

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

**Caroline Targino Alves da Silva**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO  
MEDIADA POR CIRCUITO ISOTÉRMICO (RT-LAMP-PCR) PARA O  
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO MAYARO VÍRUS**

**RECIFE**

**2021**

**CAROLINE TARGINO ALVES DA SILVA**

**Desenvolvimento e Avaliação da Técnica de Amplificação Mediada por Circuito  
Isotérmico (RT-LAMP-PCR) para o Diagnóstico Molecular do Mayaro Vírus**

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

**Orientador:** Dr. Lindomar José Pena

**Coorientadores:** Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes

Dra. Roberta Vieira de Morais Bronzoni

**RECIFE**

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos  
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

---

S586d Silva, Caroline Targino Alves da.  
Desenvolvimento e avaliação da técnica de amplificação mediada por circuito isotérmico (RT-LAMP-PCR) para o diagnóstico molecular do mayaro vírus / Caroline Targino Alves da Silva. — Recife: [s.n.], 2021.  
84 p. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Orientador: Lindomar José Pena; coorientadores: Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes, Roberta Vieira de Moraes Bronzoni.

1. Infecções por Alphavirus — diagnóstico. 2. Técnicas de Amplificação de Ácido Nucleico — métodos. 3. RNA Viral — análise. 4. Técnicas de Diagnóstico Molecular. I. Pena, Lindomar José Pena. II. Lopes, Constância Flávia Junqueira Ayres. III. Bronzoni, Roberta Vieira de Moraes. IV. Título.

---

CDU 595.771

**CAROLINE TARGINO ALVES DA SILVA**

**Desenvolvimento e Avaliação da Técnica de Amplificação Mediada por Circuito Isotérmico (RT-LAMP-PCR) para o Diagnóstico Molecular do Mayaro Vírus**

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

Aprovada em: 18 de junho de 2021.

**Banca Examinadora**

---

Dr. Lindomar José Pena

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco

*Dedico este trabalho a minha mãe, Kátia Cilene, por sempre me inspirar a alcançar voos  
mais altos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Kátia Cilene Alves da Silva, por ser meu primeiro exemplo de força, amor e perseverança sem perder a doçura. Por me mostrar que a vida é boa e que a caminhada pode e deve ser leve. Por todo amor e compreensão, por me mostrar a importância de seguir os meus sonhos, por ser uma educadora excepcional e por ser o exemplo do que eu quero ser “quando crescer”. Obrigada por me ensinar a ser um bom ser humano antes de ser uma boa profissional. Minha eterna gratidão por me mostrar e me incentivar a escolher uma profissão por amor e me lembrar a aproveitar a jornada até a colheita dos frutos. Gratidão por sempre apoiar as minhas escolhas.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Lindomar José Pena, por ser um exemplo de professor, por confiar e acreditar no meu potencial, pelo incentivo e todo apoio durante essa jornada. Minha imensa gratidão por essa oportunidade.

Agradeço às minhas co-orientadoras Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes e Dra. Roberta Vieira de Moraes Bronzoni pelo apoio e confiança.

Aos professores da Fiocruz Pernambuco, por compartilharem seu conhecimento e experiência, pela paciência e contribuição para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aos membros da banca avaliadora, Dr. Fábio André Brayner dos Santos, Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra, Dr. Antônio Carlos de Freitas e Dr. Luiz Carlos Alves por aceitarem participar da avaliação deste trabalho, contribuindo para o enriquecimento do mesmo.

Ao meu grupo de pesquisa (Virology at Fiocruz), pelo apoio, carinho, incentivo e momentos de descontração.

Ao Instituto Aggeu Magalhães e ao Laboratório de Virologia pela oportunidade da formação acadêmica. À FACEPE pelo apoio financeiro.

Aos amigos queridos que ganhei durante essa etapa, especialmente Lucas Bernardo, Cícero, Karina, Rafinha, Helena, Victor, Maiara e Adri. Obrigada pelo amor, pela cumplicidade e pelos momentos que dividimos juntos. Espero dividir momentos especiais com vocês por muitos

anos, independente do caminho que a vida nos levar, que nossa amizade seja um conforto em meio a tantas turbulências.

Ao meu pai, família e amigos que fiz durante essa caminhada, obrigada por compartilhar o conhecimento, as risadas e os momentos não tão bons assim. Agradeço por deixarem um pouquinho de cada um de vocês em mim, me ensinando a ser uma pessoa melhor e mais tolerante.

Aos amigos queridos que ganhei durante a graduação e que levei para vida, especialmente Gabriel Nascimento, Débora Lacerda, Thaynara Viegas, André Tork, Amanda Freire, Aline Dantas, Ray Arruda, Tarcísio Bonifácio, Fabrine Hilário, Alex Rique e Karolyne Estrela. Gratidão pelo amor e pela cumplicidade, amo continuar crescendo com vocês.

Aos meus amigos de longa data, especialmente Andrwey Viana e Rafael Goulart, por todos os anos de amizade, amor, carinho e apoio. Toda minha gratidão por estarem comigo em todos os momentos, obrigada por serem a extensão da minha família, vocês são os irmãos que eu escolhi.

Aos meus amigos Viviane Lima e Gabriel Brandão, pois apesar da distância, sei que tenho o amor e o apoio de vocês, obrigada por sempre acreditarem em mim.

Aos meus amigos Louise Guimarães e Gabriel Nascimento por todo amor e força que têm compartilhado comigo nos últimos anos. Minha eterna gratidão por nossa amizade.

Aos meus amigos Hyago Rique, Louise Guimarães, Maelle Luna, Bruno Gomes e Cristian Ferreira pela amizade singela e inesperada. Gratidão por me apoiarem durante essa e todas as fases.

Por último, mas não menos importante, agradeço a força que encontrei internamente. Minha gratidão a mim mesma por conseguir levantar depois de cada tombo, por não permitir que o meu sonho se apagasse diante de tantas dificuldades. Por aprender a me respeitar e respeitar meus limites internos. Por não perder a fé e a esperança. Por ter aprendido a entregar e confiar em mim e nas forças superiores. Por lembrar que a caminhada pode ser leve e prazerosa. Por manter minha integridade e bondade enquanto busco meu lugar no mundo.

*“The scientist does not study nature because it is useful to do so. He studies it because he takes pleasure in it, and he takes pleasure in it because it is beautiful. If nature were not beautiful it would not be worth knowing, and life would not be worth living.”*

*Henri Poincare (1854 – 1912)*

SILVA, Caroline Targino Alves da. **Desenvolvimento e avaliação da técnica de amplificação mediada por circuito isotérmico (RT-LAMP-PCR) para o diagnóstico molecular do mayaro vírus**. 2021. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

## RESUMO

O vírus Mayaro (MAYV), agente etiológico da febre de Mayaro, uma doença febril aguda clinicamente semelhante à febre Chikungunya, tem ocasionado pequenos surtos no Brasil. A incidência crescente em regiões não endêmicas é uma preocupação para a saúde pública, pois indica que o MAYV está se espalhando, podendo ocorrer futuras epidemias. Muitos casos de MAYV foram primeiramente diagnosticados como outros arbovírus, especialmente como CHIKV, devido à similaridade entre os sintomas e ocorrência de reatividade cruzada, o que pode levar à subnotificação da doença. Assim, o estabelecimento de métodos de diagnóstico mais específicos são de extrema importância para o controle dessa doença. Atualmente, o diagnóstico molecular de MAYV é realizado através da técnica de RT-PCR. Entretanto, o custo elevado, a necessidade de mão de obra especializada e de equipamentos sofisticados, limita a capacidade de diagnóstico em laboratórios com infraestrutura limitada. Neste trabalho, foi desenvolvida uma plataforma de transcriptase reversa seguida de amplificação isotérmica mediada por loop (RT-LAMP-PCR) para a detecção de MAYV em amostras humanas e de mosquitos. Os primers específicos para detecção de MAYV foram desenhados e sintetizados, e a técnica para detecção de MAYV foi padronizada. Os melhores resultados de amplificação foram obtidos a 70°C por 30 min de incubação. As concentrações ótimas de  $Mg^{2+}$ , enzima Bst 3.0 e dNTPs foram 6 mM, 0,12 U/ $\mu$ L e 1,8 mM, respectivamente. Também foi observado que a reação não necessita de todos os primers para o desempenho, funcionando sem os primers do loop. O teste mostrou-se específico para detecção de MAYV quando testado frente a outros arbovírus e foi capaz de detectar o vírus em amostras humanas de soro, urina, saliva e em mosquitos experimentalmente infectados. Além disso, o teste foi até 1.000 vezes mais sensível e 29 vezes mais barato que a RT-qPCR para detecção de MAYV em amostras de soro.

**Palavras-chave:** Infecções por Alphavirus-diagnóstico; Técnicas de Amplificação de Ácido Nucleico/métodos; RNA Viral/análise.

SILVA, Caroline Targino Alves da. **Development and Evaluation of the Isothermal Circuit Mediated Amplification Technique (RT-LAMP-PCR) for the Molecular Diagnosis of the Mayaro Virus.** 2021. Master's thesis (Academic Master's in Bioscience and Biotechnology at Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

### **ABSTRACT**

Mayaro virus (MAYV), the etiological agent of Mayaro fever, an acute febrile illness clinically similar to Chikungunya fever, has caused small outbreaks in Brazil. The increasing incidence in non-endemic regions is a public health concern, as it indicates that MAYV is spreading and that future epidemics may occur. Many cases of MAYV were first diagnosed as other arboviruses, especially as CHIKV due to the high similarity between symptoms and the occurrence of cross-reactivity, which can lead to sub-notification of the disease. Considering that, the establishment of more specific diagnostic methods is extremely important for disease control. Currently, the molecular diagnosis of MAYV is performed using the RT-PCR. However, the high cost, the need for specialized labor and sophisticated equipment limits the diagnostic capacity in laboratories with limited infrastructure and in developing countries, such as Brazil. In this project, a reverse transcriptase followed by loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP-PCR) platform was developed for MAYV detection in human and mosquito samples. The specific primers for MAYV were designed and synthesized, and the technique for the detection of MAYV in humans was optimized. The best amplification results were obtained at 70°C for 30 minutes of incubation, and the optimal concentrations of Mg<sup>2+</sup>, Bst 3.0 enzyme and dNTPs were 6 mM, 0.12 U/μl and 1.8 mM, respectively. Furthermore, it was observed that the reaction does not require all primers, functioning without loop primers (LF and LB). The test proved to be specific for MAYV detection when tested against other arboviruses and was able to detect the virus in human samples of serum, urine, saliva, and experimentally infected mosquitoes. Furthermore, the assay was up to 1.000 times more sensitive and 29 times cheaper than the RT-qPCR for MAYV detection in serum samples.

**Keywords:** Alphavirus Infections-Diagnosis; Nucleic Acid Amplification Techniques/methods; Viral RNA/analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Organização genômica do MAYV.....	21
<b>Figura 2 -</b>	Distribuição global do MAYV.....	22
<b>Figura 3 -</b>	Representação esquemática do mecanismo da reação do RT-LAMP-PCR.....	27
<b>Figura 4 -</b>	Representação esquemática da metodologia utilizada para a avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP-PCR para detecção do MAYV.....	38
<b>Figura 5 -</b>	Representação esquemática da metodologia utilizada para a avaliação da sensibilidade analítica do RT-LAMP-PCR para detecção do MAYV.....	
<b>Figura 6 -</b>	Alinhamento das sequências de isolados de MAYV, CHIKV, WEEV, VEEV, EEEV, DENV 1-4 e ZIKV.....	40
<b>Figura 7 -</b>	Regiões do genoma de MAYV onde os primers se anelam.....	41
<b>Figura 8 -</b>	Titulação do MAYV por ensaio de placa.....	42
<b>Figura 9 -</b>	Otimização das condições de ensaio do RT-LAMP-PCR e concentração dos reagentes.....	44
<b>Figura 10-</b>	Detecção de MAYV em amostras humanas (soro, urina e saliva) infectadas experimentalmente.....	46
<b>Figura 11-</b>	Detecção de MAYV em amostras de mosquitos ( <i>Aedes aegypti</i> ) infectadas experimentalmente.....	47
<b>Figura 12-</b>	Especificidade analítica do RT-LAMP-PCR para detecção de MAYV em amostras de soro infectadas artificialmente.....	49
<b>Figura 13-</b>	Sensibilidade analítica do RT-LAMP-PCR para detecção de MAYV em amostras de soro.....	51
<b>Figura 14-</b>	Limite de detecção do RT-LAMP-PCR em amostras de soro calculado através de análise de Probit.....	53
<b>Figura 15-</b>	Sensibilidade analítica do RT-LAMP-PCR para detecção de MAYV em amostras de <i>Aedes aegypti</i> .....	54
<b>Figura 16-</b>	Limite de detecção do RT-LAMP-PCR em amostras de <i>Aedes aegypti</i> calculado através de análise de Probit.....	56

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1-</b>	Sequências e concentrações dos primers desenhados para detecção de MAYV por RT-LAMP.....	39
<b>Quadro 2-</b>	Arbovírus utilizados para avaliar a especificidade do RT-LAMP-PCR.....	48
<b>Tabela 1-</b>	Limite de detecção do RT-LAMP-PCR em amostras de soro.....	52
<b>Tabela 2-</b>	Limite de detecção do RT-LAMP-PCR em amostras de <i>Aedes aegypti</i> .....	55
<b>Tabela 3-</b>	Custo detalhado de cada reação para diagnóstico de MAYV através do RT-LAMP-PCR.....	57
<b>Tabela 4-</b>	Custo detalhado de cada reação para diagnóstico de MAYV através da RT-qPCR.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CC</b>	Controle celular
<b>cDNA</b>	Complementary DNA
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>dNTPs</b>	Deoxynucleotides
<b>CHIKV</b>	Chikungunya virus
<b>DENV</b>	Dengue virus
<b>EEEV</b>	Eastern equine encephalitis virus
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>Fiocruz</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>IAM</b>	Instituto Aggeu Magalhães
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>kb</b>	Kilobases
<b>MAYV</b>	Mayaro virus
<b>µL</b>	Microlitro
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnésio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>NTC</b>	Non-template control
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Polimerase chain reaction
<b>PE</b>	Pernambuco
<b>POC</b>	<i>point-of-care</i>
<b>PFU</b>	Plaque forming unit
<b>PRNT</b>	Plaque reduction neutralization test
<b>RT-qPCR</b>	Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real
<b>RBS</b>	Ribosome binding site
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>RT</b>	Reverse transcription
<b>RT-LAMP</b>	Reverse transcription isothermal loop-mediated isothermal amplification
<b>SYBR</b>	Sybr Green

<b>+ssRNA</b>	Positive sense, single-stranded RNA
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Vero</b>	Células primárias de rins de macaco verde africano
<b>VEEV</b>	Venezuelan equine encephalitis virus
<b>WEEV</b>	Western equine encephalitis virus
<b>YFV</b>	Yellow fever virus
<b>ZIKV</b>	Zika virus

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Características moleculares do MAYV.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Histórico e epidemiologia.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Transmissão.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Febre de Mayaro.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5 Métodos de diagnóstico do MAYV e suas limitações.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6 RT-LAMP-PCR.....</b>	<b>26</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA.....</b>	<b>30</b>
<b>5 HIPÓTESE.....</b>	<b>31</b>
<b>6 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>32</b>
<b>6.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>32</b>
<b>7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....</b>	<b>33</b>
<b>7.1 Cepa viral.....</b>	<b>33</b>
<b>7.2 Titulação viral por ensaio de placa.....</b>	<b>33</b>
<b>7.3 Extração de RNA.....</b>	<b>33</b>
<b>7.4 Desenho dos primers para o RT-LAMP-PCR.....</b>	<b>34</b>
<b>7.5 RT-LAMP-PCR.....</b>	<b>34</b>
<b>7.6 RT-qPCR.....</b>	<b>35</b>
<b>7.7 Detecção do MAYV em amostras clínicas.....</b>	<b>35</b>
<b>7.8 Detecção do MAYV em amostras de culídeos.....</b>	<b>36</b>
<b>7.9 Avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP-PCR.....</b>	<b>36</b>
<b>7.10 Avaliação da sensibilidade do RT-LAMP-PCR.....</b>	<b>37</b>
<b>7.11 Comparação dos custos do RT-LAMP-PCR e do RT-qPCR.....</b>	<b>38</b>
<b>7.12 Considerações éticas.....</b>	<b>38</b>

<b>7.13 Análises estatísticas.....</b>	<b>38</b>
<b>8 RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>8.1 Desenho dos primers para detecção do MAYV por RT-LAMP.....</b>	<b>39</b>
<b>8.2 Titulação do vírus.....</b>	<b>42</b>
<b>8.3 Otimização dos parâmetros de ensaio do RT-LAMP.....</b>	<b>43</b>
<b>8.4 Detecção de MAYV em amostras humanas e de mosquitos.....</b>	<b>45</b>
<b>8.5 Especificidade analítica do RT-LAMP para detecção do MAYV.....</b>	<b>47</b>
<b>8.6 Sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção do MAYV.....</b>	<b>49</b>
<b>8.7 Comparação dos custos do RT-LAMP e do RT-qPCR.....</b>	<b>56</b>
<b>9 DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>10 CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE B – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICE C – ARTIGO PARA SUBMISSÃO.....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus são um grupo de vírus de RNA cujo ciclo envolve vetores artrópodes hematófagos (mosquitos) e uma gama de hospedeiros vertebrados. Dentre os diversos arbovírus destacam-se os vírus Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV), Zika (ZIKV), Dengue (DENV) e da Febre Amarela (YFV), responsáveis por grande parte dos casos de arboviroses no Brasil. DENV, ZIKV, YFV são membros do gênero *Flavivirus* dentro da família *Flaviviridae*, enquanto CHIKV e MAYV são membros do gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae* (KRAEMER *et al.*, 2015).

MAYV contém um genoma positivo de RNA de fita simples (+ssRNA) de ~12 Kb, o qual é capeado e poliadenilado nas extremidades 5' e 3', respectivamente. MAYV codifica 5 proteínas estruturais (C-E3-E2-6k-E1) e 4 proteínas não estruturais (nsP1-4) (Mota *et al.*, 2015). O principal vetor para MAYV são os mosquitos do gênero *Hemagogus*, especialmente o *H. janthinomys*. Entretanto, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que mosquitos do gênero *Aedes* são capazes de serem infectados por MAYV e de transmitirem o vírus (Long *et al.*, 2011). Além disso, também foram encontrados mosquitos de *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* detectados com genoma de MAYV na região de Cuiabá (Mato Grosso, Brasil), evidenciando uma possibilidade de novos surtos no Brasil, uma vez que o ciclo de transmissão pode tornar-se urbano utilizando humanos como hospedeiros (Serra *et al.*, 2016; Esposito e Fonseca, 2017).

O primeiro isolamento do MAYV ocorreu em 1954 a partir do sangue de cinco trabalhadores rurais que apresentavam sintomas de febre em Trinidad. Desde então, casos já foram relatados em países da América do Sul e da América Central. O vírus é endêmico em algumas regiões do Brasil, como as regiões norte e centro-oeste do país (Azevedo *et al.*, 2009; Mourao *et al.*, 2012; Zuchi *et al.*, 2014).

O Brasil é o país com maior registro de casos de MAYV nas Américas, sendo Goiás o estado com maior número de casos. De um total de 495 casos reportados no país desde os primeiros casos do vírus até maio de 2019, 199 deles foram identificados em Goiás e 194 no estado do Pará. Também foram identificados casos nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Acre e Amazonas (Ganjian e Riviere-Cinamond, 2020).

Apesar dos surtos relatados de MAYV serem pequenos e principalmente em áreas rurais, a incidência crescente em regiões onde a doença não é endêmica é uma preocupação para a saúde pública, pois indica que MAYV está se espalhando pelo Brasil e que podem ocorrer futuras epidemias dessa arbovirose. O potencial de transmissão de MAYV pelo *A. aegypti*, amplamente distribuído nas regiões brasileiras, também indica a possibilidade do surgimento

de uma rota de transmissão urbana para MAYV (Long et al., 2011; Terzian et al., 2015). Muitos casos de MAYV foram primeiramente diagnosticados como outras arboviroses, especialmente como CHIKV, devido à grande similaridade entre os sintomas e pela ocorrência de reatividade cruzada de anticorpos nos testes de diagnósticos disponíveis. Provavelmente muitos casos de febre de Mayaro não são diagnosticados, levando à subnotificação da doença. Assim, é necessário que programas de vigilância utilizando metodologias de diagnóstico confiáveis sejam desenvolvidos para monitorar com acuidade os casos dessa arbovirose (Halsey, et al., 2013; Figueiredo, 2014; Vieira et al., 2015).

O Ministério da Saúde estabelece que diagnóstico da Febre do Mayaro é epidemiológico, clínico e laboratorial. Devido a similaridade entre os sinais e sintomas com outras arboviroses circulantes no Brasil, é de extrema importância que seja realizado o diagnóstico laboratorial através da identificação direta do vírus através de isolamento viral e/ou técnicas para identificação do genoma viral (como o RT-PCR e a RT-qPCR) ou através da identificação indireta utilizando técnicas sorológicas como ELISA e PRNT (teste de redução de neutralização em placa) (BRASIL, 2020).

