96
ANEXO C – Material suplementar do artigo publicado	100
ANEXO D – Artigo publicado.....	107

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus transmitidos por mosquitos, como os vírus Chikungunya (CHIKV), Dengue (DENV) e Zika (ZIKV), têm se espalhado rapidamente pelo globo nos últimos anos, causando surtos e epidemias em larga escala em diversos países do hemisfério sul resultando em uma elevada morbidade e mortalidade, provocando assim, implicações graves para os serviços de saúde, principalmente devido à ausência de vacinas, tratamento e medidas profiláticas eficazes para o controle e prevenção (DONALISIO *et al.*, 2017). DENV e ZIKV são membros do gênero *Flavivirus* dentro da família *Flaviviridae*, que também inclui outras espécies como o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da encefalite japonesa (JEV) e vírus do Nilo Ocidental (WNV), enquanto que CHIKV pertence à família *Togaviridae* (KRAEMER *et al.*, 2015; MUSSO, GUBLER, 2016).

A emergência do ZIKV no Brasil tem sido considerada a maior epidemia do vírus até o presente momento. Como nos surtos e epidemias anteriores, a maioria das infecções pelo ZIKV têm sido assintomática e, quando presentes, os sintomas incluem erupção cutânea, febre, dor de cabeça, e artralgia (FARIA *et al.*, 2016). Entretanto, a epidemia brasileira tem causado enormes preocupações na população e em autoridades de saúde pública em todo o mundo, porque houve um aumento significativo do número de microcefalia em recém-nascidos e outras doenças neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré. Diversos estudos comprovaram categoricamente que o ZIKV é o agente etiológico envolvido na gênese da microcefalia, bem como outras malformações congênitas observadas em neonatos (RASMUSSEN *et al.*, 2016). Esses eventos mobilizaram autoridades de saúde pública e cientistas em todo o mundo para preencher lacunas de conhecimento de um patógeno até então considerado negligenciado (CORDEIRO, 2016; FERREIRA, 2017; MENESES *et al.*, 2017).

Os principais vetores para o ZIKV são os mosquitos antropofílicos do gênero *Aedes*, que estão disseminados nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (AYRES, 2016; PATTERSON *et al.*, 2016). Além disso, pesquisas recentes têm sugerido que o mosquito *Culex quinquefasciatus* pode agir como outro importante vetor do ZIKV (ELIZONDO-QUIROGA *et al.*, 2018; GUEDES *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2016; SMARTT *et al.*, 2018). Apesar da transmissão vetorial ser considerada a principal via de transmissão do ZIKV, outros estudos têm sugerido outras vias de transmissão, incluindo através do contato sexual, transplacentária, perinatal e através da transfusão sanguínea (GRISCHOTT *et al.*, 2016).

Em regiões que existe uma circulação de outros arbovírus, como por exemplo, DENV e CHIKV, o diagnóstico clínico da infecção pelo ZIKV torna-se extremamente difícil uma vez que os sinais e sintomas são muito semelhantes. Sendo assim, o diagnóstico laboratorial assume um papel fundamental. Atualmente, a reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR) é o método padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV em amostras de humanos e o mais utilizado para detecção do ZIKV em amostras de mosquitos (FAYE *et al.*, 2013; WAGGONER, PINSKY, 2016). No entanto, a qRT-PCR apresenta elevado custo, requer mão de obra altamente especializada e envolve equipamentos caros e sofisticados para amplificação e detecção do genoma viral. Essas desvantagens tornam a técnica inadequada para aplicações em grande escala em áreas que apresentam poucos recursos, o que afeta negativamente o estabelecimento de programas eficazes de controle de doenças (SCHWAB *et al.*, 2018; SHUKLA *et al.*, 2016).

Por outro lado, a vigilância do ZIKV em insetos vetores representa uma ferramenta importante para identificar a circulação viral e potenciais pontos de entrada do vírus, contribuindo para prevenir surtos da doença (AYLLÓN *et al.*, 2017). O ZIKV se espalhou rapidamente, principalmente em países em desenvolvimento que carecem de boa infraestrutura de saneamento básico e possuem várias espécies de mosquitos competentes para transmissão do ZIKV. Nessas áreas, a melhoria no controle do mosquito vetor precisa ser uma prioridade, mas na prática ocorre de forma ineficiente em países endêmicos do ZIKV, como o Brasil (AYLLÓN *et al.*, 2017; COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017). A vigilância do ZIKV em mosquitos pode auxiliar no entendimento da dinâmica do vírus e permite a detecção precoce de novas introduções antes mesmo que o vírus se espalhe nas populações vetorais e hospedeiras. Além disso, os dados de vigilância permitem avaliar as tendências e o impacto dos programas de controle de vetores (CEVALLOS *et al.*, 2018). Dada a falta de vacinas e antivirais para o combate ao ZIKV, o controle dos mosquitos vetores permanece sendo a estratégia mais eficaz de limitar a propagação do vírus e o tamanho dos surtos (MANORE *et al.*, 2017).

Embora os métodos moleculares e sorológicos sejam empregados com maior frequência para o diagnóstico do ZIKV na rotina laboratorial, ainda permanece a necessidade do desenvolvimento de novas plataformas que sejam capazes de detectar o vírus de forma simples e prática no campo. A identificação precoce da infecção pelo vírus diretamente logo após a coleta tanto em amostras humanas, bem como em amostras de mosquitos é um passo crítico para minimizar a propagação global e facilitar o controle do ZIKV (NICOLINI *et al.*, 2017). As plataformas de diagnóstico denominadas *Point-of-care* (POC) podem contornar

essas preocupações e aumentar a capacidade de diagnóstico nos países afetados pelo ZIKV, incluindo o Brasil. O termo POC é designado para se referir aos testes de diagnóstico que podem ser utilizados diretamente no campo, logo após a coleta da amostra, possibilitando o diagnóstico sem que haja requerimento de equipamentos sofisticados e/ou pessoas com treinamento avançado em biologia molecular ou virologia.

A técnica de transcrição reversa seguida de amplificação isotérmica mediada por alça (RT-LAMP) representa uma ferramenta promissora que permite o diagnóstico rápido, simples e prático de vários patógenos (ADAMS *et al.*, 2018; NODEN *et al.*, 2018; OLONINIYI *et al.*, 2017). Considerando as vantagens da amplificação rápida, operação simples, baixo custo, alta sensibilidade e especificidade, o RT-LAMP apresenta aplicações potenciais para o diagnóstico clínico, bem como para a vigilância de doenças infecciosas em países em desenvolvimento (MORI, NOTOMI, 2009). Diferentemente do ensaio qRT-PCR, a detecção do produto de amplificação do RT-LAMP pode ser realizada por análise na mudança de cor no tubo de reação que pode ser facilmente observado através do olho nu (NEMOTO *et al.*, 2010). Para esse propósito, diferentes ensaios LAMP foram desenvolvidos para detectar o ZIKV desde o seu surgimento no hemisfério ocidental (CHOTIWAN *et al.*, 2017; LAMB *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; YAREN *et al.*, 2017). No entanto, a maioria dos ensaios descritos até o presente momento de LAMP necessita de equipamentos especiais e sofisticados para a detecção de vírus, o que limita sua aplicabilidade em lugares que apresentam poucos recursos e baixa infraestrutura laboratorial.

Outra ferramenta promissora de diagnóstico POC para a detecção do ZIKV são os biossensores. Recentemente, Dr. Keith Pardee da University of Toronto-Canadá, desenvolveu duas tecnologias inovadoras que prometem reduzir drasticamente o custo e barreiras técnicas para o desenvolvimento de plataformas de diagnósticos. Especificamente, essas tecnologias incluem um método inédito, livre de células, que permite o uso de genes sintéticos no campo (PARDEE *et al.*, 2014) e novos sensores de RNA programáveis chamados de “*toehold switches*” (PARDEE *et al.*, 2016). Recentemente Dr. Pardee utilizou essa tecnologia para diagnosticar o ZIKV de forma rápida e com baixo custo (PARDEE *et al.*, 2016). Em colaboração com o Dr. Keith Pardee, serão estendidos os estudos iniciais de prova de conceito para desenvolver e implementar essa tecnologia diagnóstica.

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver ferramentas moleculares rápidas e de baixo custo para a detecção do ZIKV em amostras humanas e em amostras de mosquitos. As plataformas utilizadas neste trabalho possibilitam o diagnóstico do ZIKV sem a

necessidade da mão de obra altamente especializada e equipamentos caros e sofisticados para amplificação e detecção do genoma do vírus.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O presente tópico apresenta os aspectos teóricos dos temas abordados no decorrer do trabalho: o histórico, características moleculares do ZIKV, epidemiologia, transmissão, doença causada pelo ZIKV e diagnóstico.

2.1 Histórico

O primeiro isolamento do ZIKV ocorreu em 1947 na Uganda, em um estudo de febre amarela na floresta de Zika a partir do sangue de um macaco *Rhesus* que desenvolveu uma doença febril e, após caracterização viral descobriu-se que não se tratava de febre amarela e sim um novo vírus. Após esse episódio, o ZIKV foi identificado pela primeira vez em mosquitos da espécie *Aedes africanus* em 1948 (DICK *et al.*, 1952). Em contraste, a natureza zoonótica do ZIKV só foi documentada pela primeira vez em um caso de exposição ocupacional em 1964 (SIMPSON, 1964) e os primeiros isolamentos de vírus a partir de humanos ocorreu na Nigéria durante os anos 70 (FAGBAMI, 1979).

Desde o seu primeiro isolamento em 1947, o ZIKV permaneceu durante cerca de 60 anos como um patógeno pouco conhecido e até então considerado negligenciado, confinado apenas nos continentes Africano e Asiático, com poucos casos descritos nos seres humanos (WAGGONER, PINSKY, 2016). No entanto, em 2007 uma epidemia de ZIKV ocorreu na ilha de Yap, território dos Estados Federados da Micronésia (LANCIOTTI *et al.*, 2008; DUFFY *et al.*, 2009). Em 2013, o ZIKV ressurgiu de forma agressiva na Polinésia Francesa (IOOS *et al.*, 2014; MUSSO, NILLES, *et al.*, 2014). Coincidentemente, durante o surto que ocorreu na Polinésia Francesa foi descrito pela primeira vez a associação entre a infecção com ZIKV com a Síndrome de Guillain-Barré (GBS) (IOOS *et al.*, 2014; OEHLER *et al.*, 2014).

No início de 2015, o ZIKV foi identificado pela primeira vez no Brasil no município de Camaçari, estado da Bahia. A análise filogenética do vírus isolado do surto demonstrou que a linhagem brasileira pertencia à linhagem asiática e era muito similar a um isolado viral do surto que ocorreu na Polinésia Francesa (CAMPOS *et al.*, 2015). Inicialmente, acreditava-se que a introdução do ZIKV no Brasil havia ocorrido em 2014, possivelmente durante a Copa do Mundo de Futebol, evento que por sua vez reuniu milhões de turistas no território brasileiro (ZANLUCA *et al.*, 2015). Outra possível hipótese discutida foi que a introdução do vírus havia ocorrido durante o Campeonato Mundial de Canoagem ocorrido em agosto de

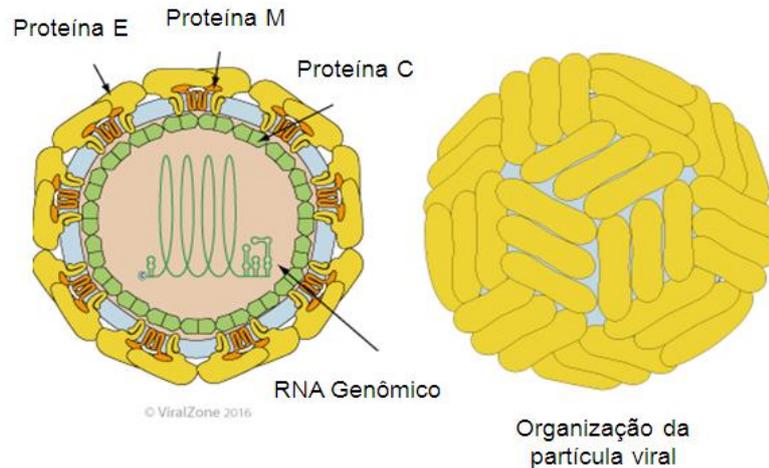
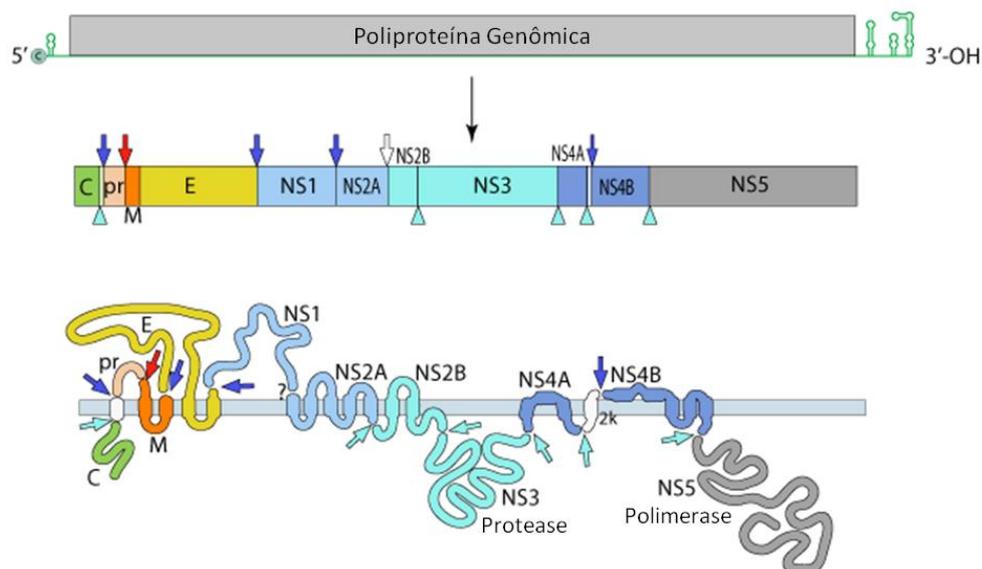
2014, no Rio de Janeiro (MUSSO, 2015). Posteriormente, verificou-se que a introdução do ZIKV no Brasil poderia ter ocorrido entre maio e dezembro de 2013, período que coincidiu com a realização de outro evento futebolístico, a Copa das Confederações (FARIA *et al.*, 2016). Dado o fato que aproximadamente 80% dos indivíduos que são infectados com o ZIKV são assintomáticos, aliado ao fato de outros arbovírus também circular no Brasil, como o DENV, o ZIKV acabou permanecendo causando infecções sem que houvesse sido detectado em 2015 (DUFFY *et al.*, 2009).

Recentemente, Campos *et al.* reportaram que o ZIKV chegou ao Brasil no final de 2013, vindo da América Central e do Caribe, mais especificamente através de imigrantes ilegais vindos do Haiti e militares brasileiros em missão no país podem ter trazido o ZIKV para o Brasil. Dessa forma, assim como os genótipos asiáticos do vírus da dengue e o vírus chikungunya, o ZIKV seguiu a mesma rota: da Ásia para a Oceania, emergindo na América Central e Ilhas do Caribe, e por fim chegando na América do Sul (CAMPOS *et al.*, 2018).

2.2 Características moleculares do ZIKV

O ZIKV é um vírus envelopado que apresenta o material genético constituído de RNA fita simples, sentido positivo (+ ssRNA) que pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. Seu genoma é capeado na extremidade 5' e contém 10,794 nucleotídeos, que codificam 3,419 aminoácidos. O genoma do vírus possui uma única sequência aberta de leitura (ORF), que é flanqueada por regiões não traduzidas (UTRs) nas extremidades 5' e 3'. Também fazem parte desta família o vírus da dengue, vírus da febre amarela, vírus do oeste do Nilo e o vírus encefalite japonesa (PETERSEN *et al.*, 2016). Com base na constituição genética, estudos filogenéticos revelaram que o ZIKV pode ser dividido em duas linhagens distintas: Africana e Asiática (BERTHET *et al.*, 2014; FAYE *et al.*, 2014).

O genoma do ZIKV codifica uma poliproteína que é processada em três proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C, 105 aminoácidos), proteína percussora de membrana (prM, 187 aminoácidos) e do envelope (E, 505 aminoácidos). Além destas, outras sete proteínas não estruturais (NS) são codificadas: NS1 (352 aminoácidos), NS2A (217 aminoácidos), NS2B (139 aminoácidos), NS3 (619 aminoácidos), NS4A (127 aminoácidos), NS4B (255 aminoácidos), e NS5 (904 aminoácidos) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura da partícula viral e organização genômica do ZIKV.**A****B**

Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics (2003, tradução nossa).

Legenda: Estrutura da partícula viral envelopada identificando a proteína do capsídeo (C), proteína precursora de membrana (M), proteína do envelope (E) e o RNA genômico. As proteínas de superfície estão dispostas em uma simetria icosaédrica. (A) Organização genômica do ZIKV mostrando suas extremidades 5' e 3'. O material genético codifica uma poliproteína que é processada em 3 proteínas estruturais: proteína do capsídeo, proteína precursora de membrana, proteína do envelope. Além destas, outras sete proteínas não estruturais (NS) são codificadas: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5 (B).

2.3 Epidemiologia

A primeira descrição de epidemia causada pelo ZIKV em seres humanos ocorreu em 2007, na ilha de Yap, território dos Estados Federados da Micronésia, com estimativa que aproximadamente 70% da população residente dessa ilha foi infectada. Portanto, não foi observado nenhum episódio de hospitalização ou morte decorrente das infecções ocasionadas pelo ZIKV (DUFFY *et al.*, 2009; LANCIOTTI *et al.*, 2008).

Subsequente, houve relatos de infecção pelo ZIKV no Camboja em 2010 (HEANG *et al.*, 2012), Filipinas em 2012 (ALERA *et al.*, 2015) e na Tailândia em 2012 (BUATHONG *et al.*, 2015). Em 2013, o ZIKV ressurgiu na Polinésia Francesa resultando em aproximadamente em 29 mil casos de doença (aproximadamente 10% da população), e depois se disseminou rapidamente por toda a área do Pacífico, incluindo Nova Caledônia, Ilhas Cook, comprovando a capacidade de disseminação do vírus (IOOS *et al.*, 2014; MUSSO, NILLES, *et al.*, 2014).

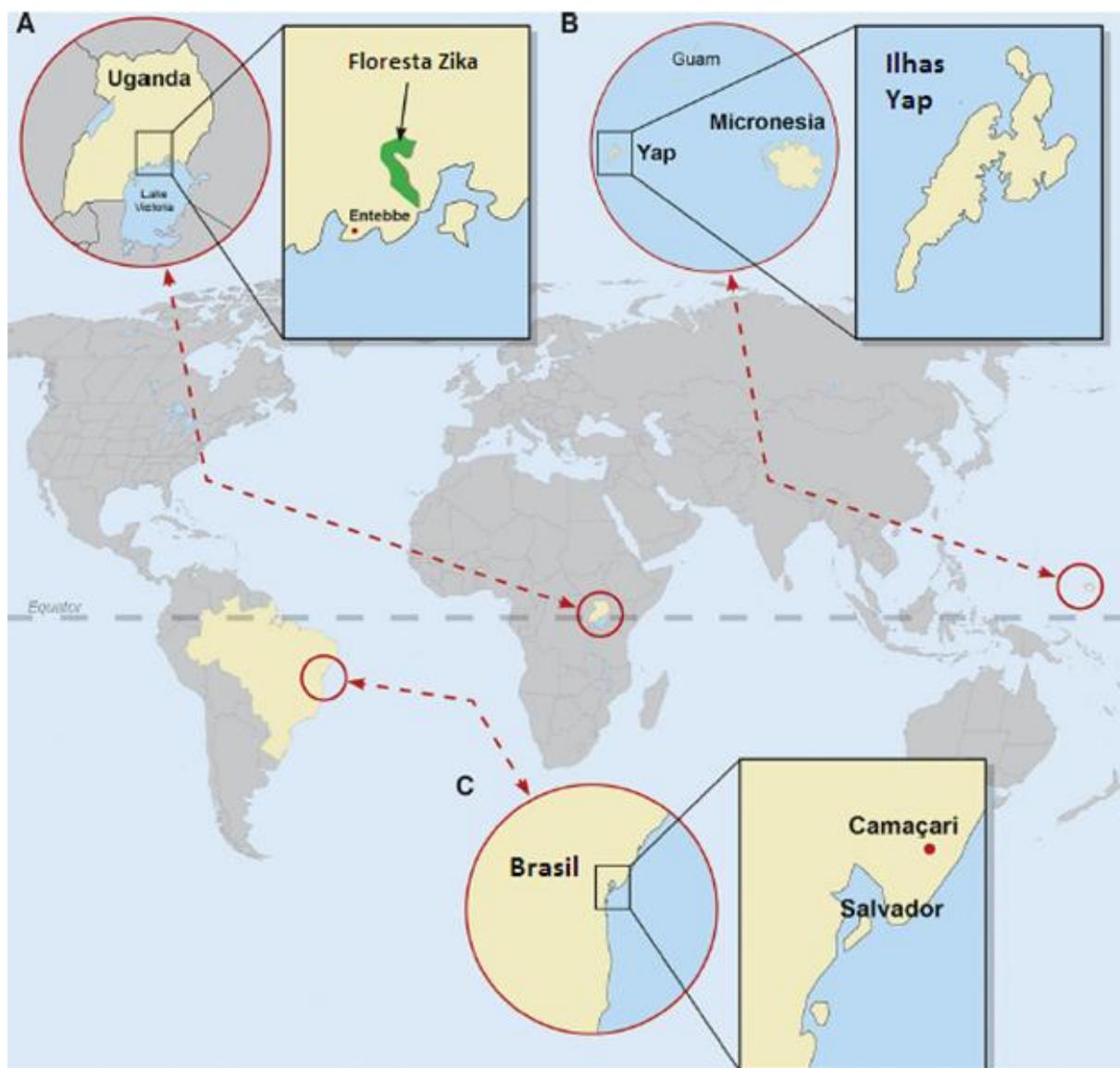
Em 29 de abril de 2015, o ZIKV foi identificado pela primeira vez no Brasil em um surto de doença exantemática similar à dengue que ocorreu no município de Camaçari, estado da Bahia (CAMPOS *et al.*, 2015) (Figura 2). Após esse episódio, o Ministério da Saúde confirmou a transmissão autóctone do ZIKV no Brasil, ou seja, em que a doença é transmitida dentro do próprio estado, e não trazida por alguém que foi infectado em outro local. Os primeiros casos foram descritos na região Nordeste do país, mais especificamente na cidade de Natal, Rio Grande do Norte. Nesse primeiro relato descrito no município de Natal, o ZIKV foi detectado através de RT-PCR, em oito dos 21 pacientes que apresentavam os sintomas da arbovirose (ZANLUCA *et al.*, 2015).

Até março de 2016, 23 estados brasileiros documentaram casos de transmissão autóctone do ZIKV comprovando a grande capacidade de disseminação do ZIKV (CHEN, HAMER, 2016). Além disso, durante a epidemia no Brasil foi descrita a associação entre o ZIKV com a malformação congênita em neonatos, bem como com episódios de mortes (ZANLUCA, 2016). Ainda em meados de 2016, autoridades de saúde pública de mais de 30 territórios e países no continente americano também reportaram a transmissão autóctone do ZIKV (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2016). Diante da situação emergencial dos casos decorrentes de infecção pelo ZIKV em inúmeros países, em 01 de fevereiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a ameaça do ZIKV como uma emergência de saúde pública (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Contudo, em 11 de maio de 2017, devido à diminuição de 95% do número de casos

registrados no Brasil, o Ministério da Saúde declarou o fim da emergência nacional (BRASIL, 2017).

Em 2019, até o fim de abril foram registrados 630 casos prováveis de Zika no país, com incidência de 0,3 casos/100 mil hab. A região Norte apresentou o maior número de casos prováveis da doença em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Sudeste (119 casos; 18,9 %), Nordeste (49 casos; 7,8%), Centro-Oeste (43 casos, 6,8%) e Sul (9 casos, 1,4%) (BRASIL, 2019). Diante desse cenário, é importante que medidas sejam estabelecidas para evitar o aumento da transmissão e consequentemente o número de casos da doença.

Figura 2 - Histórico epidemiológico do ZIKV.



Fonte: Waggoner *et al.* (2016, tradução nossa).

Legenda: O ZIKV foi descoberto inicialmente em 1947 na floresta Zika na Uganda (A). Desde o seu isolamento em 1947, foram descritos poucos casos em seres humanos até 2007, quando uma epidemia de ZIKV ocorreu na ilha de Yap, território dos Estados Federados da Micronésia (B). Em 2015, foi reportado o primeiro caso de infecção pelo vírus Zika no município de Camaçari, no estado da Bahia, Brasil (C).

2.4 Transmissão

A transmissão do ZIKV através da picada de mosquitos fêmeas pertencentes ao gênero *Aedes*, que estão disseminados nas regiões tropicais e subtropicais do mundo tem sido considerada a principal forma de transmissão do ZIKV (PATTERSON *et al.*, 2016). Mosquitos do gênero *Aedes*, incluindo as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* também são apontados como vetores de grande importância global pelo fato de serem capazes de transmitir outros arbovírus, tais como DENV e CHIKV. O primeiro isolamento do ZIKV foi realizado em 1948 a partir de mosquitos da espécie *Aedes africanus* (DICK *et al.*, 1952). Desde então, muitas cepas do ZIKV foram isoladas de mosquitos pertencentes aos gêneros: *Anopheles*, *Mansonia*, *Culex* e *Aedes* (DIALLO *et al.*, 2014). Embora os mosquitos do gênero *Aedes* sejam postulados como o principal vetor para transmissão do ZIKV, diversos estudos sugerem que mosquitos pertencentes ao gênero *Culex* podem atuar como outro vetor importante do ZIKV (ELIZONDO- QUIROGA *et al.*, 2018; GUEDES *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2016; SMARTT *et al.*, 2018).

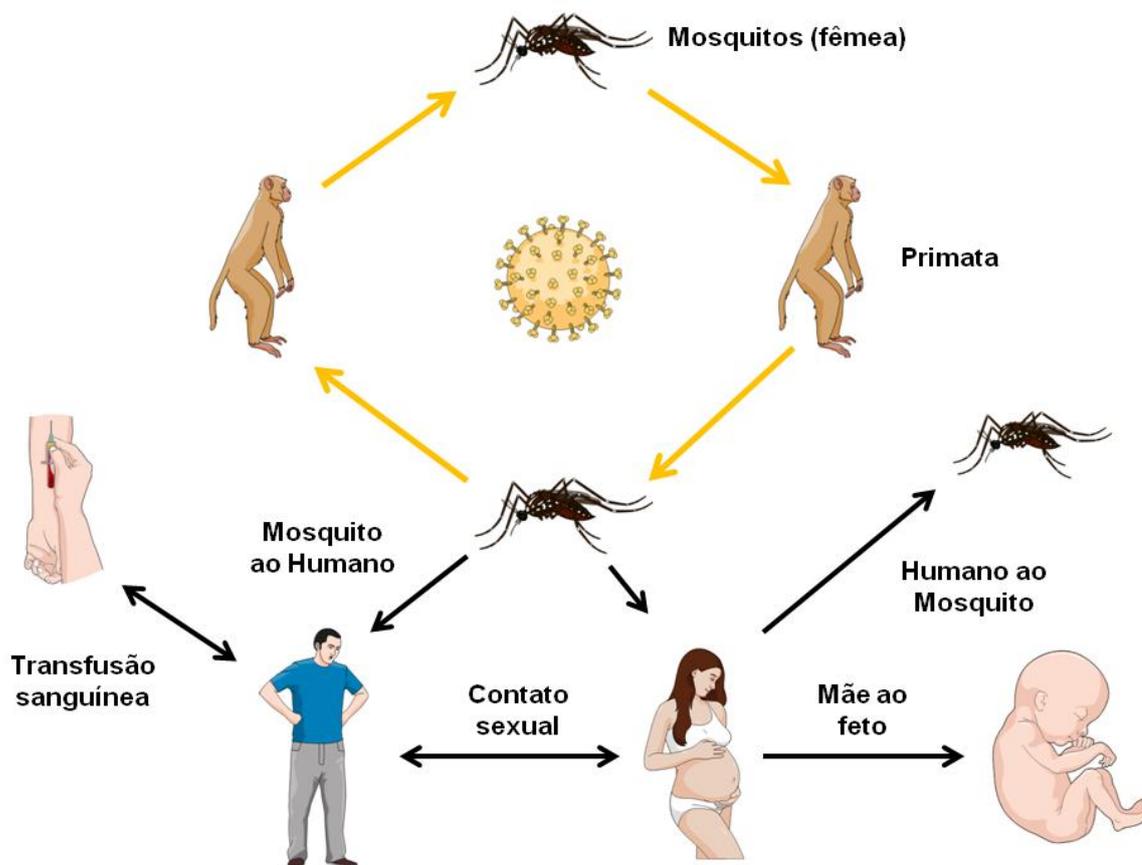
Apesar da transmissão através dos mosquitos ser postulada como a principal forma de disseminação do ZIKV, pesquisas recentes têm relatado outras vias de transmissão do vírus. Durante o surto que ocorreu na Polinésia Francesa, dois casos de transmissão perinatal foram reportados, onde o RNA viral foi detectado em amostras de soro e no leite materno de duas mães lactantes (BESNARD *et al.*, 2014). Esse tipo de transmissão também já foi descrito para outros arbovírus, como para o vírus da dengue, vírus do oeste no Nilo e vírus chikungunya (BASURKO *et al.*, 2009; FRITEL *et al.*, 2010; GÉRARDIN *et al.*, 2008; STEWART *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2008).

As evidências da transmissão sexual do ZIKV foram reportadas em vários estudos (D'ORTENZIO *et al.*, 2016; FOY *et al.*, 2011; MUSSO *et al.*, 2015). Em um dos estudos, foi reportado um caso de transmissão sexual do vírus de um homem para a sua esposa após ele ter retornado de viagem de um país endêmico (FOY *et al.*, 2011). Em 2015, o vírus foi isolado do sêmen de um indivíduo depois de várias semanas após ele apresentar a fase aguda da doença (MUSSO *et al.*, 2015). Em outro estudo, através de ensaios moleculares foi possível detectar o RNA viral na urina e no sêmen de um indivíduo 62 dias após o início dos sintomas (D'ORTENZIO *et al.*, 2016). Dado o risco de transmissão do ZIKV através de relações sexuais, é recomendado que homens que viajaram ou residem em um país endêmico devem

manter relações sexuais com o uso de preservativos, principalmente se o parceiro for uma mulher grávida (OSTER *et al.*, 2016).

A transmissão do ZIKV através da transfusão sanguínea também já foi documentada. Diante do surto de ZIKV que ocorreu na Polinésia Francesa em 2013, Musso *et al.* registraram episódios em que indivíduos doadores de sangue, embora não apresentassem sintomas no momento da doação de sangue, apresentaram resultados positivos através de testes moleculares específicos (MUSSO *et al.*, 2014). Esse tipo de transmissão também já foi documentado para outros flavivírus, como para o vírus da dengue e para o vírus do oeste do Nilo (PEALER *et al.*, 2003; TAMBYAH *et al.*, 2008; TOMASHEK, MARGOLIS, 2011).

A epidemia brasileira causou enormes preocupações na população e em autoridades de saúde pública em todo o mundo, especialmente porque houve um aumento dramático no número de casos de microcefalia em neonatos, sugerindo a transmissão intrauterina do ZIKV, ou seja, quando o vírus é transmitido da mãe para o feto (DYER, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Inúmeros estudos apontam categoricamente que o ZIKV é o agente etiológico envolvido na gênese da microcefalia, bem como outras malformações congênitas observadas em recém-nascidos (RASMUSSEN *et al.*, 2016). Além disso, outros estudos já relataram que o ZIKV foi detectado em fluídos biológicos como a saliva, urina, suor e fluído lacrimal, sugerindo assim, a possibilidade de outras vias de transmissão do vírus (MOULIN *et al.*, 2016; MUSSO *et al.*, 2015) (Figura 3).

