

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
DOUTORADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

SEVERINO JEFFERSON RIBEIRO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE PLATAFORMAS DO TIPO “*Point-of-Care*” PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EMERGENTES

RECIFE

2021

**SEVERINO JEFFERSON RIBEIRO DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE PLATAFORMAS DO TIPO “*Point-of-Care*” PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EMERGENTES**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientador:** Dr. Lindomar José Pena (Fiocruz/PE)

**Co-orientador:** Dr. Keith Pardee (University of Toronto – Canadá)

RECIFE

2021



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

S586d	<p>Silva, Severino Jefferson Ribeiro da Silva. Desenvolvimento e validação de plataformas do tipo Point-of-Care para o diagnóstico molecular de arbovírus emergentes / Severino Jefferson Ribeiro da Silva. — Recife: [s.n.], 2021. 373 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.</p> <p>Tese (doutorado) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021. Orientador: Lindomar José Pena; coorientador: Keith Pardee. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.</p> <p>1. Zika virus - isolamento &amp; purificação. 2. Chikungunya. 3. Infecção pelo Zika virus - diagnóstico. 4. Reação em Cadeia da Polimerase Via Transcriptase Reversa - métodos. 5. Técnicas Biossensoriais. 6. Culicidae - virologia. 7. Custos e Análise de Custo. 8. Estudos de Avaliação. 9. Sensibilidade e Especificidade. 10. Insetos Vetores. 11. Técnicas e Procedimentos Diagnósticos. I. Pena, Lindomar José. II. Pardee, Keith.</p>	CDU 616.92
-------	---	------------

**SEVERINO JEFFERSON RIBEIRO DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE PLATAFORMAS DO TIPO “*Point-of-Care*” PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EMERGENTES**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 13/12/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Lindomar José Pena (Orientador)

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

---

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos (Titular)

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

---

Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Titular)

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

---

Dr. Abelardo Silva Júnior (Titular)

Departamento de Veterinária/Universidade Federal de Viçosa (UFV)

---

Dr. Ronaldo Nascimento de Oliveira (Titular)

Departamento de Química/Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

*Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a minha terna gratidão por ter me sustentado até aqui. A Deus, toda honra e toda glória! Aos meus pais, Jacinta Ribeiro da Silva e José Severino da Silva (*in memorian*), por todo amor, cuidado, força, renúncia, carinho, dedicação, incentivo e por terem acreditado tanto nos meus sonhos, até mais do que eu mesmo. Foi tudo para vocês e por vocês! Agradeço também a todos os meus outros familiares.

Ao meu orientador, Dr. Lindomar Pena, pela confiança, apoio, incentivo, empenho, aprendizado e momentos de alegria proporcionados ao longo de toda minha trajetória acadêmica. O senhor é um espelho que irei levar pelo o resto da vida!

Ao meu co-orientador, Dr. Keith Pardee, por toda atenção, aprendizado e oportunidade de ir viver um dos maiores sonhos da minha vida.

A minha namorada e companheira, Larissa Krokovsky, por todo amor, carinho, cuidado, apoio e compreensão ao longo desta jornada. A caminhada ficou muito mais fácil ao seu lado. Obrigado por tanto!

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

A família Krokovsky, por todo incentivo, apoio, amor e almoço dos dias de domingo.

Ao grupo de pesquisa no qual faço parte (Virology at Fiocruz), por toda motivação, força e momentos de alegria ao longo do doutorado.

À equipe do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (Lavite) – Departamento de Virologia, por todos os momentos vividos ao longo desta jornada.

Ao grupo do Dr. Keith Pardee, por todo aprendizado.

Aos meus amigos da vida, Felipe Augusto, Rayan Feitoza, Maxsuel Ferreira e Vamberto Souza, por todo amor, atenção, incentivo e por terem segurado a minha mão quando mais precisei. Vocês fazem parte desta história!

Aos amigos que fiz no Instituto Aggeu Magalhães, em especial a Renata Mendes, Caroline Targino, Bárbara Nazly, Elisa Almeida, Marília Sena, Morganna Costa, Louise Guimarães, Jurandy Magalhães, Poliana Gomes, Carol Simões, Klarissa Miranda, Fábica Cruz, Vanessa Portela, Thiago Soares, Alexandre Freitas, Filipe Zimmer, Júnior Silva, Laís Ceschini, Aline Peixoto, Luísa Maria e Lucas Sousa, por todo o companheirismo, conselhos, incentivo, carinho, atenção e momentos de descontração.

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

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

À equipe da secretaria acadêmica do curso de Pós-Graduação, por terem sido sempre atenciosos e prestativos.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

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

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

SILVA, Severino Jefferson Ribeiro da. **Desenvolvimento e validação de plataformas do tipo “Point-of-Care” para o diagnóstico molecular de arbovírus emergentes.** 2021. Tese (Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

## RESUMO

As arboviroses, como as provocadas pelo o vírus Zika (ZIKV) e o vírus chikungunya (CHIKV), têm sido associadas a surtos em larga escala e epidemias em vários países de clima tropical e subtropical nos últimos anos. Atualmente, o diagnóstico dos pacientes infectados por estes vírus é realizado em laboratórios centralizados utilizando a reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR), que, embora seja o método molecular padrão-ouro para o diagnóstico molecular, tem várias desvantagens para uso em áreas remotas e de poucos recursos, como alto custo e necessidade de equipamentos especializados. Essas desvantagens dificultam a aplicação e utilização para um grande número de amostras. As plataformas de diagnóstico point-of-care (POC) têm o potencial de superar essas limitações, especialmente em países em desenvolvimento. Com isso em mente, nós desenvolvemos e validamos duas plataformas de diagnóstico baseadas em RT-LAMP e biossensores moleculares para a detecção rápida do ZIKV e CHIKV em amostras de pacientes e amostras de mosquitos. O RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV em diversos tipos de amostras (soro, urina, saliva e sêmen) em apenas 20 minutos, sem extração de RNA. O ensaio RT-LAMP foi altamente específico e até 100 vezes mais sensível do que RT-qPCR. Em seguida, validamos o ensaio com 100 amostras de soro de pacientes coletadas de casos suspeitos de infecção por arbovírus no estado de Pernambuco, epicentro da última epidemia de Zika. Comparado com a RT-qPCR, o ensaio RT-LAMP forneceu sensibilidade de 100%, especificidade de 93,75% e uma precisão geral de 95,00%. Por outro lado, os biossensores moleculares apresentaram sensibilidade similar e alta especificidade quando comparado a RT-qPCR. Na sequência, validamos os biossensores com 268 amostras clínicas e as análises demonstraram sensibilidade de 94,52%, especificidade de 100% e uma precisão geral de 98,51%. Demonstrando a programabilidade e extensibilidade de ambas as plataformas de diagnóstico, alcançamos um desempenho de diagnóstico semelhante para a detecção do CHIKV em soro, saliva, urina e amostras de mosquitos. Por fim, também foi otimizado um método alternativo de extração do RNA baseado em fervura acoplado a técnica de RT-qPCR para a detecção molecular do ZIKV. Tomados em conjunto, o ensaio RT-LAMP e os biossensores moleculares fornecem duas alternativas promissoras e de baixo custo para o diagnóstico rápido do ZIKV e CHIKV e possuem o potencial de aumentar a capacidade diagnóstica em áreas afetadas por estes arbovírus emergentes, particularmente em países com baixa infraestrutura laboratorial.

Palavras-chave: CHIKV; Diagnóstico; Pacientes; Mosquitos; ZIKV.

SILVA, Severino Jefferson Ribeiro da. **Development and validation of "Point-of-Care" platforms for molecular diagnosis of emerging arboviruses.** 2021. Thesis (Academic Doctorate's Degree in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2021.

## ABSTRACT

Arboviruses such as those caused by the Zika virus (ZIKV) and the chikungunya virus (CHIKV) have been associated with large-scale outbreaks and epidemics in several tropical and subtropical countries in recent years. Currently, the diagnosis of patients is performed in centralized laboratories using the reverse transcriptase reaction followed by the quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), which, although it is the gold standard molecular method for molecular diagnosis, has several disadvantages for use in remote areas with low resources, such as high cost and need for specialized equipment. These drawbacks make it difficult to apply and use for a large number of samples. Point-of-care (POC) diagnostic platforms have the potential to overcome these limitations, especially in developing countries. With this in mind, we developed and validated two assays including RT-LAMP and molecular biosensors for the rapid detection of ZIKV and CHIKV in patient and mosquito samples. RT-LAMP was able to detect ZIKV in several types of samples (serum, urine, saliva and semen) in just 20 minutes, without RNA extraction. The RT-LAMP assay was highly specific and up to 100 times more sensitive than RT-qPCR. Then, we validated the assay with 100 serum samples from patients collected from suspected cases of arbovirus infection in the state of Pernambuco, the epicenter of the last Zika epidemic. Analysis of the results, compared to RT-qPCR, found that the RT-LAMP assay provided sensitivity of 100%, specificity of 93.75% and overall accuracy of 95.00%. On the other hand, molecular biosensors showed similar sensitivity and high specificity when compared to RT-qPCR. Then, we validated the biosensors with 268 clinical samples and the analyzes showed sensitivity of 94.52%, specificity of 100% and an overall accuracy of 98.51%. Demonstrating the approach's programmability and extensibility, we then achieved similar diagnostic performance for the detection of CHIKV in serum, saliva, urine, and mosquito samples. Finally, an alternative method of RNA extraction based on boiling coupled with the RT-qPCR technique was also optimized for the molecular detection of ZIKV. Taken together, the RT-LAMP assay and molecular biosensors provide two promising and low-cost alternatives for the rapid diagnosis of ZIKV and CHIKV and have the potential to increase diagnostic capacity in areas affected by these emerging arboviruses, particularly in countries with low laboratory infrastructure.

**Keywords:** CHIKV; Diagnosis; Patients; Mosquitoes; ZIKV



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Histórico epidemiológico do ZIKV. ....	27
Figura 2 - Histórico epidemiológico do CHIKV. ....	29
Figura 3 - Morfologia e organização genômica do ZIKV. ....	31
Figura 4 - Árvore filogenética demonstrando as duas grandes linhagens do ZIKV incluindo a Asiática e Africana. ....	33
Figura 5 - Morfologia e organização genômica do CHIKV. ....	34
Figura 6 - Árvore filogenética demonstrando as principais linhagens do CHIKV. ....	35
Figura 7 - Ciclo de transmissão. ....	38
Figura 8 - Manifestações clínicas predominantemente observadas em pacientes infectados pelo ZIKV. ....	41
Figura 9 - Achados clínicos em recém-nascidos com a síndrome congênita do Zika. ....	44
Figura 10 - Achados clínicos em pacientes infectados com o CHIKV. ....	47
Figura 11 - Progressão clínica da infecção causada pelo ZIKV. ....	49
Figura 12 - Progressão clínica da infecção causada pelo CHIKV. ....	50
Figura 13 - Representação esquemática dos principais ensaios sorológicos (ELISA, PRNT e testes rápidos) empregados no diagnóstico do ZIKV e CHIKV. ....	53
Figura 14 - Representação esquemática da RT-qPCR utilizada para o diagnóstico molecular do ZIKV e CHIKV. ....	55
Figura 15 - Mecanismo de funcionamento da técnica LAMP. ....	57
Figura 16 - Mecanismo de funcionamento dos ribossensores moleculares. ....	64
Figura 17 - Fluxograma para o desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico rápido. ....	65
Figura 18 - Fluxograma demonstrando as etapas envolvidas para a produção dos sensores “switch” e gatilhos “trigger”. ....	78
Figura 19 - Esquema demonstrando o mecanismo de funcionamento da reação NASBA. ....	80
Figura 20 - <i>Layout</i> utilizado para a aplicação dos reagentes e amostras na placa de reação dos biossensores moleculares. ....	81
Figura 21 - Leitor eletrônico óptico dos biossensores moleculares. ....	82
Figura 22 - Fluxograma do ensaio RT-LAMP. ....	88
Figura 23 - Detecção do ZIKV em amostras biológicas humanas experimentalmente infectadas. ....	90
Figura 24 - Especificidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em soro humano. ....	92

Figura 25 - Sensibilidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em soro humano. .....	94
Figura 26 - Limite de detecção do ensaio RT-LAMP analisado através da análise de Probit.	95
Figura 27 - Validação do RT-LAMP para o diagnóstico do ZIKV com amostras de pacientes. .....	96
Figura 28 - Eletroferograma dos <i>amplicons</i> sequenciados pelo método de Sanger a partir reações positivas para o ZIKV de soro humano pelo RT-LAMP.....	98
Figura 29 - Otimização das concentrações dos reagentes e condições do ensaio RT-LAMP para detecção do CHIKV.....	100
Figura 30 - Detecção do CHIKV em amostras humanas e de mosquitos experimentalmente infectadas.....	102
Figura 31 - Especificidade analítica do RT-LAMP para a detecção do CHIKV. ....	103
Figura 32 - Sensibilidade analítica do RT-LAMP para a detecção do CHIKV em soro humano. ....	104
Figura 33 - Validação do RT-LAMP para o diagnóstico do CHIKV com amostras de pacientes. ....	105
Figura 34 - Detecção do CHIKV pelo RT-LAMP em amostras clínicas que estavam no limite de detecção pela RT-qPCR.....	106
Figura 35 - Eletroferograma dos <i>amplicons</i> sequenciados pelo método de Sanger a partir reações positivas para o CHIKV de soro humano pelo RT-LAMP. ....	108
Figura 36 - Especificidade analítica do biossensores moleculares para a detecção do ZIKV. .....	110
Figura 37 - Sensibilidade analítica do biossensores moleculares para a detecção do ZIKV..	112
Figura 38 - Validação do biossensores moleculares para o diagnóstico do ZIKV utilizando amostras de pacientes. ....	114
Figura 39 - Especificidade analítica dos biossensores moleculares para a detecção do CHIKV. .....	117
Figura 40 - Sensibilidade analítica dos biossensores moleculares para a detecção do CHIKV. .....	119
Figura 41 - Validação do biossensores moleculares para o diagnóstico do CHIKV empregando amostras de pacientes.....	121
Figura 42 - Esquema do método alternativo de extração do RNA acoplado a técnica de RT-qPCR para a detecção do ZIKV. ....	123
Figura 43 - Inativação por fervura do ZIKV confirmado por ensaio de placa. ....	126

Figura 44 - Valores de Cq obtidos a partir de amostras submetidas aos dois métodos de extração avaliados (Kit e Fervura)..... 128

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estruturas do genoma do ZIKV.....	30
Quadro 2 – Ensaio baseado no LAMP para detecção do ZIKV.....	59
Quadro 3 – Ensaio baseado no LAMP para detecção do CHIKV.....	61
Quadro 4 – <i>Primers</i> utilizados no ensaio RT-LAMP para detecção do ZIKV.....	75
Quadro 5 – <i>Primers</i> utilizados no ensaio RT-LAMP para detecção do CHIKV. ....	76
Quadro 6 – <i>Primers</i> empregados na linearização dos plasmídeos pCOLA Duet e pET-15.....	78
Quadro 7 – <i>Primers</i> empregados na reação NASBA. ....	79
Quadro 8 – <i>Primers</i> utilizados na RT-qPCR. ....	83
Quadro 9 – Arbovírus utilizados para avaliar a especificidade do ensaio RT-LAMP. ....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limite de detecção do RT-LAMP calculado através da análise de Probit. ....	93
Tabela 2 – Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para o diagnóstico molecular do ZIKV em amostras de pacientes. ....	97
Tabela 3 – Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para o diagnóstico molecular do CHIKV em amostras de pacientes. ....	107
Tabela 4 – Desempenho diagnóstico do biossensores moleculares do tipo “ <i>toehold switch</i> ” para detecção do ZIKV em amostras de pacientes. ....	115
Tabela 5 – Desempenho diagnóstico do biossensores moleculares do tipo “ <i>toehold switch</i> ” para detecção do CHIKV em amostras de pacientes. ....	122
Tabela 6 – Ensaio de liberação do RNA do ZIKV através do tratamento térmico. ....	125
Tabela 7 – Desempenho diagnóstico do método alternativo baseado em fervura para detecção do ZIKV em amostras de pacientes. ....	129

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>cDNA</b>	Complementary DNA
<b>Cq</b>	Cycle quantification
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>dNTPs</b>	Deoxynucleotides
<b>DENV</b>	Dengue virus
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>Fiocruz</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>h</b>	Hora
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>JEV</b>	Japanese encephalitis virus
<b>ZIKV</b>	Zika virus
<b>IAM</b>	Instituto Aggeu Magalhães
<b>kb</b>	Kilobases
<b>LACEN</b>	Laboratório Central de Saúde Pública “Dr Milton Bezerra Sobral”
<b>LAVITE</b>	Departamento de Virologia e Terapia Experimental
<b>µL</b>	Microlitro
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnésio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>NASBA</b>	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
<b>NTC</b>	Non template control
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PE</b>	Pernambuco
<b>PFU</b>	Plaque forming unit
<b>PRNT</b>	Plaque reduction neutralization test
<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>RT-qPCR</b>	Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real
<b>SIBA</b>	Strand Invasion Based Amplification
<b>SYBR</b>	Sybr Green
<b>+ssRNA</b>	Positive sense, single-stranded RNA
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>UTRs</b>	Untranslated region
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Vero</b>	Células primárias de rins de macaco verde africano
<b>WNV</b>	West Nile virus
<b>YFV</b>	Yellow Fever virus

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Histórico e epidemiologia do ZIKV .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Histórico e epidemiologia do CHIKV .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Características moleculares e genéticas do ZIKV.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4 Características moleculares e genéticas do CHIKV .....</b>	<b>33</b>
<b>2.5 Transmissão.....</b>	<b>35</b>
<b>2.6 Manifestações clínicas associadas à infecção pelo ZIKV.....</b>	<b>40</b>
<b>2.6.1 Síndrome congênita do Zika (SCZ) .....</b>	<b>42</b>
<b>2.6.2 Manifestações neurológicas associadas à infecção pelo vírus Zika.....</b>	<b>45</b>
<b>2.7 Manifestações clínicas associadas à infecção pelo CHIKV .....</b>	<b>46</b>
<b>2.8 Diagnóstico.....</b>	<b>47</b>
<b>2.8.1 Diagnóstico clínico e progressão clínica.....</b>	<b>47</b>
<b>2.8.2 Diagnóstico laboratorial.....</b>	<b>50</b>
<b>2.8.2.1 Isolamento viral.....</b>	<b>50</b>
<b>2.8.2.2 Métodos sorológicos.....</b>	<b>51</b>
<b>2.8.3 Métodos moleculares para o diagnóstico de arbovírus emergentes.....</b>	<b>53</b>
<b>2.8.3.1 RT-qPCR.....</b>	<b>54</b>
<b>2.8.3.2 RT-LAMP.....</b>	<b>56</b>
<b>2.8.4.3 Biossensores .....</b>	<b>62</b>
<b>2.9 Tratamento, prevenção e controle.....</b>	<b>65</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>67</b>
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA.....</b>	<b>68</b>
<b>5 HIPÓTESE.....</b>	<b>69</b>
<b>6 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>70</b>
<b>6.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>70</b>
<b>7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....</b>	<b>71</b>
<b>7.1 Células e vírus .....</b>	<b>71</b>
<b>7.2 Extração de RNA .....</b>	<b>72</b>
<b>7.2.1 Extração de RNA por kit .....</b>	<b>72</b>
<b>7.2.2 Extração de RNA por fervura .....</b>	<b>72</b>



7.3 Titulação viral por ensaio de placa.....	72
7.4 RT-LAMP.....	73
7.5 Biossensores moleculares.....	76
7.5.1 Produção dos sensores “switch” e gatilhos “trigger” .....	76
7.5.2 Reação NASBA .....	79
7.5.3 Reação dos biossensores moleculares do tipo “toehold switch” .....	80
7.6 RT-qPCR .....	82
7.7 Detecção dos arbovírus em amostras biológicas humanas sob condições controladas.....	84
7.8 Avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “toehold switch” .....	84
7.9 Avaliação da sensibilidade analítica do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “toehold switch” .....	85
7.10 Validação do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “toehold switch” .....	85
7.11 Sequenciamento dos <i>amplicons</i> obtidos no ensaio RT-LAMP.....	86
7.12 Considerações éticas .....	87
7.13 Análise estatísticas .....	87
<b>8 RESULTADOS .....</b>	<b>88</b>
8.1 Ensaio RT-LAMP para detecção do ZIKV .....	88
8.1.1 Detecção do ZIKV em amostras biológicas humanas sob condições controladas ...	89
8.1.2 Especificidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV .....	90
8.1.3 Sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV em soro humano ...	92
8.1.4 Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para diagnosticar o ZIKV em amostras de pacientes .....	95
8.2 Ensaio RT-LAMP para detecção do CHIKV .....	99
8.2.1 Padronização do ensaio RT-LAMP para detecção do CHIKV .....	99
8.2.2 Detecção do CHIKV em amostras biológicas humanas e mosquitos sob condições controladas .....	101
8.2.3 Especificidade analítica do RT-LAMP para detecção do CHIKV.....	102
8.2.4 Sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção do CHIKV.....	104
8.2.5 Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para diagnosticar o CHIKV em amostras de pacientes .....	105
8.3 Avaliação dos biossensores moleculares para o diagnóstico molecular do ZIKV	109
8.3.1 Especificidade analítica dos biossensores moleculares para detecção do ZIKV ...	109

<b>8.3.2 Sensibilidade analítica dos biossensores moleculares para detecção do ZIKV .....</b>	<b>111</b>
<b>8.3.3 Desempenho diagnóstico dos biossensores moleculares para diagnosticar o ZIKV em amostras de pacientes.....</b>	<b>113</b>
<b>8.4 Avaliação dos biossensores moleculares para o diagnóstico molecular do CHIKV .....</b>	<b>116</b>
<b>8.4.1 Especificidade analítica dos biossensores moleculares para detecção do CHIKV</b>	<b>116</b>
<b>8.4.2 Sensibilidade analítica dos biossensores moleculares para detecção do CHIKV ..</b>	<b>118</b>
<b>8.4.3 Desempenho diagnóstico dos biossensores moleculares para diagnosticar o CHIKV em amostras de pacientes.....</b>	<b>120</b>
<b>8.5 Avaliação do método alternativo de extração do RNA baseado em fervura acoplado a técnica de RT-qPCR para a detecção molecular do ZIKV.....</b>	<b>123</b>
<b>8.5.1 Otimização do método alternativo de extração do RNA do ZIKV baseado em fervura .....</b>	<b>124</b>
<b>8.5.2 Desempenho diagnóstico do método alternativo de extração do RNA baseado em fervura para diagnosticar o ZIKV em amostras clínicas.....</b>	<b>127</b>
<b>9 DISCUSSÃO .....</b>	<b>130</b>
<b>10 CONCLUSÕES.....</b>	<b>139</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>140</b>
<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....</b>	<b>158</b>
<b>ANEXO A - Aprovação no Comitê de Ética.....</b>	<b>160</b>
<b>ANEXO B - Aprovação no Comitê de Ética.....</b>	<b>163</b>
<b>ANEXO C - Aprovação no Comitê de Ética.....</b>	<b>167</b>
<b>ANEXO D – Minuta da patente depositada .....</b>	<b>171</b>
<b>ANEXO E – Artigos referentes a tese de doutorado .....</b>	<b>203</b>
<b>ANEXO F – Outros artigos produzidos durante o doutorado .....</b>	<b>210</b>
<b>ANEXO G – Material suplementar artigo publicado.....</b>	<b>224</b>
<b>ANEXO H – Material suplementar do artigo publicado .....</b>	<b>238</b>
<b>ANEXO I – Material suplementar do artigo publicado.....</b>	<b>270</b>
<b>ANEXO J – Material suplementar do artigo em fase de submissão .....</b>	<b>281</b>
<b>ANEXO K – Artigos completos relacionados ao doutorado.....</b>	<b>281</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As arboviroses, como as provocadas pelo o vírus Zika (ZIKV), vírus da dengue (DENV) e vírus chikungunya (CHIKV), têm sido associadas a surtos em larga escala e epidemias em vários países de clima tropical e subtropical nos últimos anos, particularmente devido à presença abundante do mosquito vetor e a ausência de alternativas profiláticas e vacinas eficazes para o controle e prevenção, gerando assim, implicações sérias para o serviço de saúde pública dos países acometidos (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). Em meio a emergência e re-emergência de vários arbovírus no Brasil nos últimos anos, é importante destacar a emergência do ZIKV e CHIKV em meados de 2013-2014 (CAMPOS *et al.*, 2018).

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika, Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Nos 60 anos seguintes após a sua descoberta, poucos casos de infecção pelo ZIKV foram relatados em humanos e o vírus permaneceu como um patógeno obscuro e até então considerado negligenciado até abril de 2007, quando o ZIKV causou um surto na Ilha de Yap, Estados Federados da Micronésia e, subseqüentemente, se espalhou rapidamente pelo Pacífico causando surtos na Polinésia Francesa, Ilhas Cook, Ilha de Páscoa e Nova Caledônia (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014; DUFFY; CHEN *et al.*, 2009; FAYE *et al.*, 2013; GATHERER; KOHL, 2016; IOOS *et al.*, 2014; LANCIOTTI *et al.*, 2008; MUSSO, 2015). O ZIKV foi então introduzido nas Américas, possivelmente em 2013, e em maio de 2015, o primeiro caso de infecção pelo ZIKV foi reportado no Brasil (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; CAMPOS *et al.*, 2018; FARIA *et al.*, 2016). Desde então, o vírus se espalhou rapidamente pelas Américas e se tornou uma ameaça global. Além da febre Zika, o vírus foi responsável por um grave surto de microcefalia e outras anomalias congênitas observadas em neonatos nascidos de mães infectadas durante a gravidez, bem como muitos casos de doenças neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) em pacientes infectados (BRASIL *et al.*, 2016; BRITO FERREIRA *et al.*, 2017; CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; MENESES *et al.*, 2017; PETERSEN *et al.*, 2016; RASMUSSEN *et al.*, 2016). Semelhante ao ZIKV, o primeiro caso reportado de infecção pelo CHIKV ocorreu no continente africano entre 1952-1953 (LUMSDEN, 1955). Desde então, vários surtos ocorreram em todo o continente africano (POWERS *et al.*, 2000; ROBINSON, 1955). Entretanto, as preocupações com o CHIKV aumentaram consideravelmente no início do século XXI, quando o vírus foi reportado em vários países ao redor do mundo (REZZA *et al.*, 2007; THIBERVILLE *et al.*, 2013). Em 2013, o CHIKV chegou nas Américas, inicialmente se

espalhando no Caribe, antes de chegar ao Brasil em 2014 (NUNES *et al.*, 2015). Desde então, o CHIKV se tornou endêmico no Brasil e tem sido associado a uma elevada morbidade (DE LIMA *et al.*, 2021).