O diagnóstico molecular de MAYV é geralmente realizado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) antecedida pela reação da transcriptase reversa que converte o RNA viral em cDNA (RT-PCR). O estabelecimento e fortalecimento dos métodos de diagnóstico e vigilância da infecção pelo MAYV são de extrema importância para o controle dessa doença. A técnica de RT-PCR é utilizada para a detecção direta do agente, porém, o custo elevado, a necessidade de mão de obra especializada e de equipamentos sofisticados para amplificação do DNA, limita a capacidade de diagnóstico laboratorial em países em desenvolvimento e em laboratórios com infraestrutura básica, que é realidade atual do Brasil. Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas simples, e que não requerem o uso equipamentos sofisticados são de extrema importância para a ampliação e melhoria do diagnóstico desses arbovírus no país (Forshey et al., 2010; Waggoner et al., 2018). Neste contexto, propomos criar uma plataforma de baixo custo para o diagnóstico e vigilância molecular do MAYV através do desenvolvimento e avaliação da técnica de amplificação mediada por circuito isotérmico (RT-LAMP-PCR) em amostras clínicas humanas e em mosquitos. O RT-LAMP-PCR é uma ferramenta de diagnóstico rápida, simples e de baixo custo que utiliza uma abordagem isotérmica, combinando uma polimerase específica, um conjunto de primers não-marcados e desoxinucleotídeos convencionais. A disponibilização desta ferramenta tem grande potencial de contribuir para sua vigilância e com isso prevenir a propagação da doença na população,

bem como seu diagnóstico, melhorando o manejo clínico de pacientes, na medida em que o MAYV se espalha para outras regiões (Nunes et al., 2015; Quoc et al., 2018).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

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

### 2.1 Características moleculares do Mayaro Vírus

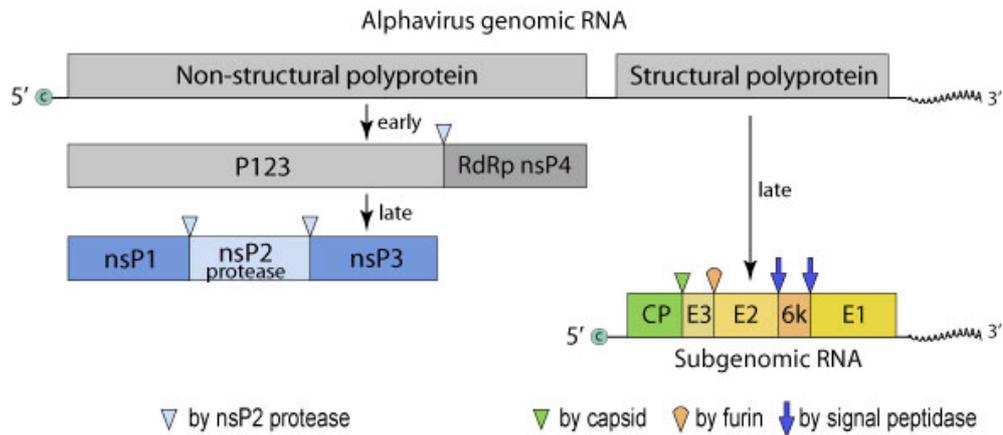
O vírus Mayaro (MAYV) é o agente etiológico da febre de Mayaro, uma doença febril aguda clinicamente semelhante à febre Chikungunya. MAYV é um membro do gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae*, é envelopado e possui um genoma de RNA fita simples, sentido positivo (+ssRNA) de ~12 Kb, o qual é capeado e poliadenilado nas extremidades 5' e 3', respectivamente (Lavergne *et al.*, 2006). O MAYV pertence ao Complexo Semliki, um grupo sorológico dentro do genoma de *Alphavirus*, que compartilha alguns sítios antigênicos comuns, os quais podem gerar reações cruzadas em testes sorológicos convencionais. O Complexo Semliki é composto por oito vírus (Bebaru, Chikungunya, Mayaro, Getah, Floresta Semliki, RossRiver, O'nyong-nyong e Una) de importância veterinária e médica, geralmente causando doença humana caracterizada por febre, artrite e exantema (Esposito e Fonseca, 2017). Filogeneticamente, o MAYV é considerado um grupo monofilético, dividido em três genótipos semelhantes (D, L, e N) - o genótipo D, que inclui a maioria dos isolados de 1954 a 2003, o genótipo tipo L, limitado aos isolados brasileiros (Powers *et al.*, 2006) e o genótipo N que foi identificado no Peru (Auguste *et al.*, 2015).

O RNA viral serve de molde para as cópias do genoma e, por ser o próprio RNA mensageiro (mRNA), é considerado infeccioso e dá origem às proteínas virais. As proteínas virais são expressas em duas ORFs separadas por uma região de junção não traduzida. O genoma viral é traduzido em uma poliproteína não-estrutural, que é processada por proteases virais e do hospedeiro. Na fase tardia da infecção, a poliproteína estrutural é expressa através de um mRNA subgenômico. O vírus utiliza o aparato metabólico da célula para expressar suas proteínas e multiplicar-se, controlando os processos bioquímicos da célula hospedeira (Mota *et al.*, 2015).

O RNA viral é estruturado em duas sequências abertas de leitura (ORFs), que são separados por uma região intergênica. A primeira ORF engloba dois terços do RNA genômico localizados na extremidade 5', que pode ser lido diretamente como um mRNA para codificar as quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) que são necessárias para a transcrição do RNA e

replicação do vírus. As proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1) são codificadas por um RNA subgenômico referido como RNA 26S, que é transcrito a partir de um RNA intermediário de cadeia negativa idêntico ao terço 3' do RNA genômico (Mota *et al.*, 2015) (Figura 1).

Figura 1 – Organização genômica do MAYV



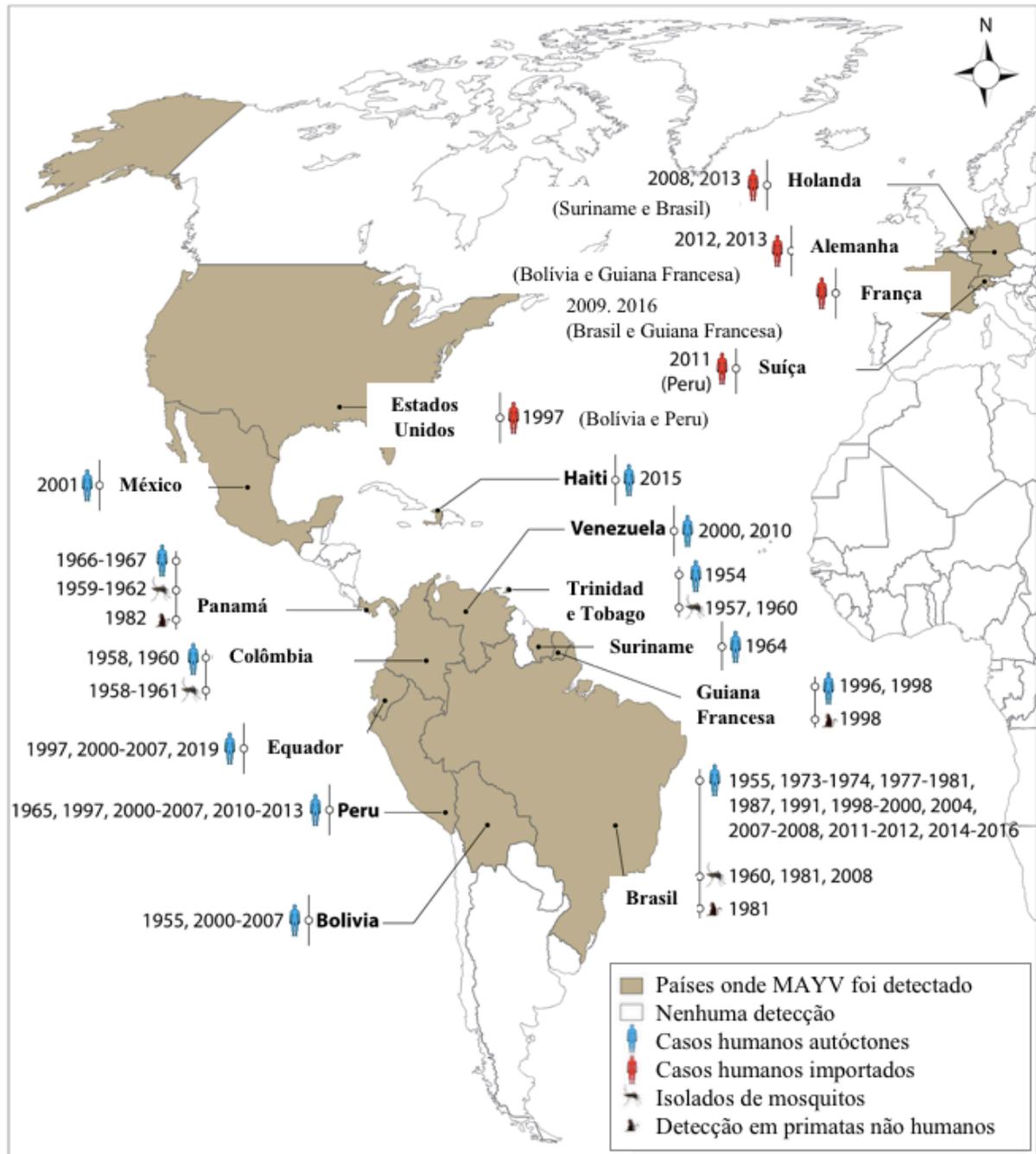
Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics (2017).

Legenda: Organização genômica do MAYV mostrando suas extremidades 5' e 3'. O RNA do vírion serve como mRNA. O genoma é traduzido em uma poliproteína não estrutural, que é processada por proteases virais e pelo hospedeiro, e em uma poliproteína estrutural, que é expressa através de um mRNA subgenômico. A RdRp (RNA polimerase dependente de RNA) é expressa pela supressão da terminação no final de 10% das poliproteínas não-estruturais. Além disso, um desvio do quadro ribossômico na região 6K induz a tradução da proteína TF em *Alphavirus*.

## 2.2 Histórico e epidemiologia

O MAYV foi isolado pela primeira vez em 1954 em Trinidad e, desde então, vem se espalhando rapidamente pela América Latina nos últimos anos, causando surtos de proporção variada (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição global do MAYV



Fonte: Adaptado de Diagne *et al.* (2020).

O primeiro surto no Brasil foi descrito em 1955, às margens do rio Guamá, próximo de Belém, Pará. O vírus é considerado endêmico em alguns lugares do Brasil, como as regiões Norte, e Centro-Oeste do país. Em um estudo realizado por Zuchi e colaboradores, o RNA do MAYV foi detectado em 2,5% dos pacientes (15 pacientes de 604) durante um surto de dengue em Mato Grosso (Zuchi *et al.*, 2014), sugerindo que o MAYV possa estar circulando silenciosamente durante os surtos de outros arbovírus no Brasil, como Zika, Dengue e

Chikungunya. Em um estudo liderado pela Dra. Roberta Bronzoni, foi investigada a presença de vários arbovírus em soros de 200 pacientes com doença febril aguda, durante um surto de dengue em Sinop, MT. Os resultados mostraram que 38 amostras foram positivas para o vírus da Dengue (DENV) tipo 1, duas para DENV tipo 4 e seis para o MAYV (Vieira *et al.*, 2015).

Entre dezembro de 2014 e janeiro de 2016, 343 casos humanos foram registrados suspeitos da febre Mayaro. Os casos suspeitos foram identificados em onze estados distribuídos nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, com destaque para o estado de Goiás com a maior frequência (183), seguido do Pará com 68, Roraima com 28, Tocantins com 25 casos suspeitos, Mato Grosso com 20, Amazonas com 8, Amapá com 7 e Bahia, Distrito Federal, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, cada um com um caso suspeito. Entre os casos notificados, 70 (20,4%) foram confirmados, 29 (8,4%) foram descartados e 244 (71,2%) permanecem em investigação, aguardando os resultados laboratoriais (Ministério da Saúde, 2015). Em 2019, foram detectados cinco casos de MAYV todos no estado do Pará. Dentre os casos, dois ocorreram em crianças e uma delas foi hospitalizada (Ministério da Saúde, 2019).

### 2.3 Transmissão

Na natureza, o MAYV é mantido em um ciclo enzoótico, semelhante ao ciclo de vida do vírus da febre amarela. Após a picada do mosquito infectado, o MAYV é inoculado e se replica na pele do hospedeiro e propaga-se através dos vasos sanguíneos para os tecidos-alvo (baço, fígado, articulações), seguido pelo recrutamento de células inflamatórias (Diagne *et al.*, 2020).

Durante os ciclos silvestre e rural, o ciclo de transmissão de MAYV envolve principalmente mosquitos do gênero *Haemagogus*, que vivem nas copas das árvores, e primatas não-humanos, como roedores, aves, preguiças e outros pequenos mamíferos. Acidentalmente, o vírus pode ser transmitido para os humanos esporadicamente. Embora os vetores primários sejam os mosquitos diurnos do gênero *Haemagogus*, outros mosquitos dos gêneros *Culex sp.*, *Sabethes sp.*, *Psorophora sp.*, *Coquillettidia sp.* e *Aedes sp.* podem ser importantes na manutenção do vírus (Mota *et al.*, 2015). Nas áreas urbanas, os mosquitos domésticos são vetores potenciais do MAYV que em condições adequadas podem transmitir o vírus aos humanos. Experimentalmente, foi demonstrado que o MAYV pode ser transmitido por *Ae. Aegypti* e *Ae. albopictus* (Smith *et al.*, 1991; Long *et al.*, 2011). Além disso, também foram encontrados *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* infectados por MAYV em Cuiabá, Mato Grosso (Serra *et al.* 2016).

## 2.4 Febre de Mayaro

Clinicamente, a Febre de Mayaro se caracteriza como uma síndrome febril moderada e autolimitada semelhante às infecções por arbovírus e apresenta duas fases: aguda e convalescente. A fase aguda apresenta uma viremia transitória, com período de incubação que varia de 7 a 12 dias, mas períodos mais curtos foram observados. Além de febre, a febre Mayaro é acompanhada de cefaléia frontal, artralgia, mialgia, edemas articulares, calafrios, dor retro-orbital, mal-estar, exantema, vômitos e diarreia (Azevedo *et al.*, 2009; Izurieta *et al.*, 2011). Aproximadamente 20% dos casos apresentam edema das pequenas articulações, especialmente nos pulsos, dedos, tornozelos e dedos do pé. A presença de erupção é mais comum em crianças do que adultos (Pinheiro *et al.*, 1981). Após a fase aguda, inicia-se o estágio convalescente. Essa fase pode ser acompanhada por artralgia e artrite, que podem persistir por várias semanas ou meses. A artralgia, que pode ser acompanhada de edema, é o principal sintoma das formas severas e, ocasionalmente, pode ser incapacitante ou limitante, persistindo por meses. Casos graves podem apresentar encefalite. No entanto, na maioria dos casos a doença é autolimitada, com o desaparecimento dos sintomas em uma semana (Mota *et al.*, 2015; Esposito e Fonseca, 2017). De importância especial para o Brasil, a febre Chikungunya e a febre do Mayaro podem exibir as mesmas manifestações clínicas e ambos os vírus estão co-circulando em algumas regiões do país, o que gera dificuldades para o diagnóstico clínico e, possivelmente, resulta na subnotificação dos casos de MAYV. Além disso, os sintomas da doença aguda provocada por MAYV também são semelhantes aos sintomas da Dengue, a arbovirose com maior incidência no Brasil. Duras as epidemias de Dengue, seu diagnóstico é realizado majoritariamente através de achados clínicos-epidemiológicos, fazendo com que outras arboviroses com sintomas similares como a Febre do Mayaro, não sejam diagnosticadas (Vieira *et al.*, 2015).

Nesse contexto, um programa de vigilância e diagnóstico laboratorial de arboviroses eficaz deve avaliar e monitorar a distribuição e a verdadeira importância desse arbovírus na etiologia das doenças exantemáticas agudas. Para isso, o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico de baixo custo, rápidas e eficazes é fundamental para o estabelecimento de um programa de vigilância do MAYV em humanos e em insetos vetores.

## 2.5 Métodos de diagnóstico do MAYV e suas limitações

Em regiões em que existe uma circulação de outros arbovírus, como por exemplo, dengue, zika e chikungunya, o diagnóstico clínico da infecção pelo MAYV torna-se

extremamente difícil uma vez que os sinais e sintomas são muito semelhantes. Sendo assim, o diagnóstico laboratorial assume uma importância fundamental.

Laboratorialmente, a infecção pelo MAYV pode ser diagnosticada pela detecção de anticorpos circulantes ou pela detecção direta do vírus através de métodos moleculares. A detecção dos anticorpos circulantes pode ser feita por diferentes metodologias, tais como ELISA, imunofluorescência indireta, inibição da hemaglutinação e soroneutralização. A presença de anticorpos da classe IgM caracteriza a infecção aguda, podendo ser detectáveis após três dias de infecção até três meses, na fase de convalescência. Os anticorpos da classe IgM devem ser confirmados por um teste de neutralização por redução de placas (PRNT) frente ao MAYV e o título comparado ao obtido contra outros *Alphavirus* circulantes na área. Apesar de valiosa para o diagnóstico nos casos de primoinfecção por um *Alphavirus*, as técnicas sorológicas, podem apresentar resultados falso-positivos devido às reações cruzadas com vírus pertencentes ao sorogrupo do Complexo Semliki (Figueiredo e Figueiredo, 2014), em especial o CHIKV que co-circula com o MAYV em várias regiões do Brasil. A técnica de ELISA e, em especial a de PRNT, exigem uma infraestrutura laboratorial sofisticada, o que associadas ao problema da reatividade cruzada, limitam de sobremaneira a eficácia e utilidade do diagnóstico sorológico da infecção pelo MAYV.

O diagnóstico molecular é realizado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) antecedida pela reação da transcriptase reversa que converte o RNA viral em cDNA (RT-PCR). Os testes moleculares detectam a presença do vírus em amostras biológicas do paciente ou do inseto vetor por meio de amplificação do seu material genético. Em 2004, foi desenvolvido um multiplex nested PCR para os principais *Alphavirus* circulantes no Brasil, incluindo MAYV (Bronzoni *et al.*, 2004). Recentemente, um teste de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) possibilitou a detecção de MAYV em plasma e urina, sendo capaz de detectar até 8 cópias genômicas (Waggoner *et al.*, 2018).

Apesar de serem bastante sensíveis e específicas, os testes de RT-PCR ou qRT-PCR necessitam de mão de obra especializada e de equipamentos relativamente caros e sofisticados para amplificação do DNA, tais como o termociclador, o que limita a capacidade de diagnóstico laboratorial em países em desenvolvimento, principalmente em cidades distantes dos grandes centros urbanos. No caso da técnica de RT-PCR, que precisa ser revelada através da técnica de eletroforese, além do custo dos equipamentos e reagentes, o tempo necessário para revelação do resultado limita sua utilidade diagnóstica. Além disso, as enzimas, kits e sondas utilizadas nesses testes são muito onerosos para a realidade da maioria dos laboratórios nacionais.

Embora seja importante estabelecer laboratórios de referência capazes de realizar o estado da arte no diagnóstico do MAYV, tais laboratórios não conseguem atender adequadamente a demanda de diagnóstico, sobretudo em regiões mais carentes e cidades interioranas do país. Até mesmo os laboratórios de referência, como é o caso do Laboratório de Virologia da Fiocruz Pernambuco, não consegue atender a demanda recebida de exames laboratoriais, deixando a população sem uma resposta satisfatória para essa emergência em saúde pública. Vale ressaltar que os testes de detecção de infecção pelo MAYV ainda não estão inseridos no Rol de Procedimentos e Eventos em Saúde da Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS), limitando ainda mais o acesso da população ao diagnóstico laboratorial.

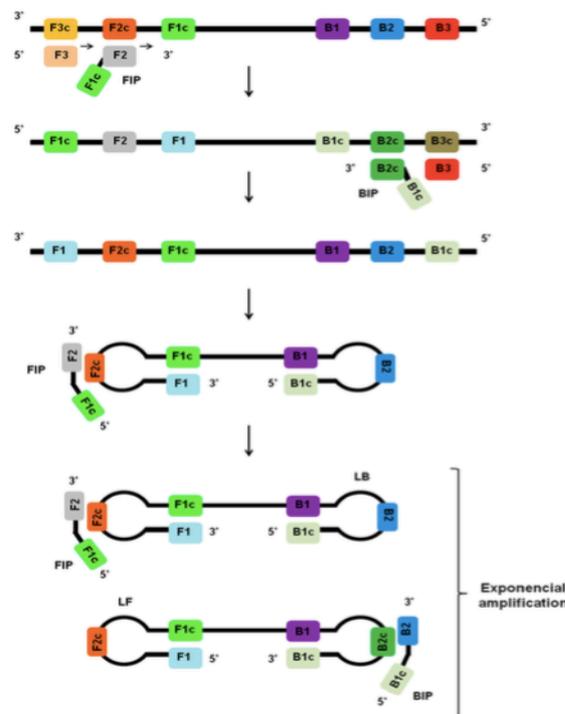
## 2.6 RT-Lamp-PCR

As plataformas de diagnóstico denominadas *point-of-Care* (POC) podem contornar essas preocupações e aumentar a capacidade de diagnóstico dos países afetados pelo MAYV, 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. Neste contexto, a técnica de amplificação mediada por circuito isotérmico (do inglês *Loop-mediated isothermal amplification–LAMP*) descrita por Notomi e colaboradores em 2000 tem se mostrado resolutive (Notomi *et al.*, 2000). 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 bom 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 internos, dois primers externos e dois primers que hibridizam na região de loop, especialmente desenhados para amplificar oito regiões no gene alvo (Parida *et al.*, 2008). O uso destes seis primers aumenta a especificidade do teste ao mesmo tempo em que melhora a velocidade da reação (Boehme *et al.*, 2007). No caso de vírus de RNA, como o MAYV, faz-se necessário a realização prévia de uma reação de transcrição reversa (RT-LAMP-PCR), de maneira similar às técnicas de RT-PCR e qRT-PCR (Balasuriya, 2014; Balasuriya *et al.*, 2014; Lau *et al.*, 2015).