Figura 3 - Ciclo de transmissão do ZIKV.

Fonte: O autor.

Legenda: O ZIKV é eficientemente transmitido entre mosquitos e seres humanos sem a necessidade de um hospedeiro enzoótico. O ZIKV é transmitido majoritariamente por mosquitos do gênero *Aedes*, embora outros vetores também possam estar envolvidos na transmissão. O ser humano quando infectado, outras vias de transmissão podem ocorrer, tais como a transmissão através do contato sexual, transmissão intrauterina (mãe ao feto), bem como a transmissão através da transfusão sanguínea.

2.5 Doença

De modo geral, a infecção pelo ZIKV é autolimitada, apresenta baixa mortalidade e aproximadamente cerca de 80% dos indivíduos acometidos apresentam a doença de forma assintomática, ou seja, o paciente é infectado com o vírus, mas não apresenta os sinais clínicos da doença (DUFFY *et al.*, 2009). Quando presente, os sintomas da infecção incluem erupção cutânea, febre, dor de cabeça, e artralgia (FARIA, *et al.*, 2016). Outros sintomas menos comuns já descritos incluem astenia, mal-estar, mialgia, calafrios, distúrbios digestivos, dor retro-orbital e linfadenopatia cervical (DUFFY *et al.*, 2009; OLSON *et al.*, 1981; ZANLUCA *et al.*, 2015). Entretanto, a principal preocupação quanto à infecção com o

ZIKV é decorrente da sua íntima relação com a gênese da microcefalia, bem como outras malformações congênicas observadas em neonatos, além de também estar associado com o estabelecimento de manifestações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré e meningoencefalite (RASMUSSEN *et al.*, 2016).

O manejo terapêutico para combater a infecção viral usualmente é através da terapia de suporte e alívio dos sintomas. Apesar dos esforços e progressos da ciência, atualmente não há nenhuma terapia antiviral disponível para as infecções causadas pelo ZIKV, como também não há vacina disponível. Entretanto, há algumas drogas descritas recentemente com atividade antiviral capaz de inibir a replicação do ZIKV e vacinas candidatas em diferentes fases de desenvolvimento (DE CARVALHO *et al.*, 2017). Dada à falta de antivirais e vacinas contra o ZIKV, o controle de vetores ainda representa a estratégia mais eficaz de limitar a propagação do vírus e o estabelecimento de surtos da doença.

Figura 4 - Características e achados clínicos em neonatos com a síndrome congênita do Zika.



Fonte: Adaptada de Meneses *et al.*, (2017).

Legenda: Achados clínicos em recém-nascidos que nasceram com a síndrome congênita do Zika. Desproporção craniofacial (A), malformação das articulações (Artrogrifose) (B) e calcificações cerebrais obtidas a partir de uma tomografia computadorizada (C).

2.6 Diagnóstico

Em regiões em que existe uma circulação de outros arbovírus, como por exemplo, DENV e CHIKV, o diagnóstico clínico da infecção pelo ZIKV torna-se extremamente difícil uma vez que os sinais clínicos e sintomas são muito semelhantes. Sendo assim, o diagnóstico laboratorial assume um papel fundamental para o diagnóstico do vírus. Laboratorialmente, a

infecção pelo ZIKV pode ser diagnosticada indiretamente pela detecção de anticorpos circulantes ou diretamente, pela detecção direta do vírus através de métodos moleculares. Inúmeros arbovírus transmitidos por mosquitos, incluindo DENV, CHIKV e ZIKV são endêmicos e co-circulam em todo o Brasil, o que dificulta de sobremaneira um diagnóstico clínico eficiente e confiável através dos médicos (MAGALHAES *et al.*, 2017; PESSÔA *et al.*, 2016).

2.6.1 Isolamento viral

Métodos baseados na utilização do cultivo celular para detectar o ZIKV são amplamente utilizados em laboratórios de saúde pública e de pesquisas, mas apesar do isolamento viral representar uma estratégia altamente específica para detectar o ZIKV, é altamente laborioso e necessita de mão de obra altamente especializada, o que limita de sobremaneira a sua utilização para diagnosticar o ZIKV. Atualmente, o método de referência para o isolamento de arbovírus, incluindo o ZIKV é através da inoculação intracerebral em ratos (DICK *et al.*, 1952; DIGOUTTE *et al.*, 1992). Além disso, o ZIKV pode ser isolado a partir de diversas linhagens celulares, incluindo células de rim de macaco verde africano (Vero) e células de mosquito *Aedes albopictus* (C6/36) (DIGOUTTE *et al.*, 1992; HADDOW *et al.*, 2012).

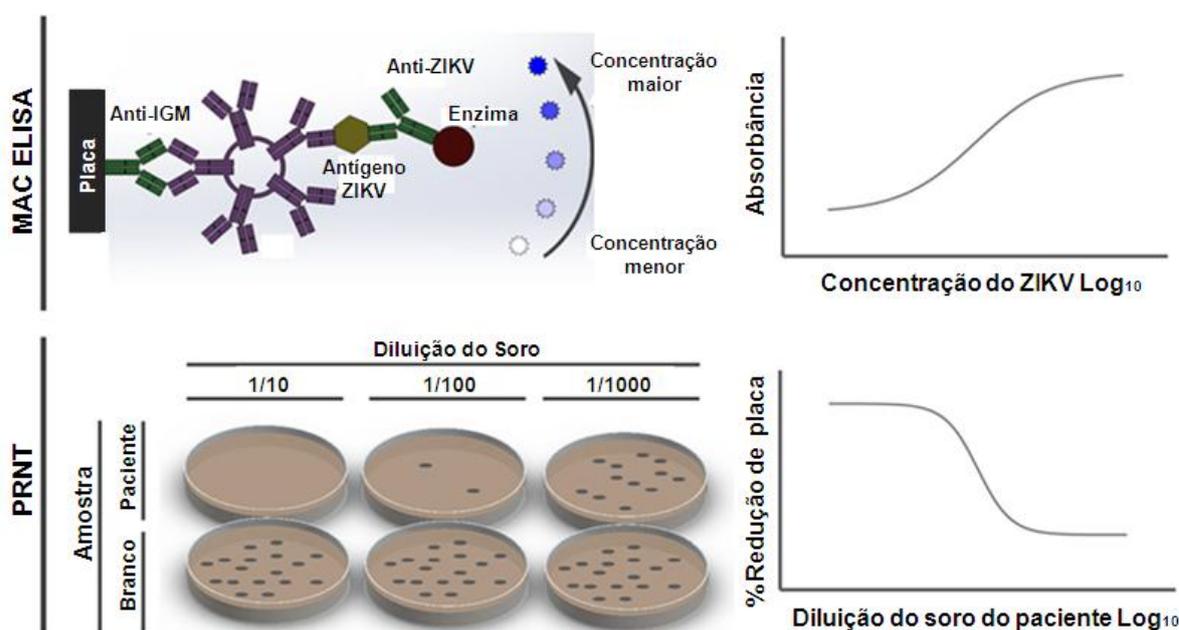
2.6.2 Métodos sorológicos

A detecção dos anticorpos circulantes pode ser feita por diferentes metodologias, tais como ELISA, imunofluorescência indireta ou imunocromatografia, também conhecido como teste rápido. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (em inglês: *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC) desenvolveu uma técnica de ELISA para detecção específica de IgM anti-Zika durante a epidemia na Micronésia em 2007. A presença de anticorpos da classe IgM caracteriza a infecção aguda, podendo ser detectáveis após 4 dias de infecção até 2-12 semanas, na fase de convalescência. Os anticorpos da classe IgM devem ser confirmados por um teste de neutralização por redução de placas (PRNT) frente ao ZIKV e o título comparado ao obtido contra outros flavivírus circulantes na área (Figura 5).

Apesar de valiosa para o diagnóstico nos casos de primoinfecção por um flavivírus, as técnicas sorológicas, podem apresentar resultados falso-positivos devido às reações cruzadas

com outros flavivírus, como o vírus da Dengue e o da Febre Amarela, seja através da infecção ou vacinação (LANCIOTTI *et al.*, 2008). A técnica de ELISA e, em especial a de PRNT, exigem uma infraestrutura laboratorial bastante sofisticada, o que associadas ao problema da reatividade cruzada, limitam a eficácia e utilidade do diagnóstico sorológico da infecção pelo ZIKV.

Figura 5 - Representação esquemática dos ensaios sorológicos (MAC ELISA e PRNT) utilizados para o diagnóstico do ZIKV.



Fonte: Adaptada de Nicolini *et al.* (2017, tradução nossa).

Legenda: Esquema dos ensaios sorológicos utilizados para o diagnóstico do ZIKV, incluindo o ensaio de imunoabsorção enzimática por captura de anticorpos IgM (MAC ELISA) e o teste de neutralização por redução de placa (PRNT). No MAC ELISA, a presença de anticorpos da classe IgM produzidos em resposta a infecção pelo ZIKV pode ser detectado após 4 dias de infecção até 2-12 semanas, na fase de convalescência. No PRNT, são realizadas diluições do soro do paciente que posteriormente são misturadas com concentrações fixas do vírus. Em seguida, essa mistura é adicionada em cultura de células confluentes. Anticorpos presentes em amostras de pacientes infectados são capazes de neutralizar o vírus, levando a uma redução do número de placas formadas.

2.6.3 Métodos moleculares

O diagnóstico molecular pode ser realizado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) antecedida pela reação da transcrição reversa que converte o RNA viral em cDNA. Os testes moleculares detectam a presença do vírus em amostras por meio de amplificação do seu material genético. Atualmente, a transcrição reversa seguida da PCR

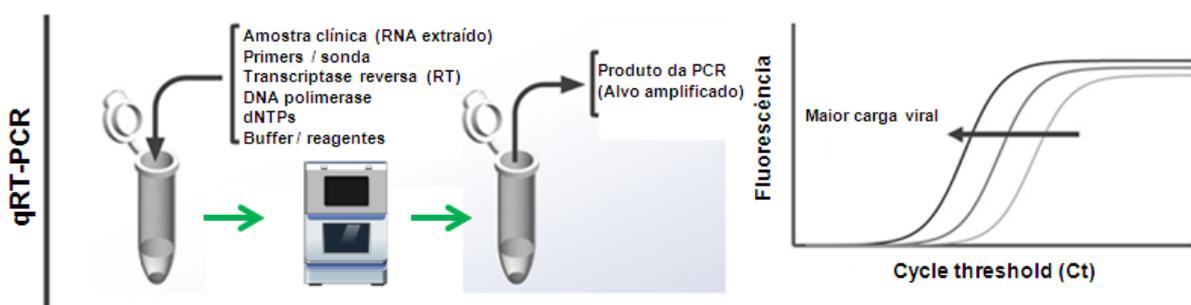
quantitativa (qRT-PCR) é a técnica padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV em amostras clínicas humanas, incluindo soro, plasma, urina, saliva, fluido amniótico e líquido cefalorraquidiano (LCR), bem como em amostras de mosquitos (FAYE *et al.*, 2013; WAGGONER, PINSKY, 2016).

2.6.3.1 qRT-PCR

Faye e colaboradores desenvolveram, em 2008, o primeiro teste de diagnóstico de RT-PCR para o ZIKV, usando como alvo o gene envelope. O teste foi desenhado com base em amostras ZIKV isoladas a partir de seres humanos e mosquitos na África Ocidental e mostrou-se rápida, específica e relativamente sensível para detecção viral (FAYE *et al.*, 2013). No mesmo ano, um teste de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) foi desenvolvido para auxiliar no diagnóstico da epidemia da Micronésia de 2007, sendo capaz de detectar até 25 cópias genômicas (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Recentemente, o CDC desenvolveu um kit Triplex baseado na qRT-PCR que permite a detecção do ZIKV, DENV e CHIKV de forma simultânea em um único ensaio, sendo capaz de detectar os três arbovírus em até 10^3 cópias do genoma/mL (SANTIAGO *et al.*, 2018).

No entanto, a qRT-PCR exige um elevado custo para a sua execução, requer mão de obra altamente especializada e envolve equipamentos caros e sofisticados para amplificação e detecção do genoma viral, o que limita de sobremaneira a capacidade de diagnóstico laboratorial em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Além disso, as enzimas, kits e sondas utilizadas nesses testes são muito onerosos para a realidade da maioria dos laboratórios brasileiros (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática do método padrão-ouro (qRT-PCR) atualmente utilizado para o diagnóstico do ZIKV.



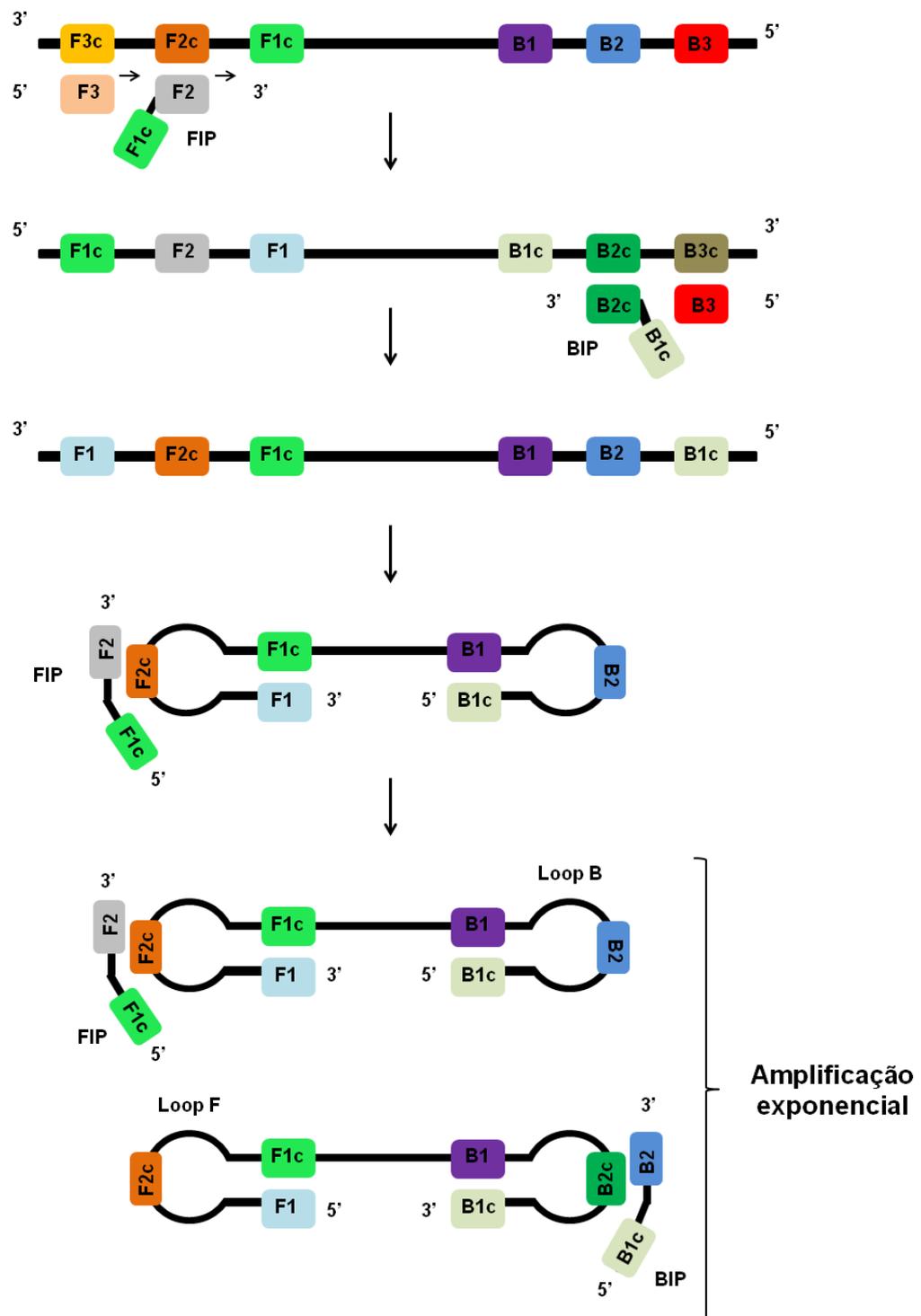
Fonte: Adaptada de Nicolini *et al.* (2017, tradução nossa).

Legenda: A transcrição reversa seguida da PCR quantitativa (qRT-PCR) é a técnica padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV em amostras clínicas humanas e amostras de mosquitos. Inicialmente, é realizada a extração do RNA da amostra. Após a extração, o RNA extraído é adicionado junto aos outros reagentes necessários para a amplificação do material genético do vírus, incluindo a transcriptase reversa, DNA polimerase, dNTPs, buffer, primers/sonda e água. As reações ocorrem em plataformas de PCR em Tempo Real sob temperaturas previamente estabelecidas em protocolo e o material genético viral amplificado é identificado por fluorescência.

2.6.3.2 RT-LAMP

A técnica de amplificação isotérmica mediada por alça (do inglês *Loop-mediated isothermal amplification* – LAMP) descrita inicialmente por Notomi e colaboradores em 2000 tem se mostrado bastante promissora (NOTOMI *et al.*, 2000) para diagnosticar inúmeros patógenos. Trata-se de um ensaio simples, prático e que não requer o uso de termocicladores, o que tem atraído muita atenção para esta técnica de amplificação de nucleotídeos potencialmente rápida, acurada e com um excelente custo-benefício.

O LAMP tem muitas características que o tornam adequado para uma detecção simples e rápida de ácidos nucleicos em amostras biológicas. É uma técnica inovadora para amplificação de genes, que consiste, basicamente, na amplificação isotérmica do DNA alvo utilizando seis primers diferentes, sendo dois primers externos, dois primers internos e dois primers que hibridizam na volta “*loop*” formado, que são especialmente desenhados para amplificar as regiões no gene alvo (PARIDA *et al.*, 2008). O uso deste conjunto seis primers aumenta a especificidade do teste e ao mesmo tempo aumenta a velocidade da reação (BOEHME *et al.*, 2007) (Figura 7). No caso dos vírus que possuem o material genético constituído de RNA, como o ZIKV, faz-se necessário a realização de uma reação de transcrição reversa (RT-LAMP), de maneira similar às técnicas de RT-PCR e qRT-PCR (BALASURIYA, 2014; BALASURIYA *et al.*, 2014; LAU *et al.*, 2015).

Figura 7 - Representação esquemática do mecanismo da reação do ensaio LAMP.

Fonte: O autor.

Representação esquemática da localização dos três sets de primers, incluindo os externos (F3 e B3), internos (FIP e BIP) e do *loop* (LF e LB) FIP, F3, BIP e B3 e as seis regiões da sequência alvo correspondente (F1c, F2c, F3c, B1c, B2c e B3c).

O ensaio RT-LAMP pode ser realizado através de um protocolo de duas etapas ou um protocolo de uma única etapa. O RT-LAMP de duas etapas requer a adição da enzima transcriptase reversa (RT) juntamente com a enzima DNA polimerase, que pode ser polimerase Bst DNA ou Bst 2.0 polimerase 2.0 WarmStart. Vários estudos descrevem a necessidade de extração de RNA das amostras antes da realização do RT-LAMP e o uso do RT-LAMP em duas etapas (CALVERT *et al.*, 2017; PRIYE *et al.*, 2017; TANNER, EVANS, 2014). No entanto, o protocolo de duas etapas é mais longo, mais caro e requer manipulação adicional de amostras, o que aumenta as chances de erros de pipetagem e contaminação.

O protocolo utilizando a enzima Bst 3.0 Polymerase 3.0 WarmStart possibilita que o ensaio ocorra em uma única etapa. Esta enzima possui alta atividade de transcriptase reversa e polimerase em uma temperatura isotérmica. Além disso, a DNA polimerase Bst 3.0 é uma enzima robusta capaz de manter a sua desempenho mesmo na presença de inibidores de reação (LEE *et al.*, 2016). Isto é especialmente relevante para a detecção viral em amostras biológicas humanas e entomológicas que são caracterizadas por possuírem inibidores de reação (BECKMANN; FALLON, 2012).

O RT-LAMP é uma ferramenta promissora que permite a detecção rápida e prática de inúmeros patógenos (ADAMS *et al.*, 2018; NODEN *et al.*, 2018; OLONINIYI *et al.*, 2017). Diferentemente do método padrão-ouro atualmente utilizado para o diagnóstico do ZIKV (qRT-PCR), a detecção do produto de amplificação do RT-LAMP pode ser obtido por análise na mudança de cor no tubo de reação que pode ser facilmente observado através do olho nu (NEMOTO *et al.*, 2010).

Após o ZIKV ser considerado um problema de saúde pública global, diferentes grupos de pesquisas do mundo todo começaram a buscar novas plataformas de diagnóstico que fossem capazes de detectar o vírus de forma barata, simples e prática (PARDEE *et al.*, 2016; SABALZA *et al.*, 2018). Recentemente, inúmeros trabalhos baseados no RT-LAMP foram desenvolvidos para detectar o ZIKV (CHOTIWAN *et al.*, 2017; LAMB *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; YAREN *et al.*, 2017) (Quadro 1). No entanto, a maioria dos ensaios descritos até o presente momento de RT-LAMP necessitam de equipamentos especiais e sofisticados para a detecção de vírus, o que limita sua aplicabilidade em lugares que apresentam poucos recursos e baixa infraestrutura laboratorial.

Quadro 1 - Estratégias baseadas no LAMP para detecção do ZIKV.

(continua)

Procedimento	Amostras	Estirpes de ZIKV usadas	Região alvo dos primers	Sensibilidade analítica (Limite de detecção)	Necessidade de extração do RNA da amostra	Validação	Referência
One-step – LAMP Detecção: desenvolvimento de cassete baseado em lateral flow assay (LFA).	Sangue humano infectado artificialmente	MR 766 Uganda (AY632535)	Proteína do envelope	1 cópia de RNA	Não	Não	Lee D, <i>et al.</i> 2016
Desenvolvimento de um cassete microfluídico baseado em RT-LAMP. Detecção: através do olho nu com o auxílio do leuco cristal violeta	Saliva infectada artificialmente	MEX 2-81 (Mosquito/2016/ México)	Proteína do envelope	5 PFU/mL	Sim	Não	Song J, <i>et al.</i> 2016.
One-step – LAMP Detecção: desenvolvimento de protocolo de LAMP acoplado com a técnica de susceptometria AC	Soro humano total experimentalment e infectado com oligonucleotídeos sintéticos de ZIKV	Oligonucleotídeos sintéticos de ZIKV	NS5	1 aM	~	Não	Tian, <i>et al.</i> 2016
One-step – LAMP Detecção: monitoramento turbidez acoplado a qRT- PCR. Através do olho nu com calceína e por UV	Saliva, urina e soro infectados artificialmente	ZIKV_SMGC-1 China (KX266255)	NS1	0.02 PFU/mL	Sim	Não	Wang X, <i>et al.</i> 2016

Quadro 2 - Estratégias baseadas no LAMP para detecção do ZIKV.

(continuação)

Procedimento	Amostras	Estirpes de ZIKV usadas	Região alvo dos primers	Sensibilidade analítica (Limite de detecção)	Necessidade de extração do RNA da amostra	Validação	Referência
One-step – RT-LAMP Detecção: através do olho nu	Amostras clínicas de urina e soro humano	Puerto Rico (PRVABC 59)	Proteína do envelope	1.2 cópias de RNA/ μ L	Sim	Sim	Calvert, <i>et al.</i> 2017
One-step – LAMP Detecção: monitoramento da fluorescência acoplado a uma plataforma de PCR em Tempo Real e através do olho nu	Amostras clínicas de soro, plasma e sêmen. Além de sangue, plasma, saliva, urina e sêmen e amostras de <i>Aedes</i> experimentalment e infectados	Puerto Rico (PRVABC59), P6-740 (HQ234449), 41525 (KU955591) e MR 766 Uganda (AY632535)	~	0,05 PFU/mL	Não	Sim	Chotiwan, <i>et al.</i> 2017
Desenvolvimento de um ensaio Trioplex Detecção: desenvolvimento de protocolo de RT-LAMP acoplado com um smartphone para detecção da fluorescência	Sangue humano artificialmente infectado	Puerto Rico (PRVABC59)	NS1	1,5 ⁵ PFU/mL	Sim	Não	Ganguli, <i>et al.</i> 2017
Desenvolvimento de uma plataforma baseada em RT-LAMP. Detecção: monitoramento da fluorescência acoplado a uma plataforma de PCR em Tempo Real.	Amostras clínicas de soro urina. Além de soro e urina infectados artificialmente	Puerto Rico, (PRVABC59)	Proteína do envelope	14,5 TCID ₅₀ /mL	Sim	Sim	Kurosaki Y, <i>et al.</i> 2017

Quadro 3 - Estratégias baseadas no LAMP para detecção do ZIKV.

(continuação)

Procedimento	Amostras	Estirpes de ZIKV usadas	Região alvo dos primers	Sensibilidade analítica (Limite de detecção)	Necessidade de extração do RNA da amostra	Validação	Referência
Desenvolvimento de um ensaio Trioplex para detectar Zika, Denv e Chikv. Detecção: desenvolvimento de protocolo de RT-LAMP acoplado com um smartphone para detecção da fluorescência	Sangue, urina e saliva infectados artificialmente	Puerto Rico (PRVABC59); Honduras (R103451);	NS5	10 ⁰ PFU/mL	Sim	Não	Priye, <i>et al.</i> 2017
Desenvolvimento de um ensaio Trioplex para detectar Zika, Denv e Chikv. Detecção: monitoramento da fluorescência acoplado a uma plataforma de PCR em Tempo Real e através do olho nu	Urina, saliva, plasma e amostras de mosquito infectados artificialmente	Puerto Rico, (PRVABC59, KU501215.1)	NS5	~ 0,71 PFU/ RNAs equivalentes	Sim	Não	Yaren, <i>et al.</i> 2017
Desenvolvimento de uma plataforma baseada em RT-LAMP. Detecção: monitoramento da fluorescência acoplado a uma plataforma de PCR em Tempo Real.	Amostras clínicas de saliva e urina. Além de saliva e urina infectados artificialmente	Puerto Rico, (PRVABC59)	Capsídeo	2,2.10 ³ cópias de RNA/mL	Sim	Não	Castro, <i>et al.</i> 2018

Quadro 4 - Estratégias baseadas no LAMP para detecção do ZIKV.

(conclusão)

Procedimento	Amostras	Estirpes de ZIKV usadas	Região alvo dos primers	Sensibilidade analítica (Limite de detecção)	Necessidade de extração do RNA da amostra	Validação	Referência
Desenvolvimento de uma plataforma baseada em RT-LAMP. Detecção: monitoramento da fluorescência acoplado a uma plataforma de PCR em Tempo Real.	RNA viral	MR 766 Uganda	NS5	3,3 ng/ μ L	Sim	Não	Guo, <i>et al.</i> 2018
Desenvolvimento de plataforma de RT-LAMP acoplada com chips microfluídicos Detecção: monitoramento da fluorescência acoplado a um smartphone	Plasma e urina infectados artificialmente	Partículas de ZIKV purificadas	NS5	1 cópia/ μ L	Sim	Não	Kaarj, <i>et al.</i> 2018
One-step – RT-LAMP Detecção: através do olho nu com SYBR	Amostras clínica de urina. Além de amostras de <i>Aedes</i> experimentalment e infectadas	MR 766 Uganda (AY632535); MEX20 (ZK-HU 0165 P), Puerto Rico (PRVABC 59) e PB81 (H815744)	NS5	1 cópia do genoma/rxn	Não	Não	Lamb, <i>et al.</i> 2018
Desenvolvimento de uma plataforma de RT-LAMP acoplada com um dispositivo microfluídico Detecção: monitoramento da fluorescência e através de dot-blot	Saliva infectada artificialmente	Puerto Rico (PRVABC59); Thailand (PLCal_ZV); Florida (FL); Honduras (R103451);	Capsídeo	2.10^2 cópias de RNA/mL	Sim	Não	Sabalza, <i>et al.</i> 2018

Fonte: O autor.

2.6.4.3 Biossensores

Embora os métodos moleculares e sorológicos sejam utilizados com maior frequência para o diagnóstico do ZIKV na rotina laboratorial, aliado ao fato de aproximadamente cerca de 80% dos indivíduos acometidos apresentarem a doença de forma assintomática e o fato de muitas amostras sofrerem degradação, visto que o material genético do ZIKV é constituído de moléculas de RNA (DUFFY *et al.*, 2009). Diante dessas circunstâncias, ainda permanece a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico que sejam capazes de detectar o vírus de forma simples e prática, tendo em vista que a identificação precoce da infecção pelo vírus diretamente logo após a coleta das amostras é um passo crítico para minimizar a propagação global e facilitar o controle do ZIKV (NICOLINI *et al.*, 2017).

Apesar de o ZIKV ter sido negligenciado por muito tempo pela comunidade científica desde a sua descoberta em 1947, trabalhos previamente publicados com outros flavivírus podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de ferramentas tecnológicas baseada em sensores para o diagnóstico do ZIKV (NICOLINI *et al.*, 2017). No campo dos biossensores, pode-se ressaltar a aplicação dos imunossensores, genossensores e ribossensores para o diagnóstico de infecções ocasionadas pelo ZIKV (FARIA *et al.*, 2016).

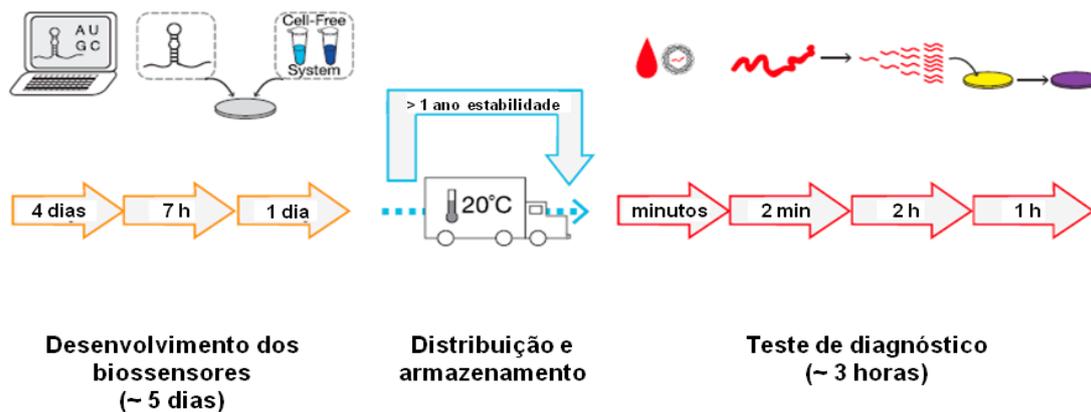
Recentemente, alguns trabalhos reportaram o desenvolvimento de biossensores para a detecção do ZIKV baseado em inúmeros mecanismos e estratégias diferentes (AFSAHI *et al.*, 2018; PARDEE *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2018). Em um desses trabalhos, o Dr. Keith Pardee da University of Toronto-Canadá, desenvolveu duas tecnologias inovadoras que prometem reduzir drasticamente o custo e barreiras técnicas para o desenvolvimento de plataformas de diagnósticos. Especificamente, essas tecnologias incluem um método inédito, livre de células, que permite o uso de genes sintéticos no campo (PARDEE *et al.*, 2014) e novos sensores de RNA programáveis chamados de “*toehold switches*” (PARDEE *et al.*, 2016). Recentemente, Dr. Pardee testou um protótipo dos biossensores baseado em papel para diagnosticar o ZIKV de forma rápida e com baixo custo. Os resultados revelaram que o biossensor foi específico e extremamente sensível a ponto de detectar concentrações ínfimas do vírus em uma escala femtomolar (fN) (PARDEE *et al.*, 2016).