O ZIKV e CHIKV são transmitidos majoritariamente aos humanos através da picada de mosquitos fêmeas infectadas do gênero *Aedes*, principalmente as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, embora outras espécies de mosquitos também possam estar envolvidas na cadeia de transmissão (DIALLO *et al.*, 2014; ELIZONDO-QUIROGA *et al.*, 2018; GIRON *et al.*, 2019; GUEDES *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2016; MARTINET *et al.*, 2019; SMARTT *et al.*, 2018). Além da transmissão vetorial, o ZIKV pode ser transmitido por meio de relações sexuais e transfusões de sangue, bem como durante a gravidez, enquanto relatos sugerem que o CHIKV pode ser transmitido através da transmissão vertical (CUNHA *et al.*, 2016; GREGORY *et al.*, 2017; HILLS *et al.*, 2016; MUSSO *et al.*, 2014; RAMFUL *et al.*, 2007).

Clinicamente, a manifestação clínica observada durante as infecções pelo ZIKV, CHIKV e DENV se sobrepõe significativamente, o que torna o diagnóstico clínico extremamente difícil (DUFFY *et al.*, 2009; MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014). Nesse contexto, ferramentas de diagnóstico exercem um papel crucial na identificação e diferenciação do agente etiológico da doença (PETERSEN *et al.*, 2016; WIKAN; SMITH, 2016). No contexto laboratorial, as infecções causadas pelo ZIKV e CHIKV podem ser diagnosticadas através da utilização de métodos sorológicos e métodos moleculares. As técnicas sorológicas disponíveis incluem o teste de neutralização por redução de placa (PRNT), ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) e ensaios de fluxo lateral para detecção de anticorpos IgM ou IgG no soro do paciente (LANCIOTTI *et al.*, 2008; WAGGONER; PINSKY, 2016). No entanto, a reatividade cruzada com outros vírus em ensaios sorológicos limita sua utilidade em regiões há a circulação de outros arbovírus, como é o caso do Brasil.

Atualmente, a técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) é considerada o método molecular padrão ouro para o diagnóstico do ZIKV e CHIKV e tem sido empregada com sucesso para detectar esses arbovírus em vários tipos de amostras biológicas (LANCIOTTI *et al.*, 2007; LANCIOTTI *et al.*, 2008). Entretanto, a RT-qPCR é uma técnica cara, requer mão-de-obra qualificada, acesso a eletricidade, processamento laborioso das amostras (extração do RNA) e necessita de equipamentos sofisticados para amplificação e detecção do genoma viral, o que acaba centralizando o diagnóstico. Juntas, estas desvantagens impactam negativamente o estabelecimento de programas eficazes de controle da doença causada por arbovírus emergentes e re-emergentes, especialmente em áreas remotas. Além disso, a pandemia de COVID-19 agravou essa situação

no Brasil, uma vez que a maioria dos recursos diagnósticos tiveram que ser redirecionados para a detecção do SARS-CoV-2 (SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021).

Apesar das técnicas sorológicas e moleculares serem utilizadas para o diagnóstico de arbovírus na rotina laboratorial, ainda permanece a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas que possam ser utilizadas para o diagnóstico dos pacientes infectados de forma simples e prática, promovendo assim, a descentralização do diagnóstico (MATTHEWS *et al.*, 2020). A técnica de transcrição reversa seguida de amplificação isotérmica mediada por alça (RT-LAMP) representa uma ferramenta rápida, simples e robusta para a amplificação rápida de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) em temperatura isotérmica (NOTOMI *et al.*, 2000). O RT-LAMP apresenta muitas vantagens em comparação a outros métodos moleculares, incluindo baixo custo, conveniência, alta sensibilidade e especificidade, o que torna um método poderoso para diagnóstico do tipo “*Point-of-care*” (POC) (NEMOTO *et al.*, 2010). Devido a essas vantagens e o potencial para aplicação no campo, muitos ensaios foram desenvolvidos baseados na técnica de LAMP para o diagnóstico do ZIKV e CHIKV desde a emergência desses vírus nas Américas (HAYASHIDA *et al.*, 2019; LOPEZ-JIMENA *et al.*, 2018; SAECHUE *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2019; SILVA; PARDEE; PENA, 2019). No entanto, muitos desses ensaios ainda requerem equipamentos sofisticados, reagentes caros ou protocolos laboriosos para amplificação e detecção do genoma viral, o que limita sua aplicabilidade em países com poucos recursos e baixa infraestrutura laboratorial.

Além do RT-LAMP, os biossensores representam outro método alternativo de detecção de arbovírus emergentes com alto rendimento. Desde a emergência do ZIKV e CHIKV nas Américas, vários grupos de pesquisa de diferentes partes do mundo também se concentraram em modalidades alternativas de detecção baseadas em sensores com a finalidade de reduzir o uso de equipamentos caros, mão-de-obra qualificada e fornecer resultados rápidos e precisos. Neste contexto, Pardee *et al.* (2016) desenvolveu uma plataforma de diagnóstico do tipo POC baseado em uma tecnologia livre de células, que permite o uso de genes sintéticos no campo (GREEN *et al.*, 2014; PARDEE *et al.*, 2014; PARDEE *et al.*, 2016). Os biossensores de RNA programáveis chamados de “*toehold switches*” são capazes de detectar o genoma viral de forma rápida e com alta sensibilidade e especificidade, onde o resultado pode ser facilmente observado através do olho nu com base na mudança de cor da reação sem a necessidade de equipamentos sofisticados (PARDEE *et al.*, 2014; PARDEE *et al.*, 2016).

Diante disso, o objetivo principal deste trabalho foi validar plataformas e protocolos moleculares do tipo POC para a detecção do ZIKV e CHIKV em amostras clínicas. As plataformas validadas neste trabalho possuem potencial de fornecer desempenho diagnóstico

igual ou até superior às técnicas utilizadas na rotina laboratorial. Como resultado, essas ferramentas do tipo POC desenvolvidas e validadas neste trabalho podem trazer descentralização da assistência à saúde por meio do diagnóstico e também apresentam grande potencial para produzir resultados confiáveis e rápidos para auxiliar os médicos na tomada de decisão e no manejo terapêutico dos pacientes infectados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O presente tópico apresenta o referencial teórico dos temas abordados no decorrer da tese: histórico e epidemiologia do ZIKV; histórico e epidemiologia do CHIKV; características moleculares e genéticas do ZIKV; características moleculares e genéticas do CHIKV; transmissão; manifestações clínicas associadas à infecção pelo ZIKV; manifestações clínicas associadas à infecção pelo CHIKV; diagnóstico; tratamento, prevenção e controle.

### 2.1 Histórico e epidemiologia do ZIKV

O ZIKV foi identificado pela primeira vez em 1947, na floresta de Zika, Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). A descoberta foi realizada a partir do sangue de um macaco *Rhesus* que havia desenvolvido uma doença febril e, após a inoculação do sangue em camundongos da linhagem Swiss e em outro macaco *Rhesus*, o vírus foi isolado e descobriu-se que se tratava de um novo vírus que até então nunca havia sido descrito (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Na sequência, em 1948, o ZIKV foi identificado pela primeira vez em mosquitos da espécie *Aedes africanus* (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). No entanto, a capacidade zoonótica do ZIKV só foi confirmada a partir da infecção em humanos em 1954, na Nigéria (MACNAMARA, 1954). Durante esse episódio, três pacientes foram acometidos com a infecção e a confirmação da infecção pelo ZIKV foi realizada através do isolamento do vírus e detecção de anticorpos utilizando ensaios sorológicos (MACNAMARA, 1954).

Após a primeira identificação em 1947, o ZIKV permaneceu como um patógeno obscuro sendo associado apenas a casos esporádicos em humanos na África e Ásia até 2007, quando ocorreu o primeiro grande surto na Ilha de Yap, território dos Estados Federados da Micronésia, localizado no leste do Pacífico (DUFFY *et al.*, 2009; LANCIOTTI *et al.*, 2008). Estima-se que durante esse primeiro momento, o ZIKV infectou aproximadamente 73% da população residente da ilha (DUFFY *et al.*, 2009). Entretanto, não foi reportado nenhum caso de óbito ou hospitalização decorrente da infecção pelo ZIKV e os sintomas mais comuns apresentados pelos pacientes acometidos com a doença foram exantema, febre, artralgia e conjuntivite (DUFFY *et al.*, 2009).

Na sequência, houve casos reportados decorrentes da infecção pelo ZIKV na Camboja em 2010, Filipinas em 2012 e na Tailândia em 2012 (ALERA *et al.*, 2015; BUATHONG *et al.*, 2015; HADDOW *et al.*, 2012; HEANG *et al.*, 2012). Em 2013, o ZIKV ressurgiu de forma

agressiva na Polinésia Francesa sendo responsável pela primeira epidemia provocada pelo vírus, com aproximadamente 28 mil casos, cerca de 11% da população (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014; MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014). Posteriormente, o ZIKV continuou se disseminando rapidamente por todo o Pacífico incluindo Nova Caledônia, Ilhas Cook, Ilha de Páscoa e as Ilhas Vanuatu e Solomon, comprovando assim, a capacidade de disseminação do vírus (IOOS *et al.*, 2014; MUSSO; CAO-LORMEAU; GUBLER, 2015; MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014). Coincidentemente, durante a epidemia ocorrida na Polinésia Francesa entre 2013 e 2014, a infecção pelo ZIKV foi intimamente associada ao desenvolvimento de manifestações neurológicas severas como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016; OEHLER *et al.*, 2014).

No início de 2015, o ZIKV foi reportado pela primeira vez nas Américas (Figura 1) (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015). Os primeiros casos foram descritos a partir de 24 pacientes que apresentaram sintomas associados à infecção pelo ZIKV no município de Camaçari, estado da Bahia (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). As amostras de soro foram testadas através da RT-PCR e os resultados demonstraram que cinco (29.2%) amostras foram positivas para o ZIKV. Além disso, os resultados revelaram através de análise filogenética que o material genético do vírus detectado durante o surto brasileiro pertencia à linhagem asiática e apresentava 99% de identidade com sequências do ZIKV obtidas a partir de pacientes da Polinésia Francesa (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; MUSSO, 2015).

Inicialmente, inúmeras hipóteses haviam sido divulgadas no meio científico a fim de tentar entender como havia ocorrido a introdução do ZIKV no Brasil. As hipóteses apontavam possíveis eventos internacionais ocorridos no Brasil em meados de 2014 como porta de entrada do vírus, tais como a Copa do Mundo de Futebol e o Campeonato Mundial de Canoagem ocorrido em agosto de 2014, no Rio de Janeiro (MUSSO, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015). Porém, estudos posteriores através de análises de bioinformática de genomas do ZIKV revelaram que a introdução do vírus no Brasil poderia ter ocorrido durante o primeiro semestre de 2013, mais especificamente entre os meses de maio e dezembro, momento que coincidiu com a realização da Copa das Confederações no Brasil (FARIA *et al.*, 2016). Devido ao fato de Brasil ser endêmico para outras arboviroses, como dengue e chikungunya, e que causam sintomas similares aos causados pela infecção do ZIKV, o vírus acabou permanecendo circulando e causando infecções sem que fosse identificado até 2015. Posteriormente, a hipótese que o ZIKV foi introduzido no Brasil em 2013 também foi demonstrada em outros trabalhos (CAMPOS *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2020). Recentemente, através de análises

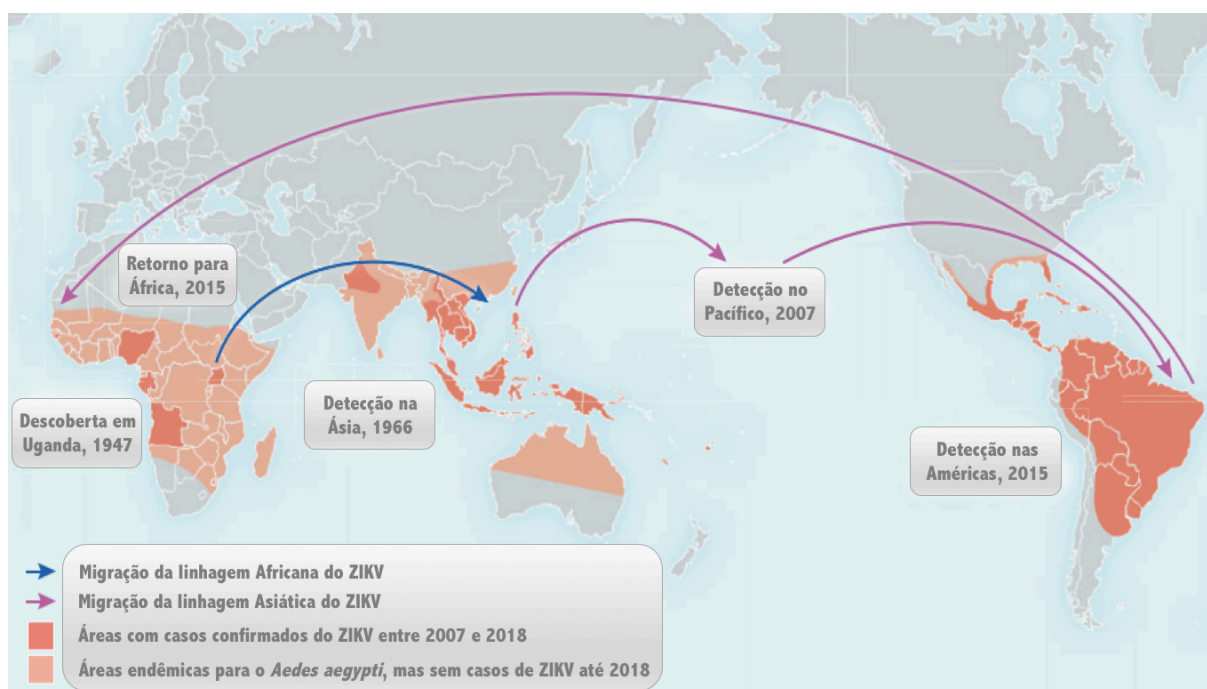


computacionais, foi possível reconstruir a história espaço-temporal do ZIKV nas Américas, apontando mais especificamente para a introdução no estado de Pernambuco, Brasil, em 2013 (COSTA *et al.*, 2020).

Após a introdução e confirmação do primeiro caso autóctone do ZIKV no Brasil, o vírus se espalhou rapidamente por todos os estados federativos e também pela América Latina. Até março de 2016, 23 estados federativos reportaram casos de transmissão, confirmando assim, a capacidade de disseminação rápida do vírus (CHEN; HAMER, 2016). Paralelamente, durante o mesmo período de emergência do ZIKV no Brasil, o número de casos de microcefalia e outras malformações congênitas também aumentaram de forma considerável, o que levou a hipótese de que a infecção pelo ZIKV estaria associada ao surgimento de malformações congênitas em neonatos (HAZIN *et al.*, 2016). Ainda em meados de 2016, autoridades de saúde pública de mais de 30 países e territórios oriundos do continente americano reportaram a transmissão autóctone do ZIKV (PAHO, 2016). De acordo com dados do Ministério da Saúde do Brasil, entre janeiro de 2015 a novembro de 2016, estima-se que foram notificados mais de 1.6 milhões de casos associados a infecção pelo ZIKV, dos quais 41,473 foram em mulheres gestantes, com maior número de casos sendo registrados na região Nordeste do país (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017). Além disso, durante o mesmo período foram confirmados 1,950 casos de recém-nascidos que nasceram com microcefalia (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Diante da situação emergencial dos casos de infecção provocados pelo ZIKV em vários países do mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou os casos associados a infecção pelo ZIKV como uma emergência de saúde pública em fevereiro de 2016 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). No entanto, logo após a epidemia ocorrida entre 2015 e 2016, o número de casos associados ao ZIKV diminuíram cerca de 95% e, em maio de 2017, o Ministério da Saúde declarou o fim da emergência nacional (SAÚDE, 2017).

Nos anos seguintes após a grande epidemia (2015-2016) nas Américas, o ZIKV continuou circulando, embora o número de casos tenha se mantido estável. Em 2020, até a semana epidemiológica 36, referente ao mês de outubro, foram confirmados 6,705 casos de Zika no Brasil, com incidência de 3.2 casos/100 mil habitantes. A região Nordeste apresentou o maior número de casos da doença em relação ao total do país (4.924, 73.4%), seguido das regiões Sudeste (760 casos; 11.3 %), Centro-Oeste (569 casos; 8.4%), Norte (369 casos, 5.5%) e Sul (83 casos, 1.3%) (SAÚDE, 2020). Mesmo com uma diminuição considerável do número de casos nos últimos anos, é recomendado que as medidas voltadas para o controle do mosquito vetor sejam mantidas a fim de diminuir a possibilidade de surgimento de novos surtos.

**Figura 1** - Histórico epidemiológico do ZIKV.

Fonte: Musso *et al.* (2019, tradução nossa).

Legenda: Os eventos epidemiológicos marcantes associados a disseminação do ZIKV ao longo da história são descritos no mapa. Além disso, o mapa demonstra as regiões com casos confirmados de ZIKV entre o período de 2007 a 2018 (laranja) e as regiões com circulação do mosquito *Aedes aegypti*, mas sem identificação de casos reportados associados à doença (rosa). Por fim, também é demonstrado a dispersão da linhagem Asiática (linhas roxas) e linhagem Africana (linha azul) durante a emergência global do ZIKV.

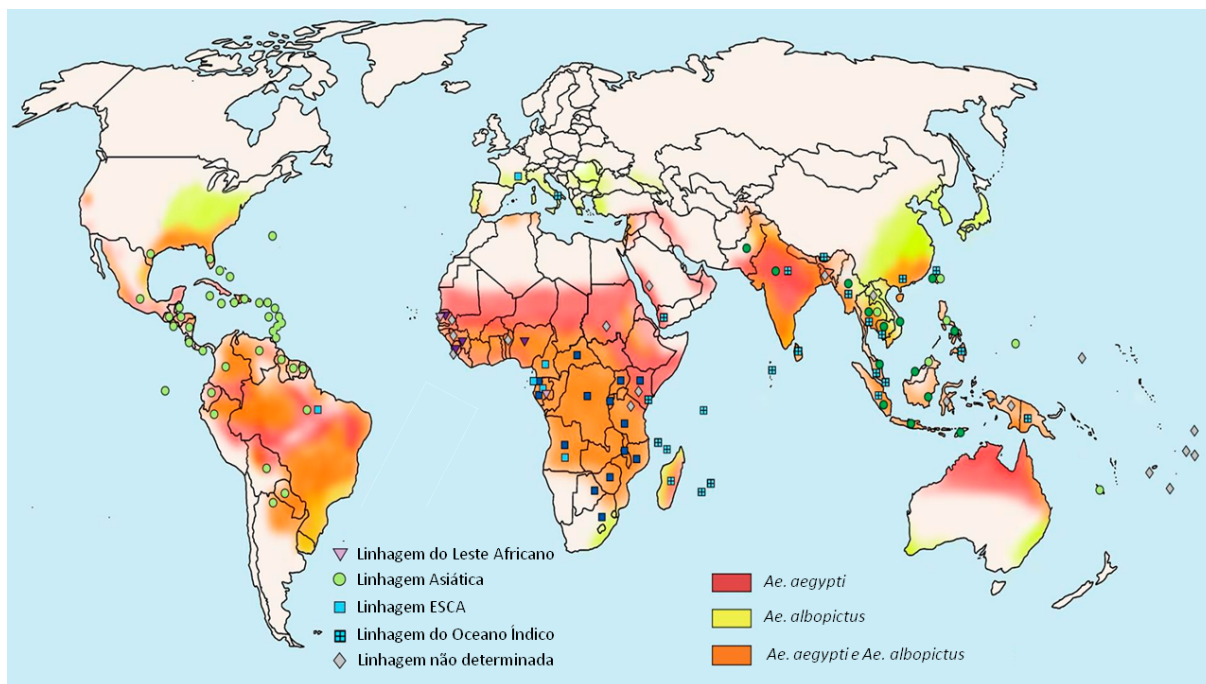
## 2.2 Histórico e epidemiologia do CHIKV

O primeiro caso reportado de infecção pelo CHIKV em humanos ocorreu na Tanzânia em 1952 (LUMSDEN, 1955). Na sequência, o CHIKV foi isolado a partir de amostras de soro humano e de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) e do gênero *Culex spp.* mosquitos em 1953 (ROSS, 1956). Desde então, vários surtos ocorreram em todo o continente africano (POWERS *et al.*, 2000; ROBINSON, 1955). Entre 1960 e 1980, o CHIKV foi identificado na África Central, Ocidental e Meridional e nos anos seguintes, na Índia e em outros países da África (POWERS *et al.*, 2000; WAHID *et al.*, 2017). Em resumo, os surtos e epidemias provocados pelo CHIKV nos últimos 70 anos apresentaram um movimento cíclico, caracterizados por surtos remotos intercalados por períodos de silêncio epidemiológico, variando de anos a décadas (SILVA *et al.*, 2018). Este comportamento epidemiológico do CHIKV é provavelmente de origem multifatorial e inclui inúmeros fatores envolvidos como ecologia do mosquito vetor, genética viral, ações antrópicas, comportamento humano,

determinantes ambientais e diferenças na suscetibilidade a infecções em humanos e vetores (SILVA *et al.*, 2018).

As preocupações com o CHIKV aumentaram consideravelmente após 2007, quando o vírus foi reportado no norte da Itália, introduzido possivelmente por um viajante infectado da Índia (REZZA *et al.*, 2007). Desde então, o CHIKV esteve relacionado com infecções em seres humanos em vários países incluindo Indonésia, Mianmar, Tailândia, Maldivas, Ilha da Reunião, Taiwan, França e Estados Unidos (REZZA *et al.*, 2007; THIBERVILLE *et al.*, 2013). Em 2013, o CHIKV chegou nas Américas, inicialmente se espalhando no Caribe, antes de chegar ao Brasil em 2014 (NUNES *et al.*, 2015). Até o presente momento, foram reportados casos de infecção pelo CHIKV em diferentes países de clima tropical subtropical em todos os continentes, exceto na Antártica (CDC, 2018). A propagação e os surtos provocados pelo CHIKV ao redor do mundo nos últimos anos são demonstrados na figura 2.

Após a introdução no CHIKV em 2014, o vírus permaneceu endêmico no Brasil e tem sido considerado uma ameaça de saúde pública no país (LIMA *et al.*, 2020). Em 2020, até a semana epidemiológica 38, foram confirmados 71,698 casos de chikungunya no Brasil, com incidência de 33,0 casos/100 mil habitantes. A região Nordeste apresentou o maior número de casos da doença em relação ao total do país (50.049, 69.8%), seguido das regiões Sudeste (19.671 casos; 27.1%), Norte (710 casos; 0.9%), Centro-Oeste (709 casos, 0.9%) e Sul (559 casos, 0.7%) (SAÚDE, 2020).

**Figura 2** - Histórico epidemiológico do CHIKV.

Fonte: Silva *et al.* (2017, tradução nossa).

Legenda: Distribuição geográfica do CHIKV e seus vetores primários, *Ae. aegypti* e *Ae. Albopictus*, ao redor do mundo. Os países nos quais casos autóctones de CHIKV foram relatados são especificados com símbolos coloridos que representam os genótipos virais distintos detectados durante surtos naquele país. Sobreposto à distribuição dos casos de CHIKV, pode-se observar as áreas geográficas que apresentam a circulação dos vetores primários responsáveis pela transmissão do CHIKV para os seres humanos. Vermelho indica as áreas com a presença de *Ae. aegypti*; Amarelo indica as áreas com a presença de *Ae. albopictus*; e as áreas onde ambas as espécies de mosquitos estão presentes são indicadas na cor laranja.

### 2.3 Características moleculares e genéticas do ZIKV

O ZIKV é um patógeno envelopado que apresenta o material genético constituído de RNA (ácido ribonucleico) sentido positivo (+ ssRNA), fita simples que pertence ao gênero *Flavivirus* dentro da família *Flaviviridae*. Outros arbovírus dentro desta família incluem o vírus da febre amarela (YFV), vírus da dengue (DENV), vírus do oeste do Nilo (WNV), vírus da encefalite japonesa (JEV), St. Louis (SLEV) e o vírus Rocio (ROCV) (FIGUEIREDO, 2000; PETERSEN *et al.*, 2016). O genoma do ZIKV possui aproximadamente 10.8 kb de comprimento, o qual é capeado na extremidade 5'. Além disso, o genoma possui uma única sequência aberta de leitura (ORF), que é flanqueada por regiões não traduzidas (UTRs) nas extremidades 5' e 3' e codifica cerca de 3,410 aminoácidos (Quadro 1) (BARONTI *et al.*, 2014; KUNO; CHANG, 2007).