Durante o processo de amplificação, o DNA forma voltas propiciadas pelas sequências dos primers internos, pois os mesmos possuem duas regiões distintas, sendo uma complementar ao gene alvo e outra complementar a fita em formação. Vale salientar que entre as duas regiões distintas contidas nos primers internos há uma sequência rica em timina, o que evita seu pareamento com a fita molde. Os primers que hibridizam na volta formada são facultativos na reação, sendo utilizados para acelerar o processo de amplificação, por pareamento em sítios adicionais que não são acessados pelos primers internos. A amplificação ocorre em temperatura constante, em torno de 63°C, pois utiliza a Bst polimerase, uma enzima com atividade de separação de dupla fita de DNA, mas que não possui atividade de exonuclease 5' – 3' (Figura 3). A temperatura constante utilizada na técnica diminui a possibilidade de formação de bandas inespecíficas (Parida *et al.*, 2008; Tomita *et al.*, 2008).

Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo da reação do RT- LAMP



Fonte: Silva et al (2020)

Legenda: Representação esquemática do mecanismo de ação do RT-LAMP. Durante o estágio inicial da reação, os primers internos (FIP ou BIP) se anelam nas regiões F2c ou B2c na região alvo. A reação é iniciada por uma invasão de fitas pelos primers internos e um deslocamento das fitas. A DNA polimerase estende o primer e separa o DNA duplex alvo. Os primers externos (F3 ou B3) hibridizam-se na região F3c ou B3c no alvo e iniciam a formação de estruturas de volta que se auto hibridizam através da invasão das fitas, resultando na formação de DNA em forma de haltere que se torna o molde para amplificação exponencial. Como resultado, estruturas de diversos tamanhos em forma de haste com múltiplas voltas são formadas. A adição dos primers do loop (LB e LF) podem acelerar o processo.

Considerando as vantagens da rápida amplificação, operação simples, baixo custo, alta sensibilidade e fácil detecção, além de ser altamente 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. Diante dessas vantagens, o método do LAMP já está sendo comercializado sob a forma de kits e utilizado na rotina de serviços de vigilância epidemiológica para detecção de agentes infecciosos (Mori e Notomi, 2009). A técnica de RT-LAMP-PCR já foi desenvolvida para a detecção de diversos arbovírus, incluindo chikungunya, zika, dengue e febre amarela (Li *et al.*, 2011; Kwallah *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 2015; Lopez-Jimena *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2019), mas ainda não para o MAYV.

### 3 JUSTIFICATIVA

MAYV é considerado uma infecção emergente, com diagnóstico clínico difícil em regiões endêmicas para chikungunya e outros arbovírus devido à similaridade dos sinais e sintomas, o que possivelmente resulta na sua subnotificação. Ao contrário da detecção viral direta, as técnicas sorológicas oferecem uma oportunidade mais ampla para o diagnóstico, mas as técnicas disponíveis atualmente apresentam resultados falso-positivos devido às reações cruzadas com outros arbovírus e são, portanto, de valor limitado (Lanciotti *et al.*, 2008). Além disso, essas técnicas exigem uma infraestrutura laboratorial relativamente mais sofisticada, o que associadas ao problema da reatividade cruzada, limitam a eficácia e utilidade do diagnóstico sorológico da infecção pelo MAYV, principalmente em regiões mais carentes.

As técnicas de detecção viral direta, incluindo isolamento viral e as técnicas moleculares de RT-PCR, são sensíveis e específicas, mas apresentam custo elevado, pois necessitam de mão de obra especializada, bem como de equipamentos caros e sofisticados, o que limita a capacidade de diagnóstico laboratorial para atender a demanda hospitalar. Neste contexto, a técnica de amplificação mediada por circuito isotérmico (RT-LAMP-PCR) tem se mostrado resolutiva. Trata-se de um teste simples e que não requer o uso de termocicladores, é uma técnica de amplificação de nucleotídeos rápida, acurada e com um excelente custo-benefício. Diante dessas vantagens, o método do LAMP já está sendo comercializado sob a forma de kits e utilizado na rotina de serviços de vigilância epidemiológica para detecção de alguns agentes infecciosos, mas ainda não foi desenvolvida para o MAYV (Lau *et al.*, 2015; Lopez-Jimena *et al.*, 2018). Recentemente, nosso grupo desenvolveu um ensaio de LAMP de único passo para o diagnóstico do vírus Zika (SILVA *et al.*, 2019). Aqui, pretendemos expandir nossos esforços iniciais e aplicar a tecnologia para o diagnóstico do MAYV contribuindo significativamente para o estabelecimento de um programa de vigilância do MAYV em humanos e em insetos vetores, e para o controle da doença em todo o país.

Dessa forma, pretende-se validar uma técnica de baixo custo para o diagnóstico de MAYV. Além de seu impacto direto no controle de possíveis epidemias de MAYV, este projeto permitirá o desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico com grande potencial inovador, contribuindo para melhoria da saúde humana e para o retardo da propagação de um possível surto de MAYV inclusive em regiões remotas e menos estruturadas.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Qual o potencial do RT-LAMP-PCR para detecção do vírus Mayaro em amostras humanas (soro, urina e saliva) e em mosquitos (*Aedes aegypti*) infectados experimentalmente?

## **5 HIPÓTESE**

O RT-LAMP-PCR é uma ferramenta molecular de baixo custo, sensível, específica e promissora para o diagnóstico do MAYV em amostras humanas e de mosquitos.

## **6 OBJETIVO GERAL**

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

### **6.1 Objetivos Específicos**

- a) Desenvolver e padronizar a técnica de RT-LAMP-PCR para a detecção de MAYV em amostras humanas (soro, urina e saliva);
- b) Desenvolver e padronizar a técnica de RT-LAMP-PCR para a detecção viral em mosquitos experimentalmente infectados com o MAYV;
- c) Comparar a sensibilidade e especificidade do RT-LAMP-PCR com o RT-qPCR para a detecção de MAYV;
- d) Demonstrar as diferenças de custos entre as técnicas de RT-LAMP-PCR e RT-qPCR para o diagnóstico do MAYV.

## **7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

O presente tópico descreve todos os métodos utilizados no decorrer do trabalho. Neste espaço é descrito a cepa viral; titulação por ensaio de placa; extração de RNA; desenho de primers para o RT-LAMP; RT-LAMP; qRT-PCR; infecção *ex vivo* de amostras clínicas com o MAYV; detecção do MAYV em amostras de culídeos vetores; avaliação da especificidade dos primers para o RT-LAMP; avaliação da sensibilidade do RT-LAMP para a detecção do MAYV; comparação dos custos do RT-LAMP-PCR e do RT-qPCR; considerações éticas e análises estatísticas.

### **7.1 Cepa viral**

Em todos os experimentos, foi utilizada a cepa do MAYV denominada Mayaro virus isolate MT/SINOP/210/2011. Essa cepa foi isolada em cultura celular através da inoculação do soro de um paciente infectado pelo MAYV em 2011 na cidade de Sinop, Mato Grosso (Vieira *et al.*, 2015). Após o isolamento, o vírus foi gentilmente cedido pela Dra. Roberta Bronzoni para o realizarmos esse e outros estudos. Os estoques virais foram produzidos em células Vero e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  na Coleção de Vírus do Departamento de Virologia da Fiocruz/PE até o momento do uso.

### **7.2 Titulação viral por ensaio de placa**

As células Vero foram distribuídas na concentração de  $1,5 \times 10^5$  células por poço de placas de 24 poços e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , com 5%  $\text{CO}_2$ , por 24 horas. Diluições seriadas de razão 10 das amostras do estoque viral foram preparadas em meio DMEM e inoculadas (0,2 mL por poço) nas células, seguido de incubação nas mesmas condições anteriormente descritas. Após 1 hora de adsorção, 2 mL de carboximetilcelulose a 1% pen/strep (Sigma-Aldrich), diluídos em DMEM suplementado com 2% de SFB, foram adicionados nos poços contendo as células infectadas. Após 48 horas de incubação, as células foram fixadas com uma solução de Formaldeído a 10% e visualizadas após coloração da monocamada com solução contendo 1% de cristal violeta.

### **7.3 Extração de RNA**

O RNA total das amostras foi extraído a partir de 140 $\mu\text{L}$  de amostra (urina, soro, saliva ou macerado de mosquito) utilizando-se o kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo

com as instruções do fabricante. O RNA foi eluído em um volume final de 60µl e estocado em freezer -80°C para realização dos ensaios moleculares. O RNA obtido foi quantificado utilizando o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

#### **7.4 Desenho dos primers para o RT-LAMP-PCR**

O primers para o RT-LAMP-PCR foram desenhados com o auxílio do programa PrimerExplorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>), o qual foi desenvolvido especificamente para o desenho de primers para LAMP, baseando-se na sequência consenso de todas as cepas do MAYV disponíveis no Genbank.

#### **7.5 RT-LAMP-PCR**

Inicialmente, foram padronizadas todas as concentrações dos reagentes, bem como todas as condições do ensaio RT-LAMP-PCR. A otimização da temperatura de reação foi avaliada sob as seguintes temperaturas (50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 68°C, 70°C, 72°C e 75°C) e o tempo de incubação sob os seguintes tempos (10 min, 15min, 20 min, 25min, 30 min). Quanto aos reagentes, foram otimizadas as concentrações ótimas de Mg<sup>2+</sup> (2 mM, 4 mM, 6 mM, 8mM e 10 mM), enzima Bst 3.0 (0,04 U/µl, 0,08 U/µl, 0,12 U/µl, 0,16 U/µl, 0,2 U/µl, 0,24 U/µl, 0,28 U/µl e 0,32 U/µl) e dNTPs (0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1,0 mM, 1,2 mM, 1,4 mM, 1,6 mM, 1,8 mM e 2,0 mM). Após a otimização de todos os parâmetros e condições do RT-LAMP, os experimentos foram realizados conforme descrito abaixo.

As reações de RT-LAMP-PCR foram realizadas em triplicata em um volume total de 25 µl contendo 1x Tampão de Amplificação Isotérmica, 6 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,12 U/µl 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 ou amostras sem extração de RNA). A fim de visualizar as reações positivas e evitar uma possível contaminação, 1 µL de SYBR Green I (ThermoFisher Scientific), diluído em água livre de RNAase (Promega) na proporção de 1:10, foi adicionado no centro das tampas dos tubos 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 70°C durante 30 minutos em um termobloco e em seguida foram inativadas a 80°C durante 5 minutos. Para avaliar a performance do ensaio para aplicações *point-of-care*, todo o estabelecimento e execução de reações do RT-LAMP foram

realizadas em uma bancada de laboratório convencional utilizando pipetas e ponteiros com filtro. O registro e análise das imagens ocorreram em salas separadas. Todos os experimentos foram replicados independentemente pelo menos três vezes.

Após a incubação, as reações dos produtos RT-LAMP foram detectadas usando três métodos diferentes. No primeiro, os produtos foram observados a olho nu, sob luz natural, e fotografados usando uma câmera convencional de celular (iPhone, Apple). A utilização do SYBR Green, intercalante de DNA, permite que seja visualizada uma mudança de cor de laranja para amarelo esverdeado para identificar a amostra positiva, enquanto uma amostra negativa permaneceu laranja. O segundo método foi a análise visual de 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. Nesse método, as amostras negativas ficaram azuis escuras e as reações positivas, 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 GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) (diluído em água ultrapura 1:500) e visualização do gel com transiluminador. Para a análise por eletroforese, utilizou-se o DNA Ladder de 1 kb Plus (ThermoFisher Scientific) como marcador de peso molecular do DNA.

## **7.6 RT-qPCR**

As amostras com MAYV foram testadas quanto à positividade de infecção pela técnica de RT-qPCR, empregando-se primers e protocolos previamente descritos, com pequenas modificações (Waggoner *et al.*, 2018). Em resumo, para as reações de RT-qPCR foi utilizado o Kit QuantiTect Probe RT-PCR (QIAGEN, Alemanha), o qual transcreve o RNA em cDNA, bem como amplifica o DNA em um único passo, minimizando possíveis contaminações. Para cada reação foram utilizados 5µl do Buffer 5x QIAGEN One Step RT-PCR, 1µl de dNTP Mix 10mM, 0,5µM de cada primer, 1µl de QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix e 3µl de RNA extraído conforme descrito anteriormente. As etapas de ciclagem foram 45°C por 15 minutos para realização da transcrição reversa, 95°C por 5 minutos para inativação da enzima transcriptase reversa, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 5 segundos, 55°C por 25 segundos e 68°C por 25 segundos, para amplificação do DNA.

## **7.7 Detecção do MAYV em amostras clínicas**

Para avaliar a detecção viral em amostras clínicas, amostras de soro, urina e saliva foram obtidas de seis voluntários saudáveis (resultado negativo para MAYV por RT-qPCR) e infectadas no laboratório com  $1 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^3$  pfu/mL do MAYV, simulando uma situação de alta e baixa carga viral, respectivamente. Após incubação a temperatura ambiente por 1 hora, a amostra foi submetida diretamente ao ensaio de RT-LAMP. O RNA viral das amostras também foi extraído para realizar os ensaios de RT-qPCR.

### **7.8 Detecção do MAYV em amostras de culídeos**

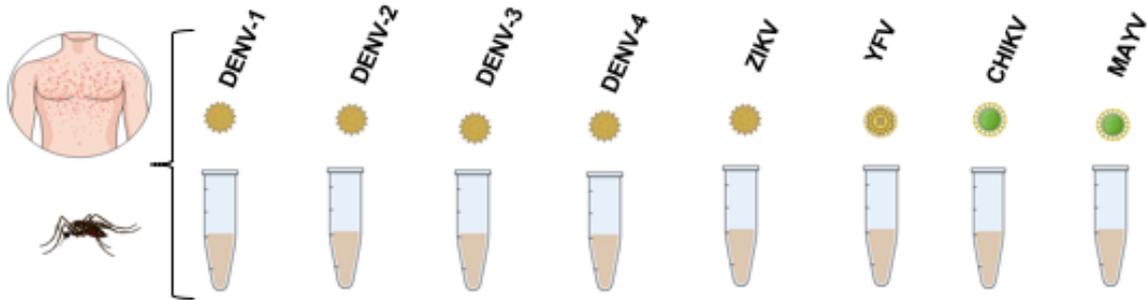
Foram utilizados mosquitos da espécie *A. aegypti*, mantidos em colônia nas instalações do insetário do Laboratório de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) / Fiocruz-PE desde 1996, sob condições padrão (temperatura,  $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ; umidade relativa do ar de 60 a 80% e fotoperíodo 12:12 h C/E). Para avaliar a habilidade do RT-LAMP em detectar o MAYV em amostras de mosquitos, pools de mosquitos obtidos de *A. aegypti* ( $n = 10$ ) foram homogeneizados em 300 $\mu\text{L}$  de água livre de RNase e, em seguida, infectados com  $1 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^3$  PFU/mL do MAYV simulando uma situação de alta e baixa carga viral, respectivamente. Após incubação a temperatura ambiente durante 1 hora, as amostras foram diretamente testadas através do RT-LAMP-PCR seguindo o mesmo procedimento realizado com as amostras humanas.

### **7.9 Avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP-PCR**

Para avaliar a especificidade analítica dos primers desenhados para MAYV frente a outros arbovírus de importância médica para o Brasil, foram realizados ensaios para testar a reatividade cruzada com outros arbovírus, incluindo os quatro sorotipos de dengue (DENV 1-4), o vírus da febre amarela, chikungunya e zika.

Inicialmente, foi realizada uma infecção artificial (“*spike viral*”) de todos os arbovírus descritos acima em soro de voluntários saudáveis. Após a infecção, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora e em seguida utilizadas para o ensaio do RT-LAMP utilizando os mesmos primers e condições utilizadas para o MAYV (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática da metodologia utilizada para a avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP para detecção do MAYV



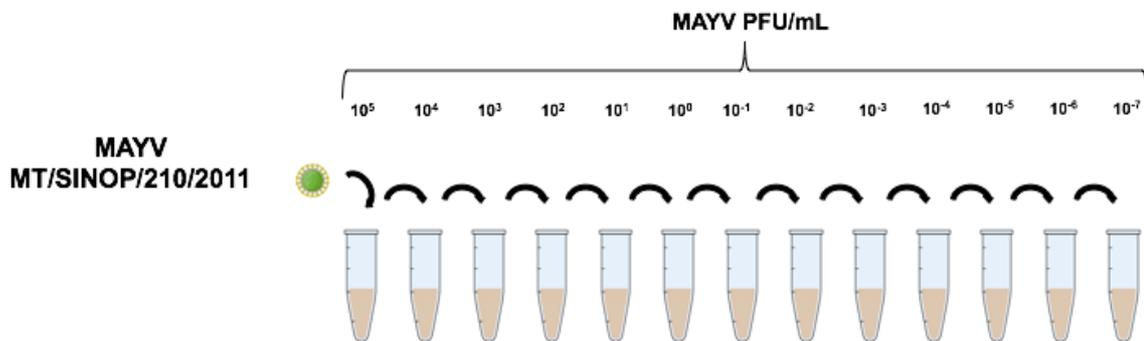
Fonte: A autora.

Legenda: Para avaliar a especificidade do RT-LAMP para a detecção do MAYV em amostras de humanos, o soro de voluntários saudáveis será infectado artificialmente com vários arbovírus, incluindo DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, YFV, CHIKV, ZIKV e MAYV. Após a infecção, as amostras serão incubadas a temperatura ambiente por 1 hora e em seguida serão utilizadas para a realização do ensaio de RT-LAMP.

### 7.10 Avaliação da sensibilidade analítica do RT-LAMP-PCR

A sensibilidade analítica (limite de detecção) do RT-LAMP-PCR para a detecção do MAYV 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 humanos, a cepa de MAYV foi diluída em série na base de 10 vezes em soro de pacientes saudáveis. A concentração de vírus nas amostras infectadas variou de  $10^6$  PFU/mL a  $10^{-7}$  PFU (Figura 5). 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 atualmente mais utilizada para o diagnóstico de arboviroses, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições e posteriormente testadas por RT-qPCR (Waggoner *et al.*, 2018). A curva-padrão foi feita a partir de triplicatas de cada diluição em três experimentos independentes.

Figura 5 – Representação esquemática da metodologia utilizada para a avaliação da sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção do MAYV



Fonte: A autora.

Legenda: Para avaliar a sensibilidade analítica (limite de detecção) do RT-LAMP em amostras de humanos, MAYV será diluído em série na base de 10 vezes em soro de pacientes saudáveis para a detecção do MAYV em amostras de humanos. A concentração de vírus nas amostras infectadas vai variar de  $10^5$  PFU/mL a  $10^{-7}$  PFU. Após a diluição, as amostras serão diretamente testadas por RT-LAMP.

### 7.11 Comparação dos custos do RT-LAMP-PCR e do RT-qPCR

Para analisar os custos entre os reagentes de ambas as técnicas, incluindo aqueles utilizados para visualização dos resultados, foi feito o cálculo do valor, em reais, para realização de cada 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 nº 466/12 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 sob o número **CAAE: 43877521.4.0000.5195** e número do parecer: 4.570.438.

### 7.13 Análises estatísticas

A análise de probit foi realizada para calcular o limite de detecção do RT-LAMP-PCR para o MAYV usando o software MedCalc (versão 18.11, MedCalc Software, Ostend, Bélgica).

## 8 RESULTADOS

O presente t3pico descreve os resultados obtidos no decorrer do trabalho.