Os biossensores desenvolvidos por Pardee *et al.* atuam como riborreguladores sintéticos programáveis capazes de controlar a tradução da enzima LacZ mediante a hibridização entre o RNA gatilho e sequências complementares presentes no biossensores. Os interruptores assumem uma estrutura de *hairpin* que bloqueiam a tradução da enzima LacZ devido ao sequestro do sítio de ligação ao ribossomo (RBS) e o códon de iniciação. Após a

ligação entre o RNA gatilho complementar e o interruptor, como resultado, ocorre o disparo da tradução da enzima LacZ. Para auxiliar o resultado através do olho nu, o próprio biossensor contém o substrato da enzima. Após a ativação dos biossensores, a enzima LacZ quando traduzida, converte um substrato amarelo (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosido) a um produto roxo (clorofenol vermelho) (Figura 8).

Segundo Kaushik *et al.* (2017) apesar das conquistas significativas no desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico do ZIKV, permanece ainda a necessidade do desenvolvimento de novos biossensores para detectar especificamente o ZIKV em baixos títulos virais que sejam acessíveis para a população. Essas plataformas de diagnóstico são cruciais para a detecção do vírus logo após a infecção em amostras de humanos, bem como para detecção do ZIKV em amostras de mosquitos. Além disso, também auxiliam na tomada de decisões terapêuticas rápidas (KAUSHIK *et al.*, 2017).

Figura 8 - Fluxograma para o desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico rápido do ZIKV.



Fonte: Pardee *et al.* (2016, tradução nossa).

Legenda: Para o desenvolvimento dos biossensores, foram utilizadas informações de banco de dados *on-line* com o auxílio de algoritmos construídos propositalmente. Uma vez sintetizados, os interruptores foram montados e validados em menos de 7 horas. No dia seguinte, os interruptores foram incorporados em discos de papel filtro e em seguida liofilizados, juntamente com um sistema de transcrição e tradução na ausência de células. Importante ressaltar o que o fato de liofilizar os biossensores permite um maior tempo de estabilidade, permitindo assim, que eles sejam distribuídos e armazenados. Para o teste de diagnóstico, o RNA é extraído através da fervura da amostra sob 95° durante 2 minutos e posteriormente aplicado nos biossensores. A detecção do RNA alvo é indicada por uma mudança de cor no disco de papel de amarelo para roxo.

3 JUSTIFICATIVA

As infecções ocasionadas pelo ZIKV são consideradas emergentes, com diagnóstico clínico difícil em regiões endêmicas para dengue e outros arbovírus devido à similaridade dos sinais clínicos e sintomas, principalmente em países em desenvolvimento que possuem uma ampla de circulação de mosquitos vetores competentes, como o Brasil. Dessa maneira, o diagnóstico laboratorial é extremamente importante para o estabelecimento do diagnóstico e, conseqüentemente, da terapia. (CORDEIRO *et al.*, 2016; DONALD *et al.*, 2016; HAZIN *et al.*, 2016; MENESES *et al.*, 2017).

Ao contrário da detecção viral direta, as técnicas sorológicas oferecem uma janela de oportunidade mais ampla para o diagnóstico. Entretanto, as técnicas disponíveis atualmente apresentam resultados falso-positivos devido às reações cruzadas com outros flavivírus e são, portanto, de valor limitado (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Já as técnicas de detecção viral direta, incluindo isolamento viral e as técnicas moleculares, são sensíveis e específicas. Entretanto, as técnicas moleculares apresentam custo elevado e necessitam de mão de obra altamente especializada e de equipamentos caros e sofisticados para amplificação e detecção do genoma viral, tais como o termociclador, o que limita de sobremaneira a capacidade de diagnóstico laboratorial para atender a demanda hospitalar.

Diante disso, este trabalho visa desenvolver duas plataformas de diagnóstico para o ZIKV. Com a execução da presente proposta, que usa ferramentas biotecnológicas inovadoras de ponta, pretende-se validar técnicas de baixo custo para a detecção do ZIKV em amostras biológicas humanas e amostras de mosquitos. Além de seu impacto direto no controle da atual epidemia de Zika, este projeto permitirá o desenvolvimento de duas plataformas de diagnóstico com grande potencial inovador, com possibilidade de obtenção de patentes, transferência e comercialização.

Ao estender nossas plataformas para a região da epidemia, a equipe multidisciplinar que compõe o projeto pretende contribuir para melhoria da saúde humana e para retardar a propagação do surto da doença e estabelecer melhores estratégias de controle do ZIKV.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Será que o RT-LAMP e os biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” são ferramentas moleculares de baixo custo sensíveis, específicas e promissoras para o diagnóstico do ZIKV em amostras humanas e mosquitos?

5 HIPÓTESE

O RT-LAMP e os biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” são ferramentas moleculares de baixo custo sensíveis, específicas e promissoras para o diagnóstico do ZIKV em amostras humanas e mosquitos.

6 OBJETIVO GERAL

Desenvolver ferramentas moleculares rápidas e de baixo custo para o diagnóstico do ZIKV em amostras humanas e amostras de mosquitos.

6.1 Objetivos específicos

- a) Desenvolver e padronizar a técnica de RT-LAMP para a detecção viral em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* experimentalmente e naturalmente infectados com o ZIKV;
- b) Comparar a sensibilidade e especificidade do RT-LAMP com a qRT-PCR para a detecção de ZIKV em amostras de mosquitos;
- c) Demonstrar as diferenças de custos entre as técnicas de RT-LAMP e qRT-PCR para o diagnóstico do ZIKV em amostras de mosquitos;
- d) Avaliar a sensibilidade e especificidade dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” para a detecção de ZIKV em amostras humanas.

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O presente tópico descreve todos os métodos empregados no decorrer do trabalho. Neste espaço é descrito as células e vírus utilizados; extração de RNA; RT-LAMP; Biossensores moleculares; qRT-PCR; detecção do ZIKV em amostras de mosquitos sob condições controladas; avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP; avaliação da sensibilidade analítica do RT-LAMP; validação do RT-LAMP; sequenciamento dos fragmentos do RT-LAMP; considerações éticas e análise estatística.

7.1 Células e vírus

As células Vero (Células primárias de rins de macaco verde africano) foram mantidas em meio de *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal inativado (SFB) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco) a 37°C em 5% de CO₂. Para a execução de todos os experimentos deste trabalho, foi utilizada a cepa do ZIKV denominada ZIKV/H (sapiens/Brazil/PE243/2015). Essa cepa foi isolada através da inoculação do soro de um paciente infectado pelo ZIKV em 2015 na linhagem celular de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36. Após o isolamento, o vírus foi propagado uma vez nas mesmas células e os estoques virais foram produzidos em células Vero e armazenados a -80 °C até o momento do uso na Coleção de Vírus do Departamento de Virologia da Fiocruz/PE. O vírus foi titulado por ensaio de placa e possui o título de $8,0 \times 10^7$ unidades formadoras de placa por mililitro de sobrenadante celular (PFU/mL).

Outros arbovírus, incluindo DENV-1 (PE / 97-42735), DENV-2 (PE / 95-3808), DENV-3 (PE / 02-95016), DENV-4 (PE / 10-0081), YFV (17DD) e CHIKV (PE2016-480) foram adquiridos da Coleção de Vírus do Departamento de Virologia da Fiocruz/PE. Os estoques virais também foram produzidos em células Vero e os sobrenadantes celulares contendo partículas virais foram usados para avaliar a especificidade analítica do ensaio RT-LAMP. Com exceção do YFV (17DD), que é uma cepa vacinal, todos os outros vírus foram isolados de humanos em Pernambuco, Brasil.

7.2 Extração de RNA

7.2.1 Extração de RNA por Kit

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Para tanto, 140µL de amostra (urina, soro, saliva, sêmen e macerado de mosquito) foi empregada para extração conforme instruções do fabricante, o RNA foi eluído em um volume final de 60µL e estocado em freezer -80°C para realização dos ensaios moleculares posteriormente.

7.2.2 Extração de RNA por Fervura

A extração do RNA das amostras utilizando o método de fervura foi realizada de acordo com as condições previamente descritas pelo Dr. Keith Pardee (PARDEE *et al.*, 2016). Para tanto, a amostra foi incubada sob uma temperatura de 95°C durante 2 minutos em banho-maria (PARDEE *et al.*, 2016). Em seguida, o produto da extração foi estocado em freezer -80°C para realização dos ensaios moleculares.

7.2.3 Extração de RNA por Trizol

A extração do RNA utilizando a purificação com Trizol (Gibco BRL, USA), foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Para tanto, 100µL de amostra (urina, soro, saliva, sêmen e macerado de mosquito) foi empregada para extração conforme instruções do fabricante, o RNA foi eluído em um volume final de 30µL em água livre de RNase e estocado em freezer -80°C para realização dos ensaios moleculares posteriormente.

7.3 RT-LAMP

Inicialmente, foram padronizadas todas as concentrações de todos os reagentes, bem como todas as condições do ensaio RT-LAMP. A otimização da temperatura de reação foi avaliada sob as seguintes temperaturas (59°C, 62°C, 65°C, 68°C, 72°C e 75°C) e o tempo de incubação sob os seguintes tempos (10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min e 60 min). Quanto aos reagentes, foram otimizadas às concentrações ótimas de Mg²⁺ (2 mM, 4 mM, 6

mM, 8mM e 10 mM), enzima Bst 3.0 (2 U, 4 U, 8 U, 12 U, 16 U e 32 U) e dNTPs (0.6 mM, 1.0 mM, 1.4 mM, 1.8 mM e 2.2 mM). Além disso, foi verificado se todos os primers, incluindo os externos (F3 e B3), internos (FIP e BIP) e do loop (LF e LB) eram necessários para a execução do ensaio RT-LAMP. Após a otimização de todos os parâmetros e condições do ensaio, foi estabelecido um protocolo padrão para a execução de todos os experimentos posteriores, conforme descrito abaixo.

As reações de RT-LAMP foram realizadas em triplicata em um volume total de 25 µL contendo 1x Tampão de Amplificação Isotérmica, 8 mM MgSO₄, 4 U de Bst DNA polimerase [versão 3.0 WarmStart; New England Biolabs (NEB)], trifosfatos de desoxinucleotídeos 1,8 mM (dNTPs) (ThermoFisher Scientific), 1.6 µM de FIP, 1.6 µM de BIP, 0.2 µM de F3, 0.2 µM de B3, 0.4 µM de LF, 0.4 µM de LB e 5 µL de amostra (controle sem molde (NTC), RNA extraído ou amostras sem extração de RNA). Estes primers foram descritos previamente e se anelam na região genômica que corresponde a proteína E do ZIKV (SONG *et al.*, 2016) (Quadro 2). A fim de visualizar as reações positivas e evitar possíveis problemas de contaminação, 1 µL de SYBR Green I (ThermoFisher Scientific) diluído em água livre de RNase (Promega) na proporção de 1:10 foi adicionado no centro das tampas do tubo de reação antes do período de incubação. Após o término do tempo de incubação, o SYBR contido na tampa do tubo foi misturado com a amostra.

As reações foram incubadas a 72°C durante 20 minutos em um termobloco e em seguida foram inativadas a 80°C durante 5 minutos. Para avaliar a performance do ensaio para aplicações POC, todo o estabelecimento e execução de reações do RT-LAMP foram realizadas em uma bancada de laboratório convencional utilizando pipetas e ponteiros com filtro designadas. O registro e a análise das imagens ocorreram em salas separadas e todos os experimentos foram replicados de forma independente pelo menos três vezes.

Após a incubação, as reações dos produtos RT-LAMP foram detectadas usando três métodos diferentes. No primeiro método, os produtos foram observados através do olho nu sob luz natural e fotografados usando uma câmera convencional de celular (iPhone, Apple). Uma mudança de cor de laranja para amarelo esverdeado foi usada para identificar a amostra positiva, enquanto uma amostra negativa permaneceu laranja. O segundo método foi realizado através da análise visual dos tubos de reação sob irradiação com luz ultravioleta (UV), utilizando um transiluminador (modelo UVB LTB 20 × 20 STV, Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) acoplado a uma câmera e conectado a um computador. Neste método, as amostras negativas foram azuis escuras e as reações positivas foram fluorescentes. No terceiro método, os amplicons do RT-LAMP foram analisados por eletroforese em gel de agarose

(2,0%) em tampão TAE 1x, seguido de coloração com brometo de etídio e visualização do gel com auxílio do transiluminador. Para a análise por eletroforese, utilizou-se o DNA Ladder de 1 kb Plus (ThermoFisher Scientific) como marcador de peso molecular do DNA.

Quadro 5 - Primers utilizados no ensaio do RT-LAMP para detecção do ZIKV.

Primer	Sequência (5'-3')	Referência
FIPs	GGCGACATTTCAAGTGGCCAGAGAGCTCTRGAGGCTGAGA	Song <i>et al.</i> , 2016
BIPs	AGGGCGTGTGCATACTCCTTGTGAGTGTTCAGCCGGGATCT	Song <i>et al.</i> , 2016
F3s	CAGTTCACACGGCCCTTG	Song <i>et al.</i> , 2016
B3s	TGTACCTCCACTGTGACTGT	Song <i>et al.</i> , 2016
LFs	CCTTCCCTTTGCACCATCCA	Song <i>et al.</i> , 2016
LBs	TACCGCAGCGTTCACATTCA	Song <i>et al.</i> , 2016

Fonte: Song *et al.* (2016).

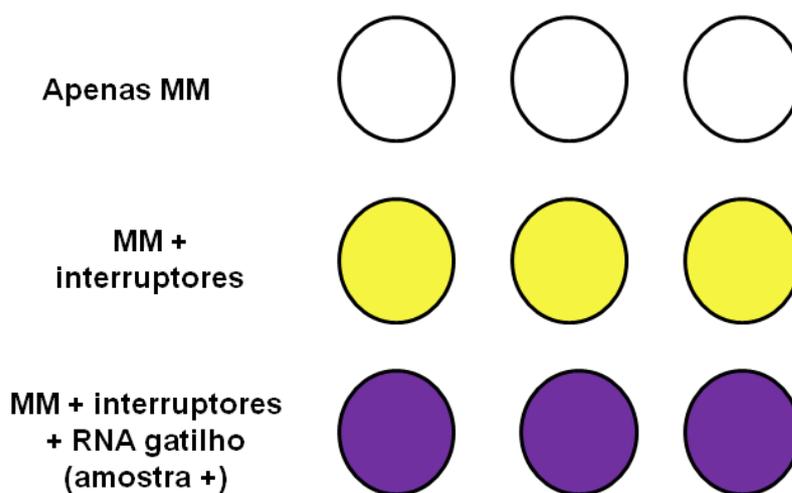
7.4 Biossensores moleculares

Resumidamente, os biossensores utilizam como base discos de papel filtro (2 mm) contendo um sistema livre de células que possui todos os componentes necessários para a transcrição e tradução *in vitro* (NEB, PURExpress) na presença de uma região complementar do genoma do ZIKV (128-178 nts). Os biossensores possuem em sua composição: Solução NEB A (40%) e B (30%), clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (Sigma, 0,6 mg / ml), inibidor da RNase (Roche, 03335402001; 0,5%) e construções lineares de DNA codificando os interruptores (0,33 nM). Os discos de papel Whatman foram bloqueados em albumina do soro bovino (BSA) a 5% durante a noite anterior antes da utilização. Após a preparação dos biossensores em placas de 384 poços de fundo preto transparente (Corning 3544), 1,8 μ L das amostras foram aplicadas conforme esquema descrito no esquema abaixo (Figura 9) e posteriormente incubadas a 37°C com o auxílio de um leitor eletrônico óptico portátil acoplado de uma câmera fotográfica (BioTek Neo) para registrar as imagens, sendo possível identificar o resultado através do olho nu decorrente da mudança de cor dos biossensores. A cor amarela caracteriza uma amostra negativa para o ZIKV, incluindo os controles negativos permanecem na cor amarela. Em contraste, a cor roxa caracteriza uma amostra positiva para o ZIKV (Figura 10). As amostras foram testadas em triplicata de forma independente.

Figura 9 - Leitor eletrônico óptico portátil.

Fonte: Pardee *et al.*, (2016).

Nota: O leitor eletrônico óptico acoplado de uma câmera fotográfica (BioTek Neo) utilizado para registrar as imagens obtidas a partir dos biossensores.

Figura 10 - Layout utilizado para aplicação das amostras nos biossensores.

Fonte: O autor.

Essa ilustração representa a forma de como as amostras foram aplicadas nos biossensores na placa de 384 poços. Apenas Master Mix (MM) caracteriza os discos de papel que receberam apenas os componentes necessários para a transcrição e tradução *in vitro* (discos de papel branco). MM + interruptores caracteriza os discos de papel que receberam os componentes necessários para a transcrição e tradução *in vitro* + região complementar do genoma do vírus Zika, os denominados interruptores (discos de papel amarelo). MM + interruptores + RNA gatilho caracteriza os discos de papel que receberam os componentes necessários para a transcrição e tradução *in vitro* + região complementar do genoma do vírus Zika, os denominados interruptores + RNA gatilho capaz de ativar os biossensores. O biossensor quando ativado, é observada uma mudança de cor de amarelo para roxo (discos de papel roxo).

7.5 qRT-PCR

As amostras com ZIKV foram testadas quanto à positividade da infecção pela técnica de qRT-PCR, padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV, de acordo com protocolos estabelecidos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças - CDC EUA, com pequenas modificações (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Resumidamente, o RNA das amostras foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen Carlsbad, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A qRT-PCR foi realizada utilizando o Kit QuantiNova Probe RT-PCR (QIAGEN, Valência, CA, EUA) com amplificação no equipamento de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) conforme protocolo do fabricante. A mistura da reação (volume total, 15 µL) continha 7,5 µL de Mistura Mestre RT-PCR QuantiNova Probe 2 x, 0.9 µM de cada primer Zika1087 (5'- CCGCTGCCCAACACAAG-3'), Zika1163C (5'- CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3'), e 0.9 µM FAM-labelled 1108 (5'- AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-3') sonda para ZIKV, 0.1 µL de QuantiNova RT Mix, 0.08 µL de QuantiNova ROX Reference Dye, 5 µL das amostras de RNA e água livre de RNase. O programa da reação consistiu em um único ciclo de transcrição reversa por 15 min a 45 ° C, seguido por 5 min a 95 ° C para inativação da transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase, e então 45 ciclos de 5 s a 95 ° C e 45 s a 60°C. A quantidade de RNA viral em cada amostra foi estimada comparando-se os valores do limiar do ciclo *threshold* (Ct) com a curva padrão feita por diluições seriadas na base de 10 vezes do ZIKV BRPE243/2015 previamente titulado.

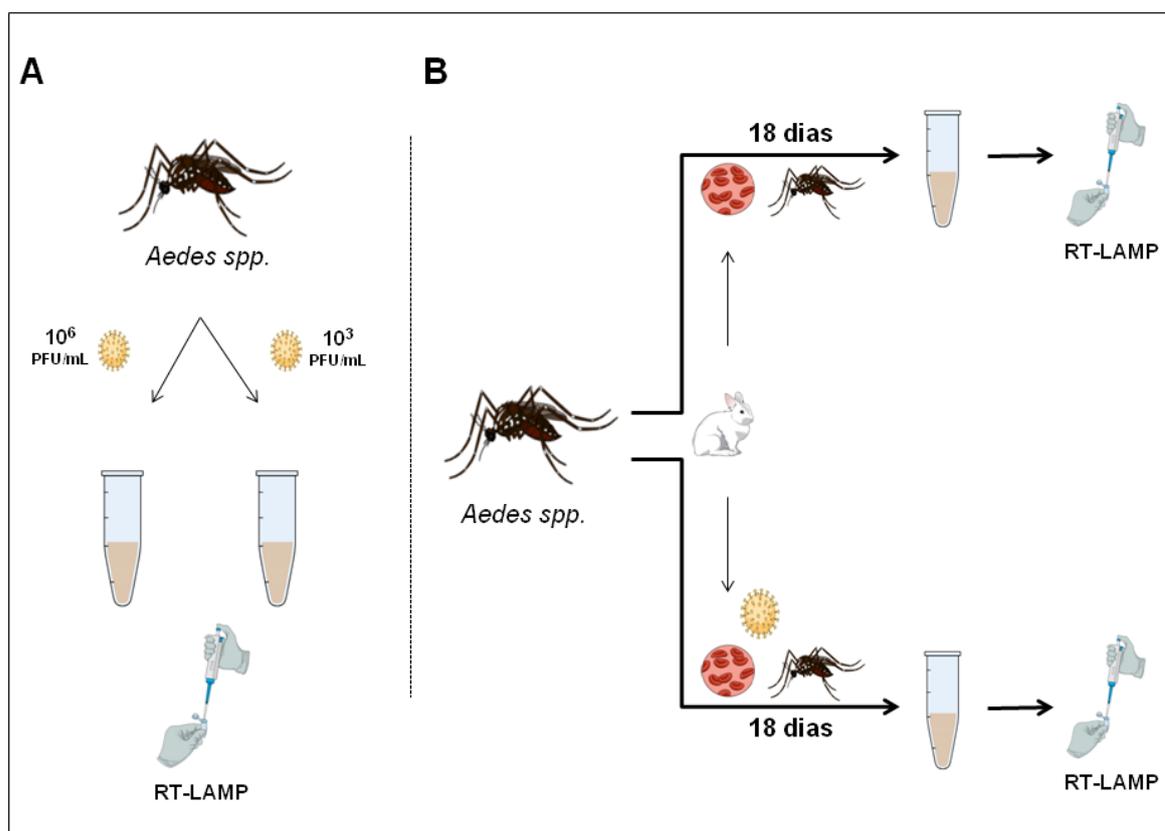
7.6 Detecção do ZIKV em amostras de mosquitos sob condições controladas

Inicialmente, para avaliar a capacidade do RT-LAMP em detectar o ZIKV em amostras de mosquitos, *pools* de mosquitos obtidos de *A. aegypti* ou *C. quinquefasciatus* (n = 10) foram homogeneizados em 300 µL de água livre de RNase e, em seguida, infectados com 1×10^6 ou 1×10^3 PFU/mL do ZIKV, simulando uma situação de alta e baixa carga viral, respectivamente. Após incubação a 37 ° C durante 1 hora, as amostras foram diretamente testadas através do RT-LAMP sem a necessidade de extração do RNA ou nenhum tratamento prévio da amostra (Figura 11A).

Em seguida, a fim de avaliar a detecção do ZIKV pelo RT-LAMP em mosquitos infectados, foram usadas amostras de mosquitos fêmeas de *A. aegypti* experimentalmente

infectados. Resumidamente, a colônia Rec-Lab foi mantida sob condições padronizadas (temperatura, $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 60 a 80% e fotoperíodo 12:12 h C/E) no Laboratório de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM). Para a alimentação artificial, o sobrenadante celular contendo 10^6 PFU/mL de ZIKV foi misturado em sangue de coelho desfibrinado na proporção de 1:1 e posteriormente fornecido aos mosquitos por 90 minutos, como descrito anteriormente (GUEDES *et al.*, 2017). As etapas de infecção e manutenção dos mosquitos infectados foram realizadas seguindo as normas internacionais de biossegurança e o procedimento de infecção oral de *Aedes aegypti* seguiu o protocolo descrito previamente por Carvalho-Leandro (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012). Os mosquitos fêmeas foram coletados 18 dias após a infecção, homogeneizados em $300\ \mu\text{L}$ de água livre de RNase e processados para a realização do RT-LAMP. Os mosquitos alimentados apenas com o sangue de coelho desfibrinado na ausência do ZIKV foram utilizados como controle do experimento (Figura 11B).

Figura 11 - Representação esquemática da metodologia utilizada para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos sob condições controladas.



Fonte: O autor.

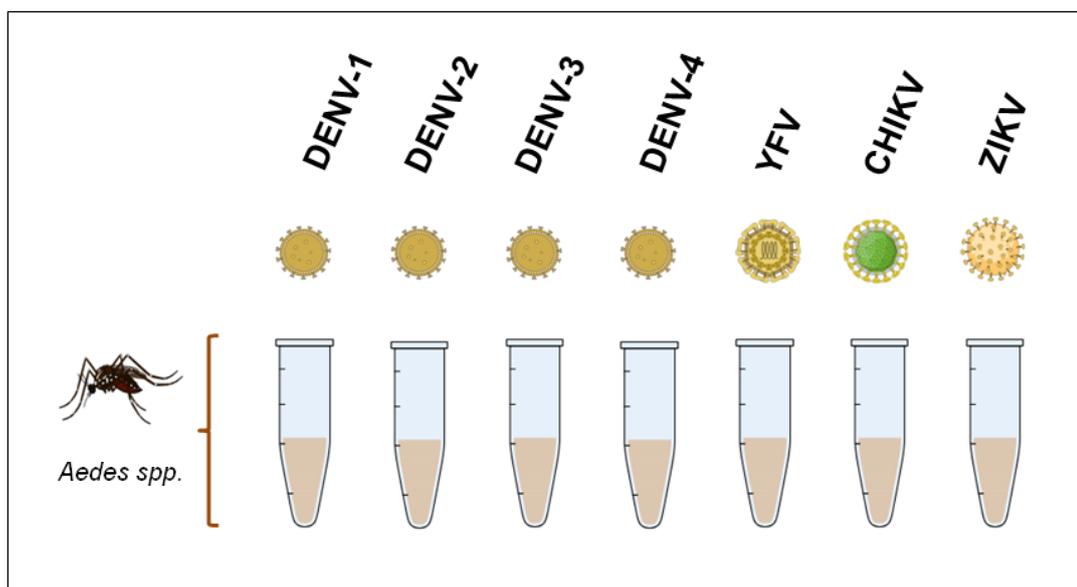
Legenda: Inicialmente, avaliar a capacidade do RT-LAMP em detectar o ZIKV em amostras de mosquitos, *pools* de mosquitos ($n=10$) foram infectados com 1×10^6 ou 1×10^3 PFU/mL do ZIKV, mimetizando uma situação fisiológica de campo de alta e baixa carga viral, respectivamente. Após incubação a 37°C durante 1 hora, as amostras foram diretamente testadas através do ensaio RT-LAMP (A). Posteriormente, a fim de avaliar a detecção do ZIKV pelo RT-LAMP em mosquitos experimentalmente infectados, mosquitos fêmeas *Aedes spp.*, foram divididos em dois grupos: um grupo se alimentou durante 18 dias com sangue de coelho desfibrinado contendo 10^6 PFU/mL de ZIKV na proporção de 1:1 e um outro grupo se alimentou apenas com o sangue de coelho desfibrinado. Após a alimentação durante 18 dias, os mosquitos foram homogeneizados em $300\ \mu\text{L}$ de água livre de RNase e processados para a realização do RT-LAMP (B).

7.7 Avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP

Para avaliar a especificidade dos primers para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos, foram realizados ensaios para avaliar a reatividade cruzada com outros arbovírus usando sete amostras, incluindo ZIKV (PE243), quatro sorotipos diferentes de dengue DENV-1 (PE / 97-42735), DENV-2 (PE / 95-3808), DENV-3 (PE / 02-95016), DENV-4 (PE / 10-0081), YFV (17DD) e CHIKV (PE2016-480).

Inicialmente, foi realizada uma infecção artificial “*spike viral*” de todos os arbovírus descritos acima em amostras de mosquitos (macerado bruto). Após a infecção artificial, as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora e posteriormente foram utilizadas para a realização do ensaio RT-LAMP (Figura 12).

Figura 12 - Representação esquemática da metodologia utilizada para a avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV.



Fonte: O autor.

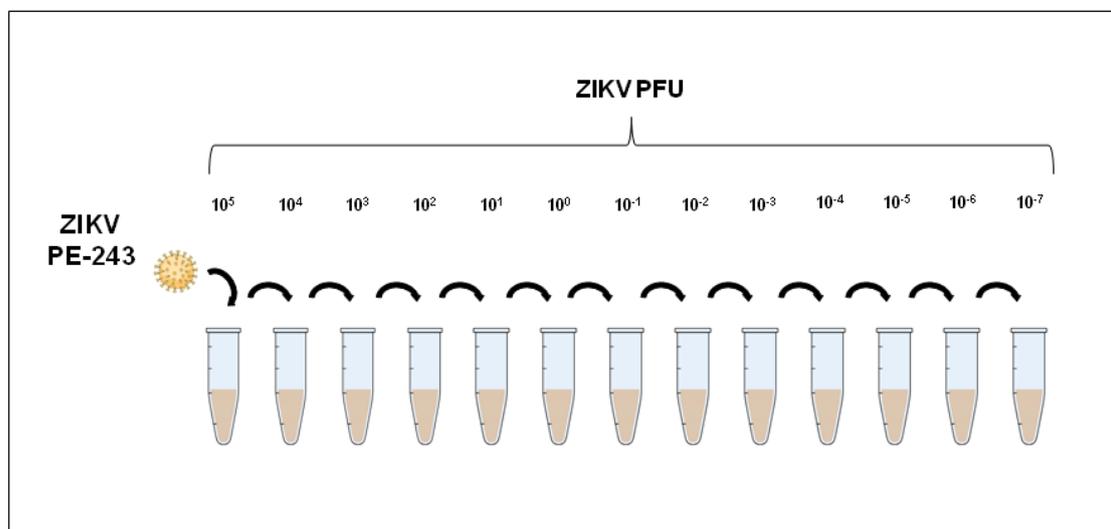
Legenda: Para avaliar a especificidade do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos, o macerado de bruto de *aegypti* foi infectado artificialmente com vários arbovírus, incluindo DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, YFV, CHIKV e ZIKV. Após a infecção, as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora e posteriormente foram utilizadas para a realização do ensaio RT-LAMP.

7.8 Avaliação da sensibilidade analítica do RT-LAMP

A sensibilidade analítica (limite de detecção) do ensaio RT-LAMP em amostras de mosquito foi calculada com base na última diluição em que o genoma viral foi detectado em

todas as repetições do teste. Para analisar o limite de detecção em amostras de mosquito, a cepa ZIKV PE243 foi diluída em série na base de 10 vezes em macerado bruto de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* não infectados. A concentração de vírus nas amostras infectadas variou de 10^5 PFU/mL a 10^{-7} PFU (Figura 13). Após a diluição, as amostras foram diretamente testadas por RT-LAMP sem a necessidade de extração do RNA. Para comparar os resultados do RT-LAMP com a técnica padrão-ouro atualmente utilizada para o diagnóstico do ZIKV, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições e posteriormente testadas por qRT-PCR (LANCIOTTI *et al.*, 2008).

Figura 13 - Representação esquemática da metodologia utilizada para a avaliação da sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV.



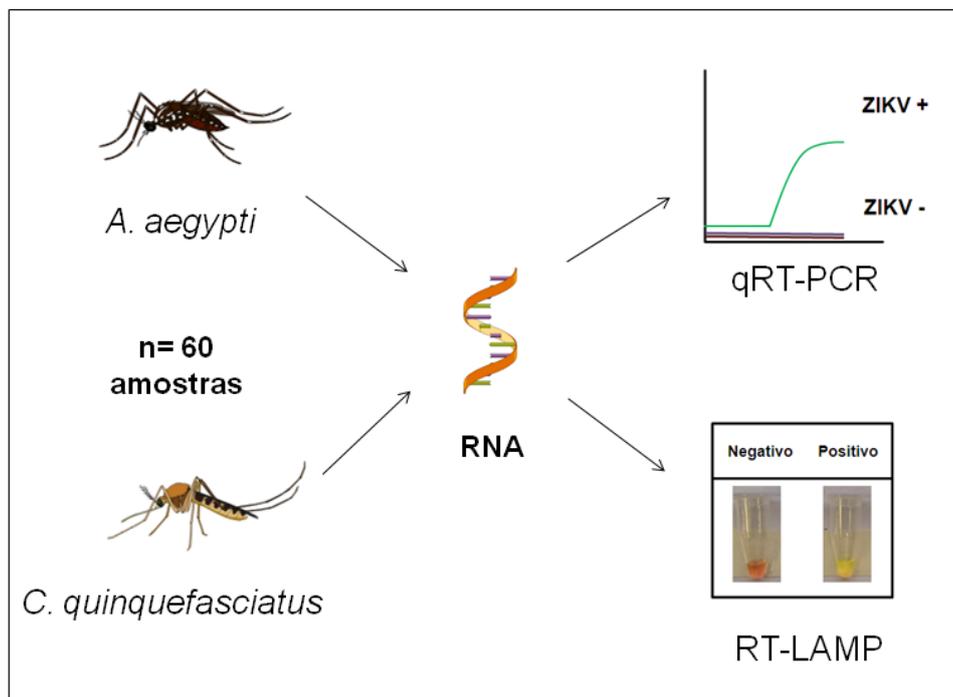
Fonte: O autor.