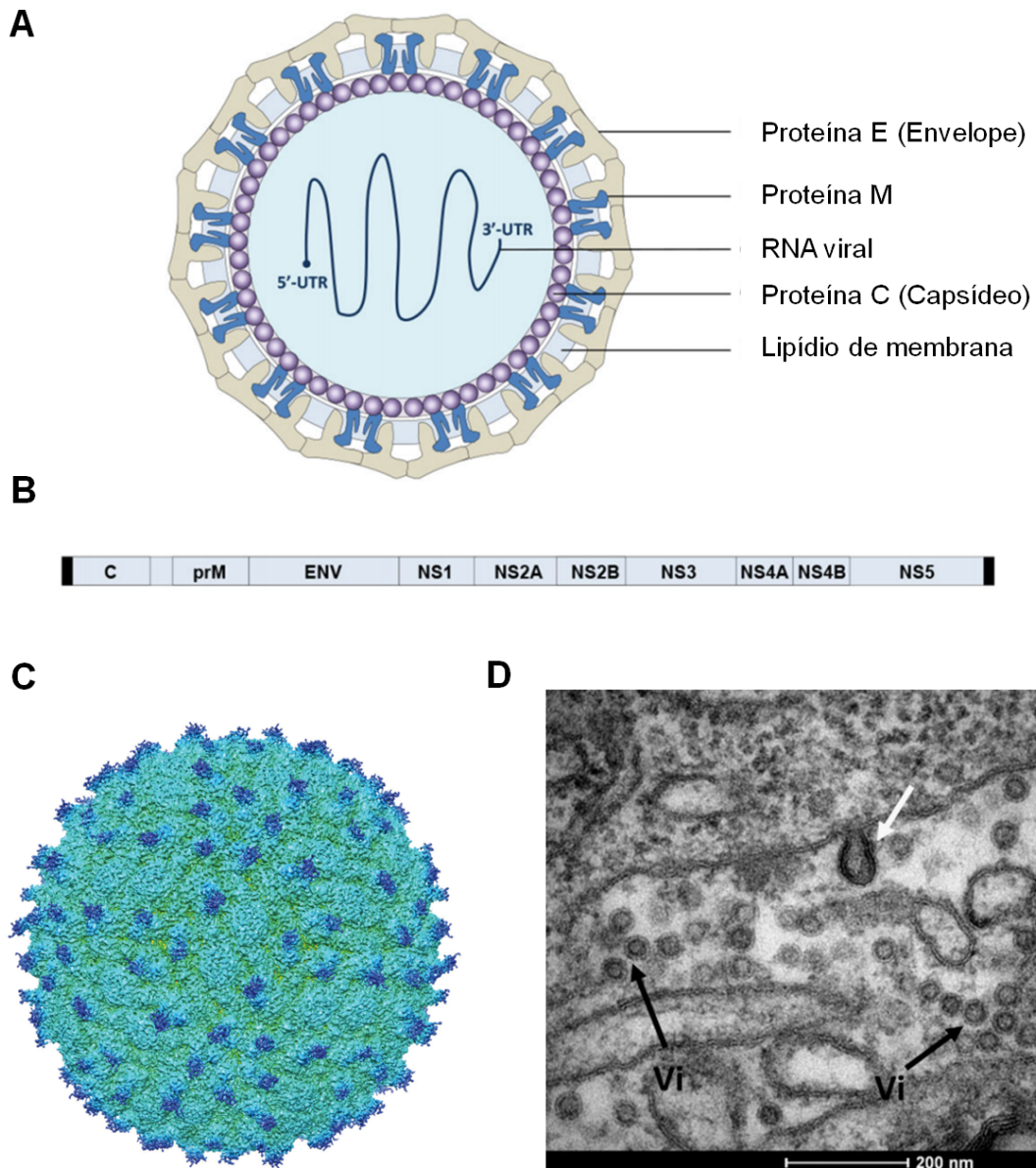
**Quadro 1** - Estruturas do genoma do ZIKV.

Gene ou região genômica	Tamanho	
	Asiática (H/PF/2013) <sup>a</sup>	Africana (MR 766) <sup>b</sup>
5' UTR	107 nt	106 nt
Capsídeo	105 aa	122 aa
PrM	187 aa	178 aa
Envelope	505 aa	500 aa
NS1	352 aa	342 aa
NS2A	217 aa	226 aa
NS2B	139 aa	130 aa
NS3	619 aa	617 aa
NS4A	127 aa	127 aa
NS4B	255 aa	252 aa
NS5	904 aa	902 aa
3' UTR	428 nt	428 nt
Genoma completo	10,617 nt	10,974 nt

Fonte: <sup>a</sup>: Baronti *et al.* (2014); <sup>b</sup>: Kuno *et al.* (2007).

Abreviações: nt: nucleotídeos; aa: aminoácidos; UTR: região não traduzida.

O RNA viral é traduzido como uma única poliproteína que a medida que é traduzido codifica três proteínas estruturais (proteína C [proteína do capsídeo], proteína prM [proteína pré-membrana] e proteína E [proteína do envelope]) que estão envolvidas e relacionadas com a formação de novas partículas virais. Além destas, outras sete proteínas não-estruturais são codificadas (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 3) (SIROHI; KUHN, 2017). Como o próprio nome sugere, as proteínas não-estruturais diferentemente das proteínas estruturais, estão relacionadas com a replicação e montagem do genoma do vírus, bem como possuem papel chave na evasão da resposta imune do hospedeiro (CHAMBERS *et al.*, 1990; KUNO; CHANG, 2007). A geração das dez proteínas individuais a partir de uma única poliproteína do genoma do ZIKV é regulada por proteases virais e por proteases do próprio hospedeiro infectado (SIROHI; KUHN, 2017).

**Figura 3** - Morfologia e organização genômica do ZIKV.

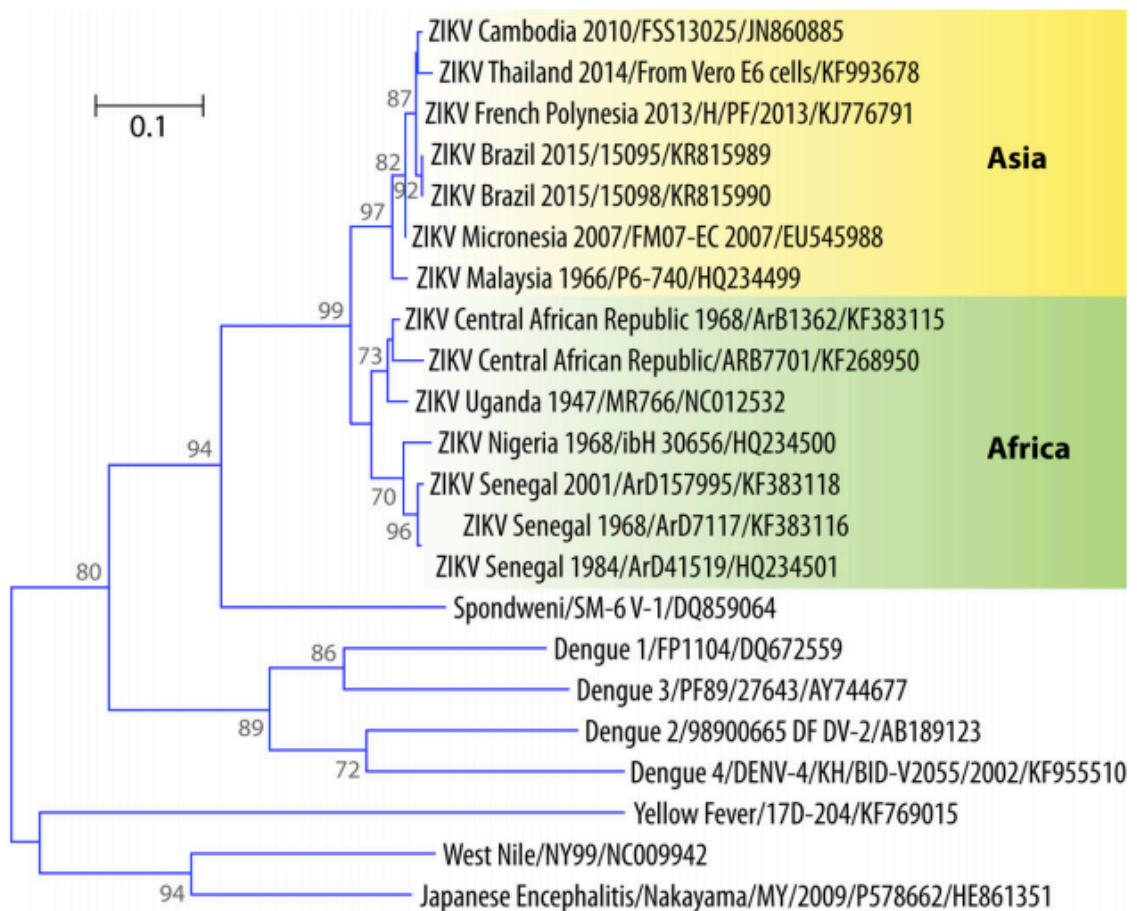
Fontes: Abbink *et al.*; Sirohi *et al.*; Guedes *et al.* (tradução nossa).

Legenda: O ZIKV é um vírus envelopado com material genético constituído de RNA fita simples sentido positivo (+ ssRNA) que codifica para proteínas estruturais e não-estruturais (A). O RNA viral é traduzido como uma única poliproteína que a medida que é traduzido codifica sete proteínas não-estruturais são codificadas (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e três proteínas estruturais (proteína C [proteína do capsídeo], proteína prM [proteína pré-membrana] e proteína E [proteína do envelope]) (B). Imagem demonstrando uma partícula viral do ZIKV madura (resolução de 3.8 Å) (C). Partículas do ZIKV maduras na glândula salivar de mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* (D). Linhas pretas (Vi): Partícula viral do ZIKV; Linha branca: formação do envelope viral a partir da membrana do retículo endoplasmático.

No último século, inúmeros estudos têm buscado caracterizar geneticamente o genoma do ZIKV (BERTHET *et al.*, 2014; FAYE *et al.*, 2014; HADDOW *et al.*, 2012). Em 2008, um estudo genético havia sugerido que o ZIKV poderia ser dividido em três grandes linhagens (Oeste africano, Leste africano e Asiática) (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Entretanto, as análises genéticas haviam sido realizadas com base na análise de apenas um gene viral (NS5) e, além disso, poucas amostras haviam sido utilizadas. Em outro estudo genético, Faye et al. (2014) analisaram os genes que codificam a proteína E e a proteína NS5 de um total de 43 genomas coletados entre 1947 e 2007 a partir de países oriundos da África, Ásia e Oceania. Os resultados das análises filogenéticas apontaram para três linhagens do ZIKV: cluster da Uganda, cluster da Nigéria e o cluster Asiático (FAYE *et al.*, 2014). Em contraste, quando as análises foram realizadas com base no genoma completo do vírus, as análises filogenéticas revelaram que o ZIKV era dividido em apenas duas grandes linhagens: Asiática e Africana (Figura 4) (HADDOW *et al.*, 2012).



**Figura 4** - Árvore filogenética demonstrando as duas grandes linhagens do ZIKV incluindo a Asiática e Africana.



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

Legenda: Árvore filogenética destacando as duas grandes linhagens do ZIKV (Asiática e Africana), onde também é possível observar a diferença genética do ZIKV com outros arbovírus, incluindo o vírus da dengue (DENV 1-4), vírus da febre amarela (YFV), vírus do Oeste no Nilo (WNV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV).

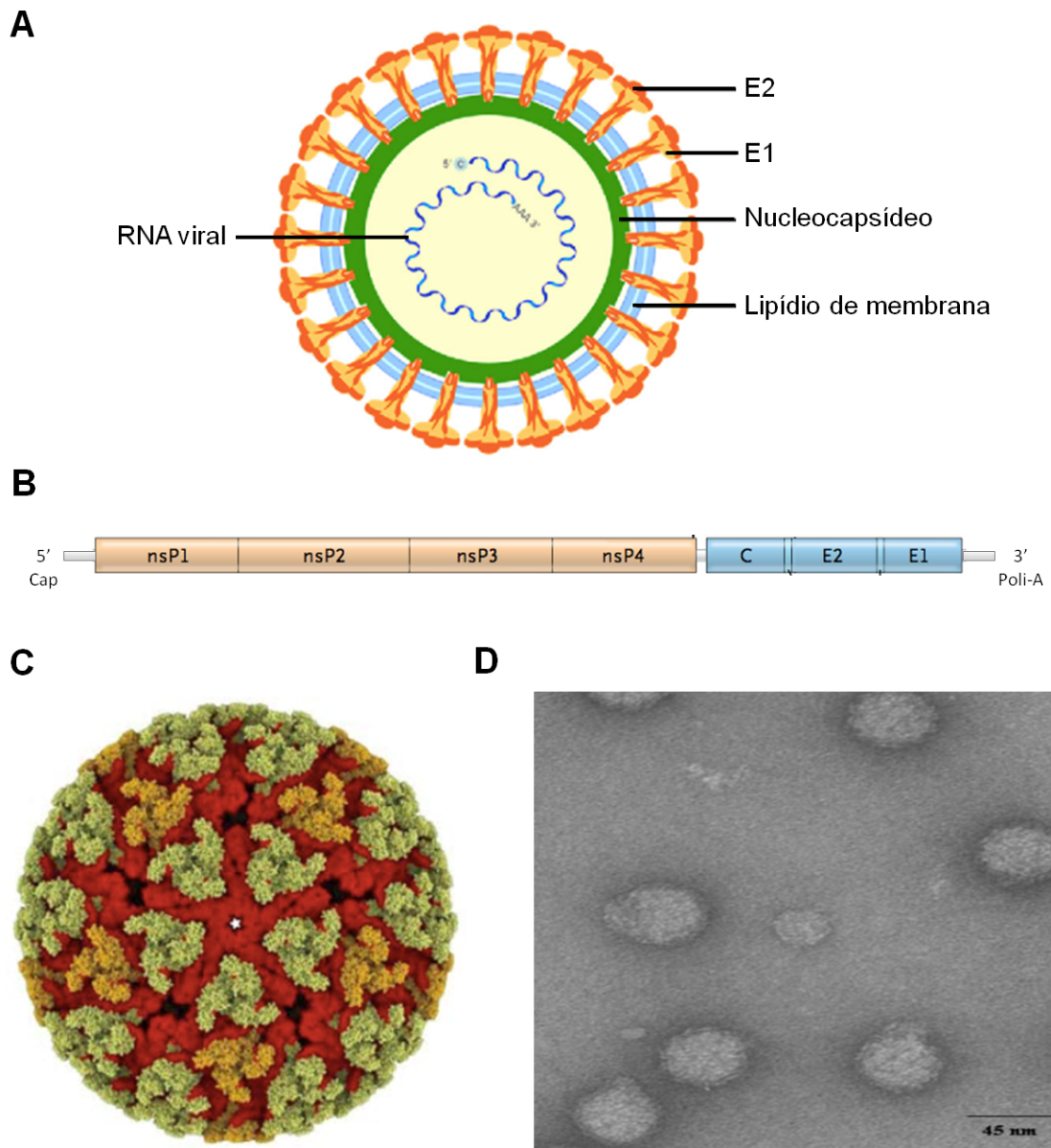
## 2.4 Características moleculares e genéticas do CHIKV

Semelhante ao ZIKV, o CHIKV é um vírus envelopado que apresenta o material genético constituído de RNA (ácido ribonucleico) sentido positivo (+ ssRNA), fita simples que pertence ao gênero *Alphavirus* dentro da família *Togaviridae* (ROSS, 1956). Outros vírus dentro desta família incluem o vírus Ross River (RRV), vírus Barmah (BFV) e o vírus Mayaro (MAYV) (TOIVANEN, 2008). O genoma do CHIKV possui aproximadamente 11.5 kb que codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e cinco proteínas estruturais principais: capsídeo (C), glicoproteínas do envelope (E) [E1, E2, E3 e EK] (Figura 5) (STRAUSS; STRAUSS, 1994). Diferente do genoma do ZIKV, o genoma do CHIKV possui



duas sequências abertas de leitura (ORFs) separadas por uma região de junção não traduzida. Além disso, seu genoma é capeado e poliadenilado nas extremidades 5' e 3', respectivamente.

**Figura 5** - Morfologia e organização genômica do CHIKV.

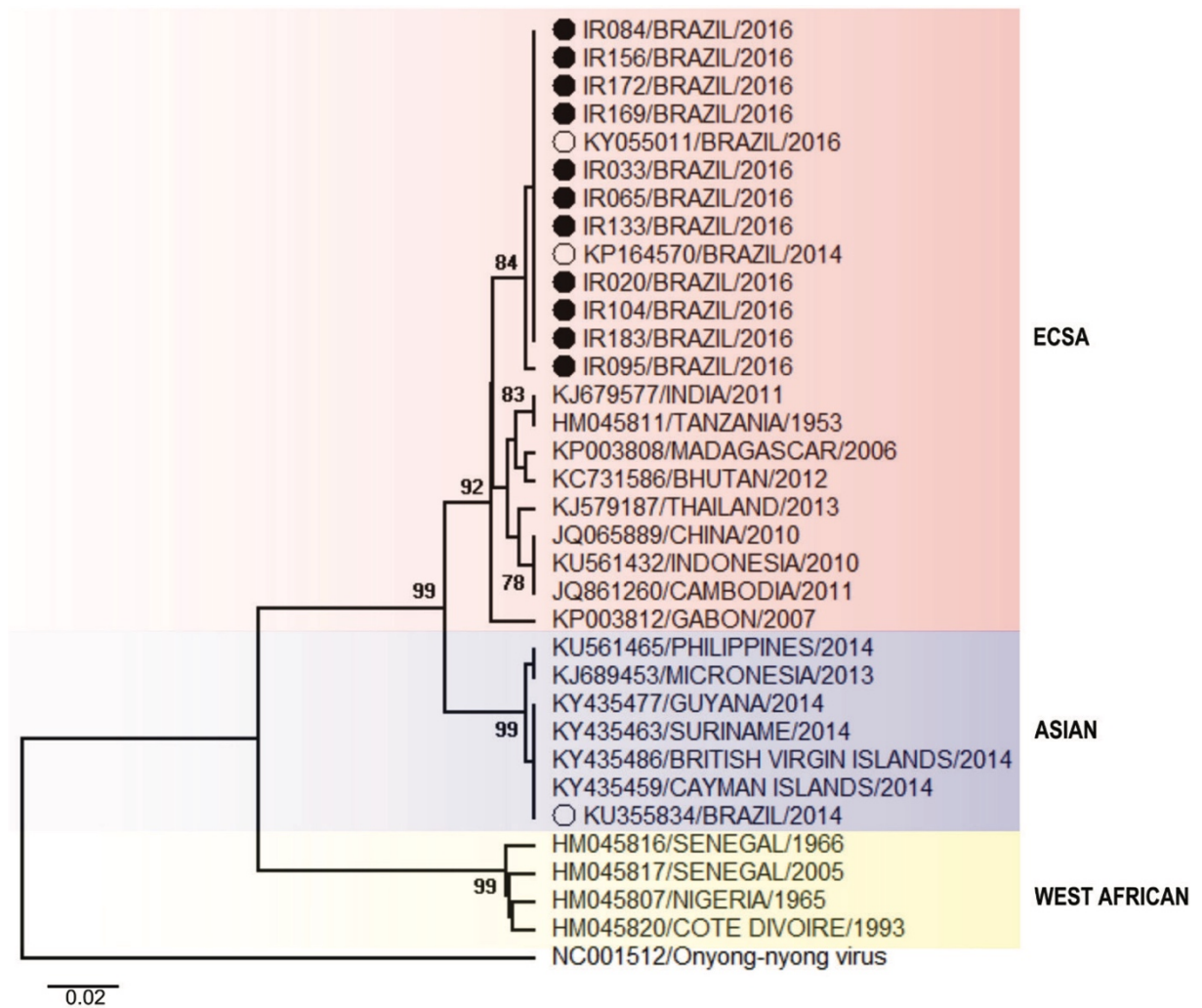


Fontes: Metz *et al.*; Weavers *et al.*; Simizu *et al.* (tradução nossa).

Legenda: O CHIKV é um vírus envelopado com material genético constituído de RNA fita simples sentido positivo (+ ssRNA) (A). Seu genoma codifica sete proteínas, sendo quatro não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e cinco proteínas estruturais (capsídeo (C), glicoproteínas do envelope (E) [E1, E2, E3 e EK]) (B). Imagem demonstrando uma partícula viral do CHIKV madura (C). Micrografia eletrônica de partículas do CHIKV purificadas com um diâmetro de aproximadamente 42 nm.

Com base na constituição genética, estudos demonstraram que o CHIKV pode ser dividido em três linhagens principais com base na análise filogenética da sequência do gene E1 e do genoma completo: linhagem do Leste / Central / África do Sul (conhecida como ECSA), linhagem Asiática e linhagem do Oeste Africano (CASAL *et al.*, 2015; POWERS *et al.*, 2000; POWERS; LOGUE, 2007; SCHUFFENECKER *et al.*, 2006) (Figura 6).

**Figura 6** - Árvore filogenética demonstrando as principais linhagens do CHIKV.



Fonte: Tanabe *et al.* (2018).

Legenda: Árvore filogenética destacando as três grandes linhagens do CHIKV: linhagem do Leste / Central / África do Sul (conhecida como ECSA), linhagem Asiática e linhagem do Oeste Africano.

## 2.5 Transmissão

O ZIKV pode ser transmitido majoritariamente em dois principais ciclos de transmissão: o ciclo urbano e o ciclo silvestre (DA SILVA *et al.*, 2020). Mosquitos antropofílicos pertencentes ao gênero *Aedes*, que estão amplamente distribuídos nas regiões tropicais e

subtropicais do mundo, são considerados o principal vetor envolvidos na transmissão do ZIKV para os seres humanos, especialmente os da espécie *Aedes aegypti* no ciclo urbano, onde através da picada dos mosquitos fêmeas, os vírus são transmitidos (GUTIÉRREZ-BUGALLO *et al.*, 2019; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Os mosquitos do gênero *Aedes*, incluindo as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, além de estarem envolvidos na transmissão do ZIKV, também exercem papel crucial na cadeia de transmissão de outras arboviroses que são consideradas problemas de saúde pública no Brasil e no mundo, tais como dengue, chikungunya e febre amarela (FIGUEIREDO, 2019). Recentemente, estudos utilizando modelos preditivos sugeriram que a distribuição geográfica do *Aedes aegypti* irá continuar aumentando como consequência do crescimento exponencial da população e de outros fatores como urbanização e mudanças climáticas, o que alerta a população e a comunidade científica para o risco de surgimento de novos surtos e epidemias (KRAEMER *et al.*, 2019).

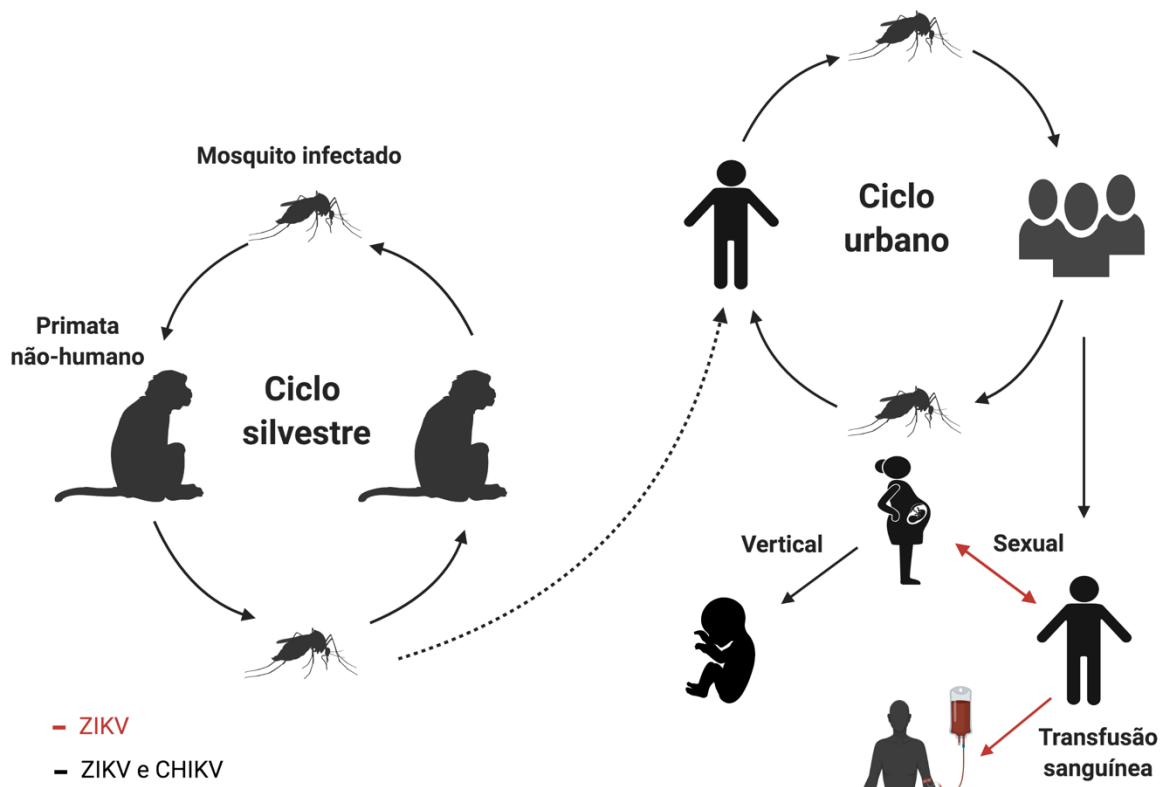
Desde o primeiro isolamento do ZIKV em mosquitos da espécie *Aedes africanus* em 1948, muitas cepas do ZIKV foram isoladas em mosquitos de outros gêneros incluindo *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia* e *Culex* (DIALLO *et al.*, 2014; DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Embora os mosquitos do gênero *Aedes* sejam apontados como o principal vetor para transmissão urbana do ZIKV, inúmeros trabalhos sugerem que os mosquitos pertencentes ao gênero *Culex* também podem atuar na cadeia de transmissão do ZIKV (ELIZONDO-QUIROGA *et al.*, 2018; GUEDES *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2016; SMARTT *et al.*, 2018). Entretanto, existe um intenso debate na literatura científica a respeito das espécies envolvidas na transmissão ZIKV tanto no ciclo urbano, bem como no ciclo silvestre.