### 8.1 Desenho dos primers para detec33o de MAYV por RT-LAMP

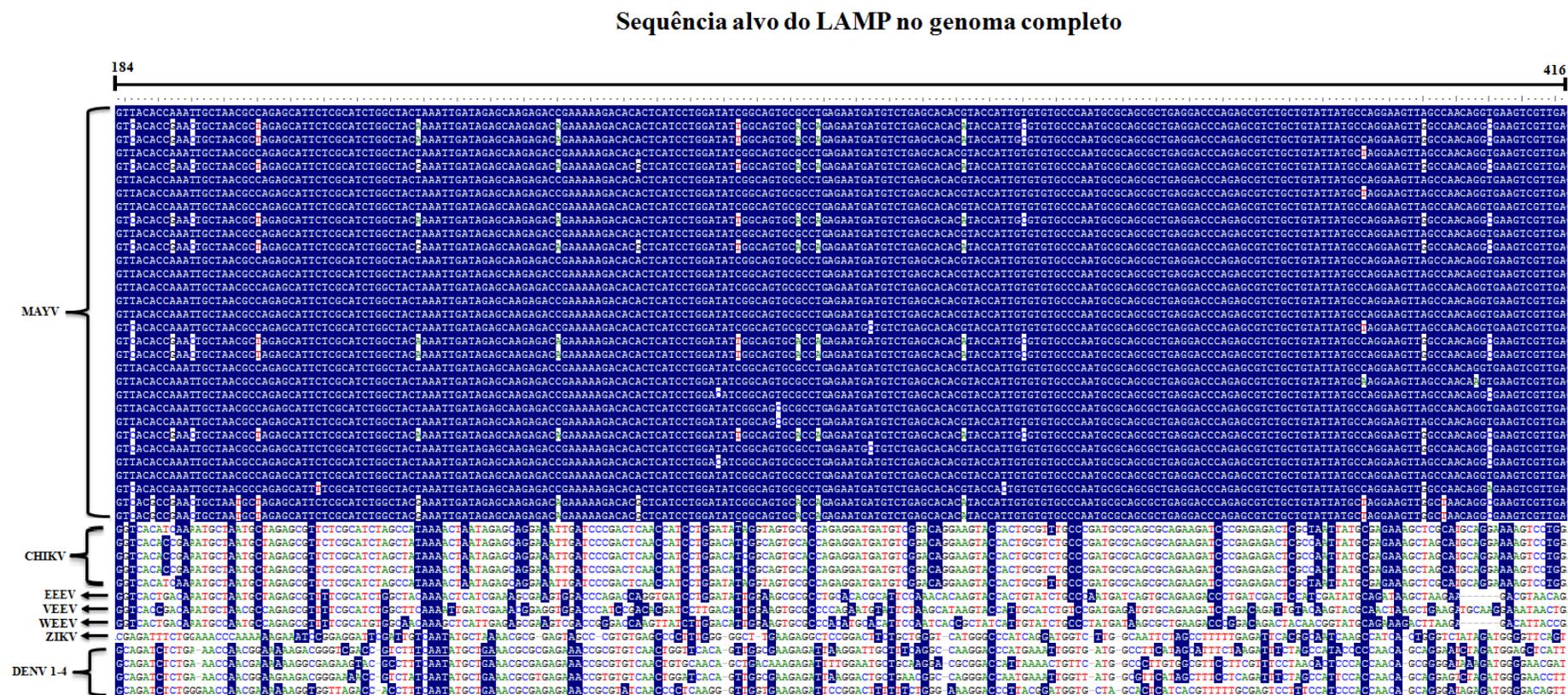
Para desenhar os primers utilizados no RT-LAMP espec3ficos para as cepas de MAYV, alinhamos e analisamos sequ3ncias gen3micas completas de MAYV (31 sequ3ncias), CHIKV (22 sequ3ncias, sendo 5 representadas na Figura 6), WEEV (1 sequ3ncia), VEEV (1 sequ3ncia), EEEV (1 sequ3ncia), DENV 1-4 (4 sequ3ncias), e ZIKV (1 sequ3ncia). A sequ3ncia da posi33o 91 a 518, regi3o de codifica33o da prote3na nsp1, foi selecionada para desenhar os primers devido 3 sua alta similaridade entre os diferentes isolados de MAYV e diverg3ncia em rela33o aos outros *Alphavirus* e *Flavivirus* analisados (Figura 6). Os seis primers para RT-LAMP foram desenhados com aux3lio do software PrimerExplorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>), e sua localiza33o no genoma est3 representada na Figura 7. Uma pesquisa BLAST do banco de dados de nucle3tidos GenBank foi realizada utilizando-se as sequ3ncias dos primers selecionados para verificar a especificidade. Os primers utilizados no ensaio de RT-LAMP foram sintetizados por um fornecedor comercial (IDT, Coralville, IA) e est3o demonstrados no Quadro 1 juntamente com as concentra33es utilizadas na rea33o.

Quadro 1 - Sequ3ncias e concentra33es dos primers desenhados para detec33o de MAYV por RT-LAMP

Primer	Sequ3ncia (5'-3')	Concentra33o ( $\mu$ M)
F3	GTCACACCGAACGACCATG	0,2 $\mu$ M
B3	TCAACGACTTCGCCTGATG	0,2 $\mu$ M
FIP	GGTGCCTGCGCAATATCCAGGAGCATTCTCGCATCTGGCTAC	1,6 $\mu$ M
BIP	ACACATACCATTGCGTGTGCCCGGCCAACTTCCTGGCATAA	1,6 $\mu$ M
LF	GTGTGTCTTTTTCTGTCTCTTGCT	0,4 $\mu$ M
LB	GCTGAGGACCCAGAGCGTCT	0,4 $\mu$ M

Fonte: A autora

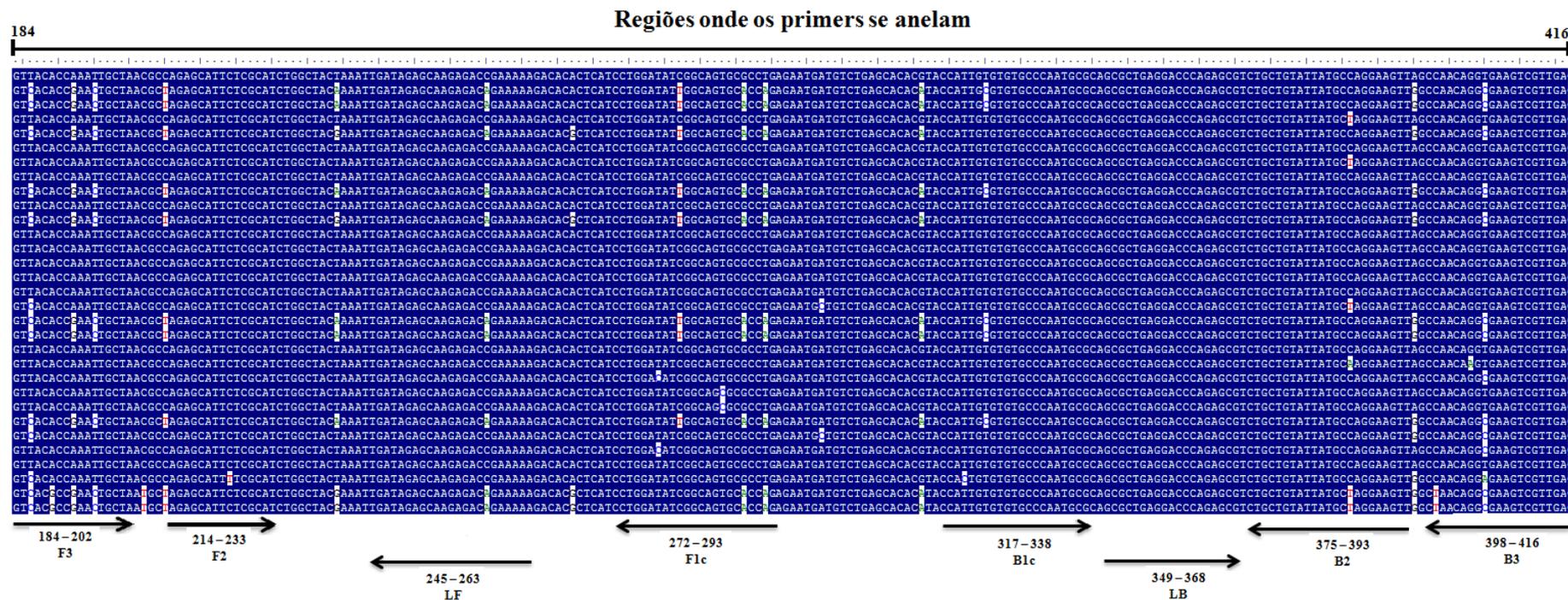
Figura 6 – Alinhamento das seqüências de isolados de MAYV, CHIKV, WEEV, VEEV, EEEV, DENV 1-4 e ZIKV



Fonte: A autora.

Legenda: Para desenhar os primers utilizados no RT-LAMP específicos para as cepas de MAYV, alinhamos e analisamos seqüências genômicas completas de MAYV, CHIKV, WEEV, VEEV, EEEV, DENV 1-4 e ZIKV. A seqüência da posição 91 a 518, região de codificação da proteína ns1, foi selecionada para desenhar os primers devido à sua alta similaridade entre os diferentes isolados de MAYV e divergência em relação aos outros.

Figura 7 – Regiões do genoma de MAYV onde os primers se anelam



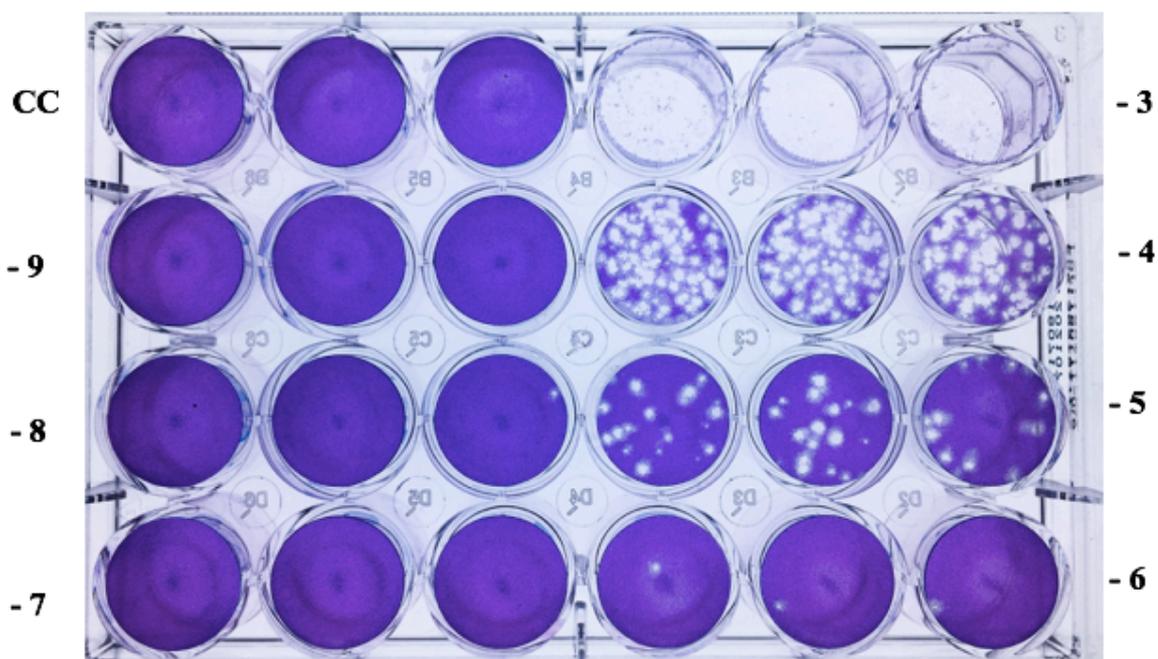
Fonte: A autora.

Legenda: Alinhamento das 31 seqüências genômicas completas de MAYV. As setas indicam as posições onde os primers se anelam (F3: posição 184-202; B3: posição 398-416; FIP = F1c + F2: posições 272-293 e 214-233, respectivamente; BIP = B1c + B2: posições 317-338 e 375-393, respectivamente; LF: posição 245-263; e LB posição 349-393). As posições são correspondentes ao alinhamento das seqüências genômicas completas de MAYV, CHIKV, WEEV, VEEV, EEEV, DENV 1-4 e ZIKV.

## 8.2 Titulação do vírus

O estoque viral de MAYV que foi utilizado nos experimentos foi titulado por ensaio de placa e o título obtido foi de  $6,8 \times 10^6$  unidades formadoras de placa por mililitro de sobrenadante celular (PFU/mL) (Figura 8).

Figura 8 – Titulação do MAYV por ensaio de placa



Fonte: A autora.

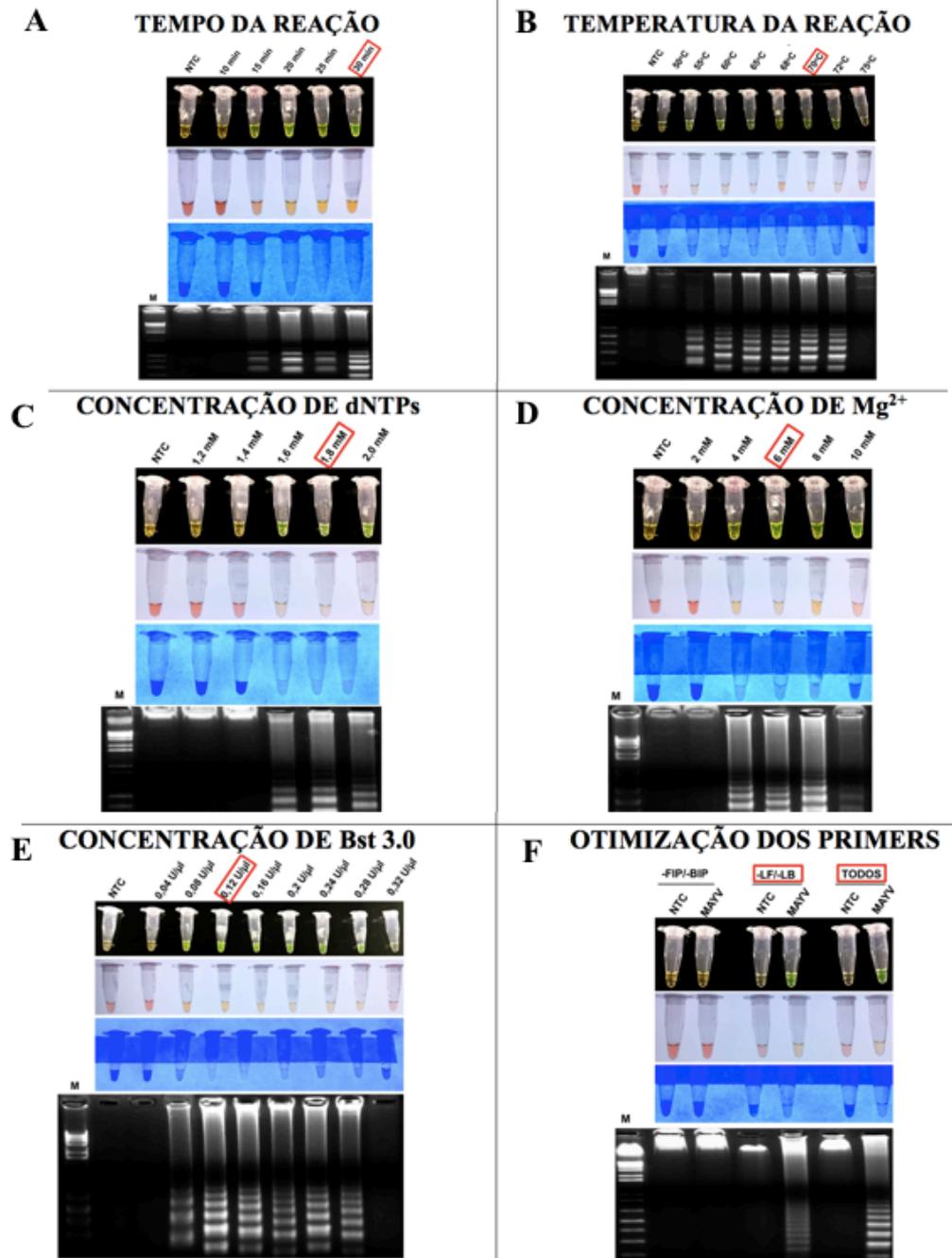
Legenda: Para titulação do vírus, foi realizado ensaio de placa em células Vero. O título viral foi expresso em PFU/mL. CC = controle celular.

## 8.3 Otimização dos parâmetros do ensaio de RT-LAMP

As condições do ensaio RT-LAMP e as concentrações dos reagentes foram otimizadas a fim de padronizar as melhores condições a serem utilizadas no ensaio. As reações foram realizadas sob temperaturas variando de  $50^{\circ}\text{C}$  a  $75^{\circ}\text{C}$  e o tempo de incubação variando entre 10 min a 30 min. Quanto aos reagentes, foram otimizadas as concentrações ótimas de  $\text{Mg}^{2+}$  (variando de 2 mM a 10 mM), enzima Bst 3.0 (variando de  $0,04\text{ U}/\mu\text{l}$  a  $0,32\text{ U}/\mu\text{l}$ ) e dNTPs (variando de 0,4 mM a 2,0 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  $70^{\circ}\text{C}$  por 30 min de incubação (Figura 9 A-B). Em relação aos reagentes, as concentrações ótimas foram 6 mM,  $0,12\text{ U}/\mu\text{l}$  da enzima e 1,8 mM, respectivamente para os reagentes  $\text{Mg}^{2+}$ , enzima Bst 3.0 e

dNTPs (Figura 9 C-D-E). Também foi observado que a reação não necessita de todos os primers para o desempenho, funcionando sem os primers do loop (LF e LB) (Figura 9 F). Após a realização da otimização de todos os parâmetros, um protocolo padrão foi estabelecido para a execução dos experimentos subsequentes.

Figura 9 – Otimização das condições de ensaio do RT- LAMP e concentração dos reagentes



Fonte: A autora.

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 30 min (A) e temperaturas variando de 50°C a 75°C (B). Quanto aos reagentes, foram otimizadas as concentrações ótimas de dNTPs (variando de 0,4 mM a 2,0 mM) (C),  $Mg^{2+}$  (variando de 2 mM a 10 mM) (D) e enzima Bst 3.0 (variando de 0,04 U/ $\mu$ l a 0,32 U/ $\mu$ l) (E). Além disso, foi observado que a reação não necessita de todos os primers para o desempenho, funcionando sem os primers do loop (LF e LB) (F). Os resultados do RT-LAMP foram observados por mudança de cor visual dos produtos no tubo de reação, sob irradiação UV e através de eletroforese em gel. Legendas: NTC (controle sem molde): água; M: marcador de peso molecular.

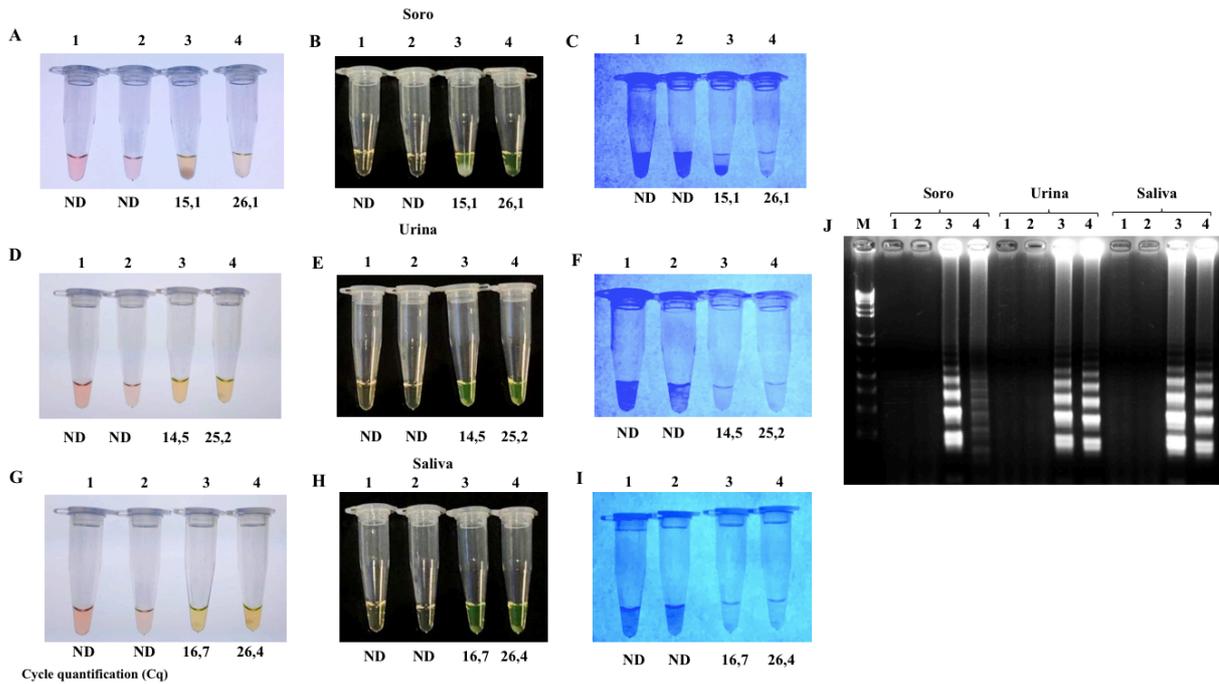
#### 8.4 Detecção de MAYV em amostras humanas e de mosquitos

Em seguida, foi avaliada a capacidade do RT-LAMP-PCR em diagnosticar MAYV em amostras humanas e de mosquitos. Para avaliar as amostras de mosquitos, foi realizado um macerado bruto de *Ae. aegypti* infectados com uma alta ( $1 \times 10^6$  PFU/mL) ou baixa ( $1 \times 10^3$  PFU/mL) carga viral. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, as amostras foram diretamente testadas através do RT-LAMP-PCR, sem a necessidade de extração do RNA das amostras.

Para avaliar as amostras humanas (soro, urina e saliva), estas foram infectadas com uma alta ( $1 \times 10^6$  PFU/mL) ou baixa ( $1 \times 10^3$  PFU/mL) carga viral. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, as amostras foram diretamente testadas através do RT-LAMP-PCR, sem a necessidade de extração do RNA das amostras.

O ensaio do RT-LAMP-PCR foi positivo para ambas as cargas virais testadas, em todas as amostras (Figura 10 e Figura 11). Além disso, foi observado que a extração de RNA não alterou o limite de detecção do RT-LAMP-PCR (dados não mostrados). Os resultados do RT-LAMP-PCR foram confirmados por RT-qPCR, através dos quais o valor de Cq foi de 15,1 e 26,1 em amostras de soro, 14,5 e 25,2 em amostras de urina, 16,7 e 26,4 em amostras de saliva e 18,1 e 28,4 em amostras de mosquitos para alta e baixa carga viral, respectivamente.