Legenda: Para analisar a sensibilidade analítica (limite de detecção) em amostras de mosquito, a cepa ZIKV PE243 foi diluída em série na base de 10 vezes em macerado bruto de *A. aegypti* e não infectado. A concentração de vírus nas amostras infectadas variou de 10^5 PFU/mL a 10^{-7} . Após a diluição, as amostras foram diretamente testadas por RT-LAMP.

7.9 Validação do RT-LAMP

Para validar o desempenho do RT-LAMP em detectar o ZIKV em amostras de mosquitos em relação ao qRT-PCR, 60 amostras de *A. aegypti* (n=32) e *C. quinquefasciatus* (n=28) (GUEDES *et al.*, 2017; PAIVA *et al.*, 2017) foram obtidas do Departamento de Entomologia e testadas pelo RT-LAMP (Figura 14). A utilidade diagnóstica intrínseca do ensaio RT-LAMP foi determinada usando vários parâmetros estatísticos. Em seguida, as amostras foram diagnosticadas pela qRT-PCR conforme o protocolo descrito por Lanciotti (2008).

Figura 14 - Representação esquemática da validação do RT-LAMP para detecção do ZIKV em amostras de mosquitos.



Fonte: O autor.

Um total de 60 amostras, incluindo amostras de mosquitos experimentalmente e naturalmente infectados (*A. aegypti* - 32 e *C. quinquefasciatus* - 28) foram obtidas do Departamento de Entomologia/IAM e testadas pelo RT-LAMP e pela qRT-PCR.

7.10 Sequenciamento dos fragmentos do RT-LAMP

A caracterização genética dos fragmentos do RT-LAMP obtidos a partir de amostras positivas oriundas de mosquitos de campo foi realizada pelo método de Sanger. Foram sequenciadas duas amostras positivas de campo obtidas de *Aedes aegypti* (1) e *Culex quinquefasciatus* (1). Após a realização do ensaio RT-LAMP, os fragmentos foram diretamente purificados utilizando o Illustra GFX PCR DNA e o Kit de Purificação de Banda em Gel de acordo com as instruções do fabricante e posteriormente eluídos em 30 μ L de água. Os produtos purificados foram sequenciados usando o primer FIP e o kit de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA) conforme estabelecido pelo fabricante e executado em um sequenciador automático (ABI Prism 3100 Capillary Automatic DNA Analyzer). As sequências de fragmentos foram analisadas usando o software Bioedit, v7.0.5 e submetidas ao banco de dados NCBI - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) para identificar a linhagem de ZIKV mais próxima.

7.11 Análise de custos

Para analisar os custos entre os reagentes de ambas as técnicas, incluindo aqueles utilizados para visualização dos resultados, foi realizado o cálculo do valor, em reais (R\$), para realização de cada teste (reação). Os cálculos foram baseados nos valores de compra de cada reagente no mercado brasileiro.

7.12 Considerações éticas

Os estudos envolvendo amostras de pacientes seguiram estritamente as normas vigentes estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fiocruz-PE e cumpriram todas as exigências da Resolução nº466/12 Conselho Nacional de Saúde (CNS). Foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para todos os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa. O projeto foi aprovado pelo CEP da Fiocruz/PE sob o número **CAAE 80247417.4.0000.5190** e **CAAE 67404117.7.0000.5190**.

7.13 Análise estatística

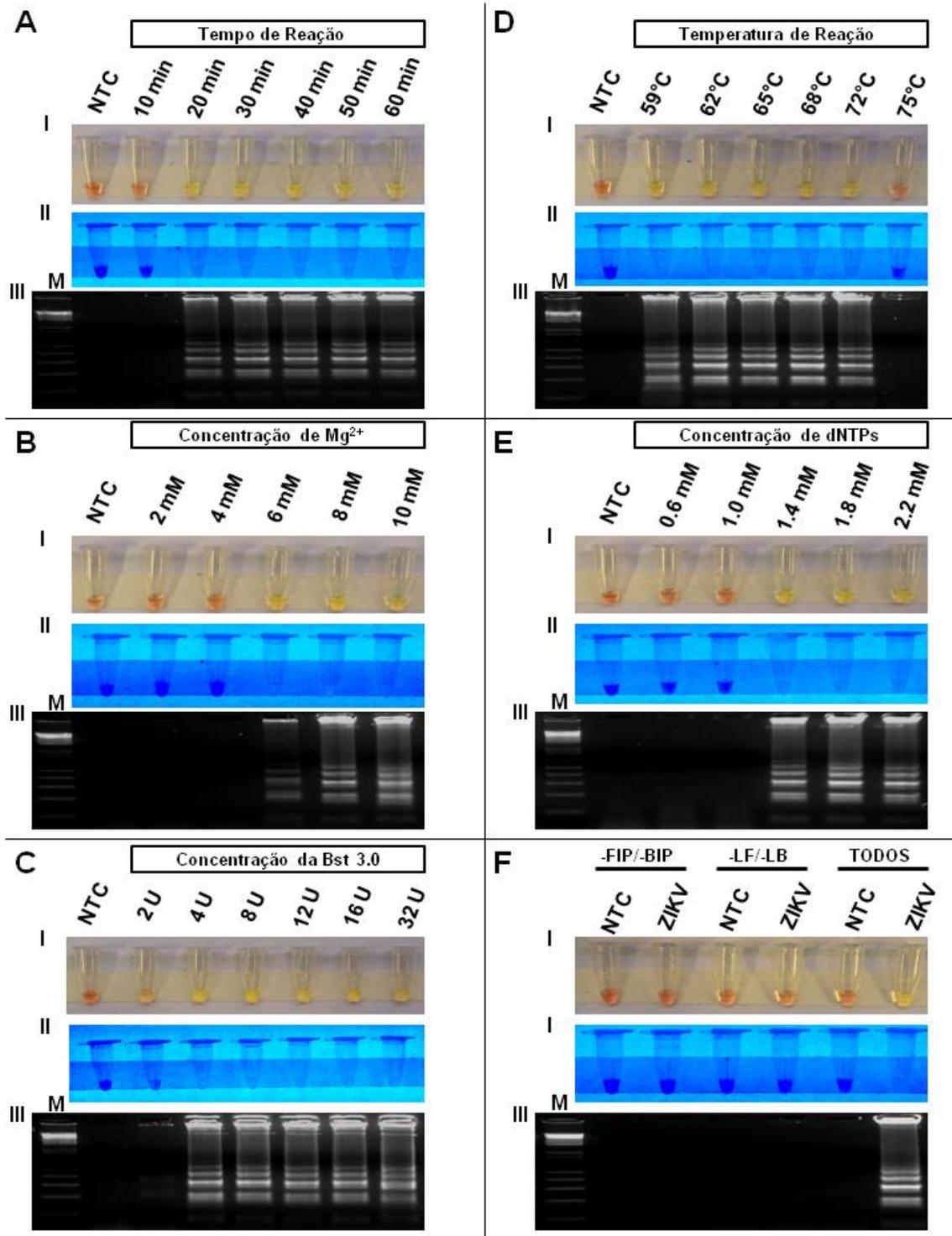
Os gráficos foram gerados usando o software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). A análise de probit foi realizada para calcular o limite de detecção do RT-LAMP para detecção de ZIKV usando o software MedCalc (versão 18.11, MedCalc Software, Ostend, Bélgica). A estimativa dos parâmetros de diagnóstico (sensibilidade, especificidade, prevalência do ZIKV, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia) do RT-LAMP para detecção de ZIKV foi calculada utilizando-se a ferramenta online gratuita denominada *MedCalc's Diagnostic Test Evaluation Calculator*, disponível em: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php. Esta análise foi baseada nos resultados de 60 amostras de mosquitos previamente diagnosticadas pela qRT-PCR.

8 RESULTADOS

O presente tópico descreve todos os resultados obtidos no decorrer do trabalho.

8.1 Otimização dos parâmetros do ensaio RT-LAMP

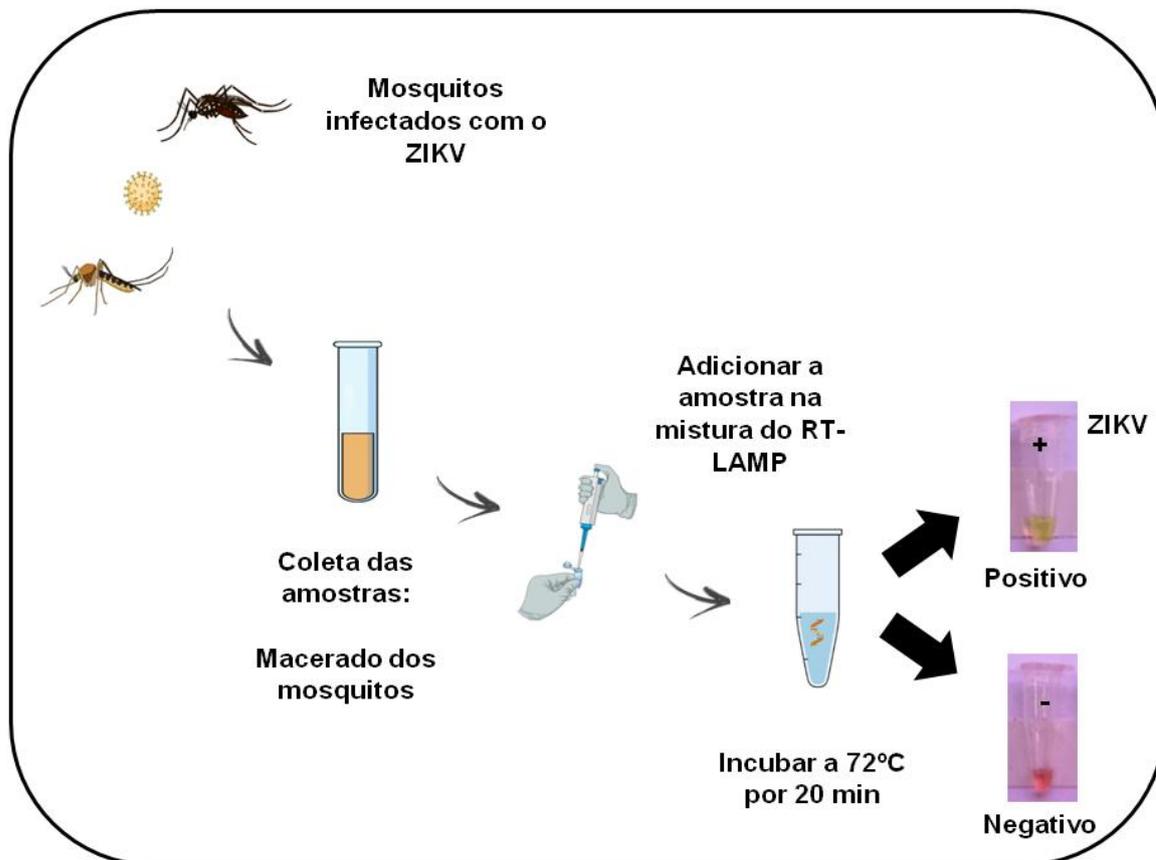
Inicialmente, foram otimizadas todas as concentrações dos reagentes, bem como todas as condições do ensaio RT-LAMP. As reações foram realizadas sob temperaturas variando de 59° C a 75° C e o tempo de incubação variando entre 10 min a 60 min. Quanto aos reagentes, foram otimizadas às concentrações ótimas de Mg^{2+} (variando de 2 mM a 10 mM), enzima Bst 3.0 (variando de 2 U a 32 U) e dNTPs (variando de 0.6 mM a 2.2 mM). Além disso, foi verificado se todos os primers, incluindo os externos (F3 e B3), internos (FIP e BIP) e do loop (LF e LB) eram necessários para a execução do ensaio RT-LAMP. Os melhores resultados de amplificação foram obtidos a 72 ° C por 20 min de incubação (Figura 15A-D). Em relação aos reagentes, as concentrações ótimas foram 8 mM, 4U da enzima e 1.8 mM, respectivamente para os reagentes Mg^{2+} , enzima Bst 3.0 e dNTPs (Figura 15B-C-E). Também foi observado que todos os primers são requeridos para um excelente desempenho do ensaio RT-LAMP (Figura 15F). Após a realização da otimização de todos os parâmetros, um protocolo padrão foi estabelecido para a execução dos experimentos subsequentes (Figura 16).

Figura 15 - Otimização das concentrações dos reagentes e condições do ensaio RT-LAMP.

Fonte: O autor.

Legenda: Todas as concentrações dos reagentes, bem como todas as condições do ensaio RT-LAMP foram otimizadas e estabelecidas. As reações foram realizadas sob tempo de incubação variando entre 10 min a 60 min (A) e temperaturas variando de 59°C a 75°C (D). Quanto aos reagentes, foram otimizadas às concentrações ótimas de Mg²⁺ (variando de 2 mM a 10 mM) (B), enzima Bst 3.0 (variando de 2 U a 32 U) (C) e dNTPs (variando de 0.6 mM a 2.2 mM) (E). Além disso, foi verificado que todos os primers, incluindo os externos (F3 e B3), internos (FIP e BIP) e do loop (LF e LB) eram necessários para a execução do ensaio RT-LAMP (F). Os resultados do RT-LAMP foram observados por mudança de cor visual dos produtos no tubo de reação e através de eletroforese em gel. Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (A-FI), sob irradiação UV (A-FII) e eletroforese em gel de agarose (A-FIII). Legendas: NTC (controle sem molde): água; M: marcador de peso molecular.

Figura 16 - Fluxograma geral do ensaio RT-LAMP.



Fonte: O autor.

Legenda: Representação esquemática do ensaio RT-LAMP descrito ao longo deste trabalho para detectar o ZIKV em amostras de mosquitos. Inicialmente, a amostra é coletada dos mosquitos (*Aedes* e *Culex*). Importante ressaltar que não há necessidade da extração do RNA da amostra, bem como nenhum tratamento prévio da amostra. Após a coleta, a amostra é adicionada junto aos reagentes necessários para a reação do RT-LAMP e posteriormente a reação é incubada a 72°C durante 20 minutos em um termobloco. Após o período de incubação da reação, basta misturar o corante SYBR Green previamente adicionado na tampa do tubo de reação com a amostra. O resultado do teste de diagnóstico pode ser visualmente observado através do olho nu, a cor laranja indica uma amostra negativa para o ZIKV. A mudança da cor laranja para a cor amarela caracteriza uma amostra positiva para o ZIKV.

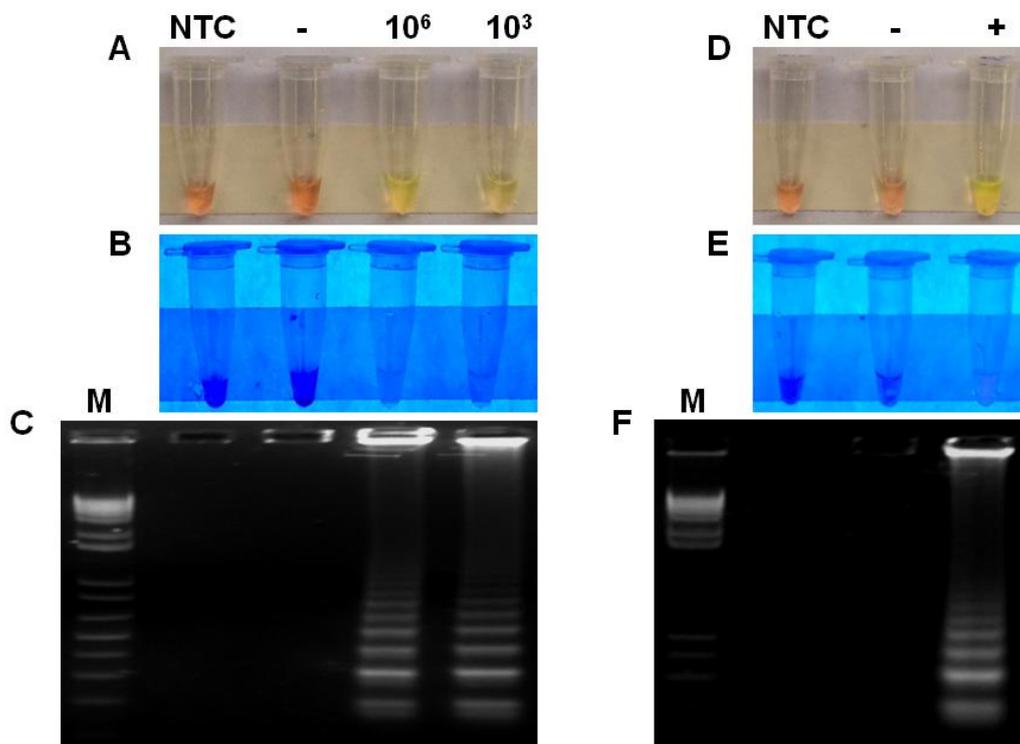
8.2 Detecção do ZIKV em amostras de mosquitos sob condições controladas

Em seguida, foi avaliada a capacidade do RT-LAMP em diagnosticar o ZIKV em amostras de mosquitos. Para este fim, o macerado bruto de mosquitos foi infectado com uma carga viral alta (1×10^6 PFU/mL) ou baixa (1×10^3 PFU/mL) para mimetizar as concentrações fisiológicas do ZIKV nesses vetores. Após a incubação durante 1 h em temperatura ambiente, as amostras foram diretamente testadas através do RT-LAMP sem a necessidade de extração do RNA das amostras. O ensaio RT-LAMP para o ZIKV foi positivo em ambas as cargas

virais testadas. Como esperado, amostras de controle não modelo (NTC) (água) e controle negativo (macerado bruto de *A. aegypti* não infectado) apresentaram resultados negativos (Figura 17A-C). Também foi observado que a extração do RNA não melhorou o limite de detecção do RT-LAMP (dados não mostrados). Os resultados do RT-LAMP foram confirmados por qRT-PCR, através dos quais o valor de Ct foi de 12,1 e 26,8, para alta carga viral e baixa carga viral, respectivamente. Resultados similares foram obtidos utilizando o macerado bruto de *C. quinquefasciatus* infectado com ZIKV (dados não mostrados).

A fim de mimetizar um cenário real de vigilância do ZIKV em mosquitos, foi avaliada capacidade do RT-LAMP em detectar ZIKV em mosquitos *A. aegypti* experimentalmente infectados por via oral com sangue de coelhos infectados com ZIKV. Neste experimento, os mosquitos alimentados apenas o com sangue de coelho na ausência do vírus também foram incluídos como controle. Utilizaram-se macerados de mosquito bruto para o ensaio RT-LAMP sem a extração do RNA. Após a incubação, o RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV apenas nos mosquitos infectados, mas não nos mosquitos alimentados com sangue na ausência do vírus e conseqüentemente não estavam infectados (Figura 17D-F), sugerindo assim, que o teste pode ser útil para a detecção do ZIKV como uma ferramenta de vigilância entomológica.

Figura 17 – Detecção do ZIKV em amostras de mosquitos naturalmente infectados e macerado bruto de *Aedes aegypti* experimentalmente infectado com ZIKV.



Fonte: O autor.

Legenda: O macerado bruto de *A. aegypti* foi infectado com uma carga viral alta (1×10^6 PFU/mL) ou baixa (1×10^3 PFU/mL) e diretamente testados através do RT-LAMP sem a extração do RNA (Fig. 3A-C). Fig. 3D-F representa os resultados RT-LAMP de mosquitos experimentalmente infectados. Os resultados do RT-LAMP foram observados por mudança de cor visual dos produtos no tubo de reação e através de eletroforese em gel. Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (A e D), sob irradiação UV (B e E) e eletroforese em gel de agarose (C e F). Legendas na Fig. 3A-C são: NTC (controle sem template): água; (-): macerado de *Aedes aegypti* não infectado; (10^6): macerado de *Aedes aegypti* infectado com 10^6 PFU/mL; (10^3): macerado de *Aedes aegypti* infectado com 10^3 PFU/mL. Legendas na Fig. 3D-F são: NTC (controle sem molde): água; (-): macerado de *Aedes aegypti* não infectado; (+): macerado do *Aedes aegypti* experimentalmente infectado pelo ZIKV. M: marcador de peso molecular.

8.3 Especificidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV

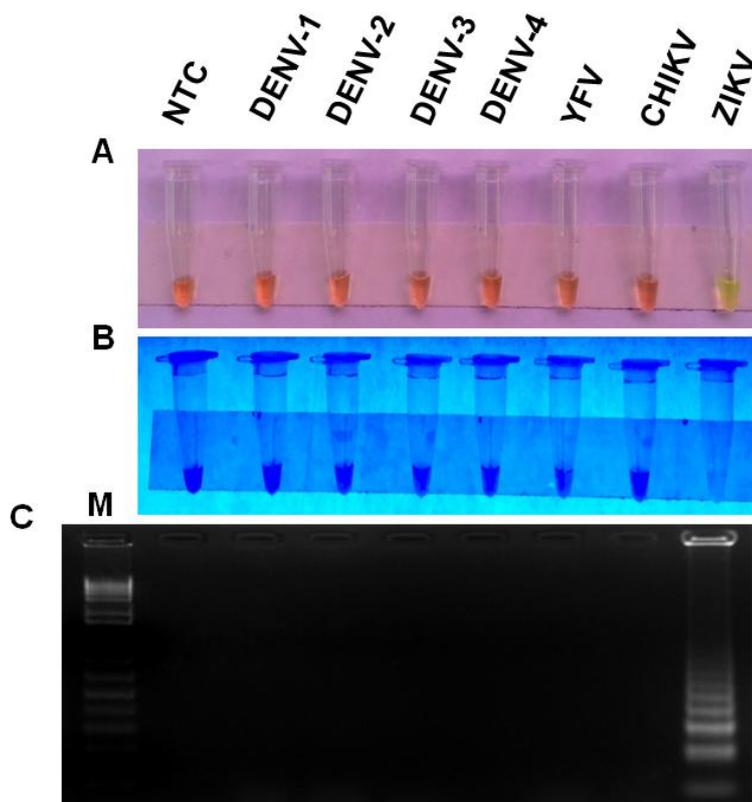
Para avaliar a especificidade do ensaio RT-LAMP em detectar apenas o ZIKV em amostras de mosquitos, os primers foram testados frente a outros arbovírus circulantes no Brasil: DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081), YFV (17DD) e CHIKV (PE2016-480) (Quadro 3). Foi realizada uma infecção artificial de todos os arbovírus descritos acima em amostras de mosquitos (macerado bruto). Apenas o macerado de mosquitos infectados artificialmente com ZIKV foi positivo na reação

do RT-LAMP, conforme determinado por análise a olho nu, observação visual sob luz UV ou eletroforese em gel de agarose (Figura 18). Assim, estes resultados sugerem que o ensaio RT-LAMP descrito ao longo deste trabalho é altamente específico para a detecção do ZIKV.

Quadro 6 - Arbovírus utilizados para avaliar a especificidade do ensaio RT-LAMP.

Família	Gênero	Espécie	Cepa	Código de acesso do GenBank	Resultado RT-LAMP
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Zika vírus	PE-243	KX197192	+
		Dengue vírus, sorotipo 1	PE/97-42735	EU259529	-
		Dengue vírus, sorotipo 2	PE/95-3808	EU259569	-
		Dengue vírus, sorotipo 3	PE/02-95016	KC425219	-
		Dengue vírus, sorotipo 4	PE/10-0081	Não publicado	-
		Vírus da Febre Amarela	17DD	DQ100292	-
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Vírus Chikungunya	PE2016-480	Não publicado	-

Fonte: O autor.

Figura 18 - Especificidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos.

Fonte: O autor.

Legenda: Foi realizada uma infecção artificial de diferentes arbovírus circulantes no Brasil (DENV 1-4, YFV, CHIKV, ZIKV) em amostras de mosquitos (macerado bruto de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*) e em seguida foram testados pelo RT-LAMP para avaliar a especificidade dos primers em detectar apenas o ZIKV. Os produtos da reação foram observados através do olho nu sob luz natural (A), sob irradiação UV (B) e eletroforese em gel de agarose (C). M: marcador de peso molecular. NTC (controle sem molde): água.

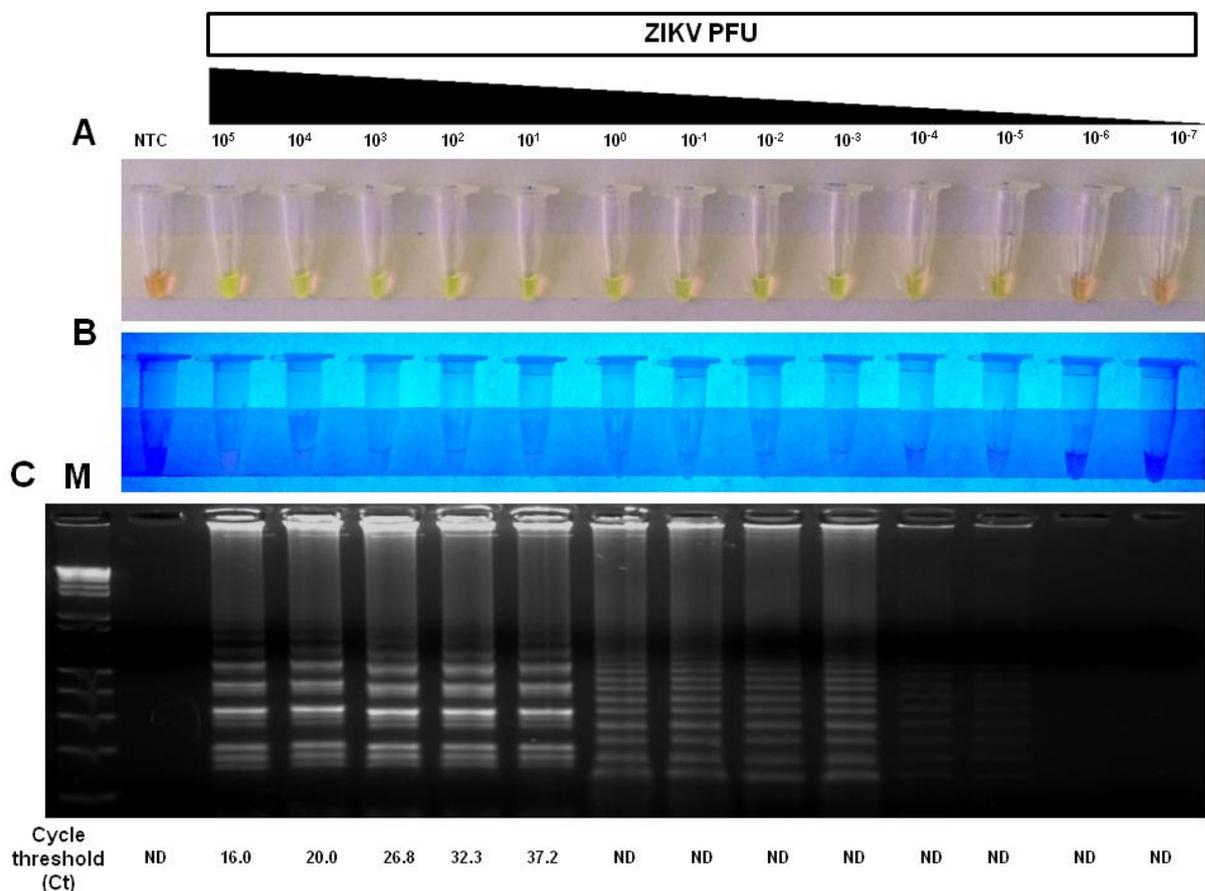
8.4 Sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV

Para calcular a sensibilidade analítica do RT-LAMP em amostras de mosquitos, foi realizada uma diluição seriada do ZIKV na base de 10 vezes em macerado de *A. aegypti* variando de 10^5 PFU/mL a 10^{-7} PFU/mL sem extração do RNA. O RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV em um largo espectro de concentrações de vírus no macerado de *A. aegypti* (de 10^5 PFU/mL a 10^{-5} PFU/mL), incluindo cargas virais encontradas em mosquitos naturalmente infectados no campo (Guedes *et al.*, 2017). A sensibilidade analítica do RT-LAMP foi determinada como 10^{-5} PFU/mL. Considerando as 10 repetições independentes do ensaio da sensibilidade analítica, a análise de probit revelou que o limite de detecção com intervalo de confiança de 95% de probabilidade do RT-LAMP para detecção do ZIKV foi de-

2,98 log₁₀ PFU do ZIKV (~ 1/1000 PFU) com intervalo de confiança de -3,62 a -1,64 (Tabela 1 e Figura 20).

Adicionalmente, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições testadas pelo RT-LAMP e posteriormente foram testadas pelo método amplamente utilizado para o diagnóstico do ZIKV (qRT-PCR) descrito por Lanciotti (Lanciotti *et al.*, 2008). Para o ensaio de qRT-PCR, o limite inferior de detecção do ZIKV foi de 10¹ PFU/mL com valor de Ct 37,2 (Figura 19). Em conjunto, esses resultados demonstraram que o ensaio RT-LAMP foi 10.000 vezes mais sensível do que a técnica padrão-ouro atualmente utilizada para o diagnóstico do ZIKV em amostras de mosquito.

Figura 19 - Sensibilidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos.



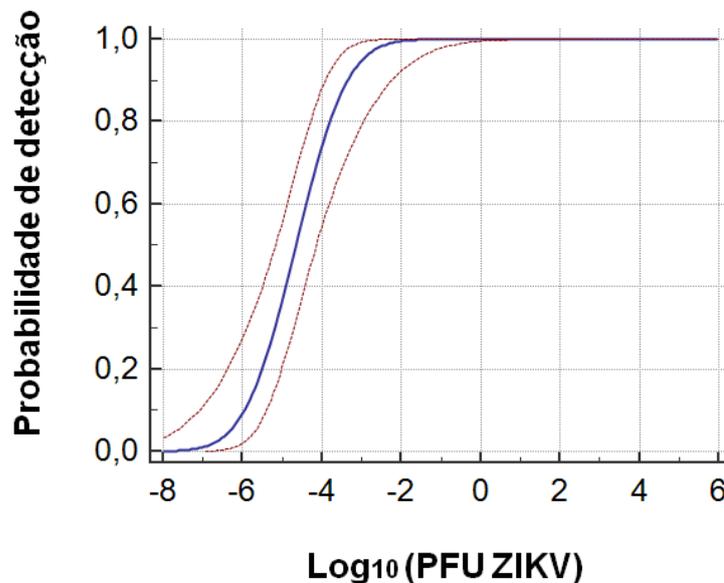
Fonte: O autor.

Legenda: A sensibilidade do RT-LAMP foi determinada com base na última diluição em que o genoma viral foi detectado através do ensaio. Para o ensaio de sensibilidade analítica, foi realizada uma diluição seriada do ZIKV na base de 10 vezes em soro (10⁵ PFU/mL a 10⁻⁷ PFU/mL) em macerado de mosquitos *Aedes aegypti* não infectados e, em seguida, foram testadas diretamente pelo RT-LAMP sem a necessidade de extração do RNA. Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (A), sob irradiação UV (B) e eletroforese em gel de agarose (C). M: marcador de peso molecular. NTC (controle sem molde): água. ND (não detectado). Para comparar os resultados do RT-LAMP com uma técnica padrão-ouro, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições usando o reagente Trizol e testados através da qRT-PCR.