Dentro do ciclo de transmissão silvestre, o ZIKV circula entre mosquitos e animais silvestres (predominantemente primatas não-humanos), com eventuais ocasiões de transmissão para os seres humanos. Na África, o ciclo de transmissão silvestre do ZIKV é bem documentado e os primatas do velho do mundo estão envolvidos no estabelecimento e na manutenção do ciclo silvestre (VALENTINE; MURDOCK; KELLY, 2019). No entanto, desde a emergência causada pelo ZIKV no Brasil, o país mais afetado durante a última epidemia, permanece incerto se o ZIKV realmente estabeleceu um ciclo silvestre nas Américas (DA SILVA *et al.*, 2020; GUTIÉRREZ-BUGALLO *et al.*, 2019). Nesse contexto, um trabalho demonstrou através de modelos matemáticos que o ZIKV apresenta alta probabilidade de estabelecer a transmissão do ciclo silvestre no Brasil em primatas não-humanos ou outros mamíferos, via mosquitos silvestres (ALTHOUSE *et al.*, 2016). Adicionalmente, vários estudos reportaram a detecção do ZIKV em primatas não-humanos oriundos de diferentes regiões do Brasil incluindo Nordeste, Sudeste e Centro-oeste (DE OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2018; FAVORETTO *et al.*, 2019;

PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2019; TERZIAN *et al.*, 2018). Em contraste, um estudo de competência vetorial utilizando cinco espécies de mosquitos silvestres (*Aedes spicularis*, *Aedes terrens*, *Sabethes albiprivus*, *Sabethes identicus* e *Haemagogus leucoceleanus*) sugeriu que seria muito improvável o estabelecimento do ciclo silvestre do ZIKV na América do Sul (FERNANDES *et al.*, 2019). Juntos, esses resultados geram certa controvérsia quanto ao estabelecimento do ciclo silvestre do ZIKV nas Américas. Considerando que a América do Sul possui uma ampla circulação de espécies de mosquitos e primatas potencialmente capazes de transmitir o ZIKV, a questão se o ZIKV iniciou um ciclo de transmissão silvestre nessa parte do mundo ainda permanece como uma questão a ser esclarecida e, portanto, requer estudos experimentais e de campo a fim de avaliar e determinar a competência de mosquitos silvestres e primatas não-humanos na transmissão do ZIKV (DA SILVA *et al.*, 2020).

Apesar de a transmissão vetorial ser apontada como a principal via de transmissão do ZIKV, diversos trabalhos têm reportado outros modos não vetoriais para a transmissão do vírus, como exemplo: transmissão sexual, transmissão vertical e a transmissão através de transfusões sanguíneas. Assim como para o ZIKV, a transmissão vetorial também representa a principal rota de transmissão para o CHIKV, especialmente através de mosquitos do gênero *Aedes* (WEAVER, 2014; WEAVER *et al.*, 2018; WEAVER; LECUIT, 2015). Além da transmissão vetorial, estudos recentes também sugeriram a possibilidade de transmissão vertical para o CHIKV (FRITEL *et al.*, 2010; RAMFUL *et al.*, 2007) (Figura 7).

Figura 7 - Ciclo de transmissão.



Fonte: O autor. Criado com Biorender.com

Legenda: O ZIKV e o CHIKV podem ser transmitidos através de dois principais ciclos de transmissão: o ciclo urbano e o ciclo silvestre. Dentro do ciclo de transmissão silvestre, esses arbovírus circulam entre mosquitos e animais silvestres (predominantemente primatas não-humanos), com eventuais situações de transmissão para os humanos. No ciclo de transmissão urbano, o ZIKV e CHIKV são transmitidos primariamente através da picada de mosquitos fêmeas pertencentes ao gênero *Aedes*. O ser humano quando infectado, outras vias de transmissão já descritas para o ZIKV incluem a transmissão sexual, transmissão vertical e transmissão vertical. Para o CHIKV, há evidências apenas para a transmissão vertical.

Desde a emergência do ZIKV nas Américas, inúmeros estudos sugeriram a possibilidade de transmissão do vírus através da relação sexual (COUNOTTE *et al.*, 2018; D'ORTENZIO *et al.*, 2016; FOY *et al.*, 2011; MCCARTHY, 2016; MUSSO *et al.*, 2015). Em um dos trabalhos pioneiros, foi sugerida a possibilidade de transmissão sexual a partir de dois cientistas americanos que estavam em trabalho de campo no Senegal, em 2008 (FOY *et al.*, 2011). Ao voltarem para os Estados Unidos, um dos cientistas transmitiu o ZIKV possivelmente através da relação sexual para a sua esposa (FOY *et al.*, 2011). Adicionalmente, o ZIKV já foi reportado no sêmen de pacientes infectados (MEAD *et al.*, 2018). Baseado em todos os relatos de transmissão sexual do ZIKV até o ano de 2018, uma revisão sistemática reportou que a duração média para a detecção do RNA do ZIKV no sêmen foi 40 dias (95% CI: 30-49 dias) e o máximo de duração foi 370 dias (COUNOTTE *et al.*, 2018). Diferente do sêmen, a duração

média no fluido vaginal foi 14 dias (95% CI: 7-20 dias) e o máximo de duração foi 37 dias (COUNOTTE *et al.*, 2018).

De modo geral, a maior parte dos trabalhos que reportaram a transmissão sexual do ZIKV são estudos do tipo relato de caso que descrevem a transmissão a partir de viajantes que estiveram em áreas endêmicas e ao retornarem para as suas residências serviram como fonte de infecção. Achados através da utilização de modelos animais também corroboraram com a possibilidade de transmissão sexual do ZIKV (DUGGAL *et al.*, 2017; ROSSI; TESH *et al.*, 2016).

Embora inúmeros trabalhos apontem para a transmissão sexual do ZIKV, a relevância epidemiológica dessa via de transmissão em regiões endêmicas permanece obscura. Recentemente, os resultados de um estudo sorológico envolvendo uma coorte de 425 indivíduos realizada no estado de Pernambuco, considerada o epicentro da última epidemia, demonstrou que a transmissão sexual teve um papel fundamental na cadeia de transmissão do ZIKV durante a última epidemia no Brasil (MAGALHAES *et al.*, 2020). Além disso, os resultados sugeriram que associado a transmissão vetorial, a transmissão sexual pode ter sido um dos fatores responsáveis pela rápida disseminação do vírus na população (MAGALHAES *et al.*, 2020).

A transmissão do ZIKV através de transfusões sanguíneas já foi reportada em vários trabalhos (BARJAS-CASTRO *et al.*, 2016; MUSSO *et al.*, 2014; MUSSO *et al.*, 2016). Entre 2013 e 2014, durante a epidemia de ZIKV que ocorreu na Polinésia Francesa, um total de 1,505 amostras foram coletadas a partir de doadores de sangue a fim de avaliar a positividade quanto ao ZIKV utilizando a técnica de RT-qPCR (MUSSO *et al.*, 2014). Após as análises, os resultados demonstraram que o RNA do ZIKV foi detectado em 42 amostras (3%), embora os indivíduos doadores fossem assintomáticos no momento da coleta. Recentemente, uma revisão sistemática estimou a prevalência do RNA do ZIKV nas amostras coletadas a partir de doadores de sangue em 1% (LIU *et al.*, 2019). Entretanto, esses valores de prevalência variaram de acordo com a região geográfica (LIU *et al.*, 2019). Importante ressaltar que essa via de transmissão também já foi descrita para outros arbovírus incluindo o vírus da dengue, o vírus do Oeste do Nilo e o vírus Ross River (HOAD *et al.*, 2015; PEALER *et al.*, 2003; STRAMER *et al.*, 2005; TAMBYAH *et al.*, 2008; TOMASHEK; MARGOLIS, 2011).

A recente epidemia causada pelo ZIKV nas Américas revelou consequências devastadoras decorrentes da infecção, principalmente depois do aumento considerável no número de casos recém-nascidos com microcefalia, sugerindo assim, a possibilidade da transmissão vertical do ZIKV (HAZIN *et al.*, 2016; RASMUSSEN *et al.*, 2016). Posteriormente, o ZIKV foi apontado como o agente etiológico responsável pela a gênese de

malformações congênitas observadas em recém-nascidos, incluindo a microcefalia e hoje nomeadas como síndrome de congênita do Zika (SCZ) (CASTANHA *et al.*, 2019; CORDEIRO *et al.*, 2016; CORDEIRO *et al.*, 2016; DE ARAÚJO *et al.*, 2018; HAZIN *et al.*, 2016). Estima-se que a transmissão vertical do ZIKV ocorra entre gestantes e fetos, principalmente quando as mães são infectadas durante o primeiro trimestre do período gestacional (HAZIN *et al.*, 2016). Adicionalmente, o RNA do ZIKV já foi detectado amostras de leite materno e soro de mães lactantes (BESNARD *et al.*, 2014; COLT *et al.*, 2017). A transmissão vertical já foi documentada para outros arbovírus incluindo o vírus da dengue, o vírus do Oeste do Nilo e o vírus chikungunya (BASURKO *et al.*, 2009; FRITEL *et al.*, 2010; STEWART; BRYANT; SHEFFIELD, 2013).

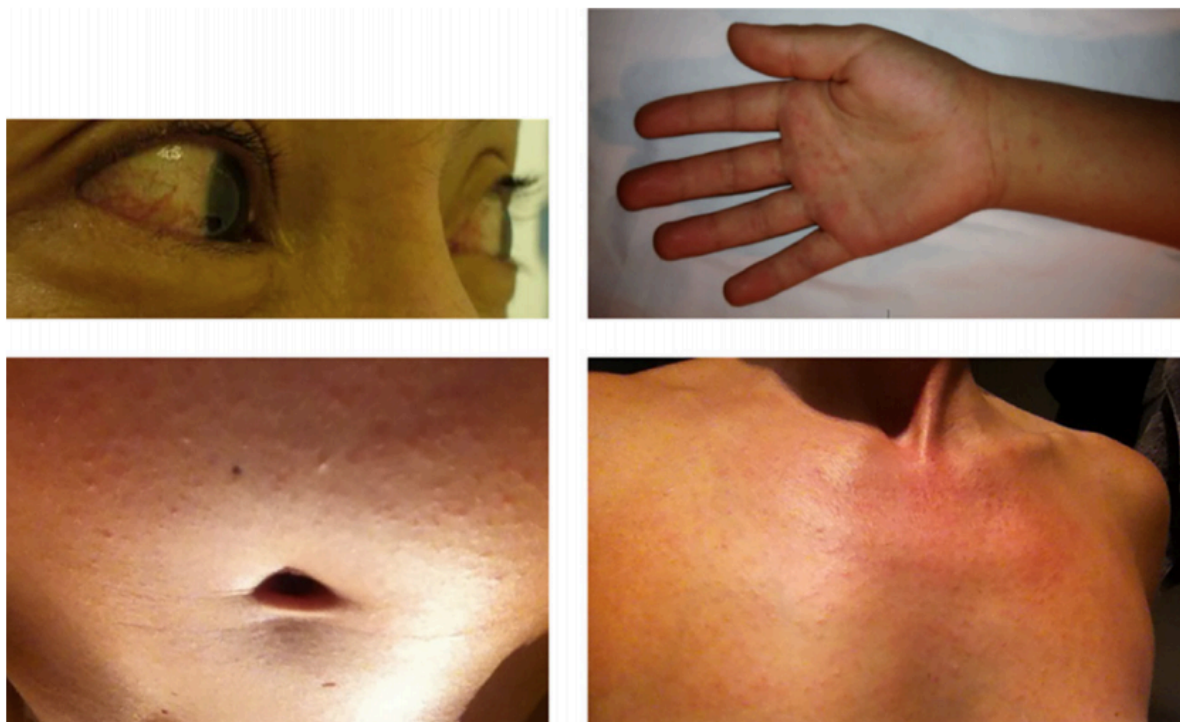
Além disso, outros estudos já reportaram que o RNA do ZIKV foi detectado em fluidos biológicos como urina, saliva, suor e fluido lacrimal, sugerindo assim, a possibilidade de outras vias de transmissão (GOURINAT *et al.*, 2015; MENEZES-NETO *et al.*, 2021; MOULIN *et al.*, 2016; MUSSO *et al.*, 2015).

## **2.6 Manifestações clínicas associadas à infecção pelo ZIKV**

A infecção pelo ZIKV é autolimitada em indivíduos adultos e está associada a uma baixa mortalidade. Aproximadamente cerca de 50-80% dos indivíduos infectados pelo vírus apresenta a doença em sua forma assintomática (DUFFY *et al.*, 2009; MUSSO; GUBLER, 2016; PETERSEN *et al.*, 2016). Após o período de incubação do vírus que é entre 3 a 14 dias após a infecção, os indivíduos que são sintomáticos apresentam geralmente uma doença moderada e, quando presente, os sintomas incluem exantema, febre, dor de cabeça, artralgia e conjuntivite (Figura 8) (DUFFY *et al.*, 2009; MUSSO; GUBLER, 2016). Outros sintomas menos frequentes já reportados em pacientes acometidos com a doença foram mialgia, linfadenopatia, edema, dor cervical, fadiga, mal-estar, dor retro-orbital, distúrbios digestivos, calafrios, tontura, vômito, diarreia e tosse, além de sintomas geniturinários incluindo hematúria, disúria e dor perineal (CHAN *et al.*, 2016; DUFFY *et al.*, 2009; MUSSO; GUBLER, 2016; ZANLUCA *et al.*, 2015).



**Figura 8** - Manifestações clínicas predominantemente observadas em pacientes infectados pelo ZIKV.



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

Legenda: Painel demonstrando as principais manifestações clínicas associadas a infecção pelo ZIKV. Na parte superior do painel é mostrado pacientes apresentando conjuntivite e exantema. Na parte inferior do painel também é mostrado pacientes apresentando exantema.

De modo geral, complicações não são observadas durante a infecção causada pelo ZIKV, mas quando ocorrem, podem ser severas e fatais (MUSSO; GUBLER, 2016). A principal preocupação quanto à infecção pelo ZIKV é decorrente da sua íntima relação com a síndrome congênita do Zika incluindo a gênese de malformações congênitas observadas em recém-nascidos cujas mães foram infectadas durante o período gestacional, além de também estar associada com o desencadeamento de manifestações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016). Embora o ZIKV demonstre tropismo para um amplo espectro de células no organismo, as características marcantes das manifestações neurológicas são resultantes do neurotropismo viral (MINER; DIAMOND, 2017).



### 2.6.1 Síndrome congênita do Zika (SCZ)

Neonatos nascidos a partir de gestantes infectadas pelo ZIKV durante o período gestacional possuem entre 5 a 14% de risco de serem acometidos com a síndrome congênita do Zika (SCG) e de 4 a 6% de nascerem com microcefalia (BRASIL *et al.*, 2016; HOEN *et al.*, 2018; HONEIN *et al.*, 2017; POMAR *et al.*, 2018; REYNOLDS *et al.*, 2017; RICE *et al.*, 2018; SHAPIRO-MENDOZA *et al.*, 2017). Interessantemente, um estudo realizado no Rio de Janeiro incluiu 345 mulheres gestantes e os resultados demonstraram que 42% dos neonatos e fetos nascidos apresentaram algum problema quando expostos ao ZIKV (BRASIL *et al.*, 2016). Embora a infecção pelo ZIKV em qualquer momento da gestação possa estar associada ao desencadeamento da síndrome congênita do Zika em neonatos, o risco é consideravelmente bem mais elevado quando a gestante é exposta ao vírus durante o primeiro trimestre do período gestacional (BRASIL *et al.*, 2016; HAZIN *et al.*, 2016; HOEN; SCHAUB; FUNK *et al.*, 2018).

Como ficou evidente durante a epidemia de ZIKV em 2015-2016, a infecção é capaz de causar um largo espectro de malformações congênitas que se estendem além da microcefalia e são distintas de outras infecções congênitas, pois suas manifestações patológicas decorrentes da infecção pelo ZIKV são restritas principalmente ao sistema nervoso central (SNC) (DIRLIKOV *et al.*, 2018; MIRANDA-FILHO *et al.*, 2016). Características marcantes de neonatos que foram acometidos com a síndrome congênita do Zika incluem ruptura cerebral fetal, condição essa que surge a partir da ruptura cerebral parcial durante a gestação com colapso subsequente do crânio fetal causado pela diminuição da pressão hidrostática intracraniana; calcificações intracranianas; sinais piramidais e extrapiramidais; contraturas congênitas causadas por um mecanismo neurogênico; lesões oculares e manchas pigmentadas na retina (Figura 9). Embora essas anomalias também sejam reportadas em outras infecções congênitas, elas parecem estar mais frequentemente associadas à síndrome congênita do Zika (MOORE *et al.*, 2017).

Recentemente, um estudo realizado no estado de Pernambuco, considerado o epicentro da última epidemia do ZIKV, envolveu uma série de casos incluindo 30 crianças que nasceram com microcefalia (VERAS GONÇALVES *et al.*, 2020). As crianças foram acompanhadas durante 41 meses desde a data do nascimento e os resultados demonstraram que 57% dos casos apresentaram pelo menos um tipo de disfunção endócrina (baixa estatura, hipotireoidismo, obesidade e alterações nas variantes do início da puberdade). Em outro estudo relacionado, Leal *et al.* (2020) avaliou 92 crianças com microcefalia e previamente foram associadas com a infecção pelo ZIKV (LEAL *et al.*, 2021). Do número total de crianças incluídas na coorte, 57

(61,9%) foram avaliadas através da nasofaringoscopia e os resultados demonstraram que 31 crianças apresentavam hipertrofia da adenoide. Juntos, esses resultados evidenciam que as crianças acometidas com a síndrome congênita do Zika devem ser monitoradas e avaliadas regularmente a fim de diagnosticar precocemente qualquer anormalidade e programar medidas de tratamento apropriadas quando necessárias.

**Figura 9** - Achados clínicos em recém-nascidos com a síndrome congênita do Zika.



Fonte: Musso *et al.* (2019).

Legenda: Achados clínicos e de imagem em neonatos que nasceram com a síndrome congênita do Zika (SCZ). Fotografias obtidas a partir de uma neurosonografia de fetos infectados com o ZIKV. Principais características encontradas foram: calcificações lineares, aumento dos espaços pericerebrais, ventriculomegalia, afinamento cortical e disgenesia do corpo caloso (A, B e C). Renossâncias magnéticas de um feto com infecção pelo ZIKV mostrando microcefalia (D, E e F). Fotografias de três neonatos – um com 1 semana de idade (G e H) e o mesmo com 10 meses de idade (I). O segundo aos 14 dias de idade (J e K) e o terceiro aos 51 dias de idade (L). Os principais achados nesses três neonatos foram microcefalia, dimorfismo craniano, artrogripose, estrabismo e hipertonia axial.

### 2.6.2 Manifestações neurológicas associadas à infecção pelo vírus Zika

Como mencionado anteriormente, o ZIKV apresenta um neurotropismo elevado, o que pode levar ao desenvolvimento de manifestações neurológicas em pacientes infectados (MINER; DIAMOND, 2017). A incidência da síndrome de Guillain-Barré (SGB) associada com a infecção pelo ZIKV é estimada entre 2 a 3 casos por 10,000 casos reportados, o que é similar ao risco da síndrome de Guillain-Barré ser associada com a infecção pela bactéria *Campylobacter* (HALPIN *et al.*, 2018; MIER-Y-TERAN-ROMERO *et al.*, 2018). Além disso, assim como para o ZIKV, o surgimento de desordens neurológicas também já foi associado à infecção provocada por outros arbovírus incluindo o DENV e o CHIKV (SOLOMON *et al.*, 2000; WIELANEK *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos apontam que o intervalo médio entre a exposição ao vírus e o surgimento da síndrome de Guillain-Barré pelo paciente infectado pode variar de 5 a 10 dias (MUÑOZ *et al.*, 2017). As manifestações neurológicas frequentemente observadas em pacientes infectados com o ZIKV que desencadearam a síndrome de Guillain-Barré incluem neuropatia axonal motora, polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda e a síndrome de Miller-Fisher (caracterizada por ataxia, arreflexia e oftalmoplegia), embora a prevalência desses achados clínicos variaram entre os estudos e as regiões onde os mesmos foram realizados (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016; DOS SANTOS *et al.*, 2016; MUÑOZ *et al.*, 2017). Inúmeros estudos envolvendo séries de casos demonstraram que o prognóstico da síndrome de Guillain-Barré associada à infecção pelo ZIKV foi similar quando comparado ao prognóstico da síndrome de Guillain-Barré ocasionada por outros processos (ocasionados por agentes infecciosos e não infecciosos). No entanto, achados clínicos de um estudo observacional do tipo caso-controle sugeriu que a síndrome de Guillain-Barré associada à infecção pelo ZIKV resultou em alta morbidade e esteve frequentemente associada ao desencadeamento de neuropatia cranial (DIRLIKOV *et al.*, 2018).

Outros tipos de desordens neurológicas já reportadas e associadas à infecção pelo ZIKV foram encefalopatias, meningoencefalite e mielite aguda (ARAUJO; SILVA; ARAUJO, 2016; MUÑOZ *et al.*, 2017).

## 2.7 Manifestações clínicas associadas à infecção pelo CHIKV

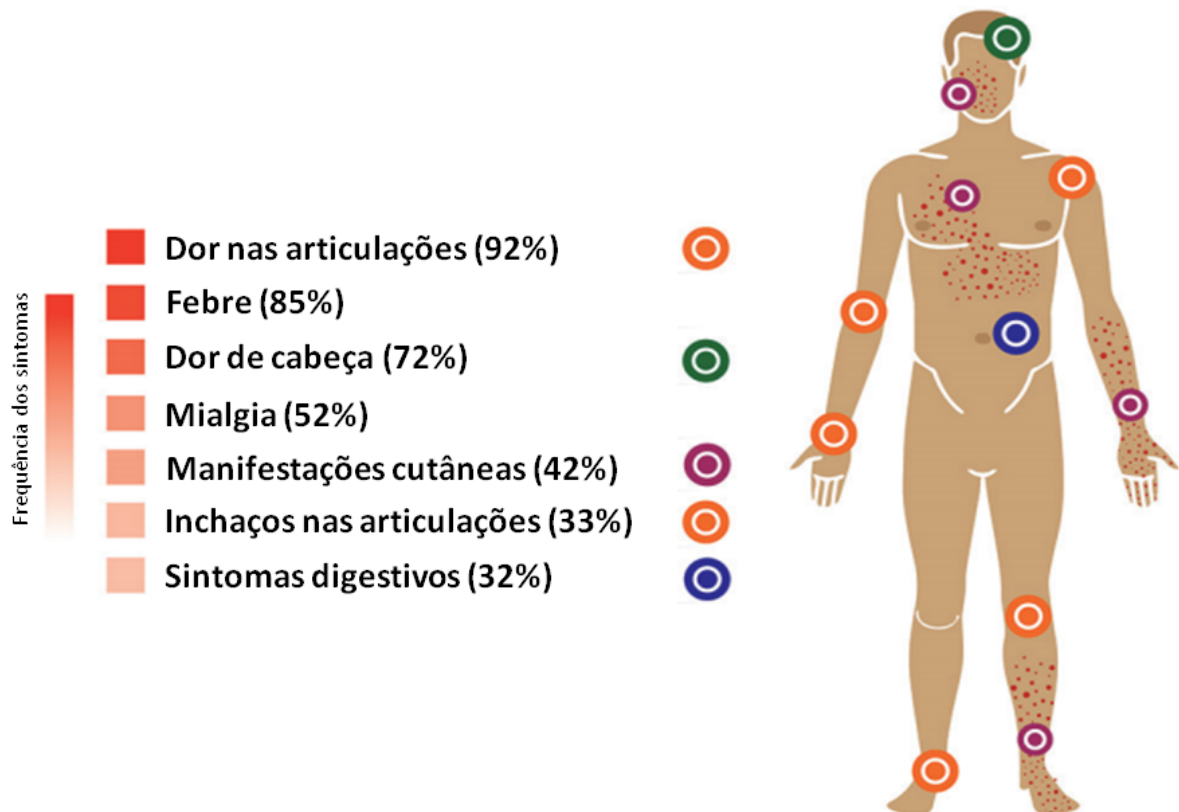
A infecção causada pelo CHIKV está tipicamente associada com febre alta ( $> 38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) no início da doença, podendo estar associada com outros sintomas incluindo astenia intensa, artralgia, mialgia, dor de cabeça, exantema e erupção cutânea (Figura 10) (TANABE *et al.*, 2018; WEAVER; LECUIT, 2015). Na maioria dos casos reportados em indivíduos adultos saudáveis, a doença causada pelo CHIKV é autolimitada e os sintomas permanecem nos pacientes por cerca de 4-7 dias, que são seguidos por uma recuperação completa do paciente (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Entretanto, vários estudos demonstraram que pacientes infectados com o CHIKV podem apresentar a persistência de mialgia e artralgia por vários meses ou até mesmo anos após a infecção, o que caracteriza a fase crônica da doença (MORO *et al.*, 2012; SCHILTE *et al.*, 2013). Ao contrário da fase aguda, a fase crônica é caracterizada pela presença de poliartralgia e/ou poliartrite, que muitas vezes está associada à fadiga (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012). Nesse contexto, a poliartralgia é descrita como a manifestação clínica mais comum da infecção pelo CHIKV e se manifesta entre 87–98% dos casos (THIBERVILLE *et al.*, 2013). Outros sintomas menos comuns reportados nos pacientes infectados incluem linfadenopatia, conjuntivite, prurido, e anormalidades digestivas (WEAVER; LECUIT, 2015).

Pacientes com febre chikungunya que requerem hospitalização tendem a ser mais velhos e apresentarem comorbidades, como diabetes, doenças cardiovasculares, neurológicas e respiratórias, que são fatores de risco independentes que aumentam o risco de progressão para um quadro severo da doença (JAVELLE *et al.*, 2014). Casos fatais relatados recentemente de infecção pelo CHIKV em idosos descreveram insuficiência hepática com colapso cardiovascular e deterioração neurológica e pulmonar seguida de falência de múltiplos órgãos (CHUA *et al.*, 2010; HOZ; BAYONA *et al.*, 2015). Outras manifestações reportadas em pacientes com doença severa incluem encefalopatia, encefalite, miocardite, acidente vascular cerebral (AVC) e ataque isquêmico transitório (BRITO FERREIRA *et al.*, 2020; WEAVER; LECUIT, 2015).