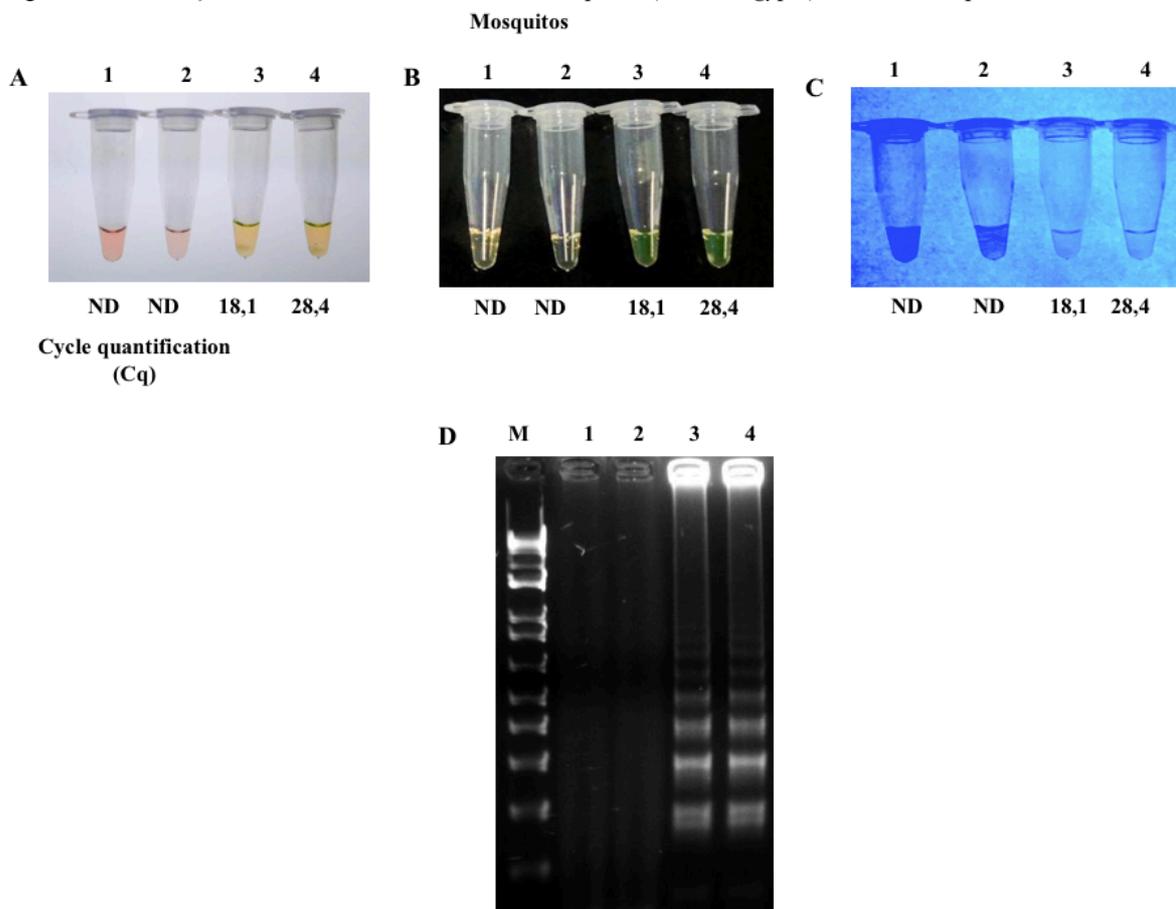
Figura 10 – Detecção de MAYV em amostras humanas (soro, urina e saliva) infectadas experimentalmente



Fonte: A autora

Legenda: Detecção de MAYV em amostras humanas e de mosquitos. Amostras biológicas humanas, (urina, soro e saliva) foram infectadas experimentalmente com alta ( $1 \times 10^6$  PFU / mL) ou baixa ( $1 \times 10^3$  PFU/mL) carga viral e avaliadas diretamente por RT-LAMP-PCR sem extração de RNA. Os resultados do RT-LAMP-PCR foram observados por alteração colorimétrica dos produtos no tubo de reação e por eletroforese em gel. Os produtos da amplificação foram observados na luz branca (A, D e G), a olho nu (B, E e H), sob irradiação UV (C, F e I) e eletroforese em gel de agarose (J). As legendas em (A-I) são: (1) NTC (controle sem molde): água; (2): amostra biológica (soro, urina ou saliva) não infectada; (3): amostra biológica (soro, urina ou saliva) infectada com  $10^6$  PFU/mL; (4): amostra biológica infectada com  $10^3$  PFU/mL. M: marcador de peso molecular.; ND: não detectável. Cor amarelo alaranjado: reação negativa para MAYV; Cor amarelo esverdeado: reação positiva para MAYV.

Figura 11 – Detecção de MAYV em amostras de mosquitos (*Aedes aegypti*) infectadas experimentalmente



Fonte: A autora

Legenda: Detecção de MAYV em amostras de mosquitos. Amostras de mosquitos (*Ae. aegypti*) foram infectadas experimentalmente com alta ( $1 \times 10^6$  PFU / mL) ou baixa ( $1 \times 10^3$  PFU/mL) carga viral e avaliadas diretamente por RT-LAMP-PCR sem extração de RNA. Os resultados do RT-LAMP-PCR foram observados por alteração colorimétrica dos produtos no tubo de reação e por eletroforese em gel. Os produtos da amplificação foram observados na luz branca (A), a olho nu (B), sob irradiação UV (C) e eletroforese em gel de agarose (D). As legendas em (A-D) são: (1) NTC (controle sem molde): água; (2): amostra de mosquitos não infectada; (3): amostra de mosquitos infectada com  $10^6$  PFU/mL; (4): amostra de mosquitos infectada com  $10^3$  PFU/mL. M: marcador de peso molecular.; ND: não detectável. Cor amarelo alaranjado: reação negativa para MAYV; Cor amarelo esverdeado: reação positiva para MAYV.

### 8.5 Especificidade analítica do RT-LAMP para detecção do MAYV

Para avaliar a especificidade do RT-LAMP-PCR na detecção do MAYV em amostras humanas, os primers foram testados frente a outros arbovirus circulantes no Brasil: CHIKV (PE2016-480), YFV (17DD), ZIKV cepa asiática (PE-243), ZIKV cepa africana (MR-766), DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081) (Quadro 2). Foi realizada uma infecção artificial em triplicata de todos os arbovirus descritos acima em amostras de soro, e foi visto que apenas as amostras de soro infectadas artificialmente com MAYV foram positivas no RT-LAMP-PCR (Figura 12). Esses resultados sugerem que o RT-LAMP-PCR desenvolvido neste trabalho é altamente específico para

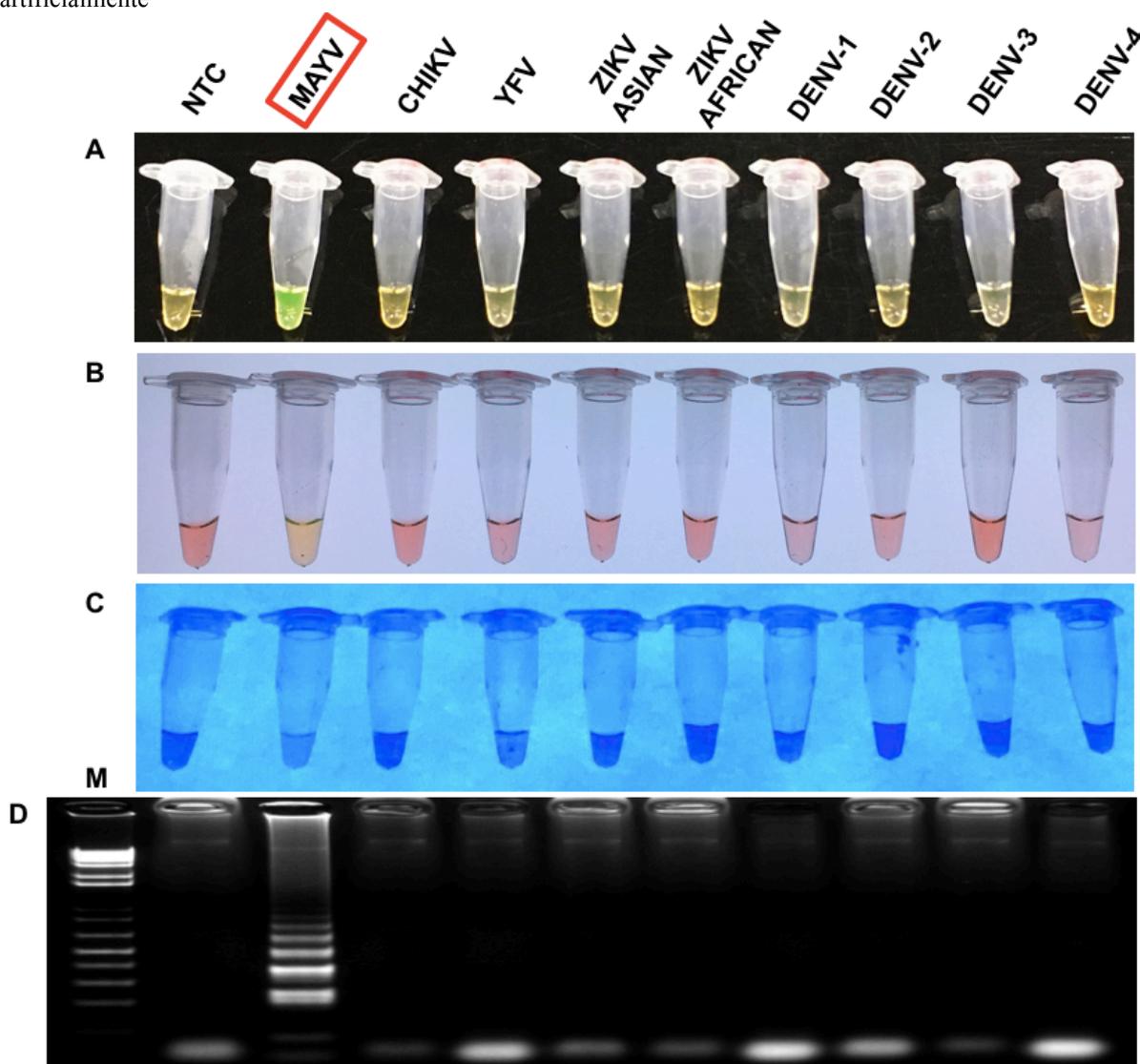
detecção de MAYV e não causa reação cruzada entre outros os principais arbovírus circulantes no Brasil.

Quadro 2 – Arbovírus utilizados para avaliar a especificidade do RT-LAMP-PCR

<b>Família</b>	<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Código de acesso do GenBank</b>	<b>Resultado RT-LAMP-PCR</b>
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Mayaro Vírus	MT/SINOP/210/2011	KF305672	+
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Chikungunya Vírus	PE2016-480	Não publicado	-
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Vírus da Febre Amarela	17DD	DQ100292	-
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Zika Vírus	PE-243 (asiática)	KX197192	-
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Zika Vírus	MR-766 (africana)	AY632535	-
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Dengue Vírus, sorotipo 1	PE/97-42735	EU259529	-
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Dengue Vírus, sorotipo 2	PE/95-3808	EU259569	-
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Dengue Vírus, sorotipo 3	PE/02-95016	KC425219	-
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Dengue Vírus, sorotipo 4	PE/10-0081	Não publicado	-

Fonte: A autora.

Figura 12 – Especificidade analítica do RT-LAMP-PCR para detecção de MAYV em amostras de soro infectadas artificialmente



Fonte: A autora

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

### 8.6 Sensibilidade analítica do RT-LAMP-PCR para detecção do MAYV

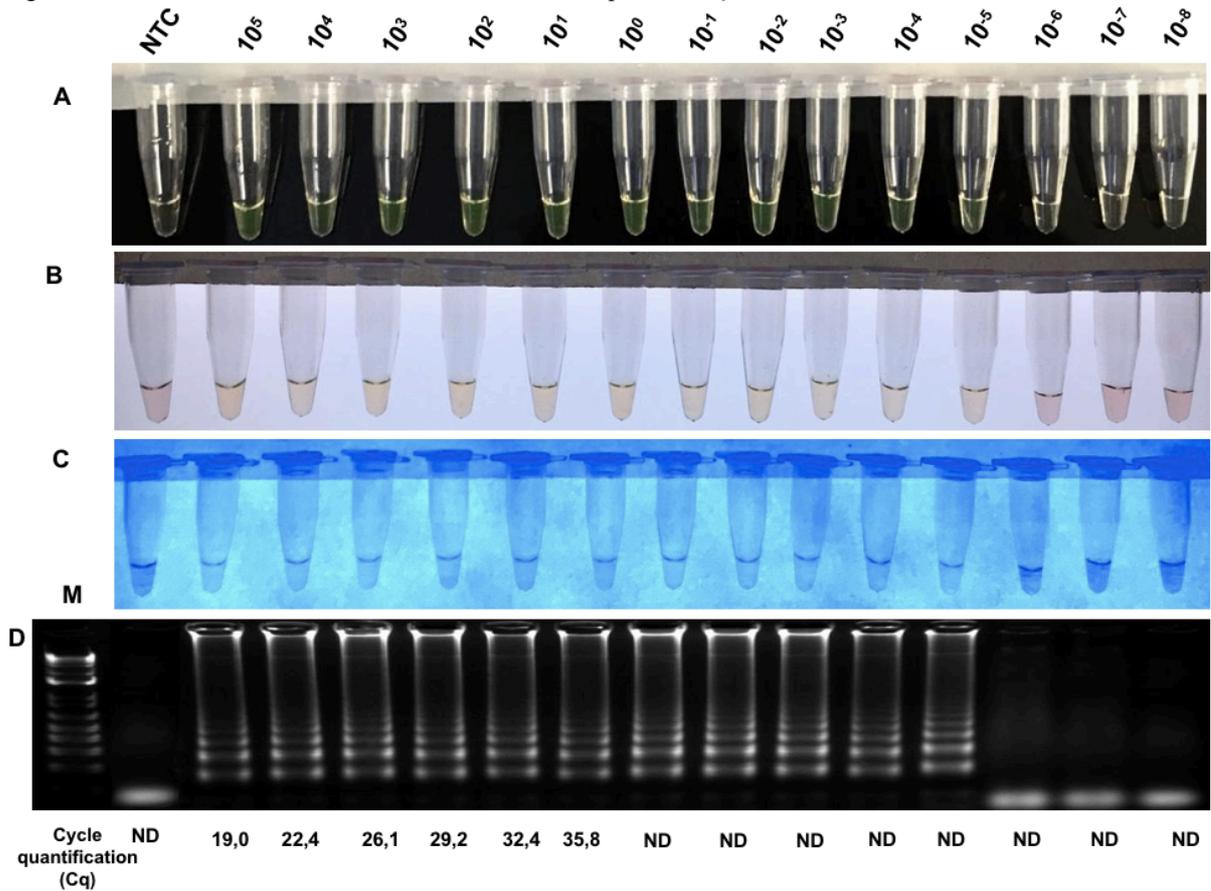
Para avaliar o limite de detecção do ensaio (sensibilidade analítica), foi realizado o ensaio de RT-LAMP-PCR em soro humano e em macerado de *Ae. aegypti* infectados experimentalmente com MAYV. Foi realizada uma diluição seriada do MAYV na base de dez vezes em soro e em mosquitos variando de  $10^5$  PFU a  $10^{-7}$  PFU de MAYV. As amostras foram testadas diretamente por RT-LAMP-PCR sem extração de RNA. O RT-LAMP foi capaz de detectar uma ampla faixa de concentrações de vírus (de  $10^5$  a  $10^{-5}$  PFU). A sensibilidade

analítica do RT-LAMP-PCR foi  $10^{-5}$  PFU/mL (Figura 13 e Figura 15). 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-PCR para detecção do MAYV em amostras de soro foi de -3,73 log<sub>10</sub> PFU do MAYV (~ 1/5370 PFU) com intervalo de confiança de -4,65 a -1,67 (Tabela 1 e Figura 14). Em amostras de mosquitos, a análise de Probit revelou que o limite de detecção com intervalo de confiança de 95% foi de -1,98 log<sub>10</sub> PFU do MAYV (~ 1/95 PFU) com intervalo de confiança de -3,08 a 0,14 (Tabela 2 e Figura 16).

Em seguida, o RNA viral das mesmas diluições foi extraído e testado por RT-qPCR. A sensibilidade analítica do RT-qPCR foi observada apenas até  $10^0$  PFU com um valor C<sub>q</sub> de 35,8 em amostras de soro e 38,1 em amostras de *Ae. aegypti* (Figura 13 e Figura 15). Os experimentos foram repetidos independentemente 10 vezes para permitir a análise de regressão probit para determinar com precisão o limite de detecção de RT-LAMP. Resultados de sensibilidade analítica semelhantes também foram obtidos em amostras de urina e saliva (dados não mostrados).

Esses resultados demonstraram em conjunto que o ensaio de RT-LAMP-PCR foi aproximadamente 1000 vezes mais sensível que a RT-qPCR descrita por Waggoner para detecção de MAYV em amostras de soro (Waggoner, 2018).

Figura 13 – Sensibilidade analítica do RT-LAMP-PCR para detecção de MAYV em amostras de soro



Fonte: A autora.

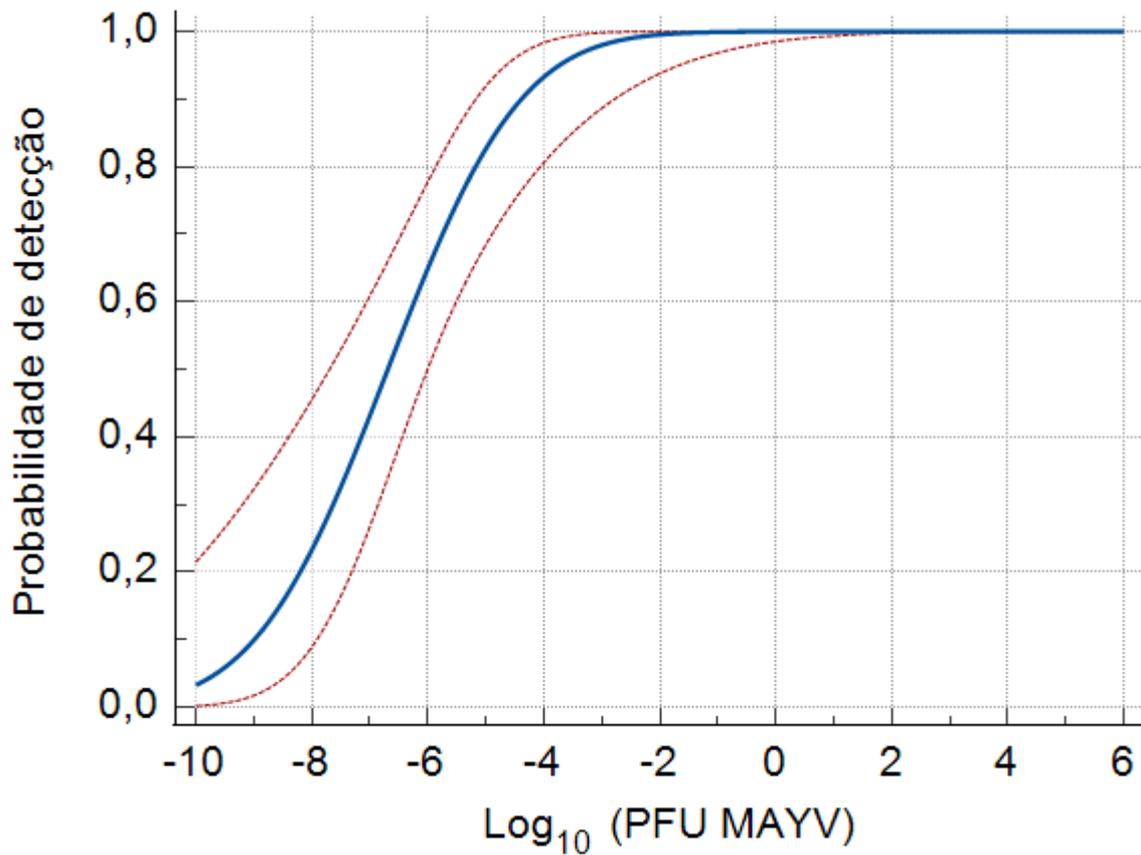
Legenda: A sensibilidade do RT-LAMP-PCR foi determinada a partir da menor diluição em que o genoma viral foi detectado através do ensaio. Para o ensaio de sensibilidade analítica, foi realizada uma diluição seriada do MAYV na base de 10 vezes em soro (de  $10^5$  a  $10^{-7}$  PFU/mL) e, em seguida, foram testadas diretamente pelo RT-LAMP-PCR sem a necessidade de extração do RNA. Os produtos de amplificação foram observados em luz branca (A), a olho nu (B) sob irradiação UV (C) e eletroforese em gel de agarose (D). M: marcador de peso molecular. NTC (controle sem molde): água. ND (não detectado). Para comparar os resultados do RT-LAMP com uma técnica utilizada na rotina, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições e testados através da RT-qPCR.

Tabela 1 – Limite de detecção do RT-LAMP-PCR em amostras de soro

<b>Concentração do MAYV</b>	<b>Número de replicatas</b>	<b>Número de resultados positivos</b>	<b>Probabilidade de detecção %</b>
$10^5$	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	9	90
$10^{-5}$	10	9	90
$10^{-6}$	10	8	80
$10^{-7}$	10	6	60
$10^{-8}$	10	0	0

Fonte: A autora.