Tabela 1 - Limite de detecção do ensaio RT-LAMP para detecção do ZIKV.

Concentração do ZIKV (PFU)	Número de replicatas	Número de resultados positivos	Prababilidade de detecção %
10^5	10	10	100
10^4	10	10	100
10^3	10	10	100
10^2	10	10	100
10^1	10	10	100
10^0	10	10	100
10^{-1}	10	10	100
10^{-2}	10	10	100
10^{-3}	10	9	90
10^{-4}	10	7	70
10^{-5}	10	6	60
10^{-6}	10	0	0
10^{-7}	10	0	0

Fonte: O autor.

Figura 20 - Limite de detecção do RT-LAMP calculado através da análise de Probit.

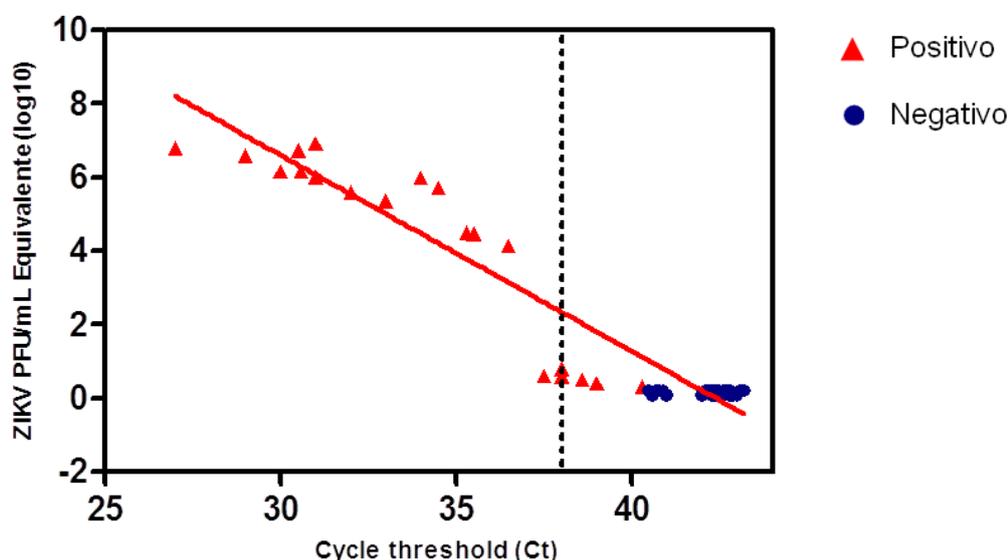
Fonte: O autor.

Legenda: A análise de Probit foi calculada usando o software MedCalc (versão 18.11), fornecendo um valor de C95 (probabilidade de detecção 95% em todas as repetições) de $-2,98 \log_{10}$ PFU do ZIKV. Isto indica que o limite de detecção é cerca de $-3 \log_{10}$ (1/1000) PFU / reação e que as amostras contendo essa concentração seriam detectada em 95% das repetições.

8.5 Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para detectar o ZIKV em amostras de mosquitos

Para a validação o desempenho diagnóstico do RT-LAMP em detectar o ZIKV em amostras de mosquitos, um total de 60 amostras de mosquitos *A. aegypti* (n = 32) e *C. quinquefasciatus* (n = 28) foram obtidas do Departamento de Entomologia. (GUEDES *et al.*, 2017; PAIVA *et al.*, 2017) e testadas posteriormente para a detecção do ZIKV pelo RT-LAMP. Amostras com valores de Ct de $\leq 38,0$ em poços duplicados foram consideradas positivas para infecção por ZIKV, conforme descrito anteriormente para as amostras clínicas humanas (DUFFY *et al.*, 2009). Destas, 31 amostras foram negativas para ZIKV conforme determinado pela qRT-PCR e 29 foram positivas, incluindo amostras de mosquitos naturalmente e experimentalmente infectados. O valor de Ct nessas amostras variou de 27,0 a $>40,0$. Do número total de 60 amostras, o ensaio RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV em 32 amostras, incluindo as 29 amostras já determinadas como positivas pela qRT-PCR (Figura 21).

Figura 21 - Diagnóstico de amostras de mosquitos pelo RT-LAMP.



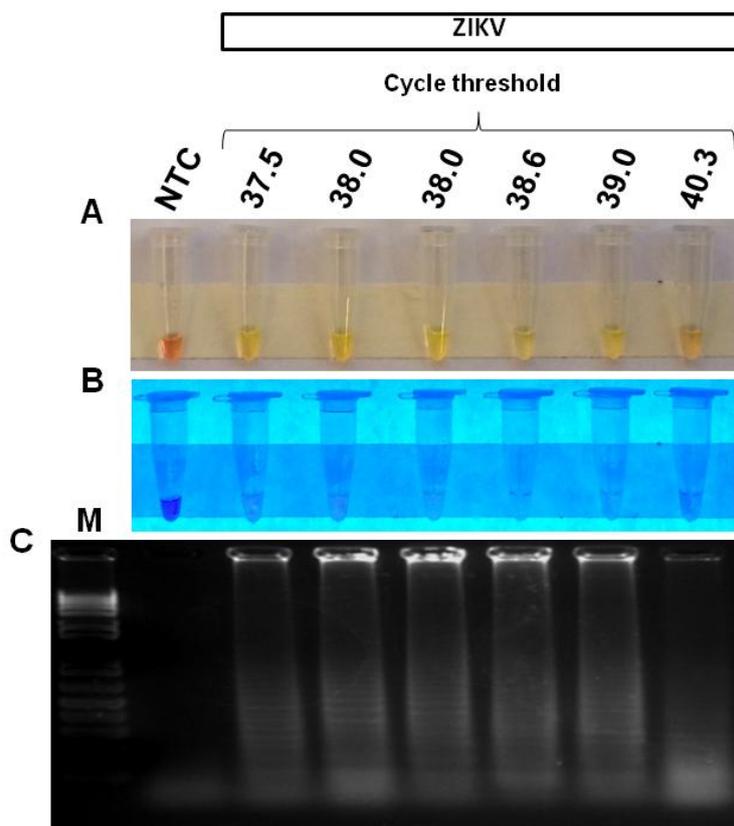
Fonte: O autor.

Legenda: Um total de 60 amostras de mosquito *Aedes aegypti* (n = 32) e *Culex quinquefasciatus* (n = 28) foram testadas para o ZIKV pelo ensaio RT-LAMP. Do número total, 29 foram positivas para ZIKV e 31 foram negativas, conforme determinado pelo método padrão-ouro qRT-PCR (B). A linha tracejada representa o valor do limiar do ciclo qRT-PCR (valor de Ct) para a positividade do ZIKV (Ct ≤ 38). Triângulo vermelho indica amostras positivas pelo RT-LAMP e o círculo azul indica amostras negativas pelo RT-LAMP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além disso, as amostras de mosquitos que estavam no limiar de detecção pela qRT-PCR (valores Ct variando de 37.5 a 40.3) foram diagnosticadas como positivas pelo RT-LAMP (Figura 22), destacando a sensibilidade do ensaio RT-LAMP em detectar o ZIKV em amostras de mosquitos em que o método padrão-ouro não foi capaz de detectar o vírus em decorrência da baixa carga viral da amostra.

Figura 22 - Detecção do ZIKV pelo RT-LAMP em amostras de mosquitos que estavam no limite de detecção pela qRT-PCR.



Fonte: O autor.

Legenda: As amostras de mosquitos que se encontravam no limiar de detecção quando testadas pela qRT-PCR (valores de Ct variando de 37,5 a 40,3) foram analisadas por RT-LAMP e todas as reações mostraram um resultado positivo. Os produtos de amplificação foram observados através do olho nu sob luz natural (A), sob irradiação UV (B) e eletroforese em gel de agarose (C). M: marcador de peso molecular. NTC (controle sem molde): água.

O desempenho diagnóstico do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos, foi avaliado a partir da análise dos parâmetros estatísticos usando o método padrão-ouro (qRT-PCR) como referência. A prevalência geral do ZIKV nas amostras foi de 46,03% (IC 95% 33,39% a 59,06%). O ensaio RT-LAMP apresentou sensibilidade diagnóstica de 100% (IC95% 88,06% a 100,00%) e especificidade diagnóstica de 91,18% (IC95% 76,32% a 98,14%). O valor preditivo positivo de 90,62% (IC 95% 76,64% a 96,61%), enquanto o valor preditivo negativo foi de 100%. A precisão geral do teste RT-

LAMP foi determinada em 95,24% (IC 95% 86,71% a 99,01%) (Tabela 2), destacando o potencial do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos que por sua vez poderá ser usada como uma ferramenta de vigilância entomológica.

Tabela 2 - Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para detecção do ZIKV em amostras de mosquitos.

	qRT-PCR +	qRT-PCR -	Total
RT-LAMP +	29	3	32
RT-LAMP -	0	31	31
Total	29	34	
Sensibilidade	100 % (95% CI 88.06% a 100.00%)		
Especificidade	91.18 % (95% CI 76.32% a 98.14%)		
Prevalência do ZIKV	46.03% (95% CI 33.39% a 59.06%)		
Valor Preditivo Positivo	90.62% (95% CI 76.64% a 96.61%)		
Valor Preditivo Negativo	100 %		
Acurácia	95.24% (95% CI 86.71% a 99.01%)		

Fonte: O autor.

Para confirmar a identidade das amostras de mosquito positivas através do RT-LAMP, foram sequenciadas amostras positivas de *Aedes spp.* (1) e *Culex spp.* (1) utilizando o método de Sanger. Os resultados do sequenciamento e a análise através da ferramenta do BLAST demonstraram que os amplicons de ZIKV obtidos pelo RT-LAMP correspondem a 100% com o vírus circulante no Brasil (Figura 23), confirmando a especificidade do RT-LAMP em detectar apenas o ZIKV.

durante um treinamento que foi realizado no *National Institute for Research in Public Health* “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez” na cidade de Quito, Equador e contou com a presença de pesquisadores e estudantes do Brasil, Canadá, Colômbia e Equador.

Os resultados iniciais obtidos durante o treinamento que ocorreu no Equador foram satisfatórios. Os biossensores se mostraram altamente específicos e sensíveis para a detecção do ZIKV em cinco amostras clínicas. Após aplicar as amostras nos biossensores, com o auxílio do leitor óptico eletrônico acoplado de uma câmera fotográfica, foram registradas as imagens dos biossensores, sendo possível identificar o resultado através do olho nu decorrente da mudança de cor dos biossensores. A cor amarela caracteriza uma amostra negativa para o ZIKV, incluindo os controles negativos permanecem na cor amarela. Em contraste, a cor roxa caracteriza uma amostra positiva para o ZIKV (Figuras 24 e 25).

Figura 24 - Avaliação inicial dos biossensores com amostras positivas.



Fonte: O autor.

Legenda: Imagem foi obtida durante o período de incubação dos biossensores no leitor óptico eletrônico acoplado a uma câmera fotográfica. Os discos de papel que apresentam a cor amarela caracterizam os controles/amostras negativas para o ZIKV. Em contraste, os discos de papel com a cor roxa caracterizam uma amostra positiva para o ZIKV.

Figura 25 - Avaliação inicial dos biossensores com amostras positivas.

Fonte: O autor.

Imagem final obtida após o fim do período de incubação dos biossensores no leitor óptico eletrônico acoplado a uma câmera fotográfica. Os discos de papel que apresentam a cor amarela indicam os controles/amostras negativas para o ZIKV. Em contraste, os discos de papel com a cor roxa indicam uma amostra positiva para o ZIKV.

8.7 Determinação dos custos para a realização de ambas as técnicas

Com base nos valores em reais (R\$) de todos os reagentes necessários para a execução de ambas as técnicas, incluindo os reagentes necessários para auxiliar na visualização dos resultados. Foi realizado o cálculo do valor, em reais, do custo para a realização de cada reação (teste). O valor de cada reação para o ensaio do RT-LAMP foi de aproximadamente R\$ 1,00 (Tabela 3) e para a realização de cada teste através da qRT-PCR foi de aproximadamente R\$ 43,00 (Tabela 4). Esses resultados sugerem que o custo de cada reação através de nossa plataforma de diagnóstico é 42 vezes mais barato quando comparado ao custo de cada reação através do método padrão-ouro, atualmente utilizado para o diagnóstico do ZIKV no Brasil.

Tabela 3 - Custo detalhado por cada reação (teste) através do RT-LAMP para detecção do ZIKV.

Reagente	Preço (R\$)	Número de reações	Valor por reação (R\$)
Enzima Bst Dna Polimerase 3.0 (New England Biolabs)	1.707,00	3.000	0,569
Set de primers (IDT Síntese Biotecnologia)	235,32	3.611	0,065
Sybr Green (ThermoFisher Scientific)	2.560,00	10.000	0,256
dNTPs (ThermoFisher Scientific)	654,50	4.545	0,144
Água livre de RNase (50mL Promega)	182,00	14.285	0,012
Total			1,046

Fonte: O autor.

Tabela 4 - Custo detalhado por cada reação (teste) através da qRT-PCR para detecção do ZIKV.

Reagente	Preço (R\$)	Número de reações	Valor por reação (R\$)
Kit de Extração de RNA (QIAGEN)	6.332,30	250,00	25,329
Primers e sonda (Exxtend Biotecnologia)	527,00	646,4	0,815
Kit OneStep (Enzima + Mix Super Script III (ThermoFisher Scientific))	8.442,00	500,00	16,884
Água livre de RNase (50mL Promega)	182,00	3.787	0,048
Total			43,076

Fonte: O autor.

9 DISCUSSÃO

A rápida detecção do ZIKV em amostras de mosquitos pode ajudar a entender e compreender a dinâmica da doença em áreas que apresentam mosquitos competentes e condições favoráveis para a transmissão do vírus, como é o exemplo do Brasil (CEVALLOS *et al.*, 2018). Neste contexto, foi desenvolvida uma ferramenta molecular rápida para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos. O ensaio RT-LAMP descrito ao longo deste trabalho representa uma plataforma simples, prática, barata e permite a detecção do ZIKV mesmo na ausência de extração do RNA. Em adição, até o presente momento, este é o primeiro trabalho que agrega a validação de um ensaio RT-LAMP usando amostras de mosquitos *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* experimentalmente e naturalmente infectados coletados no epicentro da última epidemia de Zika no Brasil.

Atualmente, a qRT-PCR é o método referência para o diagnóstico molecular do ZIKV em amostras clínicas humanas e o método mais utilizado para detecção do ZIKV em amostras de mosquitos (FAYE *et al.*, 2013; WAGGONER; PINSKY, 2016). Entretanto, a qRT-PCR apresenta inúmeras limitações, dentre elas o elevado custo, requer equipamentos sofisticados e caros, além de necessitar de recursos humanos altamente especializado, o que acaba limitando a sua aplicação em áreas que apresentam poucos recursos e afeta negativamente o estabelecimento de programas eficazes de controle de doenças e sua utilização para testar um grande número de amostras de mosquitos coletados em programas de vigilância entomológica (PAIVA *et al.*, 2017; SCHWAB *et al.*, 2018; SHUKLA *et al.*, 2016).

Outra potencial limitação da qRT-PCR é a incapacidade de detectar o ZIKV em amostras com baixos títulos virais, que podem ocorrer especialmente durante períodos interepidêmicos. O limite de detecção para o ensaio descrito por Faye foi de 0,05 unidades formadoras de placas (PFU) ou 32 equivalentes genômicos e o desenvolvido por Lanciotti foi de 25 cópias de RNA (FAYE *et al.*, 2013; LANCIOTTI *et al.*, 2008). Recentemente, outros grupos de pesquisa desenvolveram metodologias usando a abordagem LAMP para a detecção de ZIKV usando amostras de mosquitos (CHOTIWAN *et al.*, 2017; LAMB *et al.*, 2018; YAREN *et al.*, 2017). No entanto, estes estudos utilizaram apenas um número bem limitado de amostras e a menor concentração de vírus detectada foi 10^3 PFU/mL em amostras de mosquitos. O RT-LAMP descrito neste trabalho foi validado usando 60 amostras de mosquitos. Os resultados revelaram que o RT-LAMP é 10.000 vezes mais sensível que a qRT-PCR para a detecção do ZIKV em amostras de mosquito, detectando 10^{-5} PFU/mL. A

grande quantidade de RNA infeccioso e não infeccioso do ZIKV liberado no sobrenadante da cultura explica a capacidade do RT-LAMP em detectar menos de 1 PFU, mesmo sem extração de RNA. (LI *et al.*, 2016).

Vários arbovírus transmitidos por mosquitos, incluindo ZIKV, DENV e CHIKV, são endêmicos e co-circulam em todo o Nordeste do Brasil (MAGALHAES *et al.*, 2017; PESSÔA *et al.*, 2016). Uma possível limitação dos testes diagnósticos para o ZIKV é a possibilidade de reatividade cruzada com outros flavivírus, particularmente o DENV, já que são vírus pertencentes (CAMPOS *et al.*, 2016; LANCIOTTI *et al.*, 2008; ZAMMARCHI *et al.*, 2015). Neste trabalho, não foi demonstrado reação cruzada com outros arbovírus, incluindo os quatro sorotipos de DENV, YFV ou CHIKV.

O ensaio RT-LAMP foi validado usando amostras de mosquitos *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* experimentalmente e naturalmente infectadas com ZIKV. É importante ressaltar que o RT-LAMP foi capaz de detectar o RNA viral justamente em amostras que foram diagnosticadas como negativas através da qRT-PCR. Essas amostras estavam no limiar de detecção pela qRT-PCR com valor de Ct variando de 38,6 a 40,3. Em contraste com esses resultados, alguns estudos relataram que a sensibilidade analítica do ensaio RT-LAMP é menor quando comparada ao método de diagnóstico padrão-ouro (qRT-PCR) (KUROSAKI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016). No entanto, estudos publicados recentemente corroboram com os achados deste trabalho que é o fato da sensibilidade analítica do ensaio RT-LAMP ser superior a sensibilidade analítica da qRT-PCR (LAMB *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019).

O ensaio RT-LAMP pode ser realizado através de um ensaio de duas etapas ou um protocolo de uma única etapa. O RT-LAMP de duas etapas requer a adição da enzima transcriptase reversa (RT) juntamente com a enzima DNA polimerase, que pode ser polimerase Bst DNA ou Bst 2.0 polimerase 2.0 WarmStart. Vários estudos descrevem a necessidade de extração de RNA das amostras antes da realização do RT-LAMP e o uso do RT-LAMP em duas etapas (CALVERT *et al.*, 2017; PRIYE *et al.*, 2017; TANNER, EVANS, 2014). No entanto, o protocolo de duas etapas é mais longo, mais caro e requer manipulação adicional de amostras, o que aumenta as chances de erros de pipetagem e contaminação. O uso de Bst 3.0 Polymerase 3.0 WarmStart supera essas limitações. Essa enzima possui alta atividade de transcriptase reversa e polimerase em uma temperatura isotérmica, o que possibilita que o ensaio seja realizado em uma única etapa. Além disso, a DNA polimerase Bst 3.0 é uma enzima robusta capaz de manter suas atividades mesmo na presença de inibidores de reação (LEE *et al.*, 2016). Isto é especialmente relevante para a detecção viral

em amostras biológicas humanas e entomológicas que são caracterizadas por possuírem inibidores de reação (BECKMANN, FALLON, 2012).

Recentemente, Yaren et al. reportaram um teste diagnóstico baseado em RT-LAMP para a detecção de ZIKV em amostras de mosquitos (YAREN *et al.*, 2017). No entanto, a necessidade de extração de RNA limita suas aplicações para o diagnóstico do tipo POC. Em outro estudo, Lamb *et al.* descreveram um método de diagnóstico molecular de baixo custo baseado em RT-LAMP para detecção de ZIKV em amostras de mosquitos sem a necessidade de extração do RNA (LAMB *et al.*, 2018). No entanto, os autores testaram apenas cinco mosquitos do gênero *A. aegypti* experimentalmente infectados e não validaram a técnica usando mosquitos naturalmente infectados.

Outros grupos também desenvolveram várias tecnologias para detecção molecular do ZIKV (CALVERT *et al.*, 2017; CAROSSINO *et al.*, 2017; CHAN *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2018; GANGULI *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2016; PARDEE *et al.*, 2016; PRIYE *et al.*, 2017; SABALZA *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2016; YAREN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016). No entanto, muitas dessas tecnologias apresentam inúmeras limitações para o diagnóstico POC, incluindo a necessidade de extração do RNA ou o uso de *hardware* e *software* sofisticados, o que limita sua aplicabilidade em países que estão em desenvolvimento e possui uma condição de infraestrutura laboratorial bem limitada.

Apesar de os métodos moleculares e sorológicos ainda serem utilizados com maior frequência na rotina laboratorial o diagnóstico do ZIKV, ainda permanece a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico do tipo POC que sejam capazes de detectar o ZIKV de forma prática e simples no campo. A identificação imediata da infecção pelo ZIKV diretamente logo após a coleta tanto nas amostras de mosquitos, bem como nas amostras humanas é uma condição crítica para minimizar a propagação global e facilitar o estabelecimento de medidas eficazes para o controle do ZIKV (NICOLINI *et al.*, 2017). Desde o seu surgimento no hemisfério ocidental, diferentes ensaios do tipo POC baseado na técnica do LAMP estão sendo desenvolvidos para detectar o ZIKV em amostras humanas e amostras de mosquitos (CALVERT *et al.*, 2017; GANGULI *et al.*, 2017; PRIYE *et al.*, 2017; SABALZA *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2016; YAREN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016). Entretanto, muitos dos ensaios desenvolvidos utilizando o LAMP para detecção do ZIKV ainda exigem equipamentos especiais para detecção de vírus, o que limita sua aplicabilidade em cenários de poucos recursos.

As plataformas de diagnóstico denominadas POC podem contornar as limitações atualmente enfrentadas pelas técnicas utilizadas na rotina laboratorial e aumentar a capacidade

de diagnóstico nos países afetados pelo ZIKV. Neste contexto, o ensaio baseado na técnica do RT-LAMP descrito ao longo deste trabalho é o mais simples, prático e barato até o presente momento, além de ser inédito na literatura científica (SILVA *et al.*, 2019). Embora a qRT-PCR seja o método padrão-ouro para o diagnóstico do ZIKV, espera-se que os ensaios baseados em LAMP decorrente de suas inúmeras vantagens, incluindo a nossa metodologia comece a ser implementada na rotina para a detecção do ZIKV tanto em amostras humanas, bem como em amostras de mosquitos. Além disso, a proposta seguinte deste projeto será adaptar o protocolo RT-LAMP descrito ao longo deste trabalho em um Kit de diagnóstico para ser posteriormente comercializado.

As principais vantagens do ensaio RT-LAMP descrito ao longo deste trabalho é a capacidade de detectar ZIKV sem a necessidade de pré-tratamento ou extração do RNA das amostras de mosquito. É importante ressaltar que as amostras positivas podem ser diagnosticadas em apenas 20 minutos e o resultado do teste de diagnóstico pode ser facilmente interpretado através do olho nu com base na diferença da cor do tubo de reação. Dada a sua simplicidade, o ensaio pode ser executado por indivíduos sem treinamento especializado nem nenhuma expertise em biologia molecular ou virologia. O custo por reação foi de aproximadamente R\$ 1,00, sendo 43 vezes mais barato do que o custo por reação através da qRT-PCR. Estas vantagens sugerem que a ferramenta de diagnóstico descrita ao longo deste trabalho para detectar o ZIKV é adequada para aumentar a capacidade de detecção do ZIKV em amostras de insetos vetores, possibilitando a sua utilização em áreas remotas ou em países de baixos recursos afetados pelas epidemias do ZIKV ou em risco de introdução do vírus.

Em contrapartida, o protótipo inicial dos biossensores moleculares que foram testados neste trabalho de mostraram serem específicos e sensíveis, sendo capazes de detectar o ZIKV em amostras clínicas. Em uma etapa seguinte, serão estendidos os estudos iniciais a fim de validar e implementar os biossensores moleculares como uma plataforma diagnóstica. A validação será realizada utilizando amostras clínicas oriundas de três países endêmicos para o ZIKV na América do Sul, incluindo Brasil, Colômbia e Equador. Após a etapa de validação, a proposta será disponibilizar esta ferramenta de diagnóstico que por sua vez possui grande potencial de contribuir para prevenir a propagação da doença na população e melhorar o manejo clínico de pacientes, auxiliando assim, na tomada de decisões terapêuticas.

10 CONCLUSÃO

Esse trabalho demonstrou o desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico de baixo custo do tipo *point of care* baseado na técnica do RT-LAMP capaz de detectar o ZIKV em apenas em amostras de mosquitos experimentalmente e naturalmente infectados sem a necessidade de nenhum tratamento prévio ou extração do RNA das amostras. Adicionalmente, a plataforma de diagnóstico descrita ao longo deste é específica, simples, prática e mais sensível que a técnica padrão-ouro para o diagnóstico do ZIKV, sendo capaz de detectar o vírus nas amostras em um tempo mínimo de 20 minutos. Até o presente momento, o protocolo utilizado ao longo deste trabalho é inédito na literatura científica. Além disso, esse estudo também revelou que os biossensores moleculares representam outra ferramenta promissora do tipo POC para o diagnóstico do ZIKV em amostras humanas.

11 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados gerados ao longo deste trabalho fornecem duas ferramentas do tipo POC para diagnóstico molecular do ZIKV em amostras humanas e amostras de mosquitos. A disponibilização destas plataformas de diagnóstico tem grande potencial de contribuir para que países endêmicos possam estabelecer uma melhor vigilância do ZIKV em insetos vetores e melhorar a eficácia dos programas de controle, além de melhorar o manejo clínico de pacientes e prevenir a propagação da doença. Adicionalmente, o pedido da patente já foi realizado e o ensaio RT-LAMP será testado com amostras humanas, incluindo soro, urina, saliva e sêmen e por fim será validado com amostras clínicas coletadas no epicentro da última epidemia causada pelo ZIKV a fim de disponibilizar o RT-LAMP em forma de kit de diagnóstico e os biossensores como ferramentas de diagnóstico de baixo custo para a sociedade e serviços de saúde.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, E. R. et al. Development and evaluation of a novel LAMP assay for the diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 56, n. 7, p. 1-8, Apr. 2018. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/56/7/e00386-18.long>>. Acesso em: 20 set. 2018.
- AFSAHI, S. et al. Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection. **Biosens. Bioelectron.**, Barking, v. 100, p. 85-88, Feb. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566317305869?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 out. 2018.
- ALERA, M. T. et al. Zika virus infection, Philippines, 2012. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 4, p. 722-724, Apr. 2015. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/4/14-1707_article>. Acesso em: 16 jun. 2018.
- AYLLÓN, T. et al. Early Evidence for Zika Virus Circulation among *Aedes aegypti* Mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 23, n. 8, p. 1411-1412, Aug. 2017. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/8/16-2007_article>. Acesso em: 20 out. 2018.
- AYRES, C. F. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v. 16, n. 3, p. 278-279, Mar. 2016. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(16\)000736/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(16)000736/fulltext)>. Acesso em: 12 mai. 2018.
- BALASURIYA, U. B. Type A influenza virus detection from horses by real-time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR. **Methods Mol. Biol.**, Clifton, v. 1161, p. 393-402, May 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-0758-8_34>. Acesso em: 7 jun. 2018.
- BALASURIYA, U. B. et al. Rapid detection of equine influenza virus H3N8 subtype by insulated isothermal RT-PCR (iiRT-PCR) assay using the POCKIT™ Nucleic Acid Analyzer. **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v. 207, p. 66-72, Oct. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093414002468?via%3Dihub>>. Acesso em: 18 mai. 2018.
- BASURKO, C. et al. Maternal and fetal consequences of dengue fever during pregnancy. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, Amsterdam, v. 147, n. 1, p. 29-32, Nov. 2009. Disponível em: <[https://www.ejog.org/article/S0301-2115\(09\)00434-5/fulltext](https://www.ejog.org/article/S0301-2115(09)00434-5/fulltext)>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- BECKMANN, J. F.; FALLON, A. M. Decapitation improves detection of *Wolbachia pipiensis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) mosquitoes by the polymerase chain reaction. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 49, n. 5, p. 1103-1108, Sep. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3546468/>>. Acesso em: 27 nov. 2017.
- BERTHET, N. et al. Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, Larchmont, v. 14, n. 12, p. 862-865, Dec. 2014. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2014.1607>>. Acesso em: 15 out. 2018.

- BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro. Surveill.**, Saint-Maurice, v. 19, n. 13, Apr. 2014. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751>>. Acesso em: 14 mai. 2018.
- BOEHME, C. C. et al. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 45, n. 6, p. 1936-1940, Jun. 2007. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/45/6/1936>>. Acesso em: 27 set. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Resposta da Representação da OPAS/OMS no Brasil para a epidemia do vírus da zika e suas consequências**. Brasília, 2016.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília: Ministério da Saúde, v. 50, n. 5, Fev. 2019.
- BUATHONG, R. et al. Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012-2014. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 93, n. 2, p. 380-383, Aug. 2015. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.15-0022>>. Acesso em: 5 nov. 2018.
- CALVERT, A. E. et al. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 9, p. e0185340, 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0185340>>. Acesso em: 21 set. 2018.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1885-1886, Oct. 2015. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-0847_article>. Acesso em: 12 abr. 2018.
- CAMPOS, R. E. M. et al. Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 77, p. 69-70, Apr. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653216300014?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 jan. 2018.
- CAROSSINO, M. et al. Evaluation of a field-deployable reverse transcription-insulated isothermal PCR for rapid and sensitive on-site detection of Zika virus. **BMC Infect. Dis.**, London, v. 17, n. 1, p. 778, Dec. 2017. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2852-4>>. Acesso em: 7 fev. 2018.
- CARVALHO-LEANDRO, D. et al. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. **Acta Trop.**, Basel, v. 124, n. 2, p. 113-119, Nov. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X12002562?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 out. 2017.
- CEVALLOS, V. et al. Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador. **Acta Trop.**, Basel, v. 177, p. 74-80, Jan. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X17307738?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 mai. 2018.

- CHAN, K. et al. Rapid, Affordable and Portable Medium-Throughput Molecular Device for Zika Virus. **Sci. Rep.**, London, v. 6, p. 38223, Dec. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep38223>>. Acesso em: 2 out. 2017.
- CHEN, L. H.; HAMER, D. H. Zika Virus: Rapid Spread in the Western Hemisphere. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 164, n. 9, p. 613-615, May 2016. Disponível em: <<https://annals.org/aim/fullarticle/2486362/zika-virus-rapid-spread-western-hemisphere>>. Acesso em: 7 jul. 2018.
- CHOTIWAN, N. et al. Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. **Sci. Transl. Med.**, Washington, v. 9, n. 388, May 2017. Disponível em: <<http://stm.sciencemag.org/content/9/388/eaag0538>>. Acesso em: 28 jul. 2018.
- CORDEIRO, M. T. et al. Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. **Lancet**, London, v. 387, n. 10030, p. 1811-1812, Apr. 2016. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)30253-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)30253-7/fulltext)>. Acesso em: 5 out. 2017.
- COSTA-DA-SILVA, A. L. et al. Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 2, p. e0171951, Mar. 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0171951>>. Acesso em: 16 out. 2018.
- D'ORTENZIO, E. et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 374, n. 22, p. 2195-2198, Jun. 2016. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1604449>>. Acesso em: 12 mai. 2018.
- DE CARVALHO, O. V. et al. The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptopurine riboside (6MMP_r) effectively blocks Zika virus replication. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Boston, v. 50, n. 6, p. 718-725, Dec. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857917303084?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 jun. 2018.
- DE OLIVEIRA, W. K. et al. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. **Lancet**, London, v. 390, n. 10097, p. 861-870, Aug. 2017. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)31368-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)31368-5/fulltext)>. Acesso em: 18 ago. 2018.
- DIALLO, D. et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e109442, Oct. 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0109442>>. Acesso em: 19 jun. 2018.
- DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 46, n. 5, p. 509-520, Sep. 1952. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12995440>>. Acesso em: 28 ago. 2017.
- DIGOUTTE, J. P. et al. Continuous cell lines and immune ascitic fluid pools in arbovirus detection. **Res. Virol.**, Amsterdam, v. 143, n. 6, p. 417-22, 1992 Nov-Dec. 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1297177>>. Acesso em: 1 set. 2017.