Os recém-nascidos representam outro grupo de risco que estão predispostos a desenvolver uma doença mais grave associada a infecção pelo CHIKV (THIBERVILLE *et al.*, 2013; WEAVER; LECUIT, 2015). Considerando que a infecção em neonatos parece ser extremamente rara, a taxa de infecção de neonatos nascidos em mães expostas ao vírus durante o nascimento pode chegar a 50%, podendo desencadear manifestações graves e sequelas neurológicas a longo prazo nos neonatos (GÉRARDIN *et al.*, 2008). Outras manifestações

atípicas e graves já descritas neste grupo de pacientes incluem, hiperpigmentação, manifestações cutâneas, desordens neurológicas, como como convulsões e encefalite, e uma variedade de outras complicações (RAMFUL *et al.*, 2007; RAO; KHAN; CHITNIS, 2008; ROBIN *et al.*, 2008; ROBIN *et al.*, 2010).

**Figura 10** - Achados clínicos em pacientes infectados com o CHIKV.



Fonte: Tanabe *et al.* (2018).

Legenda: Principais manifestações clínicas associadas a infecção pelo CHIKV de acordo com a frequência de cada sintoma. Quando infectados, os pacientes tipicamente apresentam dor nas articulações (92%), febre alta (85%), dor de cabeça (72%), mialgia (52%), manifestações cutâneas (42%), inchaços nas articulações (33%) e sintomas digestivos (32%).

## 2.8 Diagnóstico

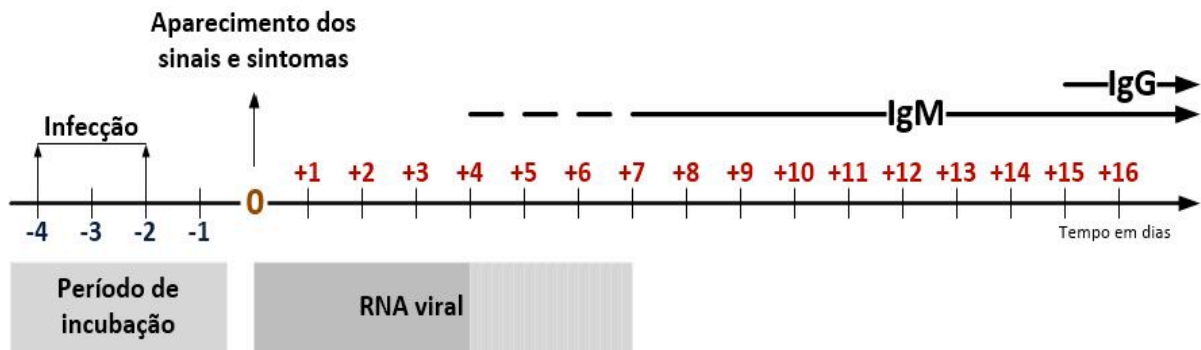
### 2.8.1 Diagnóstico clínico e progressão clínica

Em áreas em que existe uma circulação de outros arbovírus, como ZIKV, DENV e o CHIKV, o diagnóstico desses vírus com base apenas na sintomatologia apresentada pelo o paciente torna-se um desafio uma vez que os sintomas são similares, dificultando assim, a

implementação de um manejo terapêutico do paciente e o diagnóstico confiável através dos médicos (AZEREDO *et al.*, 2018; IOOS *et al.*, 2014; MAGALHAES *et al.*, 2017; PESSÔA *et al.*, 2016). Entre os sintomas comumente associados à infecção por esses três arbovírus mencionados anteriormente destacam-se febre, mialgia, artralgia, exantema e dor retro-orbital (AZEREDO *et al.*, 2018). Além disso, a infecção pelo novo coronavírus pandêmico, o SARS-CoV-2, o agente etiológico da COVID-19 também pode resultar em sintomas similares aos provocados por ZIKV, DENV e CHIKV, especialmente durante a fase inicial da infecção (DA SILVA *et al.*, 2020; NACHER *et al.*, 2020; SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021). Dessa forma, o diagnóstico laboratorial assume um papel crucial para o diagnóstico da infecção causada por arbovírus. Nos laboratórios, o diagnóstico da infecção causada pelo ZIKV e CHIKV pode ser realizado de forma indireta através da utilização de métodos sorológicos que visam detectar os anticorpos (IgM e IgG) circulantes após a infecção nos pacientes, ou de forma direta através dos métodos moleculares, cujo objetivo é detectar o material genético do vírus durante o período de viremia.

A implementação da abordagem apropriada para o diagnóstico da infecção pelo ZIKV depende da fase de infecção, que é dividida em fase aguda e fase convalescente. A fase aguda é caracterizada pelos estágios iniciais da infecção quando as partículas virais estão replicando nas células infectadas e o hospedeiro apresenta viremia. Após o início das primeiras manifestações clínicas, geralmente é observado uma resposta inicial à infecção com a produção de anticorpos da classe IgM e essa resposta imune precoce também é considerada parte da fase aguda da infecção. Em contraste, a fase convalescente ocorre durante os estágios tardios da infecção e é caracterizada por uma resposta imune persistente com elevada produção de anticorpos da classe IgG (Figura 11) (CHARREL *et al.*, 2016; MAEDA, 2013). De modo geral, os métodos moleculares e os métodos sorológicos são utilizados para detectar o RNA viral e os anticorpos IgM, respectivamente, durante a fase aguda da doença logo após o início dos primeiros sintomas e, ao contrário disso, apenas os métodos sorológicos são empregados para detectar os anticorpos IgG na fase convalescente da doença.

**Figura 11** - Progressão clínica da infecção causada pelo ZIKV.

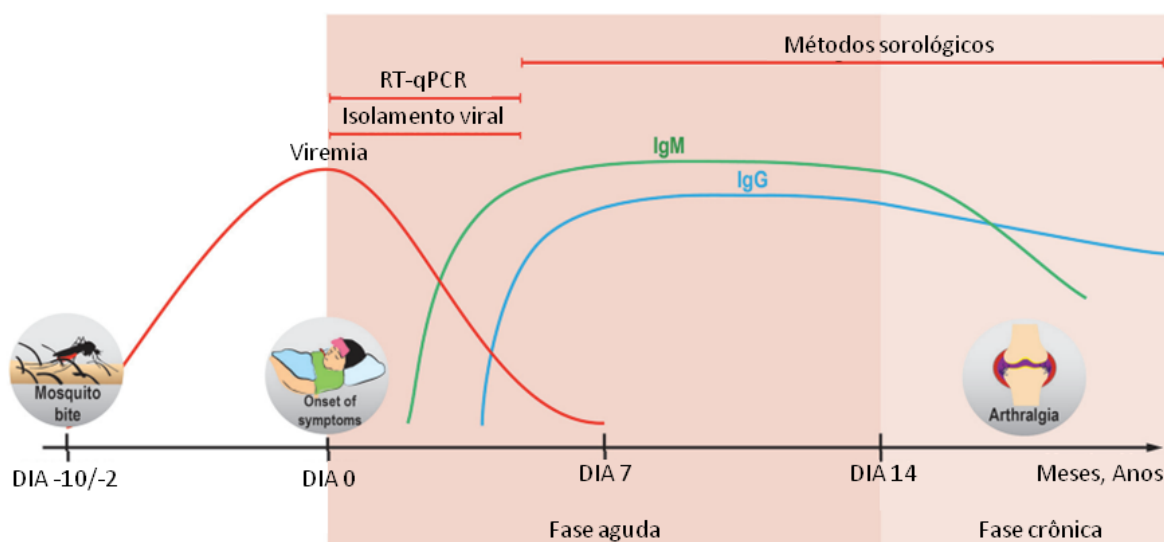


Fonte: Sullivan Nicolaidides *et al.* (2014).

Legenda: A progressão clínica da infecção causada pelo ZIKV se inicia com um breve período de incubação do vírus. Na sequência, quando sintomáticos, os pacientes começam a apresentar as manifestações associadas à infecção. Logo após o início dos primeiros sintomas, é observada a viremia nos pacientes infectados e durante esse momento os métodos moleculares devem ser empregados no diagnóstico a fim de detectar o RNA viral nas amostras oriundas dos pacientes. Ainda durante o período de viremia, o sistema imune inicia uma resposta com a produção de anticorpos da classe IgM e durante os estágios tardios da infecção é observada uma elevada produção de anticorpos da classe IgG.

Assim como para o ZIKV, a implementação da abordagem apropriada para o diagnóstico da infecção pelo CHIKV depende da progressão clínica que é apresentada pelo paciente, que pode ser dividida nas fases agudas e crônicas, respectivamente. Após a infecção, o período de incubação geralmente dura em torno de 2 a 10 dias (Figura 12) (TANABE *et al.*, 2018). O início dos primeiros sintomas coincide com o período em que ocorre a viremia nos pacientes, onde a carga viral pode alcançar rapidamente elevados níveis como  $10^9$  cópias/mililitro de sangue (WEAVER; LECUIT, 2015). A infecção aguda geralmente dura aproximadamente 1 semana até que a viremia termine e, na sequência, é observada uma resposta inicial à infecção com a produção de anticorpos das classes IgM e IgG (STAIKOWSKY *et al.*, 2009; THIBERVILLE *et al.*, 2013). Os anticorpos da classe IgM são detectados 3-8 dias após o início dos primeiros sintomas e geralmente persistem por até 3 meses (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012). Em contraste, os anticorpos da classe IgG são detectados 4-10 dias após o início dos sintomas e podem persistir por anos, o que caracteriza a fase crônica da doença causada pelo CHIKV (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012).



**Figura 12** - Progressão clínica da infecção causada pelo CHIKV.

Fonte: Tanabe *et al.* (2018).

Legenda: A progressão clínica da infecção causada pelo CHIKV se inicia com um período de incubação geralmente dura em torno de 2 a 10 dias. Logo após a infecção, é observada a viremia nos pacientes infectados e durante esse momento os métodos de detecção viral direta devem ser empregados no diagnóstico a fim de detectar as partículas virais presentes nas amostras oriundas dos pacientes, através do isolamento viral ou através da utilização dos métodos moleculares. Ainda durante o período de viremia, o sistema imune inicia uma resposta com a produção de anticorpos da classe IgM e IgG. Os anticorpos da classe IgM são detectados 3-8 dias após o início dos primeiros sintomas e geralmente persistem por até 3 meses, enquanto os anticorpos da classe IgG são detectados 4-10 dias após o início dos sintomas e podem persistir por anos, o que caracteriza a fase crônica da doença.

## 2.8.2 Diagnóstico laboratorial

### 2.8.2.1 Isolamento viral

O isolamento do ZIKV foi realizado inicialmente a partir de amostras oriundas de primatas não-humanos e mosquitos da espécie *Aedes africanus*, seguido de inoculação intracerebral em camundongos e o isolamento bem-sucedido a partir do filtrado cerebral dos animais infectados (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Posteriormente, o ZIKV foi isolado a partir da inoculação em ovos embrionados de galinhas, sacos alantóicos e membrana corioalantóica, bem como através do uso de linhagens celulares (DIGOUTTE *et al.*, 1992; TAYLOR, 1952). Após o ZIKV reemergir nas ilhas do Pacífico em 2007 e está associado com o primeiro grande surto em seres humanos, novos relatos de isolamento viral a partir de diferentes amostras biológicas humanas, como sangue, urina e sêmen foram reportados (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014; FONSECA *et al.*, 2014; MUSSO *et al.*, 2015).

Atualmente, o método referência empregado para o isolamento do ZIKV é através da inoculação intracerebral em camundongos (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; DIGOUTTE *et al.*, 1992). Além disso, o ZIKV pode ser isolado a partir de várias linhagens celulares, incluindo células C6/36 e células Vero (DIGOUTTE *et al.*, 1992; HADDOW *et al.*, 2012). Ao contrário do ZIKV, o isolamento do CHIKV deve ser realizado usando amostras recolhidas antes do oitavo dia de infecção (CUNHA; TRINTA, 2017; JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016). No geral, o CHIKV produz efeito citopático em aproximadamente três dias após a infecção, quando inoculado em várias linhagens celulares. As principais linhagens empregadas para o isolamento viral são Vero, C6/36, BHK-21 e Hela. A confirmação do isolamento do CHIKV pode ser através da utilização de técnicas como imunofluorescência, RT-PCR ou RT-qPCR (CUNHA; TRINTA, 2017). Além disso, em muitos países é necessário um laboratório de biossegurança nível 3 (BSL-3) para a realização do isolamento viral, o que representa um gargalo. Embora o isolamento viral represente uma alternativa altamente específica para detectar o ZIKV e CHIKV, trata-se de um procedimento laborioso e que necessita de mão de obra altamente especializada, o que limita de certa forma a sua aplicação para diagnosticar o ZIKV a partir de amostras de pacientes infectados. No entanto, é importante destacar que o isolamento viral tem sido amplamente empregado em laboratórios científicos para fins de pesquisas, particularmente devido ao fato que o isolamento possibilita conhecer e determinar as características fenotípicas do vírus isolado (DONALD *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2020).

#### 2.8.2.2 Métodos sorológicos

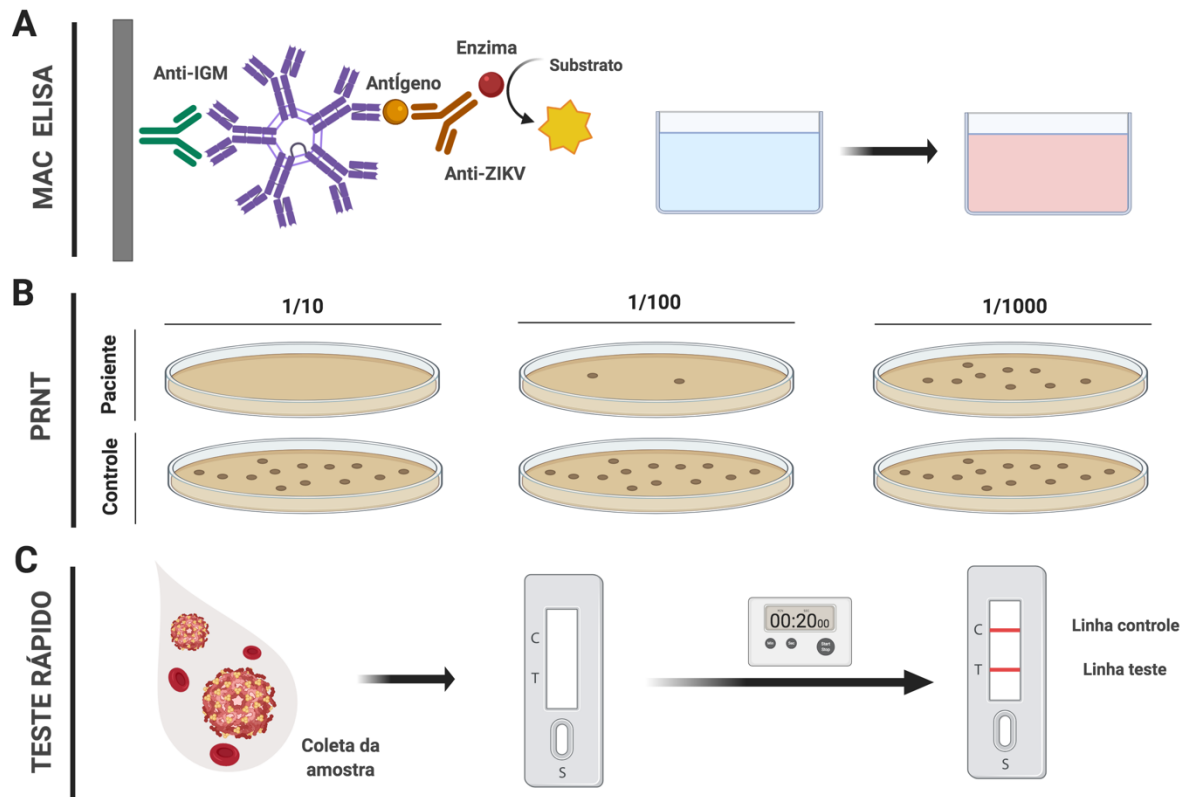
A detecção de anticorpos circulantes no organismo de pacientes infectados pelo o ZIKV e CHIKV pode ser realizada através da utilização de diferentes ferramentas e técnicas, tais como imuno-histoquímica, imunofluorescência, ensaio de imunoabsorção enzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), teste de neutralização por redução de placas (*Plaque Reduction Neutralization Test*, PRNT) e através de ensaios de fluxo lateral (testes rápidos) (Figura 13). Após a infecção pelo ZIKV, a presença de anticorpos de classe IgM é observada, podendo ser detectados 4 dias após a início dos primeiros sintomas até 12 semanas, na fase de convalescência. Na sequência, a resposta imune do hospedeiro produz anticorpos da classe IgG logo após a produção de anticorpos IgM, o que caracteriza a fase convalescente da infecção.

Baseado nisso resultados recentes demonstraram que os níveis de anticorpos da classe IgG podem permanecer elevados por pelo menos dois anos após a infecção (ZHAO *et al.*, 2019).

Durante a epidemia na Micronésia em 2007, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC*) desenvolveu um ensaio sorológico baseado na técnica de ELISA para detecção de anticorpos da classe IgM a partir de amostras de soro e fluido cerebrospinal. Em ordem de esclarecer resultados inconclusivos ou falso positivos para detecção de anticorpos IgM a partir das amostras dos pacientes, o CDC recomenda a confirmação através do ensaio PRNT, considerado o método padrão-ouro para o diagnóstico diferencial de flavivírus decorrente da alta especificidade (CDC, 2019). Juntos, ELISA e PRNT representam os ensaios sorológicos empregados na linha de frente no diagnóstico de pacientes infectados com o ZIKV. Entretanto, dada à emergência do ZIKV nas Américas em meados de 2015 e 2016, houve uma mobilização da comunidade científica e de empresas privadas em busca do desenvolvimento de testes rápidos para o diagnóstico sorológico do ZIKV. No caso do CHIKV, o diagnóstico sorológico é facilitado pela diversidade antigênica limitada do CHIKV e a ampla reatividade cruzada dos anticorpos induzidos em resposta a diferentes cepas do vírus (WEAVER; LECUIT, 2015).

Apesar de valiosa e oferecer uma janela de oportunidade mais ampla para o diagnóstico nos casos de infecção pelo ZIKV e CHIKV, os ensaios sorológicos podem apresentar altos índices de resultados falso-positivos devido às reações cruzadas com outros arbovírus, especialmente com o vírus da dengue (DENV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV) e são, portanto, de valor limitado (LANCIOTTI *et al.*, 2008; WAGGONER; PINSKY, 2016). A possibilidade reações cruzadas através da utilização dos ensaios sorológicos torna-se maior particularmente em regiões que apresentam a circulação de arbovírus, como é caso do Brasil e outros países tropicais (MAGALHAES *et al.*, 2017). Além disso, os ensaios sorológicos demandam um elevado custo e necessitam de equipamentos adequados e infraestrutura especializada, o que associadas ao tempo necessário para liberação do resultado, limitam a utilidade em larga escala no diagnóstico de rotina, principalmente em áreas com poucos recursos.

**Figura 13** - Representação esquemática dos principais ensaios sorológicos (ELISA, PRNT e testes rápidos) empregados no diagnóstico do ZIKV e CHIKV.



Fonte: O autor. Criado com Biorender.com

Legenda: Testes sorológicos empregados para o diagnóstico do ZIKV, incluindo o ensaio de imunabsorção enzimática por captura de anticorpos IgM (MAC ELISA), o teste de neutralização por redução de placa (PRNT) e os ensaios de fluxo lateral (testes rápidos). Na técnica sorológica do MAC ELISA, a presença de anticorpos IgM produzidos em resposta a infecção são detectados (A). No PRNT, são realizadas diluições do soro do paciente (1/10; 1/100; 1/1000) que posteriormente são misturadas com concentrações fixas do vírus previamente titulado. Na sequência, essa mistura é adicionada em monocamada de células confluentes. Anticorpos presentes em amostras de pacientes infectados são capazes de neutralizar o vírus, levando a uma redução do número de placas formadas. Com isso, é possível ter conhecimento se o paciente já teve uma infecção prévia causada pelo ZIKV (B). Nos testes rápidos, um pequeno volume de amostra (geralmente 20 uL para sangue total e 10 uL para soro/plasma) são coletados e adicionados no cassete do teste rápido a fim de detectar anticorpos das classes IgM e/ou IgG. Após cerca de 10-15 minutos, o resultado pode ser facilmente visualizado (C). C: Linha controle; T: Linha teste; S: Local de adicionar a amostra do paciente.

### 2.8.3 Métodos moleculares para o diagnóstico de arbovírus emergentes

Os ensaios moleculares visam detectar a presença do RNA viral nas amostras biológicas oriundas dos pacientes. Atualmente, a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) é o método padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV e CHIKV em amostras humanas (FAYE; DIALLO; DIALLO; WEIDMANN *et al.*, 2013; WAGGONER; PINSKY, 2016). No entanto, desde a emergência desses arbovírus na América

Latina, inúmeras outras plataformas moleculares foram desenvolvidas, adaptadas e redirecionadas para diagnosticar ZIKV e CHIKV como: LAMP, biossensores moleculares, NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*), SIBA (*Strand Invasion Based Amplification*) e RPA (*Recombinase Polymerase Amplification*) (EBOIGBODIN *et al.*, 2016; HERRADA *et al.*, 2018; LOPEZ-JIMENA *et al.*, 2018; PARDEE *et al.*, 2016; SILVA; PARDEE; PENA, 2019).

### 2.8.3.1 RT-qPCR

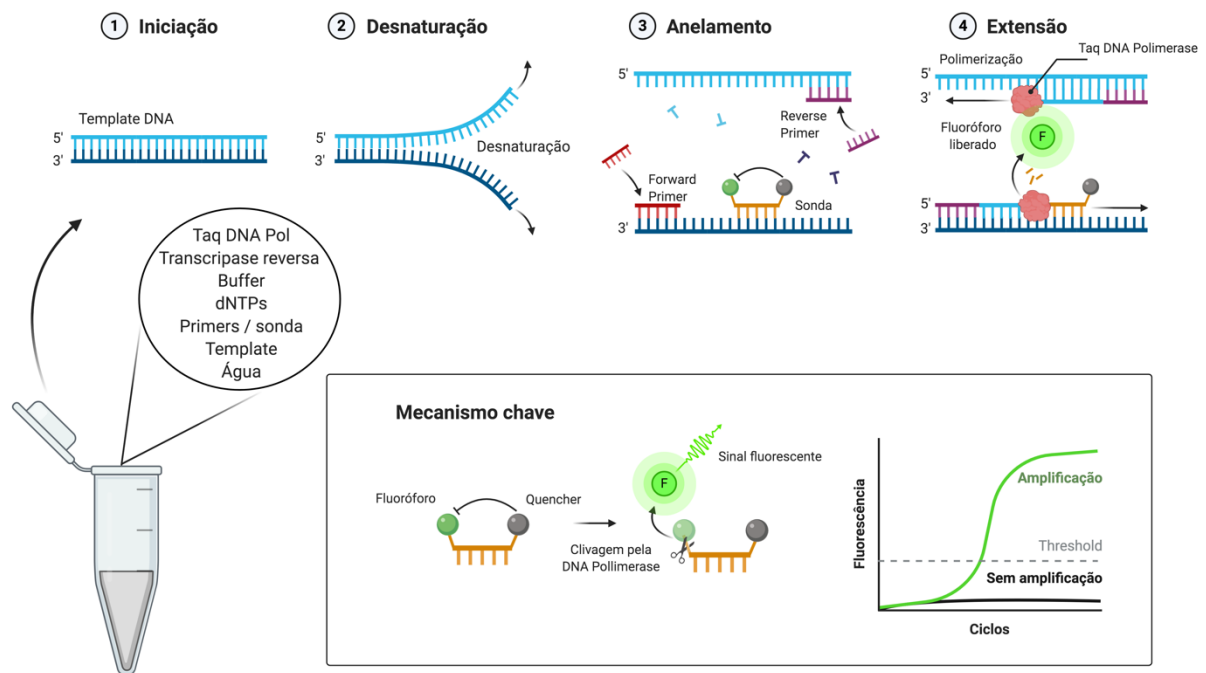
A RT-qPCR é uma técnica molecular que apresenta elevada sensibilidade, especificidade e velocidade (Figura 14). Devido a essas vantagens, a RT-qPCR tem sido aplicada para o diagnóstico de inúmeros patógenos incluindo bactérias, fungos e vírus, incluindo ZIKV, DENV e CHIKV. Durante a primeira grande epidemia provocada pelo ZIKV na Ilha de Yap em 2007, Lanciotti *et al.* (2008) desenvolveu um ensaio baseado na técnica de RT-qPCR para auxiliar no diagnóstico dos pacientes infectados, sendo capaz de detectar até 25 cópias genômicas e até o presente momento tem sido empregado como protocolo referência para o diagnóstico molecular do ZIKV (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Na sequência, Faye *et al.* desenvolveu outro protocolo de alta performance baseado na técnica de RT-qPCR para a detecção do ZIKV (FAYE *et al.*, 2013). Assim como para o ZIKV, Lanciotti *et al.* (2007) também desenvolveu um protocolo baseado na técnica de RT-qPCR para o diagnóstico do CHIKV em amostras clínicas (LANCIOTTI *et al.*, 2007), que atualmente é empregado como protocolo padrão-ouro.

Desde então, muitos testes foram desenvolvidos *in house* com base na técnica de RT-qPCR, incluindo a otimização de ensaios *multiplex* para a detecção simultânea de ZIKV, DENV e CHIKV. Nesse contexto, o CDC desenvolveu um ensaio Trioplex baseado na RT-qPCR que possibilita a detecção do ZIKV, DENV e CHIKV em um único ensaio, sendo capaz de detectar  $10^3$  cópias do genoma/mL de cada vírus (SANTIAGO *et al.*, 2018). Em outro estudo, foi desenvolvido um ensaio de RT-qPCR para a detecção simultânea de quatro arbovírus incluindo ZIKV, DENV, CHIKV e YFV (WU *et al.*, 2018). Entretanto, o maior desafio no que se refere ao desenvolvimento de ensaios *multiplex* é referente à perda de sensibilidade quando comparado aos ensaios *monoplex* para cada vírus individualmente.