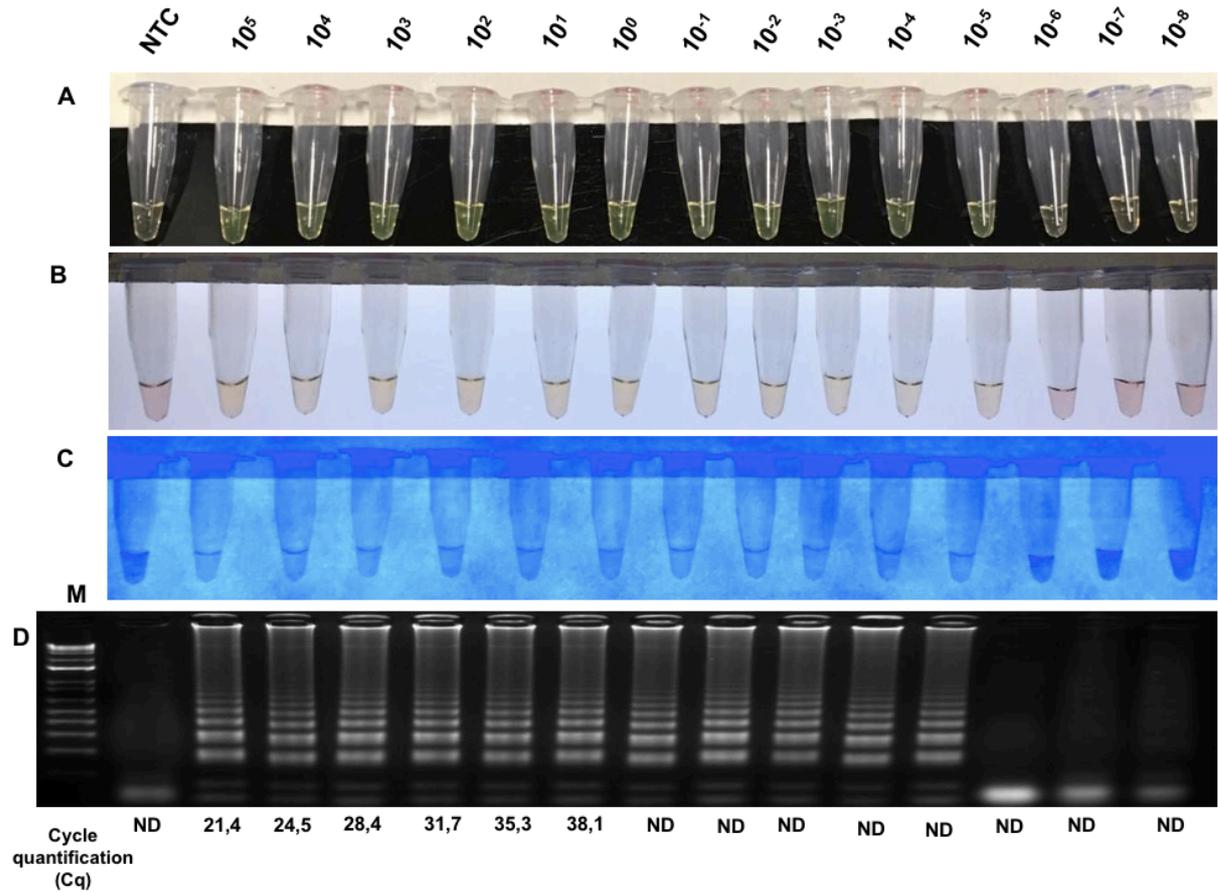
Figura 14 – Limite de detecção do RT-LAMP-PCR em amostras de soro calculado através de análise de Probit



Fonte: A autora.

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 -3,73 log<sub>10</sub> PFU do MAYV. Isto indica que o limite de detecção é cerca de -3,73 log<sub>10</sub> (1/5370) PFU/reacção e que as amostras contendo essa concentração podem ser detectadas em 95% das repetições.

Figura 15 – Sensibilidade analítica do RT-LAMP-PCR para detecção de MAYV em amostras de *Aedes aegypti*



Fonte: A autora.

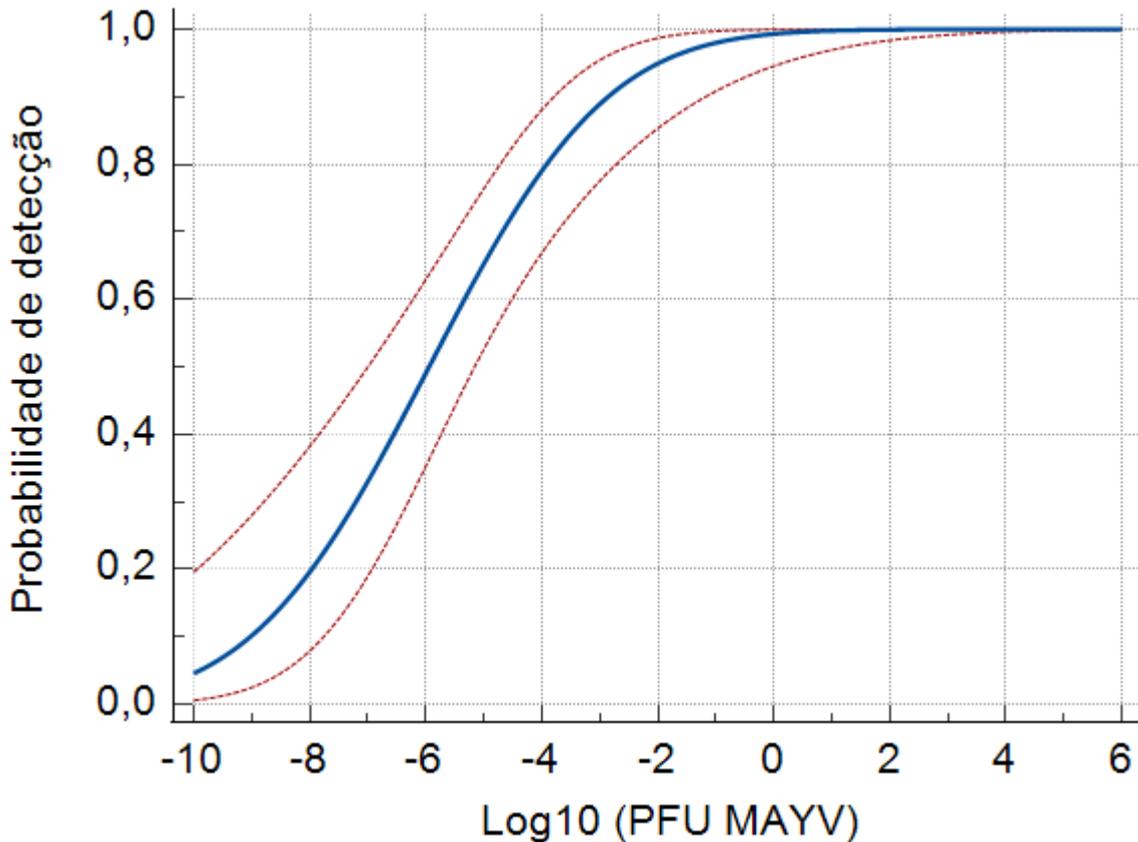
Legenda: A sensibilidade do RT-LAMP-PCR foi determinada a partir da menor diluição em que o genoma viral foi detectado através do ensaio. Para o ensaio de sensibilidade analítica em mosquitos, foi realizada uma diluição seriada do MAYV na base de 10 vezes em macerado de mosquitos (de  $10^5$  a  $10^{-7}$  PFU/mL) e, em seguida, foram testadas diretamente pelo RT-LAMP-PCR sem a necessidade de extração do RNA. Os produtos de amplificação foram observados em luz branca (A), a olho nu (B) sob irradiação UV (C) e eletroforese em gel de agarose (D). M: marcador de peso molecular. NTC (controle sem molde): água. ND (não detectado). Para comparar os resultados do RT-LAMP com uma técnica utilizada na rotina, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições e testados através da RT-qPCR.

Tabela 2 – Limite de detecção do RT-LAMP-PCR em amostras de *Aedes aegypti*

<b>Concentração do MAYV</b>	<b>Número de replicatas</b>	<b>Número de resultados positivos</b>	<b>Probabilidade de detecção %</b>
$10^5$	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	9	90
$10^{-3}$	10	8	80
$10^{-4}$	10	8	80
$10^{-5}$	10	7	70
$10^{-6}$	10	6	60
$10^{-7}$	10	5	50
$10^{-8}$	10	0	0

Fonte: A autora.

Figura 16 – Limite de detecção do RT-LAMP-PCR em amostras de *Aedes aegypti* calculado através de análise de Probit



Fonte: A autora.

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  $-1,98 \log_{10}$  PFU do MAYV. Isto indica que o limite de detecção é cerca de  $-1,98 \log_{10}$  (1/95) PFU/reação e que as amostras contendo essa concentração podem ser detectadas em 95% das repetições.

### 8.7 Determinação dos custos para realização dos ensaios

Foi realizado o cálculo do valor, em reais, do custo para a realização de cada reação de RT-LAMP-PCR, de acordo com os valores em reais (R\$) de todos os reagentes necessários para execução das técnicas, incluindo aqueles necessários para visualização dos resultados. Foi observado que o valor de cada teste por RT-LAMP-PCR foi de aproximadamente R\$ 1,55 (Tabela 3), e para realização de cada teste por RT-qPCR foi de cerca de R\$ 45,04 (Tabela 4). Esses resultados sugerem que o custo da nossa ferramenta de diagnóstico para MAYV é aproximadamente 29 vezes mais barato quando comparado ao custo de um diagnóstico molecular por RT-qPCR, padrão ouro para diversas arboviroses no Brasil.

Tabela 3 – Custo detalhado de cada reação para diagnóstico de MAYV através do RT-LAMP-PCR

<b>Reagente</b>	<b>Valor (R\$)</b>	<b>Número de reações</b>	<b>Valor por reação (R\$)</b>
Enzima Bst Dna Polimerase 3.0 (New England Biolabs)	3.092,22	3.000	1,03
Set de primers (IDT Síntese Biotecnologia)	438,50	3.611	0,121
Sybr Green (ThermoFisher Scientific)	2.560,00	10.000	0,256
dNTPs (ThermoFisher Scientific)	654,50	4.545	0,144
Água livre de RNase (500mL Promega)	108,92	14.285	0,007
<b>Total</b>			<b>1,558</b>

Fonte: A autora.

Tabela 4 – Custo detalhado de cada reação para diagnóstico de MAYV através da RT-qPCR

<b>Reagente</b>	<b>Valor (R\$)</b>	<b>Número de reações</b>	<b>Valor por reação (R\$)</b>
Kit de Extração de RNA (QIAGEN)	6.829,00	250	27,316
Primers e sonda (Exxtend Biotecnologia)	527,00	646,4	0,815
Kit OneStep (Enzima + Mix) Super Script III (ThermoFisher Scientific)	8.442,00	500	16,884
Água livre de RNase (500mL Promega)	108,92	3.787	0,028
<b>Total</b>			<b>45,043</b>

Fonte: A autora.

## 9 DISCUSSÃO

A detecção rápida do MAYV em amostras humanas e de mosquitos é de extrema importância para o monitoramento da doença e para compreensão da dinâmica viral em regiões favoráveis para circulação do vírus. Atualmente, o diagnóstico da Febre de Mayaro pode ser realizado por técnicas sorológicas ou técnicas moleculares como o isolamento viral ou RT-PCR. Entretanto, o diagnóstico diferencial não é realizado no cotidiano dos laboratórios de referência, o que pode levar a subnotificação da doença, especialmente em áreas de co-circulação de outras arboviroses devido a similaridade entre os sinais e sintomas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020).

Após 13 casos de MAYV serem confirmados em menos de três meses na Guiana Francesa em 2020, a Organização Mundial da Saúde emitiu uma nota de alerta e destacou a necessidade do monitoramento de MAYV através do diagnóstico diferencial como vem sendo realizado para outros arbovírus tais como CHIKV, ZIKV e DENV. Além disso, o número atípico de casos registrados na área urbana (85% dos casos confirmados no país em 2020) evidencia a necessidade de investigação epidemiológica, pois pode indicar que o vírus está circulando longe das áreas silvestres e rurais e que uma rota de transmissão urbana pode ser estabelecida (WHO, 2020; Mackay *et al.*, 2016).

O ensaio de RT-LAMP-PCR descrito ao longo desse trabalho representa uma plataforma inédita, simples e rápida para detecção do MAYV em uma etapa em amostras humanas de soro, saliva e urina e em amostras de mosquitos *Ae. aegypti* sem a necessidade de extração de RNA. Até o presente momento, este é o primeiro trabalho onde um ensaio de RT-LAMP-PCR foi desenvolvido para detecção de MAYV.

Alguns grupos desenvolveram a tecnologia do RT-LAMP-PCR para detecção molecular de outros arbovírus. Nos ensaios desenvolvidos para o diagnóstico de CHIKV, membro do mesmo gênero e família de MAYV, os primers foram desenhados utilizando as sequências alvo da região E1 (Parida *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2012), 6K e E1 (Lopez-Jimena *et al.*, 2018) ou região E1 e nsp1 (Saechue *et al.*, 2020). Após testes utilizando os sets de primers desenhados, foram selecionados os sets cuja sequência alvo foi a região E1 (Lopez-Jimena *et al.*, 2018; Saechue *et al.*, 2020). Em contrapartida, no ensaio desenvolvido durante esse trabalho, a sequência alvo selecionada para desenho dos primers foi a região de codificação da proteína nsp-1 pois foi a região mais conservada entre as sequências genômicas dos diferentes isolados de MAYV e divergente em relação a outros *Alphavirus* e *Flavivirus* analisados e co-circulantes no Brasil.

Atualmente, o diagnóstico laboratorial do MAYV depende do contexto epidemiológico e é realizado depois que uma amostra suspeita para CHIKV é negativa para CHIKV por RT-PCR ou apenas positiva quando testada por métodos sorológicos como ELISA e PRNT (PAHO, 2019). Entretanto essas técnicas apresentam diversas limitações, como tempo e custo elevados, necessidade de equipamentos sofisticados e mão de obra especializada.

Além disso, vários arbovírus como CHIKV, DENV e ZIKV co-circulam em diversas regiões do país. Uma potencial limitação das técnicas sorológicas disponíveis atualmente é a possibilidade de reação cruzada com outros *Alphavirus*, especialmente com o CHIKV que pertence a mesma família que o MAYV. A infecção por MAYV também pode ser erroneamente diagnosticada clinicamente como DENV e ZIKV devido a similaridade entre os sintomas, o que pode levar a subnotificação da doença, especialmente durante epidemias desses arbovírus. Nesse trabalho, desenvolvemos um teste específico para MAYV, que quando testado frente a outros arbovírus co-circulantes no Brasil como CHIKV, ZIKV, YFV e os quatro sorotipos de DENV não demonstrou reação cruzada.

Os limites de detecção dos ensaios de RT-LAMP-PCR desenvolvidos para CHIKV foram de 20, 27 e 10 moléculas de RNA e 8 PFU/tubo detectadas por reação em 30, 77, 45 e 30 minutos respectivamente (Parida *et al.*, 2007; Lopez-Jimena *et al.*, 2018; Saechue *et al.*, 2020). Entretanto, os autores não explanaram se esses limites de detecção foram calculados através de análise de probit ou através de um número determinado de repetições, com exceção de Lopez-Jimena *et al.* que reportaram o limite de detecção de 163 cópias de RNA detectadas em 40,2 minutos após análise de probit e 10 cópias de RNA detectadas 45 minutos.

Devido a ausência de ensaios de RT-LAMP-PCR desenvolvidos para MAYV, torna-se desafiador comparar a sensibilidade dos nossos ensaios com estudos publicados anteriormente. No nosso trabalho, o limite de detecção foi superior aqueles encontrados nos ensaios desenvolvidos para CHIKV. O nosso teste foi capaz de detectar  $10^{-5}$  PFU/mL em amostras de soro e mosquitos experimentalmente infectadas com MAYV. A alta quantidade de RNA do MAYV liberado no sobrenadante pode explicar a detecção de menos de 1 PFU por RT-LAMP-PCR, mesmo sem extração de RNA como observado em ZIKV (Li *et al.*, 2016).

O RT-LAMP-PCR pode ser realizado em um ensaio de uma ou duas etapas. No protocolo de duas etapas, é necessário além da polimerase Bst DNA ou Bst 2.0 Polimerase WarmStart, a adição de uma enzima transcriptase reversa (RT), sendo geralmente necessário a extração do RNA das amostras antes da realização do ensaio de RT-LAMP-PCR. Esse protocolo é mais dispendioso pois leva mais tempo, requer maior manipulação das amostras e apresenta um maior custo quando comparado ao protocolo de uma única etapa, que utiliza uma

enzima mais robusta, a Bst 3.0 Polimerase WarmStart. Essa enzima é capaz de manter sua alta atividade de transcriptase reversa e polimerase mesmo na presença de inibidores de reação, permitindo muitas vezes a utilização de amostras biológicas sem tratamento prévio (Lee et al., 2016; Beckman e Fallon 2012).

Apesar dos métodos sorológicos e moleculares serem utilizados com maior frequência para o diagnóstico de MAYV quando há suspeita de infecção e a amostra é negativa para outros arbovírus, ainda permanece a necessidade de desenvolvimento de ferramentas mais simples e específicas e que sejam capazes de detectar MAYV de forma rápida na rotina laboratorial. As ferramentas de diagnóstico do tipo *point-of-care* (POC), representam uma alternativa para contornar as limitações das técnicas mais utilizadas na rotina e aumentar a capacidade de diagnóstico diferencial de MAYV. Nesse contexto, o ensaio de RT-LAMP-PCR desenvolvido nesse trabalho representa uma alternativa de diagnóstico molecular do tipo POC que tem potencial de ser implementado na rotina laboratorial, visto que é um ensaio mais simples, específico e barato, e até o momento inédito na literatura científica.

A implementação de um diagnóstico diferencial de MAYV nos laboratórios de referência de arboviroses é urgente para compreendermos a real distribuição da doença no país. O RT-LAMP-PCR descrito ao longo desse trabalho pode auxiliar na vigilância do MAYV tanto em humanos quanto em mosquitos, pois possibilita a realização de um diagnóstico diferencial rápido e específico, o que representa uma importância ainda maior em países onde co-circulam outras arboviroses, como é o caso do Brasil.

Dentre as vantagens do ensaio de RT-LAMP-PCR desenvolvido ao longo deste trabalho podemos destacar a capacidade de detectar MAYV sem a necessidade de extração de RNA ou pré-tratamento das amostras, sugerindo que a ferramenta pode ser levada a campo com maior facilidade. Além disso, é importante ressaltar que as amostras positivas podem ser diagnosticadas em até 15 minutos, e o resultado pode ser visualizado a olho nu através da observação da alteração de cor no tubo da reação. O custo por reação foi de aproximadamente R\$ 1,55, sendo 29 vezes mais barato do que o custo por reação através da RT-qPCR, técnica que é mais utilizada na rotina de diagnóstico molecular de outras arboviroses. Considerando tal simplicidade, o ensaio pode ser realizado por indivíduos sem treinamento especializado em virologia ou biologia molecular. Somadas, essas vantagens sugerem que a ferramenta de diagnóstico descrita ao longo desse trabalho pode aumentar a capacidade de detecção de MAYV em amostras humanas e de mosquitos e pode ser utilizada para vigilância e diagnóstico em áreas remotas e em laboratórios com pouca infraestrutura em regiões que possam ser afetadas por MAYV.

## 10 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou o desenvolvimento de uma ferramenta *point-of-care* de baixo custo baseada na técnica de RT-LAMP-PCR para diagnóstico do Mayaro Vírus capaz de detectar MAYV em amostras humanas de soro, saliva e urina e em amostras de mosquitos experimentalmente infectados, sem a necessidade de extração de RNA. Este é o primeiro trabalho de desenvolvimento da técnica de RT-LAMP-PCR para detecção do MAYV. O protocolo aqui desenvolvido é inédito na literatura científica e apresenta potencial de ser utilizado para vigilância e diagnóstico diferencial de MAYV na rotina laboratorial.

## REFERÊNCIAS

- AUGUSTE, A. J. et al. Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010. Emerg. Infect. Dis., Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1742-1750, Oct. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401714>. Acesso em: 11 mar. 2020.
- AZEVEDO, R. S. S. *et al.* Monitoramento de casos de febre do Mayaro e febre do Oropouche até a Semana Epidemiológica 35, 2019: Experiência do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS). Bol. Epidemiol., Brasília, DF, v. 50, 28, p. 14-16, out. 2019. Disponível em <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/wp-content/uploads/2019/10/BE-multitematico-n28.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2021.
- AZEVEDO, R. S. et al. Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis, Atlanta, v. 15, n. 11, p. 1830-1832, Nov 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19891877>. Acesso em: 11 mar. 2020.
- BALASURIYA, U. B. et al. Type A influenza virus detection from horses by real-time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR. Methods. Mol. Biol, Clifton, 1161: 393-402. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24899448> Acesso em: 11 mar. 2020.
- 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. ISSN 1879-0984 (Electronic) 0166-0934 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24992669>. Acesso em: 14 jun 2020.
- BECKMANN, J. F.; FALLON, A. M. Decapitation improves detection of Wolbachia pipientis (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. 2020.
- 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. 1936-40, Jun 2007. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17392443>. Acesso em: 27 nov. 2020.
- BRONZONI, R. V. et al. Multiplex nested PCR for Brazilian Alphavirus diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg, Oxford, v. 98, n. 8, p. 456-61, Aug 2004. ISSN 0035-9203 (Print) 0035-9203 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15186933>. Acesso em: 27 nov. 2020.
- DIAGNE, C. T. et al. Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. Pathogens, San Francisco, 2020, v. 9, p. 738, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens9090738>. Acesso em: 7 fev. 2021.

- ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? Braz J Infect Dis, Jul 06 2017. ISSN 1678-4391 (Electronic) 1413-8670 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28688628>. Acesso em: 07 fev. 2021.
- FIGUEIREDO, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. Rev Soc Bras Med Trop, Uberaba, v. 47, n. 6, p. 677-83, Dez 2014. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25626645>. Acesso em: 07 fev. 2021.
- FORSHEY, B. et al., 2010. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in western South America, 2000–2007. PLoS Negl Trop Dis, San Francisco, v. 4. Acesso em: 07 fev. 2021.
- GANJIAN, N.; RIVIERE-CINNAMOND, A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. Rev. Panam. Salud Publica, Washington, DC, v. 44, 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51857/v44e142020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 7 fev. 2021.
- HALSEY, E.S. et al. Mayaro virus infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. Emerg Infect Dis, Atlanta, 19. 1839–1842. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837653>. Acesso em: 07 fev. 2021.
- IZURIETA, R. O. et al. Hunting in the Rainforest and Mayaro Virus Infection: An emerging Alphavirus in Ecuador. J Glob Infect Dis, Filadélfia, v. 3, n. 4, p. 317-323, Oct 2011. ISSN 0974-8245 (Electronic) 0974-777X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22223990>. Acesso em: 10 fev. 2021.
- KRAEMER, M. U. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. Elife, Cambridge, v. 4, p. e08347, Jun 30 2015. ISSN 2050-084X (Electronic). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26126267>. Acesso em: 10 fev. 2021.
- KWALLAH, A. et al. A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. J Virol Methods, Amsterdam, v. 193, n. 1, p. 23-7, Oct 2013. ISSN 1879-0984 (Electronic) 0166-0934 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23692685>. Acesso em: 12 fev. 2021.
- 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. 1232-9, Aug 2008. ISSN 1080-6059 (Electronic). Disponível em: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287_article). Acesso em: 22 fev. 2021.
- LAVERGNE, A. et al. Mayaro virus: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. Virus Res, Amsterdam, v. 117, n. 2, p. 283-90, May 2006. ISSN 0168-1702 (Print) 0168-1702 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16343676>. Acesso em: 22 fev. 2021.
- 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. 2019.

- LI, S. et al. Simultaneous detection and differentiation of dengue virus serotypes 1-4, Japanese encephalitis virus, and West Nile virus by a combined reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Virology*, Amsterdam, v. 8, p. 360, 2011. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21777455>. Acesso em: 22 fev. 2021.
- 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.
- LONG KC, ZIEGLER SA, THANGAMANI S, et al. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, Virginia, 2011; 85: 750–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21976583>. Acesso em: 22 fev. 2021.
- LOPEZ-JIMENA, B. et al. Development of a single-tube one-step RT-LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. *PLoS Negl Trop Dis*, San Francisco, v. 12, n. 5, p. e0006448, May 2018. ISSN 1935-2735 (Electronic)1935-2727 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29813065>. Acesso em: 22 fev. 2021.
- Mackay I. M. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? *Microbes Infect*. Amsterdam, 2016 Dec;18(12):724-734. doi: 10.1016/j.micinf.2016.10.007. Epub 2016 Oct 27. PMID: 27989728. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27989728>. Acesso em: 12 mar. 2021.
- MINISTERIO DA SAUDE, B. Mayaro. *Situação Epidemiológica*. Dados 2015. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/paracoccidiodomicose/975-saude-de-a-a-z/febre-do-mayaro/20947-febre-do-mayaro>. Acesso em: 12 mar. 2021.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. B. *Febre do Mayaro*. 2020. Disponível em: <https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2021.
- 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. 62-9, Apr 2009. ISSN 1341-321X (Print) 1341-321X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19396514>. Acesso em: 16 mar. 2021.
- MOTA, M. et al. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. *Future Virology*, Londres, v. 10, n. 9, 2015. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fvl.15.76?journalCode=fvl>. Acesso em: 16 mar. 2021.
- MOURAO, M.P., BASTOS, M.S., DE FIGUEIREDO R.P, et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007–2008. *Vector Borne Zoonotic Dis*, Durham, 2012; 12:42–6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249893>. Acesso em: 16 mar. 2021.
- NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, London, v. 28, n. 12, p. E63, Jun 15 2000. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048

(Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871386>. Acesso em: 16 mar. 2021.

NUNES, Marcio R.t. et al. Analysis of a Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for yellow fever diagnostic. Journal of Virological Methods, Amsterdam, v. 226, p.40-51, dez. 2015. Elsevier BV. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093415003377?via%3Dihub>. Acesso em: 21 mar. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Mayaro virus disease - French Guiana. France: WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/mayaro-virus-disease---french-guiana-france>. Acesso em: 21 mar. 2021.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Epidemiological Alert Mayaro Fever. Whashington, DC: PAHO, 2019. Disponível em: [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=15123:1-may-2019-mayaro-fever-epidemiological-alert&Itemid=42346&lang=en](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15123:1-may-2019-mayaro-fever-epidemiological-alert&Itemid=42346&lang=en). Acesso em: 21 mar. 2019.

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. 407-21, Nov-Dec 2008. ISSN 1052-9276 (Print) 1052-9276 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18716992>. Acesso em: 23 mar. 2021.

PINHEIRO, F. P. et al. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. Am J Trop Med Hyg, Virginia, v. 30, n. 3, p. 674-81, May 1981. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6266263>. Acesso em: 23 mar. 2021.

POWERS, A. M. et al. Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. Am J Trop Med Hyg, Virginia, v. 75, n. 3, p. 461-9, Sep 2006. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968922>. Acesso em: 23 mar. 2021.

QUOC, N. B. et al. Closed tube loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of hepatitis B virus in human blood. Heliyon, Amsterdam, v. 4, n. 3, p.00561-00571, mar. 2018. Elsevier BV. Disponível em: [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(17\)337052?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844017337052%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(17)337052?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844017337052%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 23 mar. 2021.

SAECHUE, B. et al. Development of a portable reverse transcription loop-mediated isothermal amplification system to detect the E1 region of Chikungunya virus in a cost-effective manner. Genes To Cells, Tokyo, p. 1-4, 22 jul. 2020. Wiley. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32562326>. Acesso em: 03 mar. 2020.

SERRA O. P. et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiaba, state of Mato Grosso, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016; 111:209. Disponível

em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/5srpmgwSdZmKNpmKsJrgP8K/?lang=en>. Acesso em: 03 mar. 2020.

SMITH, G. C. et al. Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses. *J Am Mosq Control Assoc*, v. 7, n. 1, p. 89-93, Mar 1991. ISSN 8756-971X (Print) 8756-971X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1646286>. Acesso em: 13 mar. 2021.

TERZIAN, A. C. B. et al. Isolation and Characterization of Mayaro Virus from a Human in Acre, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene*, Virginia, v. 92, n. 2, p.401-404, 4 fev. 2015. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4347347>. Acesso em: 15 abr. 2021.

TOMITA, N. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*, London, v. 3, n. 5, p. 877-82, 2008. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451795>. Acesso em: 11 abr. 2021.

VIEIRA, C. J. et al. Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. *Acta Trop*, Amsterdam, v. 147, p. 12-6, Jul 2015. ISSN 1873-6254 (Electronic)0001-706X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25817238>. Acesso em: 16 abr. 2021.

WAGGONER, J. J. et al. Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine. *J Clin Virol*, Amsterdam, v. 98, p. 1-4, Jan 2018. ISSN 1873-5967 (Electronic) 1386-6532 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29172075>. Acesso em: 16 abr. 2021.

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 109, n. 6, p. 820-3, Sep 2014. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25141284>. Acesso em: 13 mar. 2021.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa “Desenvolvimento e Avaliação da Técnica de Amplificação Mediada por Circuito Isotérmico (RT-LAMP-PCR) para o Diagnóstico Molecular do Mayaro Vírus”, sob a responsabilidade do pesquisador (a) Dr. Lindomar José Pena (Telefone para contato 081-2123-7849) e do pesquisador Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães (Telefone para contato 081-2101.2500 ou 2101-2600).

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 Mayaro vírus em humanos, inclusive em regiões remotas e menos estruturadas. Com esta, acredita-se poder contribuir para a vigilância e diagnóstico da Febre do Mayaro no Brasil.

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 ao pesquisador, sem prejuízo a ambas as partes.

A sua contribuição na pesquisa ocorrerá através da participação doando amostras biológicas (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 analisadas 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) da Universidade de Pernambuco, localizado na Rua Joaquim Nabuco, 171 - Graças, Recife/PE, CEP: 50.670-420, através do telefone 81)3182-4771 ou pelo e-mail: cep@hemope.pe.gov.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, \_\_\_\_/\_\_\_\_/2021.

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:**

**Pesquisador:** 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

ou:

**Pesquisador:** Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães

**Endereço:** Av Gregório Ferraz Nogueira - José Tomé de Souza Ramos - Serra Talhada – PE.

**E-mail:** jurandy.magalhaes@upe.br

**Telefone:** (81) 2101.2500 ou 2101-2600

## APÊNDICE B – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento e validação de métodos alternativos para a diagnóstico molecular e sorológico de vírus emergentes e re-emergentes

**Pesquisador:** Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 43877521.4.0000.5195

**Instituição Proponente:** FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PERNAMBUCO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE  
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.570.438

#### Apresentação do Projeto:

Vírus emergentes e re-emergentes têm se espalhado rapidamente pelo globo nos últimos anos, causando surtos, epidemias e até mesmo pandemias ao redor do mundo. Nesse contexto vale a pena destacar e re-emergência de vários arbovírus de grande importância para a saúde pública, bem como a emergência do novo coronavírus denominado SARS-CoV-2, o agente etiológico da COVID-19, que surgiu na China no final de dezembro de 2020 e rapidamente se disseminou por todos os continentes do mundo. Os arbovírus transmitidos por mosquitos, como os vírus chikungunya (CHIKV), dengue (DENV), mayaro (MAYV) e Zika (ZIKV). 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 e MAYV pertencem à família Togaviridae (KRAEMER; SINKA; DUDA; MYLNE et al., 2015; MUSSO; GUBLER, 2016).

Por outro lado, o SARS-CoV-2 pertence ao gênero Betacoronavirus dentro da subfamília Coronavirinae e família Coronaviridae (LU; ZHAO; LI; NIU et al., 2020; ZHU; ZHANG; WANG; LI et al., 2020). O estabelecimento e fortalecimento dos métodos e mecanismos de diagnóstico e vigilância da infecção de arbovírus e pelo SARS-CoV-2 em pacientes é de extrema relevância para o controle dessas doenças. Atualmente, a RT-PCR e RTqPCR são utilizadas para a detecção direta do agente.

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171

**Bairro:** Graças

**CEP:** 52.011-000

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)3182-4771

**Fax:** (81)3182-4660

**E-mail:** cep@hemope.pe.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO



Continuação do Parecer: 4.570.438

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 do CHIKV, DENV, MAYV, ZIKV e SARS-CoV-2. Assim, o desenvolvimento de técnicas e protocolos mais simples que não requerem o uso de termocicladores e equipamentos sofisticados serão muito importantes para a melhoria e ampliação da capacidade diagnóstica do estado e do país. Neste contexto, propomos criar plataformas e métodos alternativos de baixo custo para o diagnóstico e vigilância do CHIKV, DENV, MAYV, ZIKV e SARS-CoV-2 usando métodos moleculares e sorológicos. Além disso, iremos validar essas ferramentas para o diagnóstico de arboviroses em amostras clínicas obtidas no epicentro da epidemia brasileira.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Desenvolver e validar plataformas “point-of-care” e métodos alternativos de extração para a diagnóstico de vírus emergentes e re-emergentes.

Objetivo Secundário:

Desenvolver sistemas de detecção baseado no RT-LAMP e biossensores para o diagnóstico de arboviroses e da COVID-19;

Avaliar métodos alternativos para substituir a extração do material genético das amostras biológicas;•  
Comparar a sensibilidade e especificidade dos métodos desenvolvidos com a RT-qPCR para a detecção de arbovírus e do SARS-CoV-2 em amostras de pacientes;

Determinar a acurácia dos métodos desenvolvidos para a detecção de arbovírus e do SARS-CoV-2 em amostras clínicas;

Demonstrar as diferenças de custos entre as técnicas propostas e RT-qPCR para o diagnóstico do CHIKV, DENV, MAYV, ZIKV e SARS-CoV-2.

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171  
**Bairro:** Graças **CEP:** 52.011-000  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)3182-4771 **Fax:** (81)3182-4660 **E-mail:** cep@hemope.pe.gov.br

**FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO**



Continuação do Parecer: 4.570.438

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

O estudo não apresenta riscos diretos para os indivíduos envolvidos, visto que as amostras biológicas fornecidas já estarão processadas e o diagnóstico já liberado, tendo o paciente e serviço de saúde já tomado ciência desse diagnóstico. O risco de disseminação indevida de informações pessoais coletadas não existe, pois nenhum outro dado além do resultado laboratorial será fornecido para a pesquisa. Em todo processo será assegurada o anonimato dos pacientes. Por fim, vale salientar que as amostras fornecidas seriam descartadas pelo LACEN/PE, visto que não se enquadrariam mais nas normas da instituição.

**Benefícios:**

Quanto aos benefícios, os resultados deste projeto fornecerão dados de impacto direto no controle das doenças causadas por esses patógenos, permitindo o desenvolvimento plataformas de diagnóstico com grande potencial inovador, com possibilidade de obtenção de patentes, transferência e até mesmo comercialização.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto de relevância, em que todos os experimentos serão realizados no Laboratório de Virologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Pernambuco), em colaboração com o LACEN/PE e UPE Serra Talhada que farão as análises de custo e estatísticas do projeto. O departamento de Virologia do IAM é capaz de atender integralmente às necessidades físicas e de suporte técnico-científico para a execução deste projeto. Todas as amostras utilizadas no estudo serão fornecidas pelo LACEN/PE, que já apresentou anuência formal ao projeto.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os estudos envolvendo amostras de pacientes seguirão estritamente as normas vigentes estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e cumprirão todas as exigências da Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde (CNS).

**Recomendações:**

Lembramos que o pesquisador responsável assume o compromisso de encaminhar ao CEP da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco- HEMOPE- E-mail: cep@hemope.pe.gov.br, o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o dispositivo nas normas vigentes, Resolução nº 510/16 e 466/12. O prazo de entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171  
**Bairro:** Graças **CEP:** 52.011-000  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)3182-4771 **Fax:** (81)3182-4660 **E-mail:** cep@hemope.pe.gov.br

**FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO**



Continuação do Parecer: 4.570.438

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Considerações Finais a critério do 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_1706052.pdf	26/02/2021 17:06:27		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	20210224_Projeto_CEP_UPE.pdf	24/02/2021 16:39:17	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_FIOCRUZ.pdf	20/02/2021 17:58:22	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito
Outros	Anuencia_LACEN_assinada.pdf	20/02/2021 17:58:01	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito
Outros	TERMO_DE_CONFIDENCIALIDADE.pdf	20/02/2021 17:56:26	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito
Outros	Justificativa_de_dispenza_TCLE.pdf	20/02/2021 17:55:39	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	20/02/2021 17:54:10	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 03 de Março de 2021

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**Maria Iraci Buarque Valença**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171  
**Bairro:** Graças **CEP:** 52.011-000  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)3182-4771 **Fax:** (81)3182-4660 **E-mail:** cep@hemope.pe.gov.br

## APÊNDICE C – ARTIGO PARA SUBMISSÃO

### **Desenvolvimento de uma Plataforma de Circuito Isotérmico Mediada por Loop (LAMP) para o Diagnóstico do Vírus Mayaro**

Caroline Targino Alves da Silva<sup>1</sup>, Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes<sup>2</sup>, Roberta Vieira de Moraes Bronzoni<sup>3</sup>, Lindomar José Pena<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE), Departamento de Virologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso, 78550-267, Sinop, Mato Grosso, Brasil.

\* Autor correspondente: [lindomar.pena@fiocruz.br](mailto:lindomar.pena@fiocruz.br)

## RESUMO

O vírus Mayaro (MAYV), o agente etiológico da febre de Mayaro, doença febril aguda clinicamente semelhante à febre de Chikungunya, tem causado pequenos surtos no Brasil. O aumento da incidência em regiões não endêmicas é uma preocupação de saúde pública, pois indica que o MAYV está se espalhando no Brasil e que futuras epidemias podem ocorrer. Muitos casos de MAYV foram diagnosticados inicialmente como outros arbovírus, principalmente como CHIKV, devido à alta semelhança entre os sintomas e a ocorrência de reatividade cruzada, o que pode levar à subnotificação da doença. Diante disso, o estabelecimento de métodos diagnósticos e programas de vigilância mais específicos é de extrema importância para o controle da doença. Atualmente, o diagnóstico molecular do MAYV é realizado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) precedida pela reação da transcriptase reversa que converte o RNA viral em cDNA (RT-PCR). Porém, o alto custo, a necessidade de mão de obra especializada e equipamentos sofisticados limitam a capacidade diagnóstica em laboratórios com infraestrutura limitada e em países em desenvolvimento, como o Brasil. Neste projeto, uma plataforma de transcriptase reversa seguida de amplificação isotérmica mediada por loop (RT-LAMP-PCR) foi desenvolvida para detecção de MAYV em amostras humanas e de mosquitos. Os primers específicos para MAYV foram projetados e sintetizados, e a técnica para a detecção de MAYV em humanos foi otimizada. Os melhores resultados de amplificação foram obtidos a 70 ° C por 30 minutos de incubação, e as concentrações ótimas de Mg<sup>2+</sup>, enzima Bst 3.0 e dNTPs foram 6 mM, 0,12 U/μl e 1,8 mM, respectivamente. Além disso, observou-se que a reação não requer todos os primers, funcionando sem os primers do loop (LF e LB). O teste provou ser específico para detecção de MAYV quando testado contra outros arbovírus e foi capaz de detectar o vírus em amostras humanas de soro, urina, saliva e mosquitos infectados experimentalmente. Além disso, o ensaio foi até 1.000 vezes mais sensível e 29 vezes mais barato do que o RT-qPCR para detecção de MAYV em amostras de soro.

**Palavras-chave:** Diagnóstico. MAYV. RT-LAMP.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com o maior registro de casos de MAYV nas Américas, e Goiás é o estado com o maior número de casos. De um total de 495 casos notificados no país desde os primeiros casos do vírus até maio de 2019, 199 deles foram identificados em Goiás e 194 no Pará. Casos também foram identificados nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Acre e Amazonas (Ganjian e Riviere-Cinamond, 2020).

Embora os surtos de MAYV relatados sejam pequenos e principalmente em áreas rurais, o aumento da incidência em regiões onde a doença não é endêmica é um problema de saúde pública, pois indica que o MAYV está se espalhando pelo Brasil e que futuras epidemias desse arbovírus podem ocorrer. O potencial de transmissão do MAYV por *A. aegypti*, amplamente distribuído nas regiões brasileiras, também indica a possibilidade do surgimento de uma rota de transmissão urbana do MAYV (Long et al., 2011; Terzian et al., 2015). Muitos casos de MAYV foram diagnosticados inicialmente como outros arbovírus, principalmente como CHIKV, devido à grande semelhança entre os sintomas e a ocorrência de reatividade cruzada de anticorpos nos testes diagnósticos disponíveis. Provavelmente, muitos casos de febre de Mayaro não são diagnosticados, levando à subnotificação da doença. Assim, é necessário que programas de vigilância utilizando metodologias diagnósticas confiáveis sejam desenvolvidos para monitorar com precisão os casos desse arbovírus (Halsey, et al., 2013; Figueiredo, 2014; Vieira et al., 2015).

O Ministério da Saúde estabelece que o diagnóstico da Febre de Mayaro é epidemiológico, clínico e laboratorial. Devido à semelhança dos sinais e sintomas com outros arbovírus circulantes no Brasil, é de extrema importância que o diagnóstico laboratorial seja realizado por meio da identificação direta do vírus por meio de isolamento viral e / ou técnicas de identificação do genoma viral (como RT-PCR e RT-qPCR) ou por identificação indireta por meio de técnicas sorológicas como ELISA e PRNT (teste de redução de neutralização de placas) (Ministério da Saúde, 2020).

Neste contexto, desenvolvemos uma plataforma de baixo custo para o diagnóstico e vigilância molecular do MAYV através do desenvolvimento e avaliação da técnica de amplificação mediada por circuito isotérmico (RT-LAMP-PCR) em amostras clínicas humanas e em mosquitos. O RT-LAMP-PCR é uma ferramenta de diagnóstico rápida, simples e econômica que utiliza uma abordagem isotérmica, combinando uma polimerase específica, um conjunto de primers não marcados e desoxinucleotídeos convencionais. A disponibilidade desta ferramenta tem grande potencial para contribuir para a sua vigilância e assim prevenir a propagação da doença na população, bem como o seu diagnóstico, melhorando o manejo clínico

dos pacientes, uma vez que o MAYV se espalha para outras regiões (Nunes et al., 2015; Quoc et al., 2018).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Extração de RNA**

O RNA total das amostras foi extraído de 140µL da amostra (urina, soro, saliva ou mosquito macerado) por meio do kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi eluído em um volume final de 60µl e armazenado em freezer a -80 ° C para ensaios moleculares. O RNA obtido foi quantificado usando Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

### **Design de primers**

Os primers para RT-LAMP-PCR foram desenhados com o auxílio do programa PrimerExplorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>), que foi desenvolvido especificamente para o desenho de primers para LAMP, com base na sequência consenso de todos os MAYV cepas disponíveis em Genbank.