- DONALD, C. L. et al. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. e0005048, Oct. 2016. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005048>>. Acesso em: 13 fev. 2018.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Rev. Saude Publica**, São Paulo, v. 51, p. 30, Apr. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102017000100606&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 25 ag. 2018.
- DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl. J. Med.**, Boston, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, Jun. 2009. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0805715>>. Acesso em: 11 mai. 2018.
- DYER, O. Zika virus spreads across Americas as concerns mount over birth defects. **BMJ**, London, v. 351, p. h6983, Dec. 2015. Disponível em: <<https://www.bmj.com/content/351/bmj.h6983>>. Acesso em: 22 nov. 2017.
- ELIZONDO-QUIROGA, D. et al. Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. **Sci. Rep.**, London, v. 8, n. 1, p. 7887, May 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-18682-3>>. Acesso em: 2 out. 2017.
- FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **J. Hyg.**, London, v. 83, n. 2, p. 213-219, Oct. 1979. ISSN 0022-1724. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2129900/>>. Acesso em: 26 set. 2017.
- FARIA, N. R. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, New York, v. 352, n. 6283, p. 345-349, Apr. 2016. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/352/6283/345>>. Acesso em: 20 jan. 2018.
- FAYE, O. et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Virol. J.**, London, v. 10, p. 311, Oct. 2013. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-10-311>>. Acesso em: 22 mai. 2018.
- FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e2636, Jan. 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002636>>. Acesso em: 2 nov. 2018.
- FERNANDES, J. N. et al. Rapid, noninvasive detection of Zika virus in Aedes aegypti mosquitoes by near-infrared spectroscopy. **Sci. Adv.**, Washington, v. 4, n. 5, p. eaat0496, May 2018. Disponível em: <<http://advances.sciencemag.org/content/4/5/eaat0496>>. Acesso: 15 dez. 2018.
- FERREIRA, M. L. et al. Guillain-Barré syndrome, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis associated with Zika virus infection in Brazil: late RNA detection and viral isolation. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 97, n. 5, p. 1405-1409, Nov. 2017. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.17-0106>>. Acesso em: 27 ago. 2017.

- FOY, B. D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg. Infect. Dis.**, Baltimore, v. 17, n. 5, p. 880-882, May 2011. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/5/10-1939_article>. Acesso em: 26 out. 2017.
- FRITEL, X. et al. Chikungunya virus infection during pregnancy, Reunion, France, 2006. **Emerg. Infect. Dis.**, Baltimore, v. 16, n. 3, p. 418-425, Mar. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322036/>>. Acesso em: 8 fev. 2018.
- GANGULI, A. et al. Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care. **Biomed. Microdevices**, Boston, v. 19, n. 4, p. 73, Aug. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10544-017-0209-9>>. Acesso em: 14 mai. 2018.
- GATHERER, D.; KOHL, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **J. Gen. Virol.**, London, v. 97, n. 2, p. 269-273, Feb. 2016. Disponível em: <<https://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000381>>. Acesso em: 28 dez. 2018.
- GRISCHOTT, F. et al. Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. **Travel. Med. Infect. Dis.**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 313-330, Jul-Aug 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1477893916300801?via%3Dihub>>. Acesso em: 03 out. 2017.
- GUEDES, D. R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerg. Microbes Infect.**, New York, v. 6, n. 8, p. e69, Aug. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2017.59>>. Acesso 17 mar. 2018.
- GUO, X. X. et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerg. Microbes Infect.**, New York, v. 5, n. 9, p. e102, Sep. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2016.102>>. Acesso em: 25 fev. 2018.
- GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **PLoS Med.**, San Francisco, v. 5, n. 3, p. e60, Mar. 2008. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0050060>>. Acesso em: 16 nov. 2017.
- HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e1477, Feb. 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001477>>. Acesso em: 12 set. 2017.
- HAZIN, A. N. et al. Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 374, n. 22, p. 2193-2195, Jun. 2016. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1603617>>. Acesso em: 28 ago. 2017.
- HEANG, V. et al. Zika virus infection, Cambodia, 2010. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 18, n. 2, p. 349-351, Feb. 2012. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/2/11-1224_article>. Acesso em: 12 nov. 2017.
- IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Med. Mal. Infect.**, Paris, v. 44, n. 7, p. 302-307, Jul. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X14001085?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 out. 2017.

- KAUSHIK, A. et al. Electrochemical Biosensors for Early Stage Zika Diagnostics. **Trends Biotechnol.**, Barking, v. 35, n. 4, p. 308-317, Apr. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5366270/>>. Acesso em: 5 jan. 2018.
- KRAEMER, M. U. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, Cambridge, v. 4, p. e08347, Jun. 2015. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/08347>>. Acesso em: 12 jun. 2018.
- KUROSAKI, Y. et al. Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **Sci. Rep.**, London, v. 7, n. 1, p. 13503, Oct. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-13836-9>>. Acesso em: 20 dez. 2018.
- LAMB, L. E. et al. Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitos by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Sci. Rep.**, London, v. 8, n. 1, p. 3803, Feb. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-22102-5>>. Acesso em: 20 dez. 2018.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, Aug. 2008. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287_article>. Acesso em: 27 ago. 2017.
- LAU, Y. L. et al. Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. e0138694, Sep. 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0138694>>. Acesso em: 14 mar. 2018.
- LEE, D. et al. Simple and Highly Sensitive Molecular Diagnosis of Zika Virus by Lateral Flow Assays. **Anal. Chem.**, Washington, v. 88, n. 24, p. 12272-12278, Dec. 2016. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b03460>>. Acesso em: 12 nov. 2018.
- LI, X. F. et al. Characterization of a 2016 Clinical Isolate of Zika Virus in Non-human Primates. **EBioMedicine**, Amsterdam, v. 12, p. 170-177, Oct. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352396416304431?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 mai. 2018.
- MAGALHAES, T. et al. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 11, n. 11, p. e0006055, Nov. 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006055>>. Acesso em: 18 jun. 2018.
- MANORE, C. A. et al. Defining the Risk of Zika and Chikungunya Virus Transmission in Human Population Centers of the Eastern United States. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e0005255, Jan. 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005255>>. Acesso em: 17 out. 2018.
- CORDEIRO, M. T. et al. Results of a Zika Virus (ZIKV) Immunoglobulin M-Specific Diagnostic Assay Are Highly Correlated With Detection of Neutralizing Anti-ZIKV Antibodies in Neonates With Congenital Disease. **J Infect. Dis.**, Chicago, v. 25, n. 2, p. 1897-1904, Oct. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article/214/12/1897/2632601>>. Acesso em: 12 mai. 2018.

MENESES, J. D. A. et al. Lessons Learned at the Epicenter of Brazil's Congenital Zika Epidemic: Evidence From 87 Confirmed Cases. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 64, n. 10, p. 1302-1308, May 2017. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/cid/article/64/10/1302/3051955>>. Acesso em: 27 jul. 2018.

MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **J. Infect. Chemother.**, Tokyo, v. 15, n. 2, p. 62-69, Apr. 2009. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1341321X09707007?via%3Dihub>>.

Acesso em: 12 out. 2018.

MOULIN, E. et al. Simultaneous outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections: diagnosis challenge in a returning traveller with nonspecific febrile illness. **New Microbes New Infect.**, Hoboken, v. 11, p. 6-7, May 2016. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2052297516000202?via%3Dihub>>.

Acesso em: 5 jan. 2018.

MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1887, Oct. 2015. Disponível em:

<https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-1125_article>. Acesso em: 27 nov. 2017.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 29, n. 3, p. 487-524, Jul. 2016. Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/29/3/487>>. Acesso em: 2 set. 2017.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014.

Euro Surveill., Saint-Maurice, v. 19, n. 14, Apr. 2014. Disponível em:

<<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761>>.

Acesso em: 8 set. 2017.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v. 20, n. 10, p. O595-596, Oct. 2014.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X1465391X?via%3Dihub>>.

Acesso: 15 out. 2017.

MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus in saliva. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 68, p. 53-55, Jul. 2015. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138665321500133X?via%3Dihub>>.

Acesso em: 17 nov. 2017.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 2, p. 359-361, Feb. 2015. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/2/14-1363_article>. Acesso: 14 out. 2017.

NEMOTO, M. et al. Detection of equine rotavirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 72, n. 6, p. 823-826, Jun. 2010. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/72/6/72_09-0446/_article>. Acesso em: 4 dez. 2017.

NICOLINI, A. M.; MCCRACKEN, K. E.; YOON, J. Y. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. **J. Biol. Eng.**, London, v. 11, p. 7, Jan. 2017.

Disponível em: <<https://jbioleng.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13036-016-0046-z>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

NODEN, B. H. et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid screening of ticks and fleas for spotted fever group rickettsia. **PLoS One**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. e0192331, Feb. 2018. Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0192331>>. Acesso em: 14 fev. 2018.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 28, n. 12, p. E63, Jun. 2000. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102748/>>. Acesso em: 3 dez. 2017.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome-case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill.**, Saint-Maurice, v. 19, n. 9, Mar. 2014.

Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound Obstet. Gynecol.**, Carnforth, v. 47, n. 1, p. 6-7, Jan. 2016. Disponível em:

<<https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/uog.15831>>. Acesso em: 24 mar. 2018.

OLONINIYI, O. K. et al. Rapid detection of all known ebolavirus species by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v. 246, p. 8-14, Aug. 2017. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093416306231?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 set. 2017.

OLSON, J. G. et al. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 75, n. 3, p. 389-393, 1981. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6275577>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

OSTER, A. M. et al. Interim Guidelines for Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus - United States, 2016. **MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.**, Atlanta, v. 65, n. 5, p. 120-1, Feb. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6505e1.htm>>. Acesso em: 27 ago. 2017.

PAHO. **Pan American Health Organization**. Zika virus infection. 2016.

PAIVA, M. H. S. et al. Sensitivity of RT-PCR method in samples shown to be positive for Zika virus by RT-qPCR in vector competence studies. **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 3, p. 597-599, July-Sep. 2017. Disponível em: <Sensitivity of RT-PCR method in samples shown to be positive for Zika virus by RT-qPCR in vector competence studies>.

Acesso em: 2 set. 2018.

PARDEE, K. et al. Paper-based synthetic gene networks. **Cell**, Cambridge, v. 159, n. 4, p. 940-954, Nov. 2014. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867414012914?via%3Dihub>>. Acesso em: 5 set. 2017.

PARDEE, K. et al. Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. **Cell**, Cambridge, v. 165, n. 5, p. 1255-1266, May 2016.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416305050?via%3Dihub>>.

Acesso em: 14 nov. 2017.

PARIDA, M. et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Rev. Med. Virol.**, Chichester, v. 18, n. 6, p. 407-421, Nov. 2008. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rmv.593>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **West J. Emerg. Med.**, Orange, v. 17, n. 6, p. 671-679, Nov. 2016. Disponível em: <<https://escholarship.org/uc/item/1sb3t094>>. Acesso em: 19 jun. 2018.

PEALER, L. N. et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. **N. Engl. J. Med.**, London, v. 349, n. 13, p. 1236-1245, Sep. 2003.

Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa030969>>. Acesso em: 1 out. 2017.

PESSÔA, R. et al. Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. **Medicine**, Baltimore, v. 95, n. 12, p. e3201, Mar. 2016. Disponível em:

<<https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=27015222>>. Acesso em: 16 abr. 2018.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **N. Engl. J. Med.**, London, v. 374, n. 16, p. 1552-1563, Apr. 2016. Disponível em: <<https://www.nejm.org/zika-virus>>. Acesso em: 6 jan. 2018.

PRIYE, A. et al. A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. **Sci. Rep.**, London, v. 7, p. 44778, Mar. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep44778>>. Acesso em: 14 mai. 2018.

RASMUSSEN, S. A. et al. Zika Virus and Birth Defects-Reviewing the Evidence for Causality. **N. Engl. J. Med.**, London, v. 374, n. 20, p. 1981-7, May 2016. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMsr1604338?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dwww.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 28 jun. 2018.

SABALZA, M. et al. Detection of Zika virus using reverse-transcription LAMP coupled with reverse dot blot analysis in saliva. **PLoS One**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. e0192398, Feb. 2018. Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0192398>>. Acesso em: 26 set. 2017.

SCHWAB, S. R. et al. The importance of being urgent: The impact of surveillance target and scale on mosquito-borne disease control. **Epidemics**, Amsterdam, v. 23, p. 55-63, Jun. 2018.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1755436517301317?via%3Dihub>>.

Acesso em: 16 nov. 2017.

SHUKLA, S. et al. Rapid Detection Strategies for the Global Threat of Zika Virus: Current State, New Hypotheses, and Limitations. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 7, p. 1685, Oct 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01685/full>>. Acesso em: 1 jan. 2018.

- SILVA, S. J. R. D. et al. Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil. **Sci .Rep.**, London, v. 9, n. 1, p. 4494, Mar. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-40960-5>>. Acesso em: 14 mar. 2019.
- SIMPSON, D. I. ZIKA VIRUS INFECTION IN MAN. **Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 58, p. 335-338, Jul. 1964. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=SIMPSON%2C+D.+I.+ZIKA+VIRUS+INFECTION+IN+MAN>>. Acesso em: 27 ago. 2017.
- SMARTT, C. T. et al. Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) From Florida Transmitted Zika Virus. **Front. Microbiol.**, Lausanne , v. 9, p. 768, Apr. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00768/full>>. Acesso em: 2 out. 2017.
- SONG, J. et al. Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. **Anal. Chem.**, Washington, v. 88, n. 14, p. 7289-7294, Jul. 2016. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b01632>>. Acesso em: 12 set. 2017.
- STEWART, R. D.; BRYANT, S. N.; SHEFFIELD, J. S. West Nile virus infection in pregnancy. **Case Rep. Infect. Dis.**, Cairo, v. 2013, p. 351872, Mar. 2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/criid/2013/351872/>>. Acesso em: 12 nov. 2017.
- TAMBYAH, P. A. et al. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. **N. Engl. J. Med.**, London, v. 359, n. 14, p. 1526-1527, Oct. 2008. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc0708673?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed>. Acesso em: 14 out. 2017.
- TAN, P. C. et al. Dengue infection in pregnancy: prevalence, vertical transmission, and pregnancy outcome. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 111, n. 5, p. 1111-1117, May 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448743>>. Acesso em: 18 jul. 2018.
- TANNER, N. A.; EVANS, T. C. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. **Curr. Protoc. Mol. Biol.**, New York, v. 105, p. Unit 15.14., Jan. 2014. Disponível em: <<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0471142727.mb1514s105>>. Acesso em: 18 mai. 2018.
- TIAN, B. et al. Ferromagnetic Resonance Biosensor for Homogeneous and Volumetric Detection of DNA. **ACS Sens.**, Washington, v. 3, n. 6, p. 1093-1101, Jun. 2018. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssensors.8b00048>>. Acesso em: 17 nov. 2018.
- TIAN, B. et al. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. **Biosens. Bioelectron.**, Barking, v. 86, p. 420-425, Dec. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656631630625X?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 nov. 2017.
- TOMASHEK, K. M.; MARGOLIS, H. S. Dengue: a potential transfusion-transmitted disease. **Transfusion**, Arlington, v. 51, n. 8, p. 1654-1660, Aug. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1537-2995.2011.03269.x>>. Acesso em: 14 dez. 2017.

CAMPOS, T. L. et al. Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. **Int. J. Genomics**, New York, v. 2018, p. 1-9, Oct. 2018. Disponível em:

<<https://www.hindawi.com/journals/ijg/2018/6941735/>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 54, n. 4, p. 860-7, Apr 2016. Disponível em:

<<https://jcm.asm.org/content/54/4/860>>. Acesso em: 12 nov. 2018. Acesso em: 27 ago. 2017.

WANG, X. et al. Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v. 238, p. 86-93, Dec. 2016. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016609341630324X?via%3Dihub>>. Acesso em: 2 out. 2017.

YAREN, O. et al. Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. **BMC Infect. Dis.**, London, v. 17, n. 1, p. 293, Apr. 2017. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2382-0>>. Acesso em: 14 out. 2018.

ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 63, p. 32-35, Feb. 2015. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653214004673?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 out. 2017.

ZANLUCA, C.; DOS SANTOS, C. N. Zika virus - an overview. **Microbes Infect.**, Paris, v. 18, n. 5, p. 295-301, May 2016. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457916000496?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 set. 2017.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569-572, Jun. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000400569&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 29 ago. 2017.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa “**Validação de Sensores Moleculares para a Detecção Genômica do Zika Vírus**”, sob a responsabilidade do pesquisador (a) **Dr. Lindomar José Pena** (Telefone para contato 081-2123-7849).

Se decidir participar dela, por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o senhor (a) não consiga entender, converse com a pesquisador(a) responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los. A proposta deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) é explicar o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

Essa pesquisa pretende desenvolver um método de diagnóstico de baixo custo, rápido e eficaz, visando à melhoria da capacidade de diagnóstico bem como as ações de vigilância do Zika vírus em humanos, inclusive em regiões remotas e menos estruturadas. Com esta, acredita-se poder contribuir para o controle da epidemia de ZIKV no país.

Essa é uma atividade voluntária, sendo possível desistir a qualquer momento e a participação não envolve remuneração. O participante poderá se recusar e/ou retirar este consentimento a qualquer momento que desejar, informando à pesquisadora, sem prejuízo a ambas as partes.

A sua contribuição na pesquisa ocorrerá através da participação doando amostras biológicas (sêmen, soro, saliva e urina). O risco relacionado a participação é de um incômodo momentâneo durante a punção venosa, que será realizada por um profissional capacitado. Garantimos que todos os nossos esforços estarão direcionados para que situações de constrangimento não ocorram. Inclusive, garantimos que sua identidade não venha a público sob hipótese alguma.

Todas as informações colhidas serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Após a leitura desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, dou meu consentimento de livre e espontânea vontade, para participar como voluntário, deste estudo, assinando esse termo em duas vias, pois uma cópia pertencerá a mim e a outra a pesquisadora.

Recife, ____/____/2018.

Assinatura: _____

Nome completo: _____

Atesto que expliquei cuidadosamente a natureza e o objetivo deste estudo, os possíveis riscos e benefícios da participação no mesmo, junto ao participante.

Pesquisador - Assinatura: _____

Nome completo do Pesquisador: _____

Para qualquer esclarecimento entrar em contato com:

Pesquisadora: Dr. Lindomar José Pena

Endereço: Av. Prof. Moraes do Rego. Cidade Universitária, s/n. Recife/PE.

E-mail: lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br

Telefone: 081-2123-7849

ANEXO A - Aprovação no Comitê de Ética

	FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES	
---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação de Sensores Biomoleculares para a Detecção Genômica do Zika vírus
Pesquisador: Lindomar José Pena
Área Temática:
Versão: 4
CAAE: 80247417.4.0000.5190
Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ
Patrocinador Principal: International Development Research Center - IDRC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.647.260

Apresentação do Projeto:
Trata-se de um projeto de pesquisa de relevância, com uma abordagem experimental para a detecção de zika vírus. O referido projeto apresenta uma equipe multidisciplinar e instituições parceiras com o propósito contribuir para melhoria da saúde humana e para retardar a propagação do surto de ZIKV.

Objetivo da Pesquisa:
Validar o uso de sensores moleculares para a detecção Zika vírus em amostras de humanos.
Objetivo Secundário:

- Prospeccionar pacientes com sinais clínicos de Zika e confirmar laboratorialmente a presença ou ausência da infecção;
- Comparar a sensibilidade dos sensores moleculares com o qRT-PCR para a detecção de ZIKV em amostras de humanos;
- Determinar a especificidade dos biossensores para a detecção de ZIKV em amostras de clínicas;
- Demonstrar as diferenças de custos entre as técnicas propostas e qRT-PCR para o diagnóstico do ZIKV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Os riscos e benefícios estão devidamente descritos no documento "Informações Básicas do Projeto" e no TCLE.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº	CEP: 50.670-420
Bairro: Cidade Universitária	
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2101-2639	Fax: (81)2101-2639
	E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

Página 01 de 03



FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO
DE PESQUISAS AGGEU
MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.647.260

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de grande relevância científica, com financiamento e com total condições de execução.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentadas todas as documentações e demais declarações exigidas pelo sistema CEP/CONEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O referido projeto, nesta versão, apresenta todas as informações necessárias para compreensão do estudo. Da mesma forma, foram apresentadas todas as documentações e demais declarações exigidas pelo sistema CEP/CONEP em atendimento à RES. CNS 466/12.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1020867.pdf	09/05/2018 11:18:02		Aceito
Outros	DECLARACAO_SCTIE.pdf	23/04/2018 10:34:30	Lindomar José Pena	Aceito
Outros	20180419_20180228_Carta_resposta_pendencias.pdf	23/04/2018 10:33:43	Lindomar José Pena	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_Cadastramento_Biorrepositorio_Canada.doc	23/04/2018 10:33:17	Lindomar José Pena	Aceito

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO
DE PESQUISAS AGGEU
MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.647.260

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_Canada.pdf	23/04/2018 10:32:48	Lindomar José Pena	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	20180419_Projeto_Canada_CEP_Lindomar.pdf	23/04/2018 10:32:19	Lindomar José Pena	Aceito
Outros	AnuenciáSantaJoana.pdf	01/03/2018 16:25:30	Lindomar José Pena	Aceito
Outros	ANUENCIALACEN.pdf	01/03/2018 16:25:07	Lindomar José Pena	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	13/11/2017 14:50:05	Lindomar José Pena	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Letterupport_Pardee_Pena.pdf	13/11/2017 14:49:40	Lindomar José Pena	Aceito
Declaração do Patrocinador	Carta_IDRC_Financiamento.pdf	13/11/2017 14:48:50	Lindomar José Pena	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_Sinval_Fiotec.pdf	13/11/2017 14:45:26	Lindomar José Pena	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Participacao_Assinada.pdf	13/11/2017 14:43:36	Lindomar José Pena	Aceito

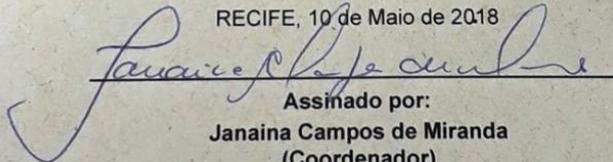
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 10 de Maio de 2018


Assinado por:
Janaina Campos de Miranda
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

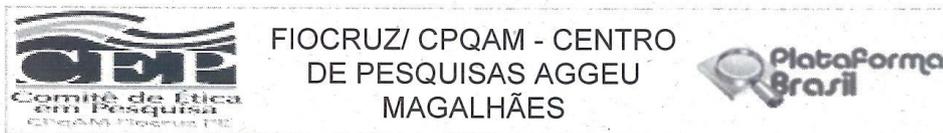
UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

ANEXO B - Aprovação no Comitê de Ética**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de Novas Técnicas Moleculares para o Diagnóstico do Vírus Zika

Pesquisador: Lindomar José Pena

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67404117.7.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A CIENCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

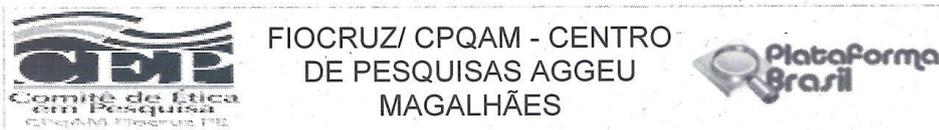
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.402.486

Apresentação do Projeto:

O estabelecimento e fortalecimento dos métodos e mecanismos de diagnóstico e vigilância da infecção pelo vírus Zika em pacientes é de extrema relevância para o controle das doenças associadas ao agente. Atualmente, a RT-PCR e qRT-PCR são utilizadas para a detecção direta do agente. Porém essas técnicas apresentam como limitação o custo, a necessidade de mão de obra altamente especializada e de equipamentos caros e sofisticados para amplificação do DNA, tais como o termociclador, o que limita de sobremaneira a capacidade de diagnóstico laboratorial em países em desenvolvimento e em laboratórios com infraestrutura básica. Essa é a realidade atual do Estado de Pernambuco e do Brasil no enfrentamento ao Zika. Neste contexto, a técnica de amplificação mediada por circuito isotérmico (RT-LAMP-PCR) tem se mostrado resolutive. Trata-se de um teste simples e que não requer o uso de termocicladores, o que tem atraído muita atenção para esta técnica de amplificação de nucleotídeos potencialmente rápida, acurada e com um excelente custo-benefício. Assim, o objetivo final deste projeto é contribuir para o controle da epidemia de ZIKV no país através do desenvolvimento de um método de diagnóstico de baixo custo, rápido e eficaz, visando à melhoria da capacidade de diagnóstico bem como as ações de vigilância do ZIKV em humanos, inclusive em regiões remotas e menos estruturadas. Por ser inovadora e translacional, o método de RT-LAMP-PCR proposto aqui contribuirá significativamente para mitigar os efeitos da epidemia de ZIKV que assola Pernambuco e o país.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.402.486

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver e padronizar a técnica de amplificação mediada por circuito isotérmico (RT-LAMP-PCR) para a detecção molecular do vírus Zika em amostras de humanos.

Objetivos Secundários:

- 1- Desenvolver e padronizar a técnica de RT-LAMP-PCR para a detecção de ZIKV em amostras humanas (soro, urina e sêmen).
- 2- Comparar a sensibilidade e especificidade do RT-LAMP-PCR com o qRT-PCR para a detecção de ZIKV.
- 3- Demonstrar as diferenças de custos entre as técnicas de RT-LAMP-PCR e qRT-PCR para o diagnóstico do ZIKV.
- 4- Contribuir para a saúde pública através do desenvolvimento de um método simples e rápido para o diagnóstico do ZIKV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Mínimos. Será realizada a coleta de sangue (5 ml) por um profissional (enfermeiro ou biomédico) experiente através da punção da veia basilica mediana. Riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Também serão obtidas amostras de saliva, urina e sêmen, coletas pelo próprio voluntário.

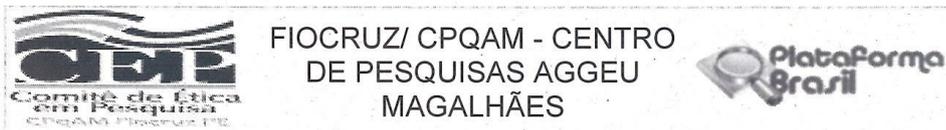
Benefícios:

Os voluntários da pesquisa contribuirão para o desenvolvimento de uma nova tecnologia para o diagnóstico do Zika vírus. O RT-LAMP-PCR oferece uma série de vantagens, pois é uma técnica de baixo custo, rápida, simples e prática para detecção de genes-alvo. Além de ser altamente sensível e específico, o RT-LAMP-PCR tem aplicações potenciais para diagnóstico clínico, assim como para vigilância de doenças infecciosas em países em desenvolvimento, sem que haja requerimento de equipamentos sofisticados e/ou pessoas com treinamento avançado em biologia molecular ou virologia. O desenvolvimento e implementação dessa técnica irá ampliar a capacidade de diagnóstico do ZIKV no Estado de Pernambuco, beneficiando a população. Pretende-se também implementar essa técnica para o diagnóstico de rotina de ZIKV na Fiocruz/PE, um dos cinco

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É uma pesquisa pertinente, que busca alternativas diagnósticas de baixo custo e eficazes para o diagnóstico do ZIKV no estado de Pernambuco.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.402.486

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os termos e demais documentações exigidas pelo sistema CEP/CONEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O referido projeto, nesta versão, apresenta todas as informações necessárias para compreensão do estudo. Da mesma forma, foram também apresentados todos os documentos e termos de responsabilidade exigidos pelo sistema CEP/CONEP em atendimento à Res. CNS 466/12.

Considerações Finais a critério do CEP:

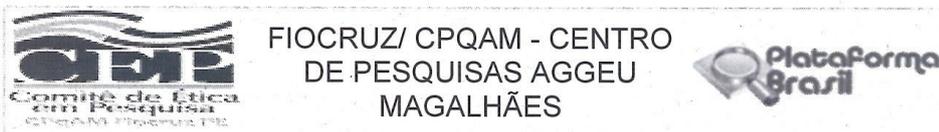
O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	regulamento_biorrepositorio.doc	09/10/2017 15:50:04	Janaina Campos de Miranda	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_898228.pdf	15/09/2017 10:42:36		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaodeparticipacaoassinada.pdf	15/09/2017 10:41:57	Lindomar José Pena	Aceito
Outros	DECLARACAOFORMACAOBIORREPOSIToRIO.pdf	15/09/2017 10:40:58	Lindomar José Pena	Aceito
Outros	RegulamentoBiorepositorio.pdf	15/09/2017 10:39:24	Lindomar José Pena	Aceito
Outros	Letter_Udeni.pdf	15/09/2017 10:38:16	Lindomar José Pena	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP_LAMP_Revisado.pdf	15/09/2017 10:36:44	Lindomar José Pena	Aceito
Outros	CartarespostaLP.pdf	15/09/2017 10:35:58	Lindomar José Pena	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLELAMPRevisadoLindomar.doc	15/09/2017 10:33:48	Lindomar José Pena	Aceito

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.402.486

Justificativa de Ausência	TCLELAMPRevisadoLindomar.doc	15/09/2017 10:33:48	Lindomar José Pena	Aceito
Outros	Declaracao_compromisso_relatorios_CE P.pdf	19/04/2017 16:29:43	Lindomar José Pena	Aceito
Outros	Lattes.pdf	19/04/2017 16:28:53	Lindomar José Pena	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuencialInstituicao.pdf	19/04/2017 16:28:03	Lindomar José Pena	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoAssinada.pdf	17/04/2017 10:35:42	Lindomar José Pena	Aceito

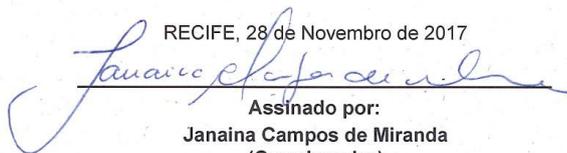
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 28 de Novembro de 2017



Assinado por:
Janaina Campos de Miranda
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

ANEXO C – Material suplementar do artigo publicado**Supplementary Information****Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil**

Severino Jefferson Ribeiro da Silva¹, Marcelo Henrique Santos Paiva^{2,3}, Duschinka Ribeiro Duarte Guedes³, Larissa Krokovsky³, Fábio Lopes de Melo⁴, Maria Almerice Lopes da Silva⁴, Adalúcia da Silva¹, Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes³, Lindomar J. Pena^{1*}

¹Department of Virology, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil;

²Agreste Academic Center, Federal University of Pernambuco (UFPE), Caruaru, Pernambuco, Brazil;

³Department of Entomology, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil;

⁴Department of Parasitology, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil;

*Corresponding author:

Lindomar Pena, PhD. Department of Virology, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz).
Address: Avenida Professor Moraes Rego. Recife, Pernambuco, Brazil. Email:
lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br

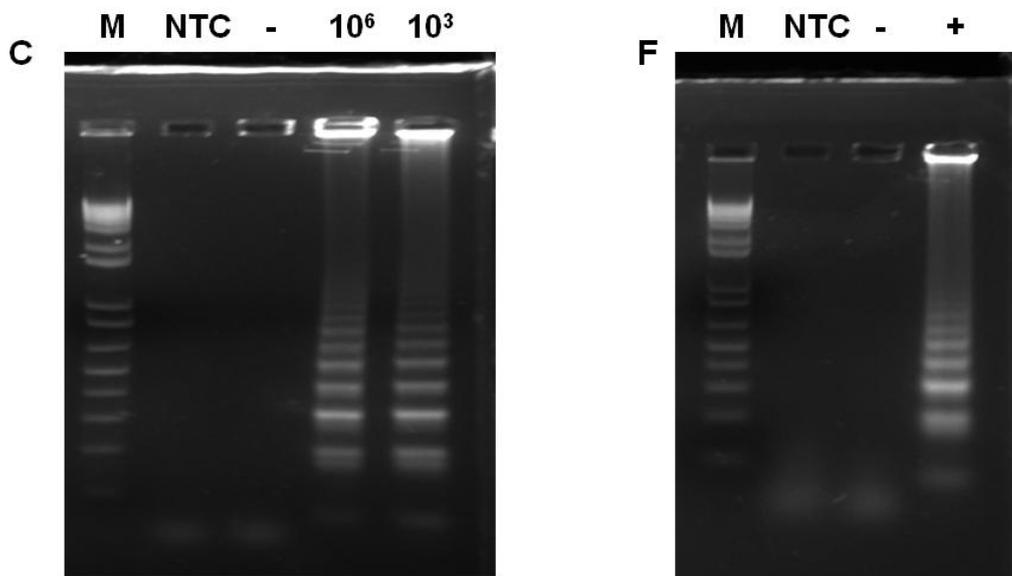
Figure S1. Original images of the gels shown in Figure 1.