Embora a RT-qPCR possua alto desempenho que justifique a sua utilização na rotina laboratorial para o diagnóstico de arboviroses, outras preocupações surgem a partir do custo

elevado que é necessário para a sua execução. A RT-qPCR envolve equipamentos caros e sofisticados para amplificação e detecção do genoma viral, além de necessitar de recurso humano altamente especializado. Além disso, o procedimento padrão para testagem das amostras oriundas dos pacientes exige a extração do RNA. Procedimento esse que é oneroso para a realidade da maioria dos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Em conjunto, esses fatores limitam de sobremaneira a capacidade de diagnóstico laboratorial, promovendo assim, a centralização do diagnóstico através de laboratórios referências.

**Figura 14** - Representação esquemática da RT-qPCR utilizada para o diagnóstico molecular do ZIKV e CHIKV.



Fonte: O autor. Criado com Biorender.com

Legenda: A RT-qPCR é técnica referência para a detecção molecular do ZIKV em amostras de pacientes e amostras de mosquitos. Similar ao que ocorre na PCR convencional, a RT-qPCR possui várias etapas incluindo: 1) Iniciação, 2) Desnaturação, 3) Anelamento dos *primers*/sonda e 4) Extensão. O protocolo utilizado para o diagnóstico do ZIKV é *one-step* utilizando o sistema de *TaqMan* ao invés de SYBR, o que possibilita que a etapa de RT ocorra e, logo em seguida, ocorra os ciclos de desnaturação e extensão na mesma reação. Essa característica acelera a liberação do resultado da reação. Inicialmente, é realizada a extração do RNA da amostra. Outro ponto-chave da RT-qPCR é a utilização de sondas, o que aumenta a especificidade e sensibilidade do ensaio. As reações ocorreram em plataformas de PCR em Tempo Real sob temperaturas previamente estabelecidas por Lanciotti et al. (2008) e o RNA viral foi amplificado e identificado com base na fluorescência emitida durante a reação.

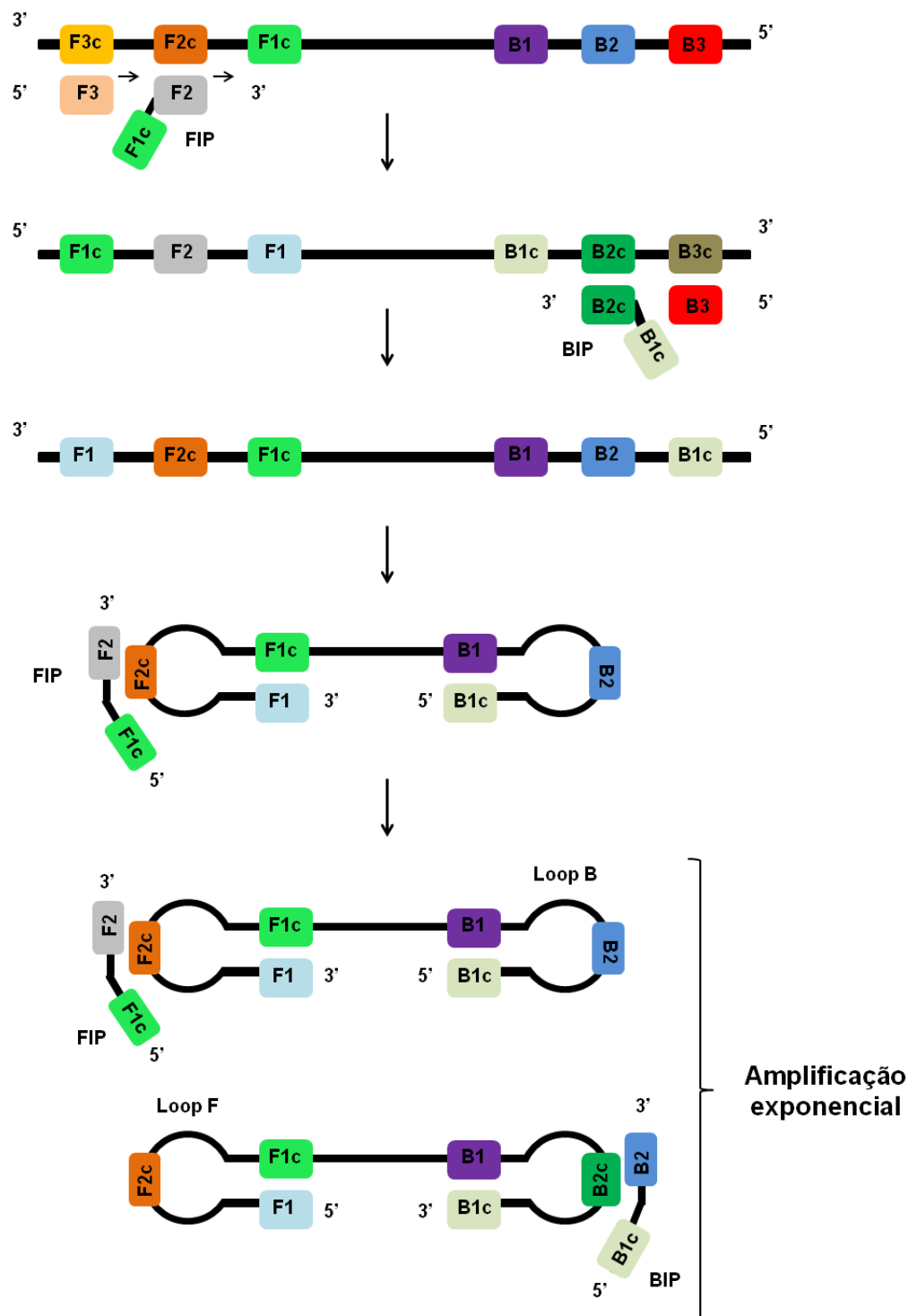
### 2.8.3.2 RT-LAMP

A técnica de amplificação isotérmica mediada por alça (*Loop-mediated isothermal amplification* – LAMP) descrita inicialmente por Notomi et al. (2000) tem demonstrado potencial de aplicação em inúmeras áreas, bem como para diagnosticar inúmeros patógenos (NOTOMI *et al.*, 2000). Trata-se de uma técnica simples e prática que permite a amplificação rápida e precisa de alvos de ácido nucleico (DNA ou RNA) em temperatura isotérmica (NOTOMI *et al.*, 2000). A técnica RT-LAMP apresenta muitas vantagens quando comparada a outros métodos moleculares incluindo rapidez, baixo custo, alta sensibilidade, alta especificidade e praticidade na visualização dos resultados através da utilização de intercalantes de DNA (NEMOTO *et al.*, 2010). Além disso, é importante destacar que a incubação em temperatura isotérmica permite que as reações do LAMP sejam realizadas diretamente no campo, na ausência de equipamentos caros e sofisticados, o que tem atraído muita atenção e interesse para utilização desta técnica (NOTOMI *et al.*, 2015).

Desde a sua primeira descrição, o LAMP sofreu muitas adaptações e foi colocado em prática para a detecção de patógenos em amostras que variam de animais, plantas, mosquitos e humanos (DAO THI *et al.*, 2020; LAMB *et al.*, 2020; NOTOMI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2019). Alguns destaques das adaptações do LAMP incluem LAMP multiplex, LAMP eletroquímico e LAMP baseado em disco (SALINAS; LITTLE, 2012; SANTIAGO-FELIPE *et al.*, 2016; WONG *et al.*, 2018). Para vírus que possuem o material genético constituído de RNA, como ZIKV, DENV e CHIKV, é necessário realizar uma reação de transcrição reversa LAMP (RT-LAMP) que inclui as enzimas que primeiro convertem RNA → DNA inicialmente durante a reação do LAMP e, na sequência, uma DNA polimerase amplifica a região alvo a menos que uma enzima com atividade conjunta de transcriptase reversa e DNA polimerase seja empregada (SILVA *et al.*, 2019; SILVA; PARDEE; PENA, 2019).

O mecanismo de funcionamento da reação LAMP usualmente emprega um conjunto de quatro ou seis *primers* diferentes, que se ligam especificamente a regiões do gene alvo (Figura 15) (NOTOMI *et al.*, 2000). Os conjuntos de *primers* para o ensaio LAMP incluem dois *primers* externos (F3 e B3), dois *primers* internos (FIP e BIP) e dois outros *primers* projetados para acelerar a amplificação, incluindo os *primers* de “loop” (LF e LB). A utilização deste conjunto de seis *primers* aumenta a especificidade da reação e ao mesmo tempo melhora a sensibilidade do ensaio (BOEHME *et al.*, 2007). Após o desenho dos *primers*, o ensaio LAMP pode ser realizado com fontes de incubação simples e prontamente disponíveis, como banho-maria ou bloco de aquecimento para aquecimento isotérmico (NEMOTO *et al.*, 2010).

Figura 15 - Mecanismo de funcionamento da técnica LAMP.



Fonte: Silva *et al.* (2019, tradução nossa).

Legenda: Durante os estágios iniciais da reação LAMP, os *primers* internos (FIP ou BIP) se anelam dentro da região alvo no genoma. Os *primers* externos (F3 ou B3) então hibridizam no alvo e inicia a formação de estruturas em *loop* de auto-hibridização pela invasão da fita. Isto resulta na formação de um DNA em forma de haltere, que se torna um ponto de partida para a amplificação exponencial. A adição dos primers do *loop* (LF e LB) podem acelerar o processo da reação.



O ensaio RT-LAMP pode ser realizado empregando um protocolo de uma ou de duas etapas a partir de diferentes matrizes da amostra, incluindo soro, urina, saliva, sêmen e macerado de mosquitos. O uso da Bst 2.0 DNA polimerase, Bst 3.0 DNA polimerase ou OmniAmp DNA polimerase permite que o ensaio seja executado em um protocolo de uma única etapa (CHANDER *et al.*, 2014; CHOTIWAN *et al.*, 2017; SILVA; PARDEE; PENA, 2019). Essas enzimas possuem atividades de transcriptase reversa (RT) e DNA polimerase em uma temperatura isotérmica (50 - 72 ° C) e, portanto, podem ser utilizadas para a detecção direta de alvos que possuem o material genético constituído de DNA ou RNA. Além disso, essas enzimas são capazes de manter suas atividades mesmo na presença de inibidores de reação, o que permite que a reação seja realizada diretamente no campo sem a necessidade de extrair o material genético das amostras (LEE *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2016). Isto é importante especialmente para a detecção do alvo viral em matrizes complexas que são caracterizadas por possuírem altas concentrações de inibidores de reação (BECKMANN; FALLON, 2012). Com base nesta vantagem, vários ensaios RT-LAMP de uma etapa foram desenvolvidos para a detecção molecular do ZIKV (LAMB *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019).

Em contraste, o protocolo RT-LAMP de duas etapas requer a adição de uma enzima RT junto com a DNA polimerase. A utilização do protocolo RT-LAMP de duas etapas para detectar ZIKV foi descrito por vários grupos (CALVERT *et al.*, 2017; KUROSAKI *et al.*, 2017; YAREN *et al.*, 2017). Entretanto, o protocolo de duas etapas apresenta algumas desvantagens que o torna menos prático do que o protocolo de uma etapa. O protocolo de duas etapas é mais caro, requer tempos mais longos, incluindo amostras mais etapas de manuseio das amostras e dos reagentes, o que aumenta a probabilidade de erro e contaminação (SILVA *et al.*, 2019). Em conjunto, esses aspectos limitam o uso prático do protocolo de RT-LAMP de duas etapas para aplicações de diagnóstico do tipo POC.

Desde a emergência do ZIKV e CHIKV nas Américas nos últimos anos, vários protocolos baseados na técnica do LAMP foram desenvolvidos para o diagnóstico molecular destes arbovírus emergentes (HAYASHIDA *et al.*, 2019; LOPEZ-JIMENA *et al.*, 2018; SILVA; PARDEE; PENA, 2019) (Quadros 2 e 3). No entanto, a maioria dos protocolos reportados até o presente momento de RT-LAMP necessitam de equipamentos sofisticados para a detecção e amplificação do ZIKV, o que limita sua aplicabilidade em áreas remotas ou regiões com poucos recursos e baixa infraestrutura laboratorial, como é o caso do Brasil.

**Quadro 2** - Ensaios baseados no LAMP para detecção do ZIKV.

<b>Modo de detecção</b>	<b>Limite de detecção (LoD)</b>	<b>Tipo de amostra empregada</b>	<b>Região de anelamento dos primers</b>	<b>Necessidade de extração do RNA</b>	<b>Referência</b>
Através do olho nu com o auxílio do leuco cristal violeta	5 PFU/mL	Saliva artificialmente infectada	Proteína E	Sim	(SONG <i>et al.</i> , 2016)
Susceptômetro AC portátil	1 aM	Soro humano experimentalmente infectado com oligonucleotídeos sintéticos do ZIKV	NS5	~	(TIAN <i>et al.</i> , 2016)
Monitoramento da turbidez e por olho nu com a utilização da calceína	0.02 PFU/mL	Saliva, urina e soro infectados artificialmente	NS1	Sim	(WANG <i>et al.</i> , 2016)
Através de um ensaio de fluxo lateral (LFA)	1 cópia de RNA	Sangue humano infectado artificialmente	Proteína E	Não	(LEE <i>et al.</i> , 2016)
Monitoramento da fluorescência através do acoplamento com uma máquina de PCR em Tempo Real	14,5 TCID <sub>50</sub> /mL	Amostras de soro e urina obtidas de pacientes. Soro e urina infectados artificialmente	Proteína E	Sim	(KUROSAKI <i>et al.</i> , 2017)
Detecção da fluorescência através do uso de um smartphone	10 <sup>0</sup> PFU/mL	Sangue, urina e saliva infectados artificialmente	NS5	Sim	(PRIYE <i>et al.</i> , 2017)
Monitoramento da fluorescência através de uma plataforma de PCR em Tempo Real e através do olho nu	~ 0,71 PFU/RNAs equivalentes	Urina, saliva, plasma e amostras de mosquito infectados artificialmente	NS5	Sim	(YAREN <i>et al.</i> , 2017)
Detecção através do olho nu	1.2 cópias de RNA/μL	Urina e soro obtidos de pacientes	Proteína E	Sim	(CALVERT <i>et al.</i> , 2017)
Detecção da fluorescência através do uso de um smartphone	1,56 <sup>5</sup> PFU/mL	Sangue artificialmente infectado	NS1	Sim	(GANGULI <i>et al.</i> , 2017)
Monitoramento da fluorescência com uma máquina de PCR em Tempo Real e	0,05 PFU/mL	Soro, plasma e sêmen. Além de sangue, plasma, saliva, urina e sêmen e amostras	NS2A	Não	(CHOTIWAN <i>et al.</i> , 2017)

através do olho nu		de <i>Aedes</i> experimentalmente infectados				
Monitoramento da fluorescência com uma máquina de PCR em Tempo Real	2,2.10 <sup>3</sup> cópias de RNA/mL	Saliva e urina obtidas de pacientes. Além de saliva e urina infectadas artificialmente	Capsídeo	Sim		(CASTRO <i>et al.</i> , 2018)
Detecção através do olho nu com a utilização do SYBR	1 cópia do genoma/rxn	Urina obtida de pacientes. Além de amostras de <i>Aedes</i> experimentalmente infectadas	NS5	Não		(LAMB <i>et al.</i> , 2018)
Detecção da fluorescência através do uso de um smartphone	1 cópia/μL	Plasma e urina infectados artificialmente	NS5	Sim		(KAARJ; AKARAPIPAD; YOON, 2018)
Monitoramento da fluorescência e através de dot-blot	2.10 <sup>2</sup> cópias de RNA/mL	Saliva infectada artificialmente	Capsídeo	Sim		(SABALZA <i>et al.</i> , 2018)
Monitoramento da fluorescência com uma máquina de PCR em Tempo Real	3,3 ng/μL	RNA viral	NS5	Sim		(GUO <i>et al.</i> , 2018)
Monitoramento da turbidez e por olho nu com a utilização da calceína	0,5×10 <sup>-9</sup> pmol/μl (NS5) / 1.12×10 <sup>-11</sup> pmol/μl (Proteína E)	Plasmídeos recombinantes contendo o gene da NS5 ou da proteína E	NS5 /Proteína E	~		(ZHAO; FENG, 2018)
Detecção através do olho nu com a utilização do SYBR	10 <sup>-3</sup> cópias de RNA	Soro de pacientes	NS5	Não		(NEVES ESTRELA <i>et al.</i> , 2019)
Detecção através do olho nu com a utilização do SYBR	10 <sup>-3</sup> PFU	Mosquitos <i>Aedes</i> e <i>Culex</i> experimentalmente e naturalmente infectados	Proteína E	Não		(SILVA <i>et al.</i> , 2019)
Monitoramento da turbidez	3.73 cópias de RNA	Soro, urina e saliva experimentalmente infectados	Junção NS2A-NS3	Sim		(TEOH <i>et al.</i> , 2020)

Fonte: O autor.

**Quadro 3** - Ensaio baseado no LAMP para detecção do CHIKV.

<b>Modo de detecção</b>	<b>Limite de detecção (LoD)</b>	<b>Tipo de amostra empregada</b>	<b>Região de anelamento dos primers</b>	<b>Necessidade de extração do RNA</b>	<b>Referência</b>
Detecção através do olho nu com a utilização do SYBR	$2 \times 10^1$ cópias	Soro de pacientes	E1	Sim	(PARIDA <i>et al.</i> , 2007)
Monitoramento da fluorescência com uma máquina de PCR em Tempo Real	37.8 cópias	Urina e plasma obtidas de pacientes e macerado de mosquitos <i>Aedes</i>	nSP2	Não	(YAREN <i>et al.</i> , 2017)
Monitoramento da fluorescência	163 moléculas	Soro de pacientes	6K-E1	Sim	(LOPEZ-JIMENA <i>et al.</i> , 2018)
Monitoramento da fluorescência através de um detector de LED e sequenciamento das amostras através do MinION	~	Soro de pacientes e sangue experimentalmente infectado	E1	Sim	(HAYASHIDA <i>et al.</i> , 2019)
Monitoramento da turbidez e detecção através do olho nu com a utilização do azul de hidroxinaftol	8 PFU	Soro e sangue de camundongos infectados. Além de soro humano experimentalmente infectado	E1	Não	(SAECHUE <i>et al.</i> , 2020)

Fonte: O autor.

### 2.8.4.3 Biossensores

Desde a emergência de inúmeros arbovírus no Brasil, vários grupos de pesquisa desenvolveram plataformas alternativas de detecção baseadas em sensores para o diagnóstico do ZIKV e CHIKV a fim de oferecer resultados rápidos e precisos e ao mesmo tempo reduzir a necessidade de equipamentos sofisticados para realização do ensaio. Essas características são cruciais, tendo em vista que identificação e confirmação precisa destes arbovírus emergentes diretamente logo após a coleta das amostras dos pacientes é um passo crítico para minimizar a propagação e facilitar o manejo clínico dos pacientes infectados, especialmente gestantes, no caso da infecção causada pelo ZIKV (NICOLINI; MCCRACKEN; YOON, 2017).

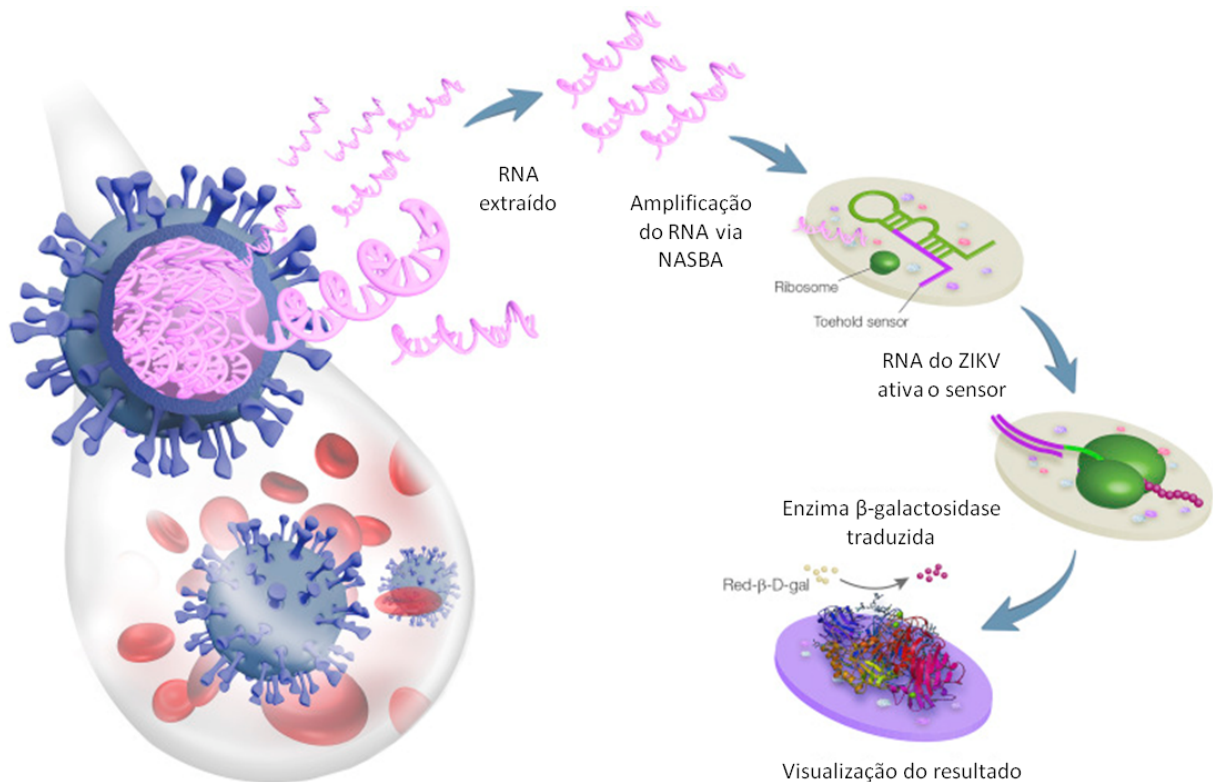
No que se refere a aplicação dos sensores para o diagnóstico rápido das infecções provocadas por arbovírus emergentes, pode-se ressaltar a utilidade dos genossensores, imunossensores e mais recentemente foi descrita a utilidade dos ribossensores. Nos últimos anos, alguns trabalhos reportaram o desenvolvimento de sensores para o diagnóstico molecular e sorológico do ZIKV e CHIKV baseado em várias estratégias e mecanismos diferentes (AFSAHI *et al.*, 2018; FARIA; MAZON, 2019; FARIA; ZUCOLOTO, 2019; KHRISTUNOVA *et al.*, 2020; NASRIN *et al.*, 2021; PARDEE *et al.*, 2016; SINGHAL *et al.*, 2018; TIAN *et al.*, 2018). De forma geral, grande parte dos avanços realizados na área dos sensores é proveniente de tecnologias previamente desenvolvidas para outros patógenos e, posteriormente, foram adaptadas e redirecionadas para a detecção do ZIKV e CHIKV.

Neste contexto, Pardee *et al.* (2016) desenvolveu uma ferramenta de diagnóstico do tipo POC utilizando uma tecnologia livre de células, que permite o uso de genes sintéticos no campo (GREEN *et al.*, 2014; PARDEE *et al.*, 2014; PARDEE *et al.*, 2016). Os ribossensores de RNA programáveis chamados de “*toehold switches*” são capazes de detectar o ZIKV de forma rápida e com alta especificidade e sensibilidade, onde o resultado pode ser facilmente analisado através do olho nu com base na mudança de cor da reação na ausência de equipamentos caros, possibilitando assim, a utilização da plataforma diagnóstica em áreas remotas e com poucos recursos laboratoriais. Inicialmente, Pardee *et al.* desenvolveu os ribossensores em resposta a ameaça global provocado pelo vírus Ebola no continente em 2014 e, após a emergência do Zika nas

Américas, a plataforma foi adaptada para a detecção do mesmo (PARDEE *et al.*, 2014; PARDEE *et al.*, 2016). Recentemente, a tecnologia foi aplicada para a detecção do SARS-CoV-2, o agente etiológico da COVID-19 (AMALFITANO *et al.*, 2021).

Os biossensores desenvolvidos por Pardee *et al.* funcionam como ribossensores sintéticos programáveis capazes de regular a transcrição e tradução da enzima LacZ mediante a hibridização entre o RNA gatilho e sequências complementares presentes nos sensores. Os interruptores “*switchs*” assumem uma estrutura de *hairpin* que bloqueiam a tradução da enzima LacZ devido ao sequestro do códon de iniciação e do sítio de ligação ao ribossomo (RBS), inibindo assim, a transcrição e tradução da enzima LacZ. Após a hibridização entre o RNA gatilho “*trigger*” e o interruptor, como resultado, ocorre o disparo da transcrição e tradução da enzima LacZ que é expressa e converte o seu substrato, o clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (naturalmente amarelo) a um produto com a cor roxa (clorofenol vermelho), o que caracteriza uma amostra positiva. Assim, após o término do tempo de incubação em temperatura isotérmica, as amostras que apresentarem cor amarela são negativas, enquanto as amostras que apresentarem cor roxa são positivas (Figura 16).

Figura 16 - Mecanismo de funcionamento dos ribossensores moleculares.



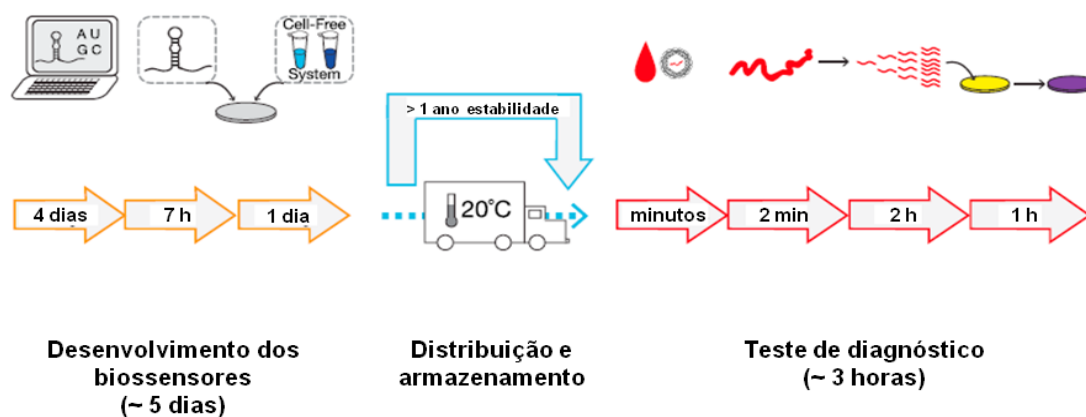
Fonte: Pardee *et al.* (2016, tradução nossa).