### **RT-LAMP-PCR**

Todas as concentrações de reagentes foram padronizadas, assim como todas as condições do ensaio RT-LAMP-PCR. A otimização da temperatura da reação foi avaliada sob as seguintes temperaturas (50 ° C, 55 ° C, 60 ° C, 65 ° C, 68 ° C, 70 ° C, 72 ° C e 75 ° C) e o tempo de incubação sob os seguintes tempos (10min, 15min, 20min, 25min, 30min). Quanto aos reagentes, as concentrações ideais de Mg<sup>2+</sup> (2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM e 10 mM), enzima Bst 3.0 (0,04 U / µl, 0,08 U / µl, 0,12 U / µl, 0,16 U / µl, 0,2 U / µl, 0,24 U / µl, 0,28 U / µl e 0,32 U / µl) e dNTPs (0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1,0 mM, 1,2 mM, 1,4 mM, 1,6 mM, 1,8 mM e 2,0 mM ) Após otimizar todos os parâmetros e condições do RT-LAMP, os experimentos foram realizados conforme descrito abaixo.

As reações de RT-LAMP-PCR foram realizadas em triplicata em um volume total de 25 µl contendo tampão de amplificação isotérmica 1x, MgSO<sub>4</sub> 6 mM, 0,12 U / µl Bst DNA polimerase [versão 3.0 WarmStart; New England Biolabs (NEB)], desoxinucleotídeo trifosfatos (dNTPs) 1,8 mM (ThermoFisher Scientific), 1,6 µM FIP, 1,6 µM BIP, 0,2 µM F3, 0,2 µM B3, 0,4 µM LF, 0,4 µM LB e amostra de 5 µL (no controle de modelo - NTC ou amostras sem extração de RNA). Para visualizar as reações positivas e evitar possível contaminação, 1 µL de SYBR Green I (ThermoFisher Scientific), diluído em água livre de RNAase (Promega) na proporção de 1:10, foi adicionado ao centro das tampas da reação tubos 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 70 ° C por 30 minutos em um termobloco e então inativadas a 80 ° C por 5 minutos. Todos os experimentos foram replicados independentemente pelo menos três vezes. Após a incubação, as reações dos produtos RT-LAMP foram detectadas usando três métodos diferentes. Na primeira, os produtos foram observados a olho nu, sob luz natural, e fotografados com câmera de celular convencional (iPhone, Apple). O uso de SYBR Green, DNA intercalante, permite que uma mudança de cor de laranja para amarelo esverdeado seja visualizada para identificar a amostra positiva, enquanto uma amostra negativa permanece laranja. O segundo método foi a análise visual de tubos de reação sob irradiação com luz ultravioleta (UV), utilizando um transiluminador (modelo UVB LTB 20 × 20 STV, Locus Biotechnology, São Paulo, Brasil) acoplado a uma câmera e conectado a um computador. Neste método, as amostras negativas tornaram-se azuis escuras e as reações positivas fluorescentes. No terceiro método, os amplicons de RT-LAMP foram analisados por eletroforese em gel de agarose (2,0%) em tampão TAE 1x, seguido de coloração com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) (diluído em água ultrapura 1: 500) e visualização de o gel com transiluminador. Para a análise por eletroforese, o DNA Ladder Plus de 1 kb (ThermoFisher Scientific) foi utilizado como marcador de peso molecular do DNA.

### **RT-qPCR**

As amostras de MAYV foram testadas quanto à positividade para infecção pela técnica de RT-qPCR, usando primers e protocolos previamente descritos, com pequenas modificações (Wagoner et al., 2018). Em resumo, para as reações de RT-qPCR, foi utilizado o Kit QuantiTect Probe RT-PCR (QIAGEN, Alemanha), que transcreve o RNA em cDNA, bem como amplifica o DNA em uma única etapa, minimizando possíveis contaminações. Para cada reação, foram usados 5µl de 5x QIAGEN One Step RT-PCR Buffer, 1µl de 10mM dNTP Mix, 0,5µM de cada primer, 1µl de QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix e 3µl de RNA extraído conforme descrito acima. As etapas do ciclo foram de 45°C por 15 minutos para a transcrição reversa, 95°C por 5 minutos para a inativação da enzima transcriptase reversa, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 5 segundos, 55°C por 25 segundos e 68°C por 25 segundos para amplificação de DNA.

### **Avaliação da especificidade analítica de RT-LAMP-PCR**

Para avaliar a especificidade analítica dos primers desenhados para MAYV contra outros arbovírus de importância médica para o Brasil, ensaios foram realizados para testar a reatividade cruzada com outros arbovírus, incluindo os quatro sorotipos da dengue (DENV 1-4), o vírus da febre amarela, chikungunya e zika.

Inicialmente, uma infecção artificial (“pico viral”) de todos os arbovírus descritos acima foi realizada no soro de voluntários saudáveis. Após a infecção, as amostras foram incubadas apenas à temperatura ambiente por 1 hora e então usadas para o ensaio RT-LAMP usando os mesmos primers e condições usadas para MAYV.

#### **Avaliação de sensibilidade analítica de RT-LAMP-PCR**

A sensibilidade analítica (limite de detecção) de RT-LAMP-PCR para detecção de MAYV 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 humanas, a cepa MAYV foi diluída em série em uma base de 10 vezes no soro de pacientes saudáveis. A concentração de vírus nas amostras infectadas variou de  $10^6$  PFU / ml a  $10^{-8}$  PFU (Figura 5). Após a diluição, as amostras foram testadas diretamente por RT-LAMP sem a necessidade de extração de RNA. Para comparar os resultados do RT-LAMP com a técnica atualmente mais utilizada para o diagnóstico de arbovírus, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições e posteriormente testado por RT-qPCR (Wagoner et al., 2018). A curva padrão foi feita a partir de triplicados de cada diluição em três experimentos independentes.

#### **Aprovação Ética**

Os estudos com amostras de pacientes seguiram rigorosamente as normas vigentes estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fiocruz / PE e atenderam a todas as exigências da Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi elaborado para todos os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa. O projeto foi aprovado pelo CEP sob o número CAAE: 43877521.4.0000.5195 e o número do parecer: 4.570.438.

#### **Análise estatística**

A análise Probit foi realizada para calcular o limite de detecção RT-LAMP-PCR para MAYV usando o software MedCalc (versão 18.11, MedCalc Software, Ostend, Bélgica).

## **RESULTADOS**

### **Primers**

Para desenhar os primers usados no RT-LAMP específico para cepas de MAYV, alinhamos e analisamos sequências genômicas completas de MAYV (31 sequências), CHIKV (22 sequências, 5 representadas na Figura 6), WEEV (1 sequência), VEEV (1 sequência), EEEV (1 sequência), DENV 1-4 (4 sequências) e ZIKV (1 sequência). A sequência da posição 91 a 518, região codificadora da proteína nsp1, foi selecionada para projetar os primers devido à sua alta similaridade entre os diferentes isolados de MAYV e divergência dos outros Alphaviruses e

Flavivirus analisados. Os seis primers RT-LAMP foram projetados usando o software PrimerExplorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>). Uma pesquisa BLAST do banco de dados de nucleotídeos do GenBank foi realizada usando sequências de primers selecionados para verificar a especificidade. Os primers usados no ensaio RT-LAMP foram sintetizados por um fornecedor comercial (IDT, Coralville, IA).

### **Otimização dos parâmetros de ensaio RT-LAMP**

As condições do ensaio RT-LAMP e as concentrações dos reagentes foram otimizadas a fim de padronizar as melhores condições a serem utilizadas no ensaio. As reações foram realizadas sob temperaturas variando de 50 ° C a 75 ° C e o tempo de incubação variando de 10 min a 30 min. Quanto aos reagentes, as concentrações ideais de Mg<sup>2+</sup> (variando de 2 mM a 10 mM), enzima Bst 3.0 (variando de 0,04 U/μl a 0,32 U/μl) e dNTPs (variando de 0,4 mM a 2,0 mM) Além disso, foi verificado se todos os primers, incluindo primers externos (F3 e B3), internos (FIP e BIP) e loop (LF e LB) eram necessários para realizar o ensaio RT-LAMP. Os melhores resultados de amplificação foram obtidos a 70 ° C por 30 min de incubação. Em relação aos reagentes, as concentrações ótimas foram 6 mM, 0,12 U / μl da enzima e 1,8 mM, respectivamente para os reagentes Mg<sup>2+</sup>, enzima Bst 3.0 e dNTPs. Observou-se também que a reação não necessita de todos os primers para sua execução, ela funciona sem os primers de loop (LF e LB). Após realizar a otimização de todos os parâmetros, foi estabelecido um protocolo padrão para a execução dos experimentos subsequentes.

### **Detecção de MAYV em amostras humanas e de mosquitos**

Em seguida, foi avaliada a capacidade do RT-LAMP-PCR para diagnosticar MAYV em amostras humanas e de mosquitos. Para avaliar as amostras de mosquitos, um bruto macerado de *Ae. aegypti* infectado com carga viral alta (1x10<sup>6</sup> PFU/mL) ou baixa (1x10<sup>3</sup> PFU/mL). Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram testadas diretamente por RT-LAMP-PCR, sem a necessidade de extração do RNA das amostras.

Para avaliar amostras humanas (soro, urina e saliva), elas foram infectadas com carga viral alta (1x10<sup>6</sup> PFU/mL) ou baixa (1x10<sup>3</sup> PFU/mL). Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram testadas diretamente por RT-LAMP-PCR, sem a necessidade de extração do RNA das amostras.

O ensaio RT-LAMP-PCR foi positivo para ambas as cargas virais testadas em todas as amostras. Além disso, foi observado que a extração de RNA não alterou o limite de detecção do RT-LAMP-PCR (dados não mostrados). Os resultados de RT-LAMP-PCR foram confirmados por RT-qPCR, em que o valor C<sub>q</sub> foi 15,1 e 26,1 em amostras de soro, 14,5 e 25,2

em amostras de urina, 16, 7 e 26,4 em amostras de saliva e 18,1 e 28,4 em amostras de mosquito para alta e carga viral baixa, respectivamente.

#### **Especificidade analítica de RT-LAMP para detecção de MAYV**

Para avaliar a especificidade do RT-LAMP-PCR na detecção de MAYV em amostras humanas, os primers foram testados contra outros arbovírus circulantes no Brasil: CHIKV (PE2016-480), YFV (17DD), ZIKV cepa asiática (PE-243), ZIKV Cepa africana (MR-766), DENV-1 (PE / 97-42735), DENV-2 (PE / 95-3808), DENV-3 (PE / 02-95016), DENV-4 (PE / 10 -0081) (Mesa 2). Uma infecção artificial em triplicado de todos os arbovírus descritos acima foi realizada em amostras de soro, e foi visto que apenas as amostras de soro infectadas artificialmente com MAYV foram positivas no RT-LAMP-PCR. Esses resultados sugerem que o RT-LAMP-PCR desenvolvido neste trabalho é altamente específico para detecção de MAYV e não apresenta reação cruzada com outros arbovírus importantes em circulação no Brasil.

#### **Sensibilidade analítica de RT-LAMP-PCR para detecção de MAYV**

Para avaliar o limite de detecção do ensaio (sensibilidade analítica), o ensaio RT-LAMP-PCR foi realizado em soro humano e em macerado de *Ae. aegypti* infectado experimentalmente com MAYV. Uma diluição em série de dez vezes de MAYV foi realizada no soro e em mosquitos variando de  $10^5$  PFU a  $10^{-7}$  PFU de MAYV. As amostras foram testadas diretamente por RT-LAMP-PCR sem extração de RNA. O RT-LAMP foi capaz de detectar uma ampla gama de concentrações de vírus (de  $10^5$  a  $10^{-5}$  PFU). A sensibilidade analítica de RT-LAMP-PCR foi de  $10^{-5}$  PFU/ml. Considerando as 10 repetições independentes do ensaio de sensibilidade analítica, a análise probit revelou que o limite de detecção com intervalo de confiança de 95% do RT-LAMP-PCR para detectar MAYV em amostras de soro foi de  $-3,73 \log_{10}$  PFU de MAYV ( $\sim 1/5370$  PFU) com intervalo de confiança de  $-4,65$  a  $-1,67$ . Em amostras de mosquitos, a análise Probit revelou que o limite de detecção com um intervalo de confiança de 95% foi  $-1,98 \log_{10}$  PFU de MAYV ( $\sim 1/95$  PFU) com um intervalo de confiança de  $-3,08$  a  $0,14$ .

Em seguida, o RNA viral das mesmas diluições foi extraído e testado por RT-qPCR. A sensibilidade analítica do RT-qPCR foi observada apenas até 100 PFU com um valor Cq de 35,8 em amostras de soro e 38,1 em amostras de *Ae. aegypti*. Os experimentos foram repetidos independentemente 10 vezes para permitir a análise de regressão probit para determinar com precisão o limite de detecção de RT-LAMP. Resultados de sensibilidade analítica semelhantes também foram obtidos em amostras de urina e saliva (dados não mostrados).

Esses resultados juntos demonstraram que o ensaio RT-LAMP-PCR foi aproximadamente 1000 vezes mais sensível do que o RT-qPCR descrito por Waggoner para detectar MAYV em amostras de soro (Waggoner, 2018).

## **Custos**

Foi realizado o cálculo do valor, em reais, do custo de realização de cada reação de RT-LAMP-PCR, de acordo com os valores em reais (R \$) de todos os reagentes necessários à realização das técnicas, inclusive os necessários à visualização de resultados. Observou-se que o valor de cada teste pelo RT-LAMP-PCR foi de aproximadamente R \$ 1,55 e para a realização de cada teste pelo RT-qPCR foi de aproximadamente R \$ 45,04. Esses resultados sugerem que o custo de nossa ferramenta diagnóstica para MAYV é aproximadamente 29 vezes mais barato quando comparado ao custo de um diagnóstico molecular por RT-qPCR, o padrão ouro para vários arbovírus no Brasil.

## **DISCUSSÃO**

A rápida detecção do MAYV em amostras humanas e de mosquitos é extremamente importante para o monitoramento da doença e para a compreensão da dinâmica viral em regiões favoráveis à circulação do vírus. Atualmente, o diagnóstico da Febre de Mayaro pode ser realizado por técnicas sorológicas ou moleculares como o isolamento viral ou RT-PCR. Porém, o diagnóstico diferencial não é realizado no dia a dia dos laboratórios de referência, o que pode levar à subnotificação da doença, principalmente em áreas de co-circulação de outros arbovírus devido à semelhança entre sinais e sintomas (OMS, 2020).

Após 13 casos de MAYV terem sido confirmados em menos de três meses na Guiana Francesa em 2020, a Organização Mundial da Saúde emitiu uma nota de alerta e destacou a necessidade de monitoramento de MAYV por meio de diagnóstico diferencial, como tem sido feito para outros arbovírus como CHIKV, ZIKV e DENV. Além disso, o número atípico de casos registrados em áreas urbanas (85% dos casos confirmados no país em 2020) destaca a necessidade de investigação epidemiológica, pois pode indicar que o vírus está circulando longe de áreas silvestres e rurais e que há transmissão rota urbana pode ser estabelecida (OMS, 2020; Mackay e Arden, 2016).

O ensaio RT-LAMP-PCR descrito ao longo deste trabalho representa uma plataforma sem precedentes, simples e rápida para a detecção de MAYV em uma etapa em amostras de soro humano, saliva e urina e em *Ae. aegypti* sem a necessidade de extração de RNA. Este é o primeiro trabalho em que um ensaio RT-LAMP-PCR foi desenvolvido para a detecção de MAYV.

Alguns grupos desenvolveram a tecnologia RT-LAMP-PCR para detecção molecular de outros arbovírus. Em ensaios desenvolvidos para o diagnóstico de CHIKV, um membro do mesmo gênero e família que MAYV, os primers foram desenhados usando as sequências alvo da região

E1 (Parida et al., 2007; Lu et al., 2012), 6K e E1 (Lopez -Jimena et al. 2018) ou região E1 e nsp1 (Saechue et al., 2020). Após os testes usando os conjuntos de primers projetados, os conjuntos cuja sequência alvo era a região E1 foram selecionados (Lopez-Jimena et al., 2018; Saechue et al., 2020). Em contraste, no ensaio desenvolvido durante este trabalho, a sequência alvo selecionada para projetar os primers foi a região codificadora da proteína nsp-1, pois era a região mais conservada entre as sequências genômicas de diferentes isolados de MAYV e divergente de outros Alphavírus e Flavivírus analisado e co-circulante no Brasil.

Atualmente, o diagnóstico laboratorial do MAYV depende do contexto epidemiológico e é realizado após uma amostra suspeita de CHIKV ser negativa para CHIKV por RT-PCR ou apenas positiva quando testada por métodos sorológicos como ELISA e PRNT (PAHO, 2019). Porém, essas técnicas apresentam várias limitações, como tempo e custo elevados, necessidade de equipamentos sofisticados e mão de obra especializada.

Além disso, diversos arbovírus como CHIKV, DENV e ZIKV co-circulam em diferentes regiões do país. Uma limitação potencial das técnicas sorológicas atualmente disponíveis é a possibilidade de reação cruzada com outros Alphaviruses, especialmente com o CHIKV que pertence à mesma família do MAYV. A infecção por MAYV também pode ser clinicamente diagnosticada como DENV e ZIKV devido à semelhança entre os sintomas, o que pode levar à subnotificação da doença, especialmente durante surtos desses arbovírus. Neste trabalho, desenvolvemos um teste específico para MAYV, que quando testado contra outros arbovírus co-circulantes no Brasil, como CHIKV, ZIKV, YFV e os quatro sorotipos DENV, não apresentou reação cruzada.

Os limites de detecção dos ensaios de RT-LAMP-PCR desenvolvidos para CHIKV foram 20, 27 e 10 moléculas de RNA e 8 PFU / tubo detectados por reação em 30, 77, 45 e 30 minutos respectivamente (Parida et al., 2007; Lopez-Jimena et al., 2018; Saechue et al., 2020). No entanto, os autores não explicaram se esses limites de detecção foram calculados por meio de análise probit ou por um determinado número de repetições, com exceção de Lopez-Jimena et al. que relatou o limite de detecção de 163 cópias de RNA detectadas em 40,2 minutos após a análise probit e 10 cópias de RNA detectadas 45 minutos.

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram nenhum conflito de interesse.

## **REFERÊNCIAS**

FIGUEIREDO, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 6, p. 677-83, Nov-Dec 2014. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25626645> >.

GANJIAN N, RIVIERE-CINNAMOND A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica*. 2020;44:e14. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.14>.

TERZIAN, Ana Carolina B. et al. Isolation and Characterization of Mayaro Virus from a Human in Acre, Brazil. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 92, n. 2, p.401-404, 4 fev. 2015. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.14-0417>.

HALSEY, E.S., SILES, C., GUEVARA, C., VILCARROMERO, S., JHONSTON, E.J., et al. (2013) Mayaro virus infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. **Emerg Infect Dis** 19. 1839–1842.

MINISTERIO DA SAUDE, B. Mayaro. **Situação Epidemiológica**. Dados 2015.

LONG KC, ZIEGLER SA, THANGAMANI S, et al. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:750–7.

LOPEZ-JIMENA, B. et al. Development of a single-tube one-step RT-LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 5, p. e0006448, May 2018. ISSN 1935-2735 (Electronic)1935-2727 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29813065> >.

Mackay IM, Arden KE. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? **Microbes Infect**. 2016 Dec;18(12):724-734. doi: 10.1016/j.micinf.2016.10.007. Epub 2016 Oct 27. PMID: 27989728.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento de casos de febre do Mayaro e febre do Oropouche até a Semana Epidemiológica 35, 2019**: Experiência do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS). 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre do Mayaro**. 2020.

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**, v. 18, n. 6, p. 407-21, Nov-Dec 2008. ISSN 1052-9276 (Print) 1052-9276 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18716992> >.

PAHO. **Pan American Health Organization**. Epidemiological Alert Mayaro Fever. 2019

QUOC, Nguyen Bao et al. Closed tube loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of hepatitis B virus in human blood. **Heliyon**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.00561-00571, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00561>.

SAECHUE, Benjawan; KAMIYAMA, Naganori; WANG, Yinan; FUKUDA, Chiaki; WATANABE, Kei; SOGA, Yasuhiro; GOTO, Mizuki; DEWAYANI, Astri; ARIKI, Shimpei; HIROSE, Haruna. Development of a portable reverse transcription loop-mediated isothermal

amplification system to detect the E1 region of Chikungunya virus in a cost-effective manner. **Genes To Cells**, [S.L.], p. 1-4, 22 jul. 2020. Wiley.

VIEIRA, C. J. et al. Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Trop**, v. 147, p. 12-6, Jul 2015. ISSN 1873-6254 (Electronic)0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25817238> >.

WAGGONER, J. J. et al. Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine. **J Clin Virol**, v. 98, p. 1-4, Jan 2018. ISSN 1873-5967 (Electronic) 1386-6532 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29172075> >.

OMS. **Organização Mundial da Saúde**. Mayaro virus disease - French Guiana, France. 2020.