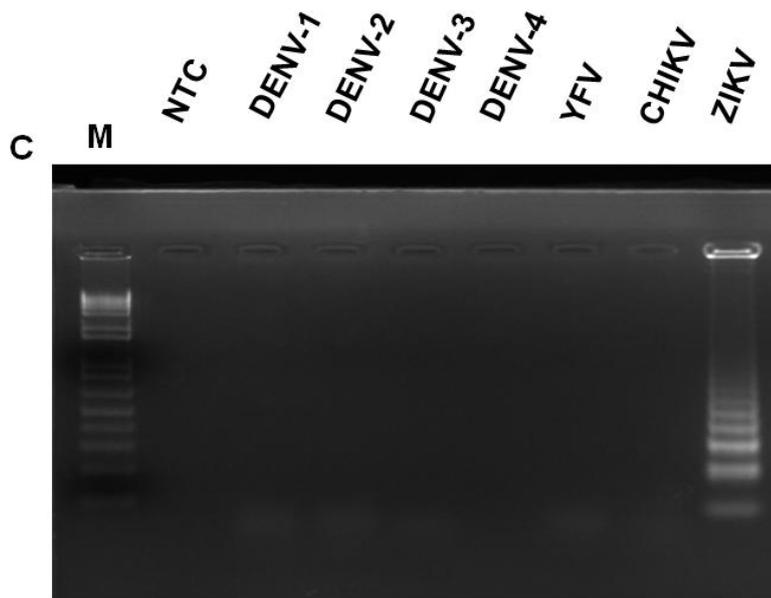
Figure S2. Original image of the gel shown in Figure 2.

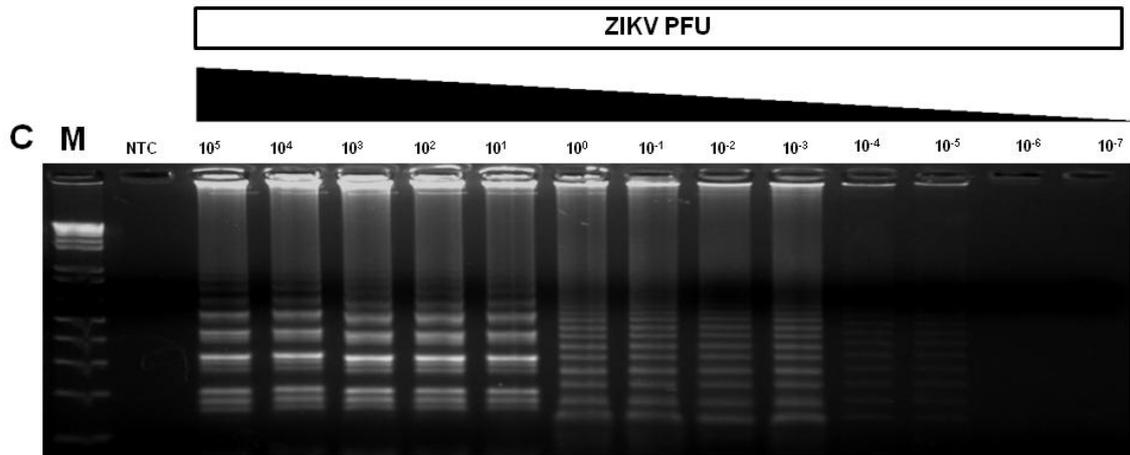
Figure S3. Original image of the gel shown in Figure 3.

Figure S4. Amplification plots obtained from the qRT-PCR. RT-LAMP results were confirmed by qRT-PCR with the infected lysates, through which the Ct value was 12.1 and 26.8, for high viral and low viral load, respectively.

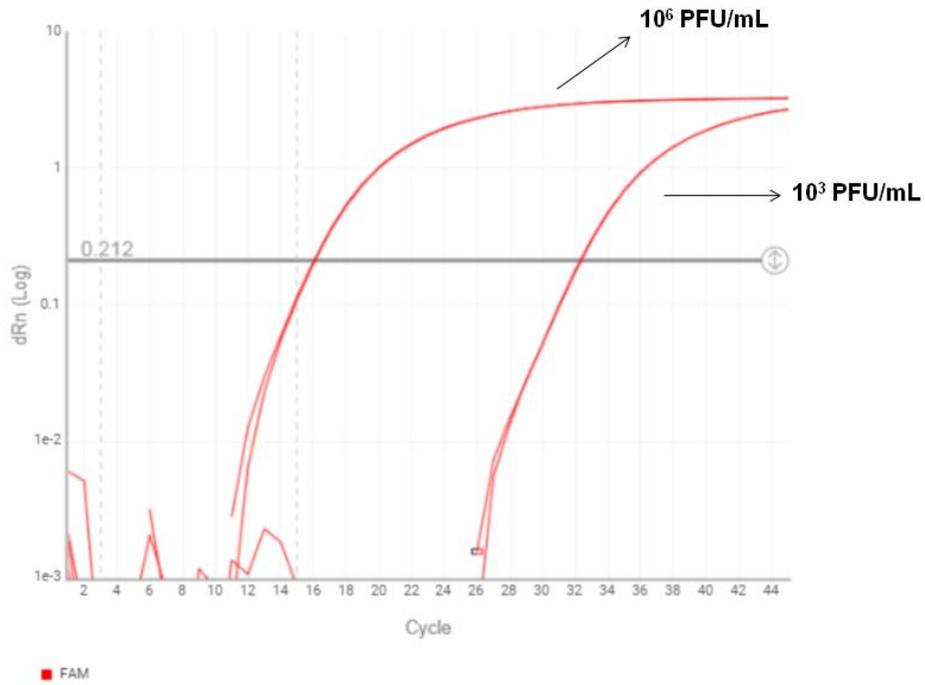


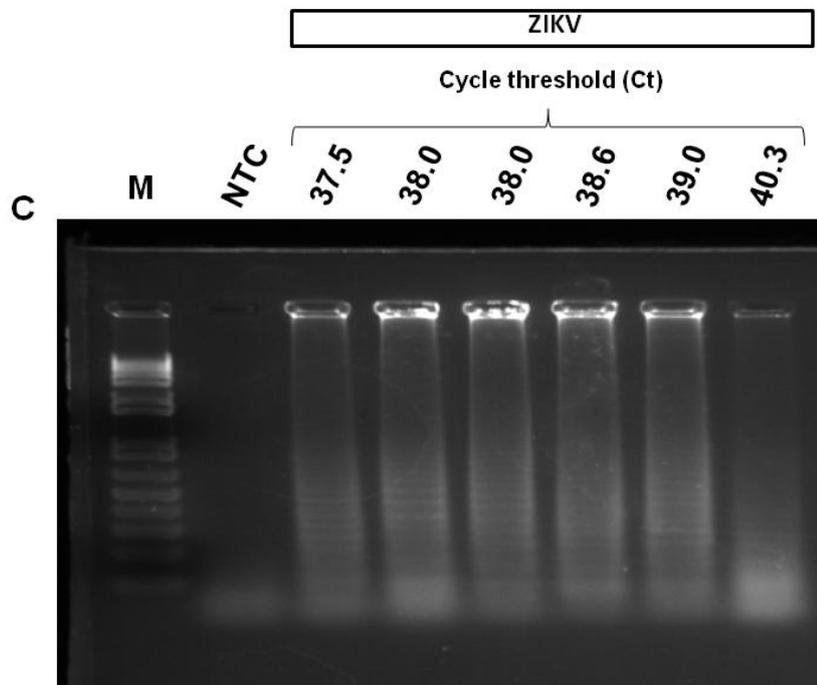
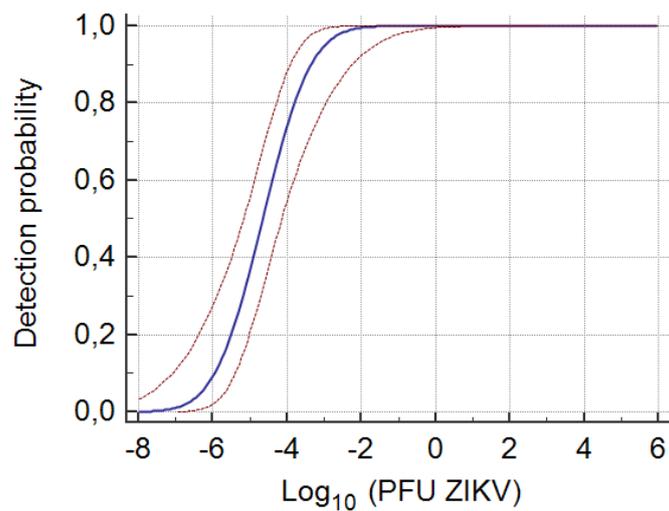
Figure S5. Original image of the gel shown in Figure 5.

Figure S6. Limit of detection of the ZIKV RT-LAMP assay. The probit regression analysis curve was obtained from ten replicates of serial dilutions ($10^5 - 10^{-7}$ PFU) using MedCalc software.



ANEXO D – Artigo publicado

Título: Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil

Revista: Nature - Scientific Reports

Data da submissão: 06 de Julho de 2018

Data da publicação: 14 de Março de 2019

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil

Severino Jefferson Ribeiro da Silva¹, Marcelo Henrique Santos Paiva^{2,3}, Duschinka Ribeiro Duarte Guedes³, Larissa Krokovsky³, Fábio Lopes de Melo⁴, Maria Almerice Lopes da Silva⁴, Adalúcia da Silva¹, Constância Flávia Junqueira Ayres³ & Lindomar J. Pena¹ 

The rapid spread of Zika virus (ZIKV) represents a global public health problem, especially in areas that harbor several mosquito species responsible for virus transmission, such as Brazil. In these areas, improvement in mosquito control needs to be a top priority, but mosquito viral surveillance occurs inefficiently in ZIKV-endemic countries. Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) is the gold standard for molecular diagnostic of ZIKV in both human and mosquito samples. However, the technique presents high cost and limitations for Point-of-care (POC) diagnostics, which hampers its application for a large number of samples in entomological surveillance programs. Here, we developed and validated a one-step reverse transcription LAMP (RT-LAMP) platform for detection of ZIKV in mosquito samples. The RT-LAMP assay was highly specific for ZIKV and up to 10,000 times more sensitive than qRT-PCR. Assay validation was performed using 60 samples from *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes collected in Pernambuco State, Brazil, which is at the epicenter of the Zika epidemic. The RT-LAMP had a sensitivity of 100%, specificity of 91.18%, and overall accuracy of 95.24%. Thus, our POC diagnostics is a powerful and inexpensive tool to monitor ZIKV in mosquito populations and will allow developing countries to establish better control strategies for this devastating pathogen.

Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne flavivirus, first identified in a rhesus monkey from Uganda in 1947 and isolated from *Aedes africanus* mosquitoes in 1948¹. For nearly 60 years few ZIKV cases in human have been reported. However, in 2007 a large ZIKV outbreak occurred in the Yap Island, Federated States of Micronesia. In 2013, the virus was detected in French Polynesia and rapidly spread throughout the Pacific^{2,3}. In these outbreaks, most ZIKV infections have been asymptomatic and, when present, symptoms include rash, fever, headache, and arthralgia⁴. However, the unprecedented epidemics of developmental defects first reported in newborns from Brazil and neurological complications associated with the infection such as Guillain-Barré syndrome (GBS) mobilized public health officials and scientists around the world to fill knowledge gaps of this until then overlooked pathogen⁵⁻⁷.

¹Department of Virology, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil. ²Agreste Academic Center, Federal University of Pernambuco (UFPE), Caruaru, Pernambuco, Brazil. ³Department of Entomology, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil. ⁴Department of Parasitology, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.J.P. (email: lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br)

ZIKV is an arbovirus member of the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae*. The ZIKV genome consists of a single positive-sense single-stranded RNA (+ssRNA), with approximately 11 Kb in length. Other important viruses within this genus include yellow fever virus (YFV), dengue 1–4 virus (DENV 1–4), Japanese encephalitis virus (JEV) and West Nile virus (WNV)⁸.

Mosquitoes from the genus *Aedes* are widespread in tropical and subtropical regions of the world and have been postulated as the main vector for ZIKV⁹. However, different studies have suggested that the southern house mosquito *Culex quinquefasciatus* mosquitoes could act as another important ZIKV vector^{10–13}. Moreover, many ZIKV strains have been isolated from *Anopheles*, *Mansonia*, *Culex* and *Aedes* mosquitoes¹⁴. Non-vector-borne transmission of ZIKV can occur through blood transfusion, transplacentally, perinatally and sexually¹⁵. Given the lack of vaccines and antivirals against ZIKV, vector control remains the most effective manner to limit virus spread and the size of outbreaks¹⁶.

ZIKV surveillance in insect vectors is an important tool for identifying viral circulation and potential entry points, therefore contributing to prevent outbreaks of disease¹⁷. This virus has spread rapidly particularly in developing countries that lacks good sanitation infrastructure and harbors several mosquito species competent for ZIKV transmission. In these areas, improvement in mosquito control needs to be a top priority, but occurs inefficiently in ZIKV-endemic countries, such as Brazil^{17–19}. Surveillance of ZIKV in mosquitoes sheds lights into virus dynamics and allows early detection of new introductions before the virus become widespread in vector and host populations. In addition, surveillance data allows the evaluation of trends and the impact of vector control programs²⁰.

Currently, quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) is the gold standard for molecular diagnostic of ZIKV in both humans and mosquito samples^{21,22}. However, qRT-PCR is expensive, requires highly specialized manpower, and involves costly and sophisticated equipment for amplification and detection of the viral genome. These drawbacks make the technique unsuitable for large-scale applications in low-resource settings areas, which negatively impact the establishment of effective disease control programs^{23,24}.

Point-of-care (POC) molecular diagnostic platforms may address these concerns and increase the diagnostic capacity of ZIKV-affected countries. RT-LAMP is a promising tool that allows rapid, simple and practical diagnosis of a number of pathogens^{25–27}. Considering the advantages of rapid amplification, simple operation, low cost, high sensitivity and specificity, RT-LAMP has potential applications for clinical diagnosis as well as for surveillance of infectious diseases in developing countries²⁸. Differently from the qRT-PCR assay, detection of RT-LAMP amplification products can be achieved by naked eye analysis through color change of the reaction tube²⁹. For this purpose, different LAMP assays have been developed for detecting the ZIKV since its emergence in the Western hemisphere^{30–38}. However, most ZIKV LAMP assays developed to date evaluated only handful mosquito samples, which raise concerns about their fitness for ZIKV detection in the field. Moreover, many of the developed ZIKV LAMP assays still require special equipments for virus detection, which limits its applicability in low-resource scenarios.

In the present study, we developed and validated a one-step reverse transcription LAMP (RT-LAMP) platform for detection of ZIKV in both laboratory and wild-caught mosquitoes. The RT-LAMP assay described here enables the diagnosis of ZIKV in mosquito samples as fast as 20 minutes even in the absence of RNA isolation from the samples. In addition, it does not require highly trained workforce and does not involve expensive and sophisticated equipment for amplification and virus detection. Our point-of-care test is a powerful and inexpensive tool to monitor ZIKV in mosquito populations and will allow developing countries to establish better and timely decisions regarding ZIKV control strategies.

Results

Detection of ZIKV in *Aedes aegypti* under controlled conditions. First, we determined the ability of RT-LAMP to detect ZIKV in *A. aegypti* under controlled conditions. To this end, crude lysate of uninfected mosquitoes were spiked to result in either a high (1×10^6 PFU/mL) or low viral load (1×10^3 PFU/mL) in order to mimic physiological concentrations of ZIKV in these vectors. Spiked samples were processed for RT-LAMP without RNA isolation. RT-LAMP assay for ZIKV were positive in both viral loads tested. As expected, non template control (NTC) samples (water) and negative control (crude lysate of uninfected *A. aegypti*) tested negative (Fig. 1A–C). RNA extraction did not improve RT-LAMP detection (data not shown). RT-LAMP results were confirmed by qRT-PCR, through which the Ct value was 12.1 and 26.8, for high viral and low viral load, respectively (Figs 1 and S4). The same results were obtained with viral spike in *C. quinquefasciatus* homogenates (data not shown).

In order to mimic a real world scenario of ZIKV surveillance in mosquitoes, we determined the capacity of the RT-LAMP to detect ZIKV in *A. aegypti* mosquitoes experimentally infected by oral feeding on rabbit blood spiked with ZIKV. In this study, mosquitoes fed on unspiked rabbit blood were also included as controls. Crude mosquito lysates were used for RT-LAMP assay without RNA isolation. After incubation, the RT-LAMP was able to detect ZIKV only in infected mosquitoes, but not controls (Fig. 1D–F), suggesting the test may be useful for ZIKV detection in entomological samples. RNA extraction did not improve RT-LAMP detection (data not shown).

Analytical specificity of RT-LAMP for detection of ZIKV. To evaluate the specificity of the RT-LAMP assay to detect only ZIKV, we tested crude lysate of *A. aegypti* spiked with several arboviruses circulating in Brazil: DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081), YFV (17DD), and CHIKV (PE2016-480) (Table 1). Only the *A. aegypti* lysate spiked with ZIKV was positive in RT-LAMP reaction, as determined by naked eye analysis, visual observation under UV light or agarose gel electrophoresis (Fig. 2). Thus, these results suggested that RT-LAMP assay described here is highly specificity for detection of ZIKV.

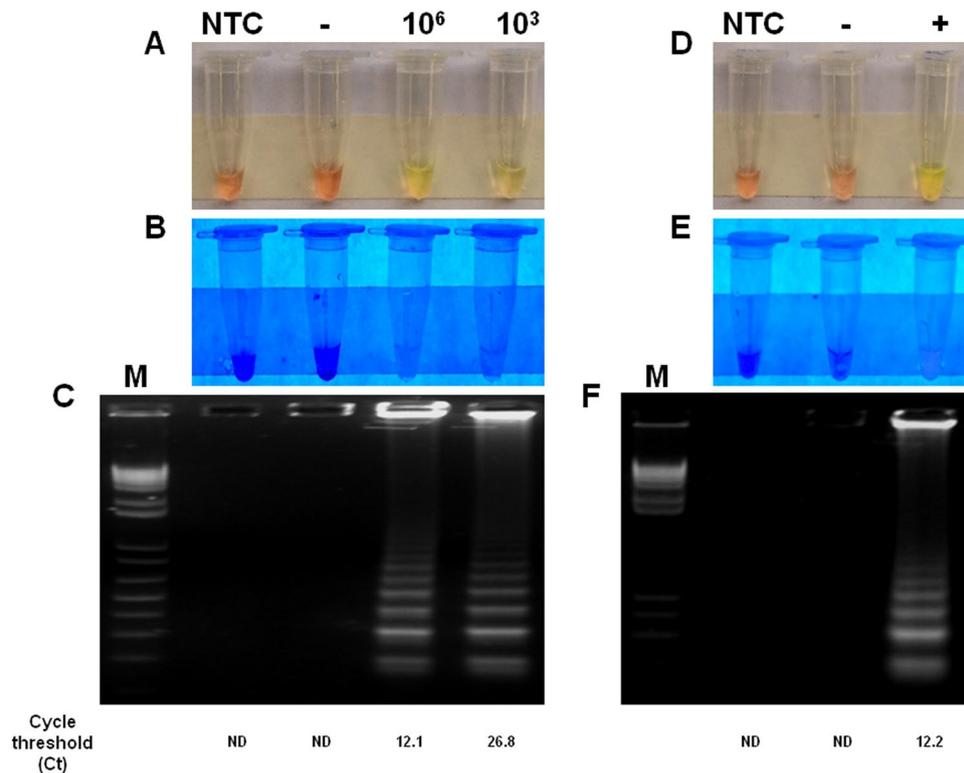


Figure 1. Detection of ZIKV in virus-spiked mosquito samples and crude lysate of experimentally infected *Aedes aegypti*. Crude lysates of uninfected *A. aegypti* were spiked with ZIKV to result in either a high (1×10^6 PFU/mL) or low viral load (1×10^3 PFU/mL) and processed for RT-LAMP without RNA isolation (A–C). (D–F) Represents RT-LAMP results of experimentally infected mosquitoes. RT-LAMP amplicons were observed by visual color change of the products and gel electrophoresis. The amplification products were observed by naked eye under natural light (A,D), under UV irradiation (B,E) and agarose gel electrophoresis (C,F). Legends in (A–C) are: NTC (non-template control); water; (–): macerate of uninfected *Aedes aegypti*; (10^6): macerate of *Aedes aegypti* spiked with 10^6 PFU; (10^3): macerate of *Aedes aegypti* spiked with 10^3 PFU. Legends in (D–F) are: NTC (non-template control); water; (–): macerate of uninfected *Aedes aegypti*; (+): macerate of *Aedes aegypti* experimentally infected with ZIKV. M: molecular weight marker.

Family	Genus	Species	Strain	GenBank access code	Result of RT-LAMP
Flaviviridae	Flavivirus	Zika virus	PE-243	KX197192	+
		Dengue virus serotype 1	PE/97-42735	EU259529	–
		Dengue virus serotype 2	PE/95-3808	EU259569	–
		Dengue virus serotype 3	PE/02-95016	KC425219	–
		Dengue virus serotype 4	PE/10-0081	Unpublished	–
		Yellow fever virus	17DD	DQ100292	–
Togaviridae	Alphavirus	Chikungunya virus	PE2016-480	Unpublished	–

Table 1. Viruses used in this study.

Analytical sensitivity of RT-LAMP for detection of ZIKV. First, we sought to optimize the RT-LAMP assay conditions, reactions were performed at temperatures ranging from 59 °C to 75 °C following an incubation that ranged from 10 min to 60 min. The best amplification results were obtained at 72 °C for 40 min, but incubation time as short as 20 minutes was sufficient for detecting positive samples. Therefore, all assays were carried out using 40-min incubation time. The analytical sensitivity (limit of detection) of RT-LAMP was determined in crude lysate of *A. aegypti* spiked with a 10-fold serial dilution of ZIKV ranging from 10^5 PFU to 10^{-7} PFU without RNA isolation. RT-LAMP was able to detect a broad range of virus concentration (from 10^5 to 10^{-5} PFU), including viral loads found in naturally infected mosquitoes³⁹. Considering 10 independent replicates per protocol developed, the probit regression analysis revealed that the limit of detection at 95% probability for each RT-LAMP was $-2,98 \log_{10}$ PFU of ZIKV ($\sim 1/1000$ PFU) with confidence interval from $-3,62$ to $-1,64$ (Table 2 and Fig. S6). Additionally, viral RNA extracted from the same dilutions tested by RT-LAMP was assayed by the widely used ZIKV qRT-PCR method developed by Lanciotti⁴⁰. For qRT-PCR assay, the lower detection limit was

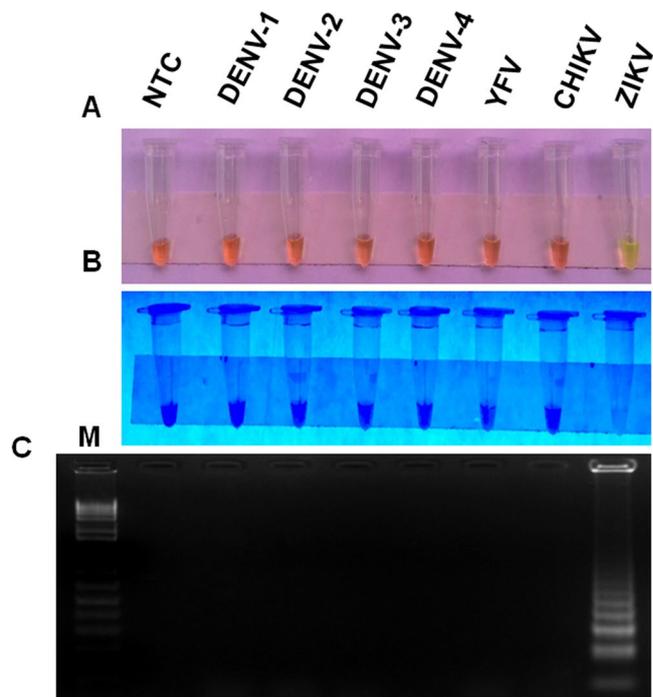


Figure 2. Analytical specificity of ZIKV RT-LAMP in mosquito samples. Crude lysates of uninfected *A. aegypti* were spiked with different arboviruses (DENV 1–4, YFV, CHIKV and ZIKV) circulating in Brazil so the final concentration would be 10^6 PFU per reaction. Spiked samples were then assayed by ZIKV RT-LAMP. The amplification products were observed by naked eye under natural light (A), under UV irradiation (B) and agarose gel electrophoresis (C). M: molecular weight marker. NTC (non-template control): water.

ZIKV Concentration (PFU)	No. of Replicates	No. of positive results	Hit rate in %
10^5	10	10	100
10^4	10	10	100
10^3	10	10	100
10^2	10	10	100
10^1	10	10	100
10^0	10	10	100
10^{-1}	10	10	100
10^{-2}	10	10	100
10^{-3}	10	9	90
10^{-4}	10	7	70
10^{-5}	10	6	60
10^{-6}	10	0	0
10^{-7}	10	0	0

Table 2. Detection limit of the ZIKV RT-LAMP assay^a. ^aProbit regression analysis was calculated using MedCalc software (version 18.11), giving a C_{95} value (concentration detectable 95% of the time) of $-2.98 \log_{10}$ PFU of ZIKV. This indicates that the limit of detection is about $-3 \log_{10}$ (1/1000) PFU/reaction and that samples containing that concentration would be detected 95% of the time.

10^1 PFU ZIKV with Ct value 37.2 (Fig. 3). Taken together, the limit of detection was thus slightly than the gold standard technique for the diagnosis of ZIKV.

Diagnostic performance of ZIKV RT-LAMP for mosquito samples. A total of 60 mosquito samples from *A. aegypti* (n = 32) and *C. quinquefasciatus* (n = 28) were obtained from the Entomology Department^{39,41} and tested for ZIKV by RT-LAMP assay. Samples with Ct values of ≤ 38.0 in duplicate wells were considered positive for ZIKV infection⁴². Of these, 31 samples were ZIKV negative as determined by qRT-PCR and 29 were positive, including naturally and experimentally infected mosquitoes (Table 3). The Ct value in these samples ranged from 27.0 to >40.0 . From the total of 60 samples, the RT-LAMP assay was able to detect ZIKV in 32 samples,

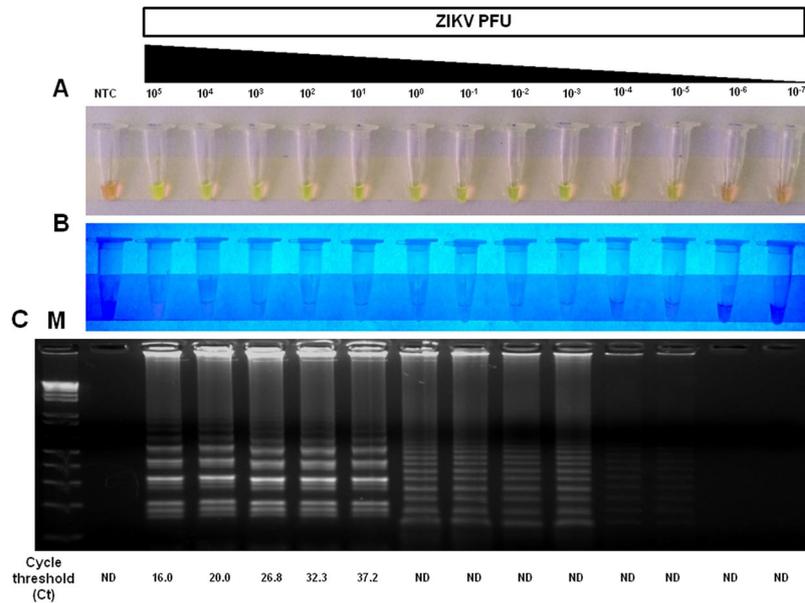


Figure 3. Analytical sensitivity of ZIKV RT-LAMP in mosquito samples. The sensitivity of RT-LAMP was determined by spiking different amounts (10^5 PFU to 10^{-7} PFU) of ZIKV in crude lysates of uninfected *Aedes aegypti* mosquitoes and then testing by RT-LAMP directly without RNA extraction. The amplification products were observed by naked eye under natural light (A), under UV irradiation (B) and agarose gel electrophoresis (C). M: molecular weight marker. NTC (non-template control): water. ND (Not detected). To compare the results of RT-LAMP with a gold standard technique, viral RNA was extracted from the same dilutions using Trizol reagent and assayed qRT-PCR.

including the 29 samples already determined to be positive by qRT-PCR (Fig. 4). Moreover, samples that were at the detection threshold by qRT-PCR (Ct values ranging from 37.5 to 40.3) were tested positive by the RT-LAMP assay result (Fig. 5), highlighting the sensitivity of the test in mosquito samples.

The diagnostic performance of ZIKV RT-LAMP for mosquito samples was determined by statistical analysis using qRT-PCR as the gold standard technique. The overall ZIKV prevalence in the samples was 46.03% (95% CI 33.39% to 59.06%). The RT-LAMP assay had a diagnostic sensitivity of 100% (95% CI 88.06% to 100.00%) and diagnostic specificity of 91.18% (95% CI 76.32% to 98.14%). The positive predictive value, which is probability that the virus is present when the test is positive, was 90.62% (95% CI 76.64% to 96.61%), whereas the negative predictive value, which indicates the probability that the virus is absent when the test is negative, was 100%. The overall accuracy of the RT-LAMP test was determined to 95.24% (95% CI 86.71% to 99.01%) (Table 4), highlighting the practical value of RT-LAMP for ZIKV detection in entomological samples.

To confirm the identity of ZIKV RT-LAMP positive samples, we sequenced positive samples from field-caught *Aedes spp.* and *Culex spp.* mosquitoes by the Sanger method. Sequencing results and BLAST analysis demonstrated that ZIKV RT-LAMP amplicons match 100% with virus circulating in Brazil (Fig. 6), confirming the specificity of the RT-LAMP for ZIKV.

Together, these results indicated that our ZIKV RT-LAMP assay represents a robust and affordable diagnostic platform that can be used as a surveillance tool for mosquitoes infected with ZIKV.

Discussion

The rapid detection of ZIKV in mosquito samples can help to understand the dynamics of the disease in areas that have favorable conditions for virus transmission²⁰. In this context, we developed a rapid molecular test for the detection of ZIKV in mosquito samples that may be a valuable tool for vector surveillance. The RT-LAMP assay described here is straightforward, inexpensive, and enables ZIKV detection even in the absence of RNA extraction. To our knowledge, this is the first validation of a ZIKV RT-LAMP assay using experimentally and naturally infected *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* mosquitoes collected at the epicenter of the Zika epidemic in Brazil.