Legenda: O RNA extraído a partir das amostras é direcionado para reação NASBA a fim de aumentar a quantidade no número de cópias da região alvo do ZIKV e, conseqüentemente, facilitar a detecção através dos sensores. Após a reação NASBA, o produto é utilizado como *template* para a reação dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”. Os ribossensores atuam regulando a transcrição e tradução da enzima LacZ mediante a hibridização entre o RNA gatilho e sequências complementares presentes nos sensores. Os interruptores “*switches*” assumem uma estrutura de *hairpin*, inibindo assim, a tradução da enzima LacZ. Após a hibridização entre o RNA gatilho “*trigger*” e o interruptor, como resultado, ocorre o disparo da tradução da enzima LacZ que posteriormente converte o seu substrato, o clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo (naturalmente amarelo) a um produto com a cor roxa (clorofenol vermelho), o que caracteriza uma amostra positiva.

De acordo com o protótipo estabelecido para o vírus Ebola e para o vírus Zika, o fluxograma para o desenvolvimento dos ribossensores ocorre em torno de cinco dias. Após o desenvolvimento, os sensores podem ser liofilizados e transportados até o local de testagem em temperatura ambiente. Na sequência, os sensores podem ser empregados para o diagnóstico rápido do patógeno em questão. Juntas, essas vantagens possibilitam que os sensores possam ser adaptados rapidamente para o diagnóstico de qualquer

patógeno que seja considerado uma ameaça de saúde pública (Figura 17) (PARDEE *et al.*, 2016).

**Figura 17** - Fluxograma para o desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico rápido.



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

Legenda: Usando informações de sequência de bancos de dados *online*, os *primers* para amplificação isotérmica do RNA e os ribossensores foram construídos *in silico* utilizando algoritmos específicos. Uma vez sintetizados, os sensores podem ser montados e validados em menos de 7 horas. Em um dia, os sensores validados podem ser incorporados em papel e liofilizados junto com um sistema de transcrição e tradução livre de células para ser implantado no campo. Para o teste de diagnóstico, o RNA extraído é amplificado isotermicamente via NASBA e usado para reidratar os sensores de papel liofilizado. A detecção do RNA apropriado é indicada por uma mudança de cor no disco de papel de amarelo para roxo.

## 2.9 Tratamento, prevenção e controle

Atualmente, o manejo terapêutico para combater as infecções causadas por ZIKV e CHIKV é mediado através da terapia de suporte e alívio dos sintomas provocados pela doença. Desde a emergência desses arbovírus no Brasil entre 2014 e 2016, inúmeros trabalhos demonstraram potenciais drogas com atividade *in vitro*, embora até o momento nenhuma tenha sido avaliada através de ensaios clínicos (BERNATCHEZ *et al.*, 2020; DE CARVALHO *et al.*, 2017; MASMEJAN *et al.*, 2018). A abordagem terapêutica utilizada no tratamento de pacientes com a síndrome de Guillain-Barré associada à infecção pelo ZIKV é a mesma empregada para os pacientes que apresentam a síndrome de Guillain-Barré clássica, cujo manejo terapêutico inclui a troca de plasma ou aplicação de imunoglobulina intravenosa (ADEBANJO *et al.*, 2017).



Dada a íntima relação do ZIKV com a gênese de malformações congênitas observadas em neonatos, é recomendada a realização de exames laboratoriais e de imagem durante todo o período gestacional, especialmente para gestantes que foram diagnosticadas laboratorialmente com a infecção pelo ZIKV. Adicionalmente, os recém-nascidos devem ser monitorados por uma equipe multidisciplinar a fim de diagnosticar qualquer complicação precocemente e facilitar a implementação de intervenções adequadas de forma rápida, quando forem necessárias (ADEBANJO *et al.*, 2017).

Dado o risco de transmissão do ZIKV através do contato sexual, é recomendado que homens que viajaram ou residem em países com circulação ativa do ZIKV devem manter relações sexuais com o uso de preservativos, principalmente se o parceiro for uma gestante (DÉNES *et al.*, 2019; OSTER *et al.*, 2016). Resultados recentes revelaram que a prática da relação sexual de forma segura pode contribuir de forma significativa a redução do número de casos de Zika (DÉNES *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, a comunidade científica vem realizando esforços consideráveis para desenvolver vacinas contra o ZIKV e CHIKV. Cerca de dez vacinas diferentes avançaram na fase 1 através de testes *in vitro* e *in vivo* e uma vacina iniciou a fase 2 com os ensaios clínicos para o ZIKV, enquanto que inúmeras plataformas vacinais também estão avançando (fases 1, 2 e 3) contra o CHIKV (ABBINK; STEPHENSON; BAROUCH, 2018; FOLEGATTI *et al.*, 2021; GAO; SONG; ZHANG, 2019; WILDER-SMITH *et al.*, 2018). No caso do ZIKV, o maior gargalo associado ao desenvolvimento das vacinas está sendo a diminuição do número de casos de Zika desde a última epidemia, o que pode impactar diretamente na execução dos ensaios clínicos das vacinas durante as fases 2 e 3 (VANNICE *et al.*, 2019; WILDER-SMITH *et al.*, 2018). Dada à falta de vacinas e antivirais atualmente disponíveis contra a infecção pelo ZIKV e CHIKV, medidas voltadas para o controle do mosquito vetor ainda permanecem como a estratégia mais eficaz de limitar a propagação de arbovírus e, conseqüentemente, reduzir o risco de surgimento de novos surtos e epidemias (WEAVER *et al.*, 2018).

### 3 JUSTIFICATIVA

A emergência de arbovírus nas Américas, incluindo ZIKV e CHIKV, têm acarretado implicações sérias para o serviço de saúde dos países onde esses vírus são endêmicos, como é o caso do Brasil. Clinicamente, é muito difícil diagnosticar a infecção causada por arbovírus, especialmente em países onde há a circulação simultânea de outros patógenos como ZIKV, DENV e CHIKV (DA SILVA *et al.*, 2020; SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021). Dessa forma, o diagnóstico laboratorial apresenta papel crucial para a tomada de decisão dos profissionais de saúde e, conseqüentemente, para melhorar o manejo terapêutico dos pacientes infectados.

Embora os ensaios sorológicos e moleculares sejam utilizados com maior frequência na rotina laboratorial para o diagnóstico do ZIKV e CHIKV através da utilização de laboratórios centralizados, ainda permanece a necessidade do desenvolvimento de novas plataformas e protocolos de diagnóstico do tipo POC que possam ser utilizados para identificar e confirmar a infecção dos indivíduos infectados com o ZIKV e CHIKV de forma rápida, simples e prática diretamente no campo, logo após a coleta da amostra. Além disso, as técnicas atualmente utilizadas para o diagnóstico do ZIKV a partir de amostras de pacientes apresentam elevado custo e necessitam de infraestrutura laboratorial para identificação do agente etiológico, o que limita de sobremaneira a capacidade de diagnóstico laboratorial para atender a demanda hospitalar.

Assim, o desenvolvimento e validação de novas ferramentas e protocolos de diagnóstico do tipo POC irão auxiliar de forma direta a sociedade e os profissionais de saúde, além de promover a descentralização do diagnóstico e estabelecer melhores estratégias para o enfrentamento de arbovírus emergentes no Brasil como ZIKV e CHIKV.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

O RT-LAMP e os biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” são plataformas moleculares de baixo custo sensíveis, específicas e eficientes para o diagnóstico de arbovírus emergentes em amostras clínicas?

## 5 HIPÓTESE

O RT-LAMP e os biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” são plataformas moleculares de baixo custo sensíveis, específicas e eficientes para o diagnóstico de arbovírus emergentes em amostras clínicas.

## 6 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar plataformas do tipo “*Point-of-Care*” para o diagnóstico molecular de arbovírus emergentes

### 6.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a especificidade analítica do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” para detecção do ZIKV;
- b) Determinar a sensibilidade analítica do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” para detecção do ZIKV;
- c) Desenvolver e padronizar a técnica de RT-LAMP para a detecção do CHIKV em amostras biológicas humanas e de mosquitos *Aedes aegypti* naturalmente infectadas;
- d) Avaliar a especificidade analítica do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” para detecção do CHIKV;
- e) Determinar a sensibilidade analítica do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” para detecção do CHIKV;
- f) Comparar a sensibilidade e especificidade clínica do RT-LAMP com a RT-qPCR para a detecção de ZIKV em amostras de pacientes;
- g) Comparar a sensibilidade e especificidade clínica dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” com a RT-qPCR para a detecção do ZIKV em amostras de pacientes;
- h) Comparar a sensibilidade e especificidade clínica dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” com a RT-qPCR para a detecção do CHIKV em amostras de pacientes;
- i) Desenvolver e validar um método alternativo de extração do RNA acoplado a técnica de RT-qPCR para a detecção do ZIKV em amostras clínicas;

## 7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O presente tópico descreve todos os métodos utilizados na execução deste trabalho. Neste espaço é descrito as células e vírus utilizados; extração de RNA; titulação viral por ensaio de placa; RT-LAMP; biossensores moleculares; RT-qPCR; detecção do ZIKV e CHIKV em amostras biológicas humanas sob condições controladas; avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”; avaliação da sensibilidade analítica do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”; validação do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”; sequenciamento dos *amplicons* obtidos no ensaio RT-LAMP; considerações éticas e análise estatística.

### 7.1 Células e vírus

Para a produção do estoque de todos os vírus foram cultivadas células Vero (células primárias de rins de macaco verde africano) mantidas em meio de *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal inativado (SFB) (Gibco), 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 2 mM de L-glutamina (Gibco) em condições de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para a realização de todos os experimentos, foi utilizada a cepa do ZIKV PE243 como referência. A cepa PE243 foi isolada de um paciente com sinais clássicos de doença exantemática causada por arboviroses, porém sem sinais neurológicos. Essa cepa foi gentilmente cedida pela Dr<sup>a</sup> Marli Tenório (Fiocruz, PE). Após o rendimento viral, o estoque foi titulado em células Vero por ensaio de placa e possui o título de  $1,0 \times 10^7$  unidades formadoras de placa por mililitro de sobrenadante celular (PFU/mL) e, posteriormente, armazenado a -80°C até o momento do uso. Além disso, a cepa africana do ZIKV (MR-766) foi gentilmente cedida pela Dr<sup>a</sup> Laura Gil (Fiocruz, PE) e propagada em células Vero para utilização em partes dos ensaios com o intuito de avaliar a especificidade analítica.

Outros arbovírus, incluindo YFV (17DD), DENV-1 (PE / 97-42735), DENV-2 (PE / 95-3808), DENV-3 (PE / 02-95016), DENV-4 (PE / 10-0081) e CHIKV (PE2016-480) e foram adquiridos da Coleção de Vírus do Departamento de Virologia da Fiocruz/PE. Os estoques virais também foram produzidos em células Vero e os sobrenadantes celulares foram usados para avaliar a especificidade analítica do ensaio

RT-LAMP e dos biossensores moleculares. Com exceção do YFV (17DD), que é uma cepa vacinal, o vírus Mayaro, cedido gentilmente Dr<sup>a</sup> Roberta Bronzoni (Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT, Campus Sinop, MT) e a cepa africana do ZIKV (MR766), todos os outros vírus foram isolados a partir de amostras de pacientes coletadas no estado de Pernambuco, Brasil.

## **7.2 Extração de RNA**

### **7.2.1 Extração de RNA por kit**

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o kit de extração QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Para tanto, 140µL de amostra incluindo soro, urina, saliva e sêmen foi utilizado para extração conforme as instruções do fabricante. Ao final da extração, o RNA total foi eluído em um volume de 60µL em seguida estocado em freezer -80°C até a realização dos ensaios moleculares.

### **7.2.2 Extração de RNA por fervura**

Inicialmente, o método de fervura das amostras foi padronizado com o objetivo de avaliar a melhor combinação entre tempo e temperatura. Para tanto, o sobrenadante de cultura contendo partículas do ZIKV foi aquecido no termociclador Veriti 96-well Thermal Cycle (Applied Biosystems) sob temperaturas (55°C, 65°C, 75°C, 85°C e 95°C) e o tempo de incubação (5 min, 15 min, 30 min e 60 min). Em seguida, o produto obtido do tratamento térmico foi estocado utilizado para realização dos ensaios moleculares. O efeito do tratamento térmico sobre as partículas infecciosas do ZIKV contidas no sobrenadante de cultura também foi avaliado utilizando ensaio de placa conforme metodologia descrita na seção abaixo.

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

A titulação viral foi realizada em placas de 24 poços previamente semeadas com 200.000 células/poço e incubadas por 24 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram preparadas diluições seriadas 1:10 do ZIKV PE243 em meio DMEM sem SFB. O meio

de cultivo foi removido e 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição viral foram inoculados em triplicata. A placa com as diluições do vírus foi incubada por 1 h com agitações em intervalos de 15 min para melhor distribuir o inóculo. Em seguida, os inóculos foram removidos e adicionou-se 1 mL de meio semissólido DMEM com 2.5% de carboximetilcelulose (CMC) e 2,5% SFB. Após incubação realizada durante 5 dias, o meio foi removido e as células foram fixadas por 1 h com formalina 10% diluída em PBS e coradas com cristal violeta 2% para contagem de placas de lise. O cálculo da concentração de partículas virais utilizou o número de placas de lise provocadas pelo ZIKV multiplicado pelo inverso da diluição usada no inóculo. O resultado foi ainda multiplicado pelo inverso da fração de mililitro que foi utilizada e expresso em PFU  $\text{mL}^{-1}$ , conforme demonstrado na fórmula representada abaixo.

#### 7.4 RT-LAMP

As reações do RT-LAMP foram realizadas em triplicata conforme o protocolo estabelecido por Silva et al (2019) (SILVA *et al.*, 2019). As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25  $\mu\text{L}$  contendo 4 U de Bst DNA polimerase (versão 3.0 WarmStart; New England Biolabs [NEB]), 2,5  $\mu\text{L}$  do tampão de amplificação isotérmica 1X, 8 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 1,8 mM de trifosfatos de desoxinucleotídeos (dNTPs) (ThermoFisher Scientific), 0,2  $\mu\text{M}$  de F3, 0,2  $\mu\text{M}$  de B3, 1,6  $\mu\text{M}$  de FIP, 1,6  $\mu\text{M}$  de BIP, 0,4  $\mu\text{M}$  de LF, 0,4  $\mu\text{M}$  de LB e 5  $\mu\text{L}$  da amostra (controle sem molde (NTC), RNA extraído ou amostras sem extração de RNA). Estes *primers* foram reportados previamente e se anelam na região genômica que corresponde a proteína E no genoma do ZIKV (SONG *et al.*, 2016) (Quadro 2). Na sequência, as reações foram incubadas a 72°C durante 40 minutos em um termobloco e em seguida foram inativadas a 80°C durante 5 minutos. A fim de visualizar os resultados e evitar possíveis problemas de contaminação, 1  $\mu\text{L}$  de SYBR Green I (ThermoFisher Scientific) diluído em água livre de RNase (Invitrogen) na proporção de 1:10 foi inserido no centro das tampas do tubo de reação antes mesmo do período de incubação. Após o término da incubação, os tubos de reação foram levemente invertidos a fim de misturar o SYBR contido na tampa com a amostra e, posteriormente, visualização do resultado.

Dado o sucesso do ensaio RT-LAMP para o diagnóstico do ZIKV, foi possível avaliar a versatilidade do RT-LAMP para outro arbovírus emergente na América Latina.



Para a próxima demonstração diagnóstica, foi escolhido o CHIKV, que apresenta sinais clínicos que se sobrepõem aos causados pelo ZIKV. Inicialmente, o ensaio RT-LAMP para a detecção do CHIKV foi otimizado baseado no protocolo do RT-LAMP para detecção do ZIKV como modelo, conforme estabelecido por Silva et al (2019) (SILVA *et al.*, 2019). Após a otimização de todas as condições do ensaio RT-LAMP, as reações de amplificação foram realizadas em termobloco contendo um volume total de 25  $\mu$ L contendo 4 U de Bst DNA polimerase (versão 3.0 WarmStart; New England Biolabs [NEB]), 2,5  $\mu$ L do tampão de amplificação isotérmica 1X, 8 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1,8 mM de trifosfatos de desoxinucleotídeos (dNTPs) (ThermoFisher Scientific), 0,2  $\mu$ M de F3, 0,2  $\mu$ M de B3, 1,6  $\mu$ M de FIP, 1,6  $\mu$ M de BIP, 0,4  $\mu$ M de LF, 0,4  $\mu$ M de LB e 5  $\mu$ L da amostra por 30 minutos a 65° C. Os *primers* empregados no ensaio para detecção do CHIKV foram reportados previamente e se anelam na região genômica que corresponde a região 6K-E1 do genoma (Quadro 3) (LOPEZ-JIMENA; WEHNER; HAROLD; BAKHEIT *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos no ensaio RT-LAMP para ambos os vírus, ZIKV e CHIKV, foram visualizados utilizando três estratégias diferentes. 1) na primeira estratégia, os produtos foram observados através do olho nu sob luz natural e fotografados usando uma câmera convencional de celular (iPhone, Apple). Uma mudança de cor de laranja para amarelo esverdeado foi usada para caracterizar as amostras positivas, enquanto as amostras negativas permaneceram na cor laranja; 2) na segunda estratégia, os produtos foram observados através da análise visual dos tubos de reação sob irradiação com luz ultravioleta (UV), utilizando um transiluminador (modelo UVB LTB 20  $\times$  20 STV, Loccus Biotecnologia, Brasil) e fotografados usando uma câmera convencional de celular. Neste método, as reações positivas foram fluorescentes e as reações negativas foram azuis escuras; 3) na terceira estratégia, os *amplicons* do RT-LAMP foram analisados por eletroforese em gel de agarose (2,0%) em tampão TAE 1x e visualizados do gel com auxílio do transiluminador acoplado a uma câmera fotográfica e conectado a um computador. Para a análise dos *amplicons* na eletroforese em gel de agarose, utilizou-se o DNA Ladder de 1 kb Plus (ThermoFisher Scientific) como marcador de peso molecular.

Para avaliar a total performance do ensaio RT-LAMP, todos os experimentos do RT-LAMP foram realizados em uma bancada de laboratório utilizando pipetas e ponteiras com filtro designadas. O registro e a análise das imagens ocorreram em salas diferentes

para eliminar o risco de reações cruzadas e todos os ensaios foram realizados de forma independente pelo menos três vezes.

**Quadro 4** - *Primers* utilizados no ensaio RT-LAMP para detecção do ZIKV.

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

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

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

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Referência</b>
0F3	TCCCGAACACGGTGGGAGTACC	Lopez-Jimena <i>et al.</i> , 2018
0B3	GCGGATGCGGTATGAGCCCT	Lopez-Jimena <i>et al.</i> , 2018
0FIP	ACCGCAGCATTTCACGTACGGAAGTCAACAGACCGGGCTACAGC	Lopez-Jimena <i>et al.</i> , 2018
0BIP	AGGTCTTCACCGGCGTCTACCCCGGACTTCTCCACATGTGCTTCG	Lopez-Jimena <i>et al.</i> , 2018
0LF	TCGCACGTGATGTAATCAAGCGA	Lopez-Jimena <i>et al.</i> , 2018
0LB	GGCGGCGCCTACTGCTTCTG	Lopez-Jimena <i>et al.</i> , 2018

Fonte: Lopez-Jimena *et al.* (2018).

## 7.5 Biossensores moleculares

### 7.5.1 Produção dos sensores “*switch*” e gatilhos “*trigger*”

A produção dos sensores e dos gatilhos foi realizada a partir dos plasmídeos construídos baseados nos genomas do ZIKV e CHIKV e enviados pelo o grupo do colaborador do projeto, o Dr. Keith Pardee (University of Toronto, Canadá). As regiões de ambos os sensores “*switch*” (região do ZIKV acoplado com a enzima LacZ) e gatilhos “*trigger*” (usado como controle positivo) foram clonadas separadamente nos plasmídeos pCOLA Duet e pET-15, respectivamente, no caso do ZIKV. Para o CHIKV, o sensor foi clonado no plasmídeo pCOLA Duet STAT10. Após o recebimento dos plasmídeos, foi iniciada a produção em larga escala dos sensores que posteriormente foram utilizados para a validação com amostras clínicas. A produção dos sensores “*switch*” e gatilhos “*trigger*” foram realizados seguindo um fluxograma de várias etapas: linearização do plasmídeo através da PCR convencional utilizando *primers* específicos, seguido de purificação e quantificação. Após a produção, os sensores foram utilizados durante as

reações do tipo *toehold switch* conforme esquema metodológico demonstrado na figura 18.

A linearização de ambos os plasmídeos foi realizada através da PCR convencional. Para cada reação (volume final, 50  $\mu$ L), foi utilizada a enzima *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB, USA) de acordo com as instruções do fabricante e empregando *primers* específicos que amplificaram um fragmento de 3.046 nucleotídeos no pCOLA Duet e um fragmento de 688 nucleotídeos no pET-15 (Quadro 4). As condições da PCR para a amplificação e linearização dos sensores “*switch*” do ZIKV (pCOLA Duet) e CHIKV (pCOLA Duet STAT10) foram: 30 segundos a 98° C para desnaturação inicial, seguido de 35 de ciclos, cada um composto por 10 segundos a 98° C para a desnaturação, 20 segundos a 60 ° C para o anelamento e por um minuto e 30 segundos a 72° C para a extensão, com 5 minutos de extensão final a 72° C. Por outro lado, as condições da PCR para a amplificação e linearização dos gatilhos “*trigger*” seguiram as condições: 30 segundos a 98° C para desnaturação inicial, seguido de 35 de ciclos, cada um composto por 10 segundos a 98° C para a desnaturação, 10 segundos a 60 ° C para o anelamento e 15 segundos a 72° C para a extensão, com 5 minutos de extensão final a 72° C. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2% em tampão TAE 1X com o auxílio do marcador de peso molecular de 1kb Plus (Invitrogen) e visualizados através do transiluminador acoplado a uma câmera fotográfica e conectado a um computador.

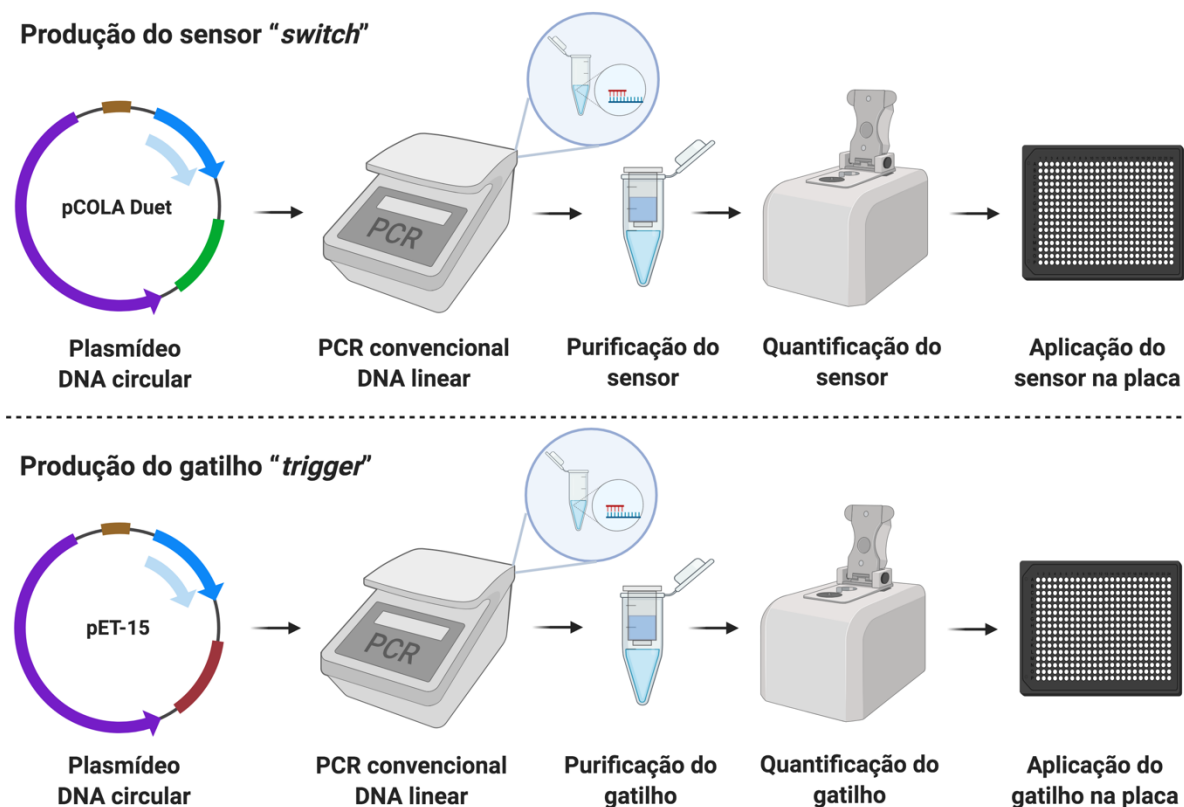
Após a linearização dos plasmídeos, os fragmentos da PCR foram diretamente purificados empregando o kit de purificação (QIAGEN) conforme as instruções do fabricante e, em seguida, eluídos em 20  $\mu$ L de água livre de RNase. Na sequência, o DNA purificado foi quantificado utilizando o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) seguindo as instruções recomendadas pelo o fabricante. Após isto, os sensores “*switch*” e gatilhos “*trigger*” foram armazenados a -20° C até o momento do uso.