Currently, the gold standard technique for detection of ZIKV in mosquito samples is qRT-PCR. This assay is specific for detecting the virus in both human and mosquito samples^{21,40}. However, its prohibitive cost makes qRT-PCR unfit for testing a large number of mosquitoes collected in entomological surveillance programs⁴¹. Another potential limitation of qRT-PCR is the inability to detect low viral titers, which may occur especially during interepidemic periods. The limit of detection for the assay described by Faye was 0.05 plaque forming unit (PFU) or 32 genome-equivalents and the one developed by Lanciotti was 25 RNA copies^{21,40}. Recently, other research groups have developed methodologies using the LAMP approach for the detection of ZIKV using mosquito samples³⁴⁻³⁶. However, these studies used only a handful of mosquito samples and the lowest virus concentration detected was 10^3 PFU. Our RT-LAMP was evaluated using 60 and revealed to be about 10,000 fold more sensitive than the qRT-PCR, detecting virus concentrations as low as 10^{-5} PFU. The large amount of infectious and non-infectious ZIKV RNA released into the culture supernatant explains the ability of RT-LAMP to detect

Sample (ID)	Ct value	ZIKV PFU/mL equivalent	Mosquito sample	Source	Result of RT-LAMP
1	27.0	6.20×10^6	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	+
2	29.0	3.97×10^6	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	+
3	29.0	3.97×10^6	<i>Aedes aegypti</i>	Laboratory sample	+
4	30.0	1.50×10^6	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	+
5	30.0	1.50×10^6	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	+
6	30.0	1.50×10^6	<i>Aedes aegypti</i>	Laboratory sample	+
7	30.5	5.31×10^6	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
8	30.6	1.45×10^6	<i>Aedes aegypti</i>	Laboratory sample	+
9	30.6	1.45×10^6	<i>Aedes aegypti</i>	Laboratory sample	+
10	31.0	8.23×10^6	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
11	31.0	8.23×10^6	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
12	31.0	8.23×10^6	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	+
13	31.0	8.23×10^6	<i>Aedes aegypti</i>	Laboratory sample	+
14	32.0	3.91×10^5	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
15	32.0	3.91×10^5	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
16	32.0	3.91×10^5	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	+
17	32.0	3.91×10^5	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	+
18	33.0	2.27×10^5	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	+
19	34.0	9.97×10^5	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
20	34.0	9.97×10^5	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
21	34.5	5.17×10^5	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
22	35.3	3.23×10^4	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
23	35.5	3.00×10^4	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
24	35.5	3.00×10^4	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
25	36.5	1.41×10^4	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
26	36.5	1.41×10^4	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
27	37.5	6.00×10^1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	+
28	38.0	5.60×10^1	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
29	38.0	5.60×10^1	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
30	38.6	5.00×10^1	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	+
31	39.0	4.15×10^1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	+
32	40.3	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	+
33	>40.0	0	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	–
34	>40.0	0	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	–
35	>40.0	0	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	–
36	>40.0	0	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	–
37	>40.0	0	<i>Aedes aegypti</i>	Field sample	–
38	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
39	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
40	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
41	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
42	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
43	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
44	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
45	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
46	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
47	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
48	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
49	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
50	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
51	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
52	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
53	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
54	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
55	>40.0	0	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field sample	–
56	>40.0	0	<i>Aedes aegypti</i>	Laboratory sample	–

Continued

Sample (ID)	Ct value	ZIKV PFU/mL equivalent	Mosquito sample	Source	Result of RT-LAMP
57	>40.0	0	<i>Aedes aegypti</i>	Laboratory sample	—
58	>40.0	0	<i>Aedes aegypti</i>	Laboratory sample	—
59	>40.0	0	<i>Aedes aegypti</i>	Laboratory sample	—
60	>40.0	0	<i>Aedes aegypti</i>	Laboratory sample	—

Table 3. Mosquito samples used for RT-LAMP validation.

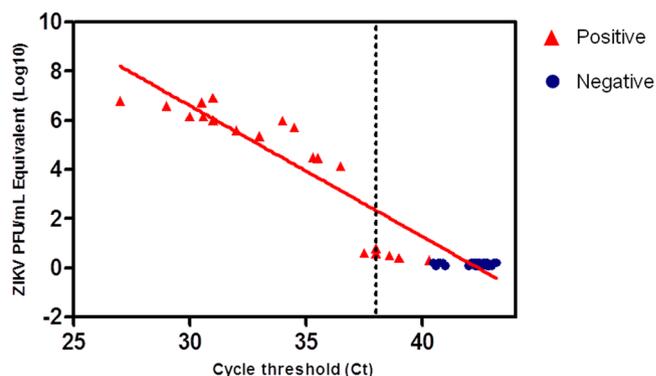


Figure 4. Diagnostic of mosquito samples by RT-LAMP. A total of 60 mosquito samples from *Aedes aegypti* (n = 32) and *Culex quinquefasciatus* (n = 28) were tested for ZIKV by RT-LAMP assay. Of these, 29 were positive for ZIKV and 31 were negative as determined by qRT-PCR. Dashed line represents the qRT-PCR cycle threshold (Ct value) value for ZIKV positivity (Ct ≤ 38). Red triangle indicates samples positive by RT-LAMP and blue circle are samples negative by RT-LAMP.

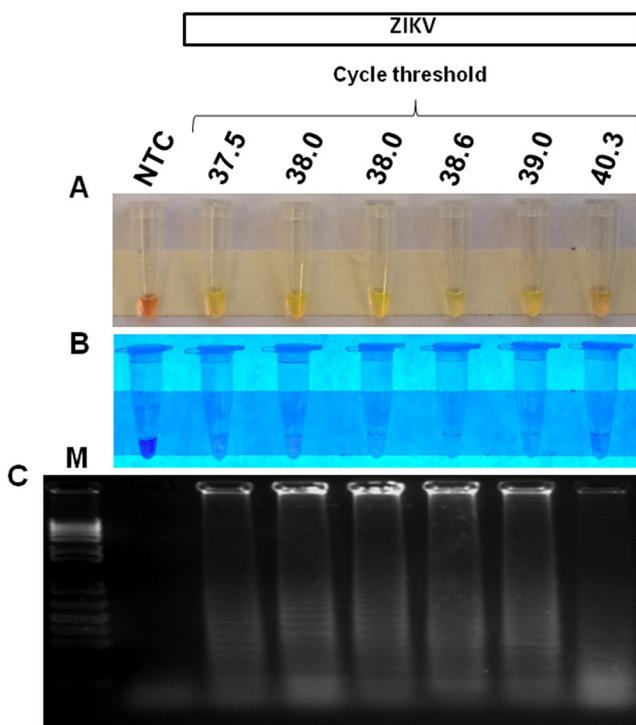


Figure 5. ZIKV detection by RT-LAMP in mosquito samples at the qRT-PCR detection limit. Mosquito samples at the detection threshold by qRT-PCR (Ct values ranging from 37.5 to 40.3) were assayed by RT-LAMP and all reactions showed a positive result. The amplification products were observed by naked eye under natural light (A), under UV irradiation (B) and agarose gel electrophoresis (C). M: molecular weight marker. NTC (non-template control): water.

	qRT-PCR +	qRT-PCR –	Total
RT-LAMP +	29	3	32
RT-LAMP –	0	31	31
Total	29	34	
Sensitivity	100% (95% CI 88.06% to 100.00%)		
Specificity	91.18% (95% CI 76.32% to 98.14%)		
ZIKV prevalence	46.03% (95% CI 33.39% to 59.06%)		
Positive Predictive Value	90.62% (95% CI 76.64% to 96.61%)		
Negative Predictive Value	100%		
Accuracy	95.24% (95% CI 86.71% to 99.01%)		

Table 4. Diagnostic performance of ZIKV RT-LAMP for mosquito samples.

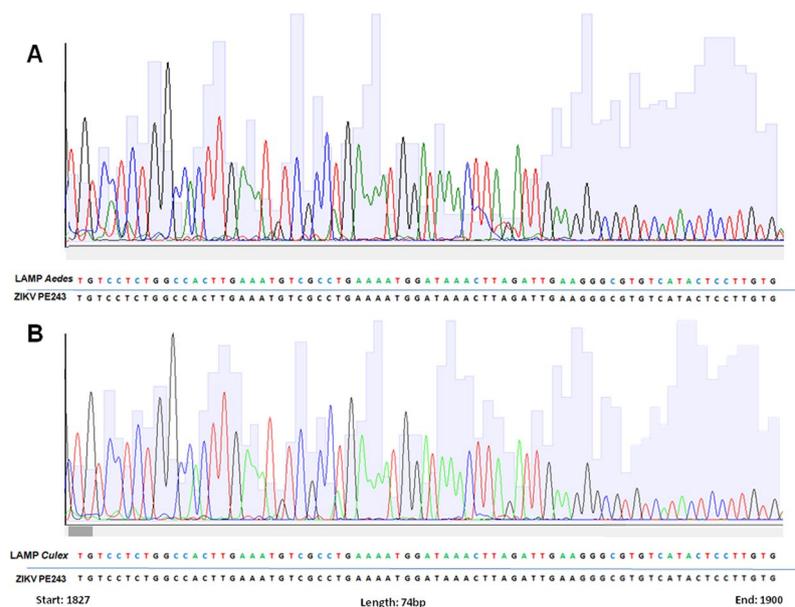


Figure 6. Electropherogram of ZIKV RT-LAMP detected in field-caught *Aedes spp.* and *Culex spp.* mosquitoes. Amplicons from RT-LAMP reaction from field-caught *Aedes aegypti* (A) and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes (B) were sequenced using Sanger method to confirm the identity of ZIKV. The region amplified was genome position 1827 to 1900. The obtained sequences were aligned against the ZIKV PE243 reference strain.

less than 1 PFU even without RNA extraction⁴³. The analytical sensitivity of both our qRT-PCR and RT-LAMP differed from previously published studies which developed the primers^{30,40}. There are a number of reasons that might have accounted for this variation, including differences in kits and research suppliers, viral strains, type of biological samples, and detection systems.

Several mosquito-borne arboviruses, including ZIKV, DENV and CHIKV, are endemic and co-circulate throughout the Northeast Brazil^{44,45}. One possible limitation of diagnostic tests for ZIKV is the possibility of cross-reactivity with other flaviviruses, particularly DENV^{40,46,47}. Here, we showed no cross-reactions with other arboviruses including four serotypes of DENV, YFV or CHIKV and sequencing of RT-LAMP amplicons from naturally infected *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* confirmed ZIKV identity.

We validated the RT-LAMP assay using samples obtained from experimentally and naturally ZIKV-infected *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus*. The RT-LAMP had a sensitivity of 100%, specificity of 91.18%, and overall accuracy of 95.24% as compared to qRT-PCR. Importantly, the ZIKV RT-LAMP could undoubtedly detect ZIKV RNA in mosquito samples that had been previously tested as negative by qRT-PCR. These samples were at the detection threshold by the qRT-PCR with Ct value ranging from 38.6 to 40.3. In contrast with our findings, some studies have reported that the analytical sensitivity of the RT-LAMP assay is lower when compared to the gold standard diagnostic test (qRT-PCR)^{32,38}. However, recently published studies have corroborated our findings that the analytical sensitivity of the RT-LAMP assay is superior than qRT-PCR^{36,48}.

The RT-LAMP assay can be performed through either a two-step assay or one-step protocol. Two-step RT-LAMP requires the addition of the reverse transcriptase (RT) enzyme together with the DNA polymerase enzyme, which may be wild-type Bst DNA polymerase or Bst 2.0 polymerase 2.0 WarmStart. Several studies report the need for RNA extraction before performing the RT-LAMP assay and the use of the two-step RT-LAMP^{49–51}. However, the two step protocol is longer, more expensive, and requires additional sample

handling, which increases the chances of pipetting errors and contamination. The use of Bst 3.0 Polymerase 3.0 WarmStart overcomes these concerns. This enzyme possesses high activity of reverse transcriptase and polymerase in a single-temperature incubation which allows the assay to be performed in a one-step. Additionally, the Bst 3.0 DNA polymerase is a robust enzyme capable of maintaining its activities even in the presence of inhibitors³³. This is especially relevant for viral survey in entomological samples which are notorious to harbor amplification inhibitors⁵².

Recently, Yaren *et al.* reported a diagnostic test based on RT-LAMP for detection of ZIKV in mosquito samples³⁵. Nonetheless, the need for RNA extraction limits its applications for POC diagnostics. In another study, Lamb *et al.* reported a low-cost molecular diagnostic test method based on RT-LAMP for detection of ZIKV in mosquito samples without RNA isolation³⁶. However, the authors tested only five experimentally infected *A. aegypti* and did not validate the technique using naturally infected mosquitoes.

Other groups have also developed several technologies for molecular detection of ZIKV^{30–33,35,50,51,53–58}. However, many of these technologies still have limitations for POC diagnostic applications, including the need for RNA isolation or the use of sophisticated and proprietary hardware and software, which limits its applicability in the developing world.

The main advantages of the RT-LAMP assay described here is the ability to detect ZIKV without the need for pretreatment or RNA extraction from the mosquito samples. Importantly, positive samples can be diagnosed in just 20 minutes and the result can be easily interpreted visual examination. Given its simplicity, the assay can be run by individuals without specialty training. The cost per sample was inferior to \$1, which is considerably lower than qRT-PCR. These advantages suggest that our diagnostic assay to detect ZIKV is suitable for use in viral surveillance in mosquitoes in remote areas or low resource countries affected by the ZIKV epidemics or at risk of viral introduction.

Conclusion

We have developed a low cost, point-of-care diagnostic platform based on the RT-LAMP assay to detect ZIKV in mosquito samples collected at the epicenter of the Zika epidemics in Brazil. The test is a robust, fast and inexpensive tool for surveillance of ZIKV in mosquito populations and will enable developing countries to establish better viral surveillance in vectors and improve the efficacy of control programs. Our results provide a potential new molecular diagnostic test for ZIKV in mosquito samples as a novel straightforward and inexpensive method for detection of ZIKV in arthropod vectors.

Methods

Cells and viruses. Vero cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Carlsbad, CA) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco) and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco) at 37 °C in 5% CO₂. The ZIKV strain PE243 (GenBank access code: KX197192.1) used in this work was isolated in C6/36 cell line using serum sample of a Brazilian patient infected by ZIKV in 2015. After isolation, the virus was propagated and stored at –80 °C until use. Other arboviruses, including DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081), YFV (17DD) and CHIKV (PE2016-480) were similarly propagated in Vero cells and used to determine the specificity of the RT-LAMP. All viruses were titrated in Vero cells by the standard plaque assay method and resulted in titers ranging from 10⁶ to 10⁷ PFU/mL. With the exception of YFV (17DD), which is a vaccine strain, all other viruses were isolated from humans in Pernambuco, Brazil.

RT-LAMP assay. RT-LAMP reactions were carried out in triplicate in a total volume of 25 µL containing 1x Isothermic Amplification Buffer, 8 mM MgSO₄, 4 U of Bst DNA polymerase [version 3.0 WarmStart; New England Biolabs (NEB)], 1.8 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (ThermoFisher Scientific), 1.6 µM for FIP (5'-GGCGACATTTCAAGTGGCCAGAGAGCTCTRGAGGCTGAGA-3'), 1.6 µM for BIP (5'-AGGGCGTGTACTACTCCTTGTGAGTGTTCAGCCGGGATCT-3'), 0.2 µM for F3 (5'-CAGTTCACACGGCCCTTG-3'), 0.2 µM for B3 (5'-TGTACCTCCACTGTGACTGT-3'), 0.4 µM for LF (5'-CCTTCCCTTTGCACCATCCA-3'), 0.4 µM for LB (5'-TACCGCAGCGTTCACATTCA) primers and 5 µL test sample (no template control (NTC), extracted RNA, or samples without RNA extraction). These primers have been previously described³⁰. In order to visualize positive reactions and prevent contamination, 1 µL of SYBR Green I (ThermoFisher Scientific) diluted 1:10 dilution in RNase-free water (Promega) was added to the center of the tube caps before the reaction and mixing afterwards. Reactions were incubated at 72 °C for 40 min in a heat block, and then inactivated at 80 °C for 5 minutes. To evaluate the robustness of the assay for POC applications, all set-up and execution of RT-LAMP reactions were done in a conventional lab bench using designated pipettes and filter tips. Imaging analysis took place in separate rooms. All experiments were independently replicated at least six times.

After the incubation, the RT-LAMP products reactions were detected using three different methods. In the first, the products were observed by naked eye under natural light and photographed using a conventional smartphone camera. A color change from orange to greenish yellow was used to identify positive sample, while a negative sample remained orange. The second method was visual analysis of reaction tubes under UV light irradiation (UV wavelength of 302–312 nm) using a transilluminator (model UVB LTB 20 × 20 STV, Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brazil) coupled with a camera and connected to a computer. In this method, negative samples were dark blue and positive reactions were light fluorescent. In the third method, the RT-LAMP amplicons were analyzed by agarose gel electrophoresis (2.0%) in 1x TAE buffer, followed by ethidium bromide staining and gel visualization using transilluminator. For electrophoresis analysis, 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific) was used as a DNA size marker.

Real time RT-PCR. Samples with ZIKV are tested for positivity of the infection by qRT-PCR, according to protocols established by the Centers for Disease Control and Prevention - CDC USA with minor modifications⁴⁰. Briefly, RNA from samples was extracted using Trizol reagent (Invitrogen Carlsbad, USA) following the instructions of the manufacturer. qRT-PCR was conducted using the QuantiNova Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) with amplification in the Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as per the manufacturer's protocol. The reaction mixture (total volume, 15 μ L) contained 7.5 μ L of QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix 2 \times , 0.9 μ M each primers Zika1087 (5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3'), Zika1163C (5'-CCACTAACGTTCTTTTGACAGACAT-3'), 0.9 μ M FAM-labelled 1108 (5'-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-3') probe for ZIKV, 0.1 μ L of QuantiNova RT Mix, 0.08 μ L of QuantiNova ROX Reference Dye, 5 μ L of the RNA samples and RNA-free water. Primers and probes were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies, Skokie, Illinois, USA). The reaction program consisted of a single cycle of reverse transcription for 15 min at 45 °C, followed by 5 min at 95 °C for reverse transcriptase inactivation and DNA polymerase activation, and then 45 cycles of 5 s at 95 °C and 45 s at 60 °C. The amount of viral RNA in each sample was estimated by comparing the cycle threshold values (Ct) to the standard curve made by serial 10-fold serial dilutions of previously titrated ZIKV BRPE243/2015.

Detection of ZIKV in Mosquito Samples Under Controlled Conditions. To evaluate the ability of RT-LAMP to detect ZIKV in mosquitoes, pools of *A. aegypti* or *C. quinquefasciatus* mosquitoes (n = 10) were homogenized in 300 μ L of RNA-free water. Crude lysates were then spiked with 100 μ L of ZIKV so the final viral concentration in the lysates was either 10⁶ or 10³ PFU/mL, thus simulating a situation of high and low viral load, respectively. After incubation at 37 °C for 1 hour, samples were directly assayed by RT-LAMP without RNA extraction.

In order to assess ZIKV detection by RT-LAMP in infected mosquitoes, we used samples from experimentally infected female *A. aegypti* mosquitoes. In brief, the Rec-Lab colony was maintained under standard conditions (temperature, 26 °C \pm 1 °C, relative humidity of 60 to 80% and photoperiod 12:12 h C/E) at the Entomology Laboratory of the Institute Aggeu Magalhães (IAM). For artificial feeding, cell supernatant containing 10⁶ PFU of ZIKV were mixed in 1:1 defibrinated rabbit blood and provided to starving mosquitoes for 90 minutes as previously described³⁹. Whole female mosquitoes were collected at 18 days post-infection, homogenized in 300 μ L of RNA-free and processed for RT-LAMP. Mosquitoes independently fed on non-infected culture cells mixed to the defibrinated rabbit blood was used as controls.

Analytical Specificity and Analytical Sensitivity of RT-LAMP. To test specificity of the RT-LAMP primers for ZIKV, primers were validated by testing the cross-reactivity with other arboviruses currently circulating in Brazil, including ZIKV (PE243), four different serotypes of dengue DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081), YFV (17DD) and CHIKV (PE2016-480). Crude lysates of uninfected *A. aegypti* were spiked with different arboviruses so the final concentration would be 10⁶ PFU per reaction. Spiked samples were then assayed by ZIKV RT-LAMP.

To evaluate the analytical sensitivity (limit of detection) of the RT-LAMP assay, ZIKV strain PE243 was 10-fold serially diluted in crude lysates of uninfected *A. aegypti* mosquito. Virus concentration in spiked mosquito samples ranged from 10⁵ PFU to 10⁻⁷ PFU. After dilution, samples were directly assayed by RT-LAMP without RNA isolation. To compare the results of RT-LAMP with a gold standard technique, viral RNA was extracted from the same dilutions using Trizol reagent (Invitrogen Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions and then assayed by the widely used ZIKV qRT-PCR method⁴⁰.

Validation of RT-LAMP for ZIKV detection in Mosquito Samples. To validate the performance of the RT-LAMP for the diagnosis of ZIKV relative to qRT-PCR, 60 samples from *A. aegypti* (n = 32) and *C. quinquefasciatus* (n = 28) previously assayed by qRT-PCR^{11,41} were obtained from the Entomology Department and tested by RT-LAMP. The intrinsic diagnostic utility of the test was determined using several statistical parameters described below.

Sequencing of LAMP fragments. The genetic characterization of the LAMP fragments from two field positives samples from *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* was performed by the Sanger sequencing method. Amplicons from RT-LAMP reaction were directly purified using illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE) according to the manufacturer's instructions and eluted in 30 μ L of water. Purified amplicons were directly sequenced using the primer FIP and the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) as established by the manufacturer and run on an ABI Prism 3100 Capillary Automatic DNA Analyzer. Sequences of fragments were analyzed using the Bioedit software, v7.0.5 and submitted to NCBI BLAST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) to identify the most closely ZIKV strain.

Statistical analysis. Graphs were generated using the GraphPad Prism Software version 5.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). A probit regression was performed to calculate the limit of detection of the RT-LAMP for detection of ZIKV using MedCalc software (version 18.11, MedCalc Software, Ostend, Belgium). The estimation of the several diagnostic parameters (sensitivity, specificity, ZIKV prevalence, positive predictive value, negative predictive value and overall accuracy) of the RT-LAMP for detection of ZIKV was calculated using the web-based software MedCalc's Diagnostic Test Evaluation Calculator (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php). This analysis was based on the results from 60 mosquito samples previously diagnosed by qRT-PCR.

References

- Dick, G. W., Kitchen, S. F. & Haddock, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **46**, 509–520 (1952).
- Musso, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerging infectious diseases* **21**, 1887, <https://doi.org/10.3201/eid2110.151125> (2015).
- Gatherer, D. & Kohl, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *The Journal of general virology* **97**, 269–273, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000381> (2016).
- Musso, D., Nilles, E. J. & Cao-Lormeau, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **20**, O595–596, <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707> (2014).
- Meneses, J. D. A. et al. Lessons Learned at the Epicenter of Brazil's Congenital Zika Epidemic: Evidence From 87 Confirmed Cases. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **64**, 1302–1308, <https://doi.org/10.1093/cid/cix166> (2017).
- Marli T. et al. Zika virus IgM-specific based diagnostic is highly correlated with detection of neutralising antibodies in neonates with congenital disease. *J Infect Dis.*, first published online October 5, 2016, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw477> (2016).
- Ferreira, M. L. B. et al. Guillain-Barré syndrome, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis associated with Zika virus infection in Brazil: late RNA detection and viral isolation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **97**, 1405–1409, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0106> (2017).
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M. & Honein, M. A. Zika Virus. *The New England journal of medicine* **374**, 1552–1563, <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113> (2016).
- Patterson, J., Sammon, M. & Garg, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *The western journal of emergency medicine* **17**, 671–679, <https://doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904> (2016).
- Elizondo-Quiroga, D. et al. Author Correction: Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. *Sci Rep* **8**, 7887, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25807-9> (2018).
- Guedes, D. R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg Microbes Infect* **6**, e69, <https://doi.org/10.1038/emi.2017.59> (2017).
- Smartt, C. T., Shin, D., Kang, S. & Tabachnick, W. J. Diptera: Culicidae) From Florida Transmitted Zika Virus. *Front Microbiol* **9**, 768, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00768> (2018).
- Guo, X. X. et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. *Emerging microbes & infections* **5**, e102, <https://doi.org/10.1038/emi.2016.102> (2016).
- Diallo, D. et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PloS one* **9**, e109442, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109442> (2014).
- Grischott, F., Puhon, M., Hatz, C. & Schlagenhauf, P. Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. *Travel medicine and infectious disease* **14**, 313–330, <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.07.002> (2016).
- Manore, C. A., Ostfeld, R. S., Agosto, F. B., Gaff, H. & LaDeau, S. L. Defining the Risk of Zika and Chikungunya Virus Transmission in Human Population Centers of the Eastern United States. *PLoS neglected tropical diseases* **11**, e0005255, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005255> (2017).
- Ayllón, T. et al. Early Evidence for Zika Virus Circulation among *Aedes aegypti* Mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* **23**, 1411–1412, <https://doi.org/10.3201/eid2308.162007> (2017).
- Costa-da-Silva, A. L. et al. Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. *PLoS One* **12**, e0171951, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171951> (2017).
- de Oliveira, W. K. et al. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. *Lancet* **390**, 861–870, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31368-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31368-5) (2017).
- Cevallos, V. et al. Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador. *Acta Trop* **177**, 74–80, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.029> (2018).
- Faye, O., Diallo, D., Diallo, M., Weidmann, M. & Sall, A. A. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology journal* **10**, 311, <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-311> (2013).
- Waggoner, J. J. & Pinsky, B. A. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. *Journal of clinical microbiology* **54**, 860–867, <https://doi.org/10.1128/JCM.00279-16> (2016).
- Shukla, S., Hong, S. Y., Chung, S. H. & Kim, M. Rapid Detection Strategies for the Global Threat of Zika Virus: Current State, New Hypotheses, and Limitations. *Front Microbiol* **7**, 1685, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01685> (2016).
- Schwab, S. R., Stone, C. M., Fonseca, D. M. & Fefferman, N. H. The importance of being urgent: The impact of surveillance target and scale on mosquito-borne disease control. *Epidemics* **23**, 55–63, <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2017.12.004> (2018).
- Noden, B. H., Martin, J., Carrillo, Y., Talley, J. L. & Ochoa-Corona, F. M. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid screening of ticks and fleas for spotted fever group rickettsia. *PLoS One* **13**, e0192331, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192331> (2018).
- Oloniyyi, O. K., Kurosaki, Y., Miyamoto, H., Takada, A. & Yasuda, J. Rapid detection of all known ebolavirus species by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Virol Methods* **246**, 8–14, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.03.011> (2017).
- Adams, E. R. et al. Development and evaluation of a novel LAMP assay for the diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, <https://doi.org/10.1128/JCM.00386-18> (2018).
- Mori, Y. & Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy* **15**, 62–69, <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9> (2009).
- Nemoto, M. et al. Detection of equine rotavirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Vet Med Sci* **72**, 823–826 (2010).
- Song, J. et al. Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. *Anal Chem* **88**, 7289–7294, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01632> (2016).
- Tian, B. et al. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. *Biosens Bioelectron* **86**, 420–425, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.085> (2016).
- Wang, X. et al. Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* **238**, 86–93, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.10.010> (2016).
- Lee, D. et al. Simple and Highly Sensitive Molecular Diagnosis of Zika Virus by Lateral Flow Assays. *Anal Chem* **88**, 12272–12278, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03460> (2016).
- Chotiwan, N. et al. Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. *Sci Transl Med* **9**, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag0538> (2017).
- Yaren, O. et al. Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. *BMC Infect Dis* **17**, 293, <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2382-0> (2017).
- Lamb, L. E. et al. Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitoes by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Sci Rep* **8**, 3803, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22102-5> (2018).

37. Kaarj, K., Akarapipad, P. & Yoon, J. Y. Simpler, Faster, and Sensitive Zika Virus Assay Using Smartphone Detection of Loop-mediated Isothermal Amplification on Paper Microfluidic Chips. *Sci Rep* **8**, 12438, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30797-9> (2018).
38. Kurosaki, Y. *et al.* Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Sci Rep* **7**, 13503, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13836-9> (2017).
39. Guedes, D. R. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerging microbes & infections* **6**, e69, <https://doi.org/10.1038/emi.2017.59> (2017).
40. Lanciotti, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases* **14**, 1232–1239, <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287> (2008).
41. Paiva, M. H. S., Guedes, D. R. D., Leal, W. S. & Ayres, C. F. J. Sensitivity of RT-PCR method in samples shown to be positive for Zika virus by RT-qPCR in vector competence studies. *Genetics and molecular biology* **40**, 597–599, <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0312> (2017).
42. Duffy, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England journal of medicine* **360**, 2536–2543, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715> (2009).
43. Li, X. F. *et al.* Characterization of a 2016 Clinical Isolate of Zika Virus in Non-human Primates. *EBioMedicine* **12**, 170–177, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.022> (2016).
44. Pessôa, R. *et al.* Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. *Medicine (Baltimore)* **95**, e3201, <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003201> (2016).
45. Magalhaes, T. *et al.* Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* **11**, e0006055, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006055> (2017).
46. Campos, R. E. M. *et al.* Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. *J Clin Virol* **77**, 69–70, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.02.009> (2016).
47. Zammarchi, L. *et al.* Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **63**, 32–35, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.12.005> (2015).
48. Zhao, J. & Feng, R. Sensitive and rapid detection of Zika virus by loop-mediated isothermal amplification. *Virus Genes*, <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1612-x> (2018).
49. Tanner, N. A. & Evans, T. C. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Curr Protoc Mol Biol* **105**, Unit 15.14, <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1514s105> (2014).
50. Calvert, A. E., Biggerstaff, B. J., Tanner, N. A., Lauterbach, M. & Lanciotti, R. S. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS One* **12**, e0185340, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185340> (2017).
51. Priye, A. *et al.* A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. *Sci Rep* **7**, 44778, <https://doi.org/10.1038/srep44778> (2017).
52. Beckmann, J. F. & Fallon, A. M. Decapitation improves detection of *Wolbachia pipiensis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) mosquitoes by the polymerase chain reaction. *Journal of medical entomology* **49**, 1103–1108 (2012).
53. Pardee, K. *et al.* Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell* **165**, 1255–1266, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.059> (2016).
54. Sabalza, M. *et al.* Detection of Zika virus using reverse-transcription LAMP coupled with reverse dot blot analysis in saliva. *PLoS One* **13**, e0192398, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192398> (2018).
55. Ganguli, A. *et al.* Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care. *Biomed Microdevices* **19**, 73, <https://doi.org/10.1007/s10544-017-0209-9> (2017).
56. Chan, K. *et al.* Rapid, Affordable and Portable Medium-Throughput Molecular Device for Zika Virus. *Sci Rep* **6**, 38223, <https://doi.org/10.1038/srep38223> (2016).
57. Carossino, M. *et al.* Evaluation of a field-deployable reverse transcription-insulated isothermal PCR for rapid and sensitive on-site detection of Zika virus. *BMC Infect Dis* **17**, 778, <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2852-4> (2017).
58. Fernandes, J. N. *et al.* Rapid, noninvasive detection of Zika virus in. *Sci Adv* **4**, eaat0496, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat0496> (2018).

Acknowledgements

This work was supported by the Foundation for Science and Technology of Pernambuco (FACEPE – APQ-0154-2.12/16). S.S. is supported by a Masters Scholarship sponsored by IDRC. The funder had no role in study design, sample collection and analyses of results, decision to publish, or preparation of the manuscript. We are grateful to Ana Paula de Araújo and Mônica Crespo for their assistance with Probit analysis.

Author Contributions

L.P. conceived the work. Experiments were performed by S.S., M.P., D.G., L.K. and A.S. All authors were performed data analysis and interpretation. S.S. drafted the article. All authors critically revised the article and approved the final version.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40960-5>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019