**Quadro 6** - *Primers* empregados na linearização dos plasmídeos pCOLA Duet e pET-15.

Primer	Sequência (5'-3')	Referência
pCOLADuet_F3593	AATTGACTCTCTTCCGGGCG	Pardee <i>et al.</i> , 2016
pCOLADuet_R547	AGTGTGACCGTGTGCTTCTC	Pardee <i>et al.</i> , 2016
pET-15_F4928	CTCGACGCTCTCCCTTATGC	Pardee <i>et al.</i> , 2016
pET-15_R5616	GCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATC	Pardee <i>et al.</i> , 2016

Fonte: Pardee *et al.* (2016)

**Figura 18** - Fluxograma demonstrando as etapas envolvidas para a produção dos sensores “switch” e gatilhos “trigger”.



Fonte: O autor. Criado com Biorender.com

Legenda: A produção do sensor “switch” e gatilho “trigger” foram realizados a partir dos plasmídeos construídos baseados no genoma do ZIKV e enviados pelo o grupo do colaborador do projeto, o Dr. Keith Pardee (University of Toronto, Canadá). As regiões do sensor (região do ZIKV acoplado com a enzima LacZ) e gatilho foram clonadas separadamente nos plasmídeos pCOLA Duet e pET-15, respectivamente. Na sequência, a linearização das regiões alvos foi realizada utilizando *primers* específicos através da técnica

de PCR, seguido de eletroforese em gel de agarose, purificação do DNA (sendor e gatilho), quantificação no Nanodrop e, por fim, aplicação na placa de reação.

### 7.5.2 Reação NASBA

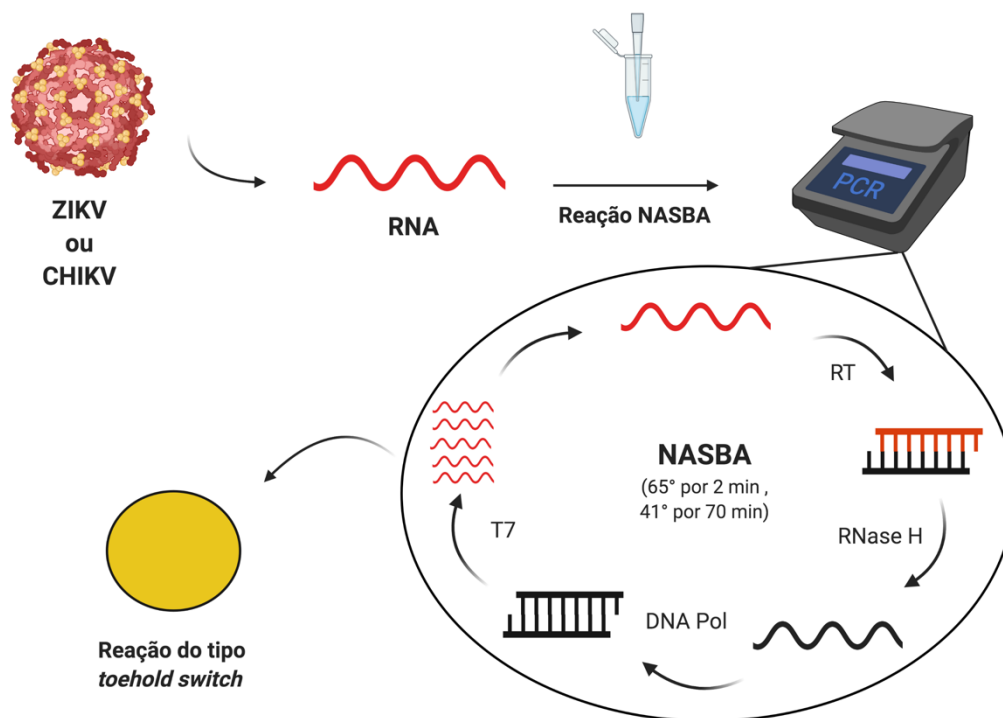
Para as reações NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*), cujo objetivo é aumentar a concentração de *template* nas amostras testadas, foi realizada empregando o kit líquido NASBA (Life Sciences, EUA) conforme descrito no protocolo do fabricante. A reação de amplificação (volume total, 5  $\mu\text{L}$ ) continha 1,67  $\mu\text{L}$  do buffer da reação, 0,832  $\mu\text{L}$  do mix de nucleotídeos, 0,1  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (Quadro 5) e 1,0  $\mu\text{L}$  do *template* (água livre de RNase [NTC] ou RNA extraído das amostras). Na sequência, as reações foram incubadas no termociclador Veriti 96-well Thermal Cycle (Applied Biosystems) em um programa que consistiu em 65 ° C durante 2 minutos, seguido de 41 ° C por 10 minutos. Após o término desse tempo, as reações foram colocadas no gelo rapidamente e em seguida foi adicionado 1,25  $\mu\text{L}$  do mix de enzimas em cada reação. Por fim, as reações foram incubadas novamente no termociclador sob 41 ° C durante 1 hora de incubação. Após o término da reação, o produto foi mantido no gelo até o momento do uso como *template* na reação do tipo *toehold switch* conforme metodologia descrita abaixo e demonstrado no esquema da figura 19. Com exceção dos *primers* listados no quadro 4, é importante destacar que o mesmo protocolo de reação NASBA foi empregando para ambos os vírus, ZIKV e CHIKV.

**Quadro 7** - *Primers* empregados na reação NASBA.

Alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Referência
ZIKV	NASBA_27B_F	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCAC AGTGGGATGATCGTTA	Pardee <i>et al.</i> , 2016
	NASBA_27B_R	CCTGTCCTCGGTTCAACAATCAA	Pardee <i>et al.</i> , 2016
CHIKV	NASBA_CHIKV_F	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACA CAACTGGTACTGCAGA	Karlikow <i>et al.</i> , 2021
	NASBA_CHIKV_R	AATGGTGCTGTGTGCTGCAGCG	Karlikow <i>et al.</i> , 2021

Fonte: Pardee *et al.* (2016), Karlikow *et al.* in press (2021)

**Figura 19** - Esquema demonstrando o mecanismo de funcionamento da reação NASBA.



Fonte: O autor. Criado com Biorender.com

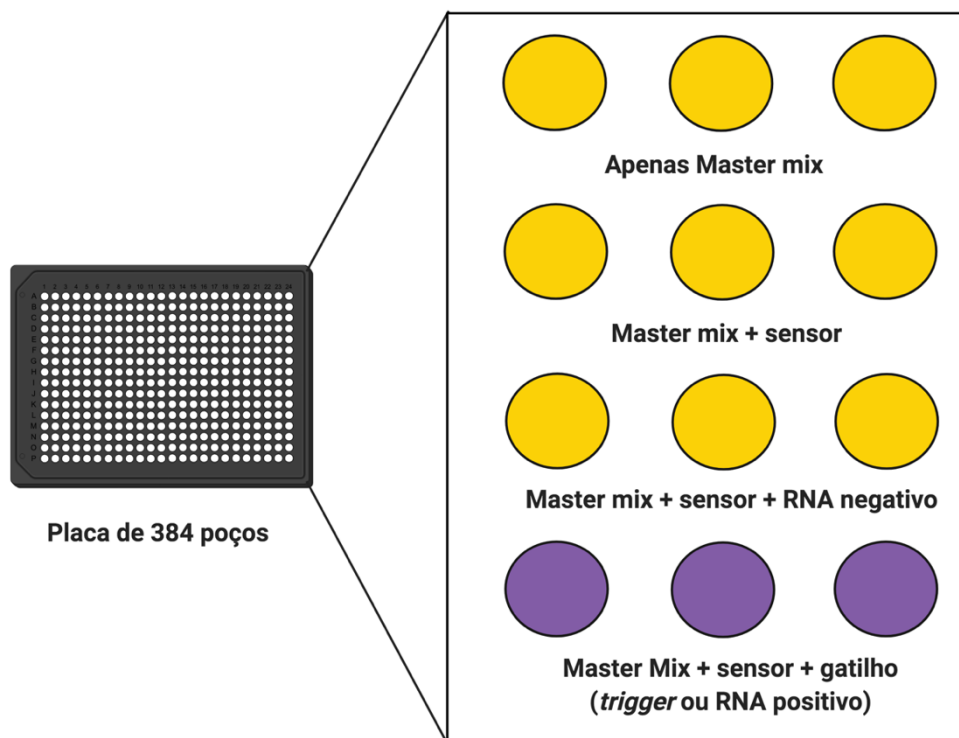
Legenda: Após a extração do material genético do ZIKV ou CHIKV, os RNAs foram submetidos à reação NASBA. Esta reação foi executada empregando um kit comercial denominado NASBA composto por um mix de enzimas (RT, RNase H, DNA Pol e T7 RNA Pol), cujo objetivo é aumentar o número de cópias de RNA das amostras dos pacientes, aumentando assim, a probabilidade de detecção através dos biossensores moleculares. Após o término da reação NASBA, o produto foi utilizado como *template* para a reação do tipo “*toehold switch*”.

### 7.5.3 Reação dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”

As reações do tipo “*toehold switch*” foram realizadas em placas de 384 poços de fundo preto transparente (Corning). Para tanto, foi adicionado como base um disco de papel filtro (2 mm) em cada poço. Para as reações do tipo “*toehold switch*” foi utilizado o kit comercial PURExpress (NEB). Esse kit consiste em um sistema livre de células que possui todos os componentes requeridos para a transcrição e tradução *in vitro*. Para cada reação foi elaborada de acordo com a seguinte composição: 40% da solução NEB A, 30% da solução B, 0,6 mg/mL de clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (Sigma), 0,5% do inibidor de RNase (Roche) e seguido da aplicação de 10 ng/ $\mu$ L dos sensores “*switch*” e 5 ng/ $\mu$ L do *template* (água livre de RNase para o NTC, gatilho “*trigger*” [controle positivo] ou RNA extraído das amostras). Na sequência, 1,8  $\mu$ L das amostras foram testadas em triplicata e aplicadas conforme esquema ilustrado na figura 20 e,

posteriormente, incubadas a 37°C durante 240 minutos com o auxílio de um leitor eletrônico óptico portátil (PLUM) acoplado a uma câmera fotográfica (BioTek Neo) para registro dos resultados durante o tempo de incubação (Figura 21). Após o termino da incubação, a cor amarela caracterizou as amostras negativas para o ZIKV ou CHIKV, incluindo os controles negativos permanecem na cor amarela. Em contraste, a cor roxa caracterizou as amostras positivas para o ZIKV ou CHIKV. Embora tenha sido utilizado um leitor eletrônico óptico para a análise dos resultados obtidos em todos os experimentos realizados neste trabalho, os resultados também foram facilmente observados através do olho nu com base na mudança de cor dos tubos de reações.

**Figura 20** - *Layout* utilizado para a aplicação dos reagentes e amostras na placa de reação dos biossensores moleculares.



Fonte: O autor. Criado com Biorender.com

Legenda: Este esquema representa o modelo de como os reagentes e as amostras foram aplicadas nos biossensores moleculares empregando círculos de papel filtro como base inseridos em uma placa de 384 poços. O *layout* consiste na aplicação inicial de apenas o master mix da reação contendo todos componentes necessários para a transcrição e tradução *in vitro*. Uma segunda condição consistiu em aplicar o master mix + sensores. A terceira condição consistiu em aplicar o master mix + sensor + RNA gatilho. Quando o RNA gatilho é negativo para ZIKV ou CHIKV, não ocorre hibridização entre o sensor e o RNA e, conseqüentemente não há o disparo da tradução da enzima LacZ. Como resultado após o final da incubação o disco permanece na cor amarela. Quando o RNA gatilho é positivo para ZIKV ou CHIKV, ocorre hibridização entre o sensor e o RNA e, conseqüentemente há o disparo da tradução da enzima LacZ que converte o seu substrato em um produto com a cor roxa. Como resultado após o final da incubação o disco permanece na cor roxa.



**Figura 21** - Leitor eletrônico óptico dos biossensores moleculares.



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

Nota: O leitor eletrônico óptico portátil (PLUM) acoplado a uma câmera fotográfica (BioTek Neo) para registro dos resultados durante a incubação da reação.

## 7.6 RT-qPCR

Todas as amostras foram testadas quanto à positividade da infecção pelo ensaio de RT-qPCR, padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV e CHIKV, de acordo com as recomendações estabelecidas pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças - CDC EUA, com mínimas modificações (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Adicionalmente, todas as amostras clínicas utilizadas para a validação foram testadas para o gene endógeno humano RNase P com a finalidade de garantir a qualidade do material genético das amostras, conforme protocolo estabelecido pelo CDC-USA (CDC, 2020). Para tanto, o RNA das amostras foi extraído usando o kit de extração QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de RT-qPCR foi executada utilizando o kit QuantiNova Probe RT-PCR (QIAGEN, Valência, CA, EUA) conforme protocolo do fabricante. As reações de amplificação (volume total, 10  $\mu\text{L}$ ) continham 5,0  $\mu\text{L}$  do mix RT-PCR QuantiNova Probe 2 x, 0,8  $\mu\text{M}$  de cada primer *forward*, 0,8  $\mu\text{M}$  de cada primer *reverse*, 0,4  $\mu\text{M}$  da sonda, 0,05  $\mu\text{L}$  do QuantiNova ROX Reference Dye, 0,1  $\mu\text{L}$  do QuantiNova RT Mix e 3,5  $\mu\text{L}$  do *template* (água livre de RNase [NTC] ou RNA extraído das amostras) (Quadro 6). O programa da reação foi executado no equipamento de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems,

Foster City, CA, EUA) seguindo os seguintes passos: um único ciclo de transcrição reversa por 45 °C por 15 minutos, seguido de 95 °C por 5 minutos para inativação da transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase, e então 45 ciclos de 95 °C por 5 seg e 60°C por 45 seg. Ao final de todas as corridas, os dados foram analisados utilizando o software da Applied Biosystems 7500. A quantidade de RNA viral em cada amostra foi estimada comparando-se os valores do limiar do *Cycle quantification* (Cq) com a curva-padrão feita por diluições seriadas na base de 10 vezes do ZIKV (PE243) ou CHIKV (PE2016-480) previamente titulados através do ensaio de placa.

**Quadro 8** - *Primers* utilizados na RT-qPCR.

Alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Referência
ZIKV	Zika 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	Lanciotti <i>et al.</i> , 2008
	Zika 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	Lanciotti <i>et al.</i> , 2008
	Zika 1107	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-MGB	Lanciotti <i>et al.</i> , 2008
CHIKV	CHIKV 6856	TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA	Lanciotti <i>et al.</i> , 2007
	CHIKV 6981	TTGACGAACAGAGTTAGGAACATAACC	Lanciotti <i>et al.</i> , 2007
	CHIKV 6919	VIC-AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG-MGB	Lanciotti <i>et al.</i> , 2007
RNase P	RP-F	AGATTTGGACCTGCGAGCG	CDC <i>et al.</i> , 2020
	RP-R	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	CDC <i>et al.</i> , 2020
	RP-P	FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ-1	CDC <i>et al.</i> , 2020

Fonte: Lanciotti *et al.* (2008), Lanciotti *et al.* (2007), CDC *et al.* (2020)

### **7.7 Detecção dos arbovírus em amostras biológicas humanas sob condições controladas**

Inicialmente, para avaliar a habilidade do RT-LAMP em detectar o ZIKV ou CHIKV em amostras biológicas humanas, amostras biológicas humanas incluindo soro, urina, saliva e sêmen foram coletadas a partir de indivíduos saudáveis e, em seguida, infectadas com duas concentrações diferentes sendo  $1 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^3$  PFU/mL do ZIKV ou CHIKV, simulando assim, uma situação de alta e baixa carga viral, respectivamente. Após incubação a 37 °C durante 1 hora, as amostras foram diretamente testadas através do RT-LAMP. A fim de comparar os resultados do RT-LAMP com o método padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV e CHIKV, o RNA foi extraído de ambas as concentrações de todas as amostras biológicas de  $10^6$  e  $10^3$  PFU/mL e, posteriormente, testados usando a RT-qPCR.

### **7.8 Avaliação da especificidade analítica do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”**

Para avaliar a especificidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV ou CHIKV em biológicas humanas, foram realizados experimentos para avaliar a reatividade cruzada com outros arbovírus, incluindo ZIKV (PE243), ZIKV (MR766) YFV (17DD), quatro sorotipos diferentes do vírus da dengue DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081), e CHIKV (PE2016-480) e MAYV (BR/Sinop/H307).

Inicialmente, foi realizada uma infecção artificial “*spike viral*” de todos os arbovírus descritos acima em soro humano. Após a infecção, as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora e na sequência foram utilizadas para a realização dos ensaios moleculares incluindo o RT-LAMP e os biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”.

### **7.9 Avaliação da sensibilidade analítica do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”**

A sensibilidade analítica do ensaio RT-LAMP em amostras biológicas humanas (soro, urina, saliva e sêmen) foi determinada com base na menor concentração em que o ZIKV foi detectado em todos os experimentos. Para tanto, a cepa ZIKV PE243 foi diluída seriadamente na base de 10 vezes em soro, urina, saliva e sêmen obtidos a partir de indivíduos saudáveis. A concentração de vírus nas amostras infectadas variou de  $10^5$  PFU a  $10^{-7}$  PFU. 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 o ensaio padrão-ouro atualmente utilizado para o diagnóstico molecular do ZIKV em amostras de pacientes, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições e posteriormente testados em paralelo com a RT-qPCR (LANCIOTTI *et al.* 2008).

Por outro lado, a análise da sensibilidade analítica os biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” foi realizada utilizando o RNA extraído a partir do sobrenadante de cultura contendo partículas do ZIKV previamente titulado através do ensaio de placa. Inicialmente, o RNA total foi extraído do sobrenadante de cultura conforme metodologia descrita na seção de extração do RNA. Após a extração, o RNA extraído foi diluído seriadamente na base de 10 vezes de forma que a concentração de vírus nas amostras variou de  $10^5$  PFU a  $10^{-3}$  PFU. Na sequência, as diluições foram utilizadas pelo os biossensores moleculares. Similar ao que foi estabelecido para análise da sensibilidade analítica do RT-LAMP e com o objetivo de comparar os resultados com o método referência para a detecção molecular do ZIKV, as mesmas diluições foram testadas paralelamente utilizando a RT-qPCR. Todos os experimentos foram executados em triplicata.

### **7.10 Validação do RT-LAMP e dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”**

Para validar o desempenho do RT-LAMP no diagnóstico molecular do ZIKV em amostras clínicas em relação a RT-qPCR, 100 amostras clínicas (soro) foram obtidas do LACEN/PE e testadas pelo RT-LAMP e em paralelamente com a RT-qPCR conforme o protocolo descrito por Lanciotti (2008) (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Para a validação dos biossensores moleculares, foram utilizadas 268 amostras clínicas (soro) também obtidas

do LACEN/PE e testadas pelos os biossensores moleculares. Por fim, a validação do método alternativo de extração do RNA baseado em fervura acoplado a técnica de RT-qPCR para a detecção molecular do ZIKV descrito neste trabalho foi realizada empregando um total de 205 amostras clínicas, incluindo soro, urina, saliva e sêmen. Similar ao desenho experimental realizado para o RT-LAMP e biossensores moleculares, o método alternativo de extração do RNA baseado em fervura também foi avaliado em paralelo com o protocolo referência de RT-qPCR empregando kit de extração comercial para extração do RNA e seguindo as instruções necessárias para a validação de um protocolo ou teste de diagnóstico conforme descrito por Silva e Pena (SILVA; PENA, 2021). O soro humano foi escolhido como amostra referência durante a validação de ambos os ensaios moleculares devido ao fato de ser considerada como amostra padrão ouro na rotina laboratorial para o diagnóstico molecular do ZIKV. Por fim, a utilidade diagnóstica intrínseca do ensaio RT-LAMP e dos biossensores moleculares foi determinada usando vários parâmetros estatísticos.

### **7.11 Sequenciamento dos *amplicons* obtidos no ensaio RT-LAMP**

A caracterização genética dos *amplicons* obtidos do RT-LAMP a partir de uma amostra positiva oriunda de um paciente foi realizada pelo método de Sanger. Após a execução do RT-LAMP, os produtos da reação foram diretamente purificados empregando o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) DNA seguindo as instruções do fabricante e, em seguida, eluídos em 30 µL de água. Na sequência, o DNA purificado foi sequenciado usando o primer FIP (ZIKV ou CHIKV) do RT-LAMP e o kit de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e realizado em um sequenciador automático (ABI Prism 3100 Capillary Automatic DNA Analyzer). As sequências dos *amplicons* foram analisadas usando o software Bioedit, v7.0.5 e submetidas ao banco de dados público NCBI - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) a fim de identificar a linhagem de ZIKV e CHIKV mais próximas e, conseqüentemente, confirmar a especificidade do RT-LAMP em detectar apenas estes arbovírus.

### 7.12 Considerações éticas

Os experimentos envolvendo amostras clínicas obtidas a partir de pacientes seguiram estritamente as normas vigentes preconizadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fiocruz-PE e cumpriram todas as exigências da Resolução nº466/12 Conselho Nacional de Saúde (CNS). Além disso, foi preparado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para todos os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa, embora tenha sido dispensado pelo CEP da Fiocruz-PE. Os experimentos e ensaios relacionados com o ZIKV foram aprovados pelo CEP da Fiocruz/PE sob os números: **CAAE 80247417.4.0000.5190** e **CAAE 67404117.7.0000.5190**. Em contraste, os experimentos e ensaios relacionados com o CHIKV foram aprovados pelo CEP do HEMOPE/PE sob o número: **CAAE 43877521.4.0000.5195**.

### 7.13 Análise estatísticas

Os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). A análise de probit foi realizada para calcular a sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção de ZIKV usando o software MedCalc (versão 18.11, MedCalc Software, Ostend, Bélgica). A estimativa dos parâmetros de diagnóstico incluindo sensibilidade clínica, especificidade clínica, prevalência, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia do RT-LAMP e dos biossensores moleculares para a detecção de ZIKV ou CHIKV foi calculada utilizando-se a ferramenta online gratuita denominada *MedCalc's Diagnostic Test Evaluation Calculator*, disponível em: [https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) e de acordo com todos os parâmetros exigidos para a validação de um teste de diagnóstico (SILVA; PENA, 2021). Esta análise foi baseada nos resultados de 100 amostras de pacientes para o RT-LAMP, 268 amostras para os biossensores moleculares e 205 amostras clínicas para o método alternativo de extração de RNA. Os resultados obtidos do método padrão-ouro (RT-qPCR) foram usados como referência para validação de todos os protocolos. Para as análises de comparação entre os protocolos de extração de RNA através de fervura e kit comercial, o test-t pareado (\*P<0.05) foi utilizado.

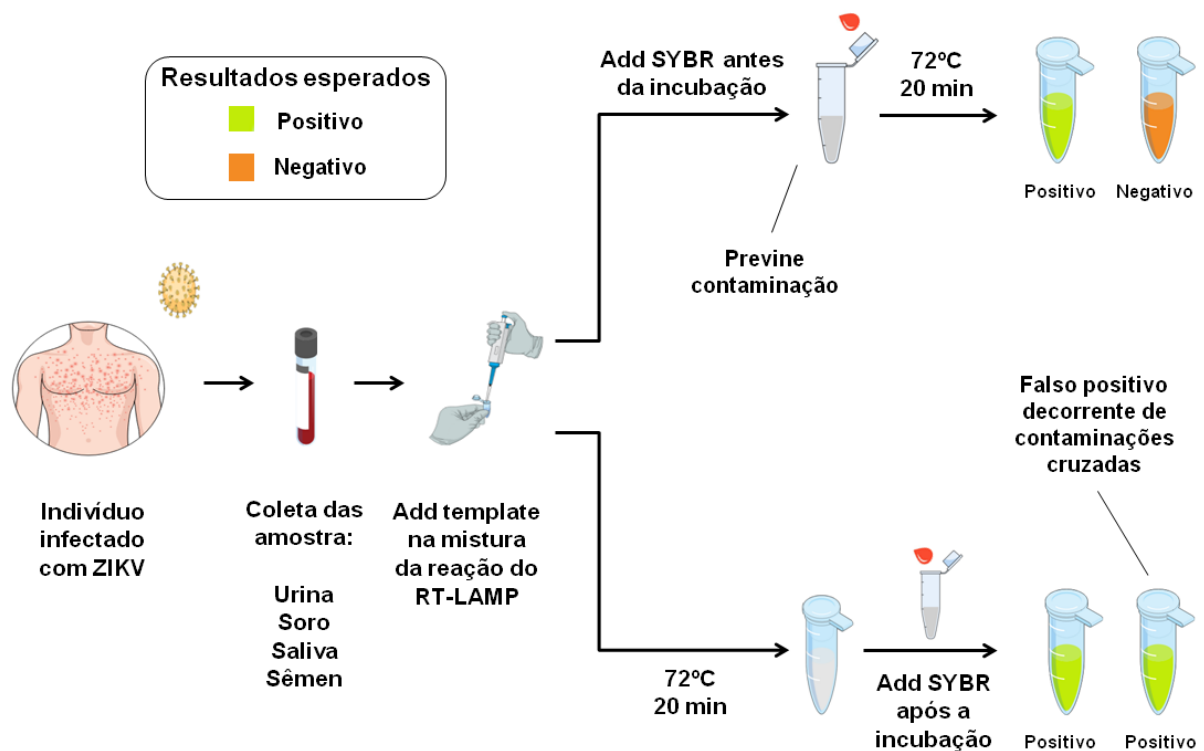
## 8 RESULTADOS

O presente t3pico descreve todos os resultados obtidos no decorrer da tese.

### 8.1 Ensaio RT-LAMP para detec33o do ZIKV

Todas as condi33es referentes ao ensaio RT-LAMP foram otimizadas previamente conforme ensaio RT-LAMP estabelecido por Silva (2019) (SILVA *et al.*, 2019). Ap33s a realiza33o da otimiza33o de todos os par33metros para detec33o do ZIKV em amostras de mosquitos, um protocolo padr33o foi estabelecido para validar o ensaio RT-LAMP com amostras biol33gicas humanas conforme demonstrado no fluxograma abaixo (Figura 22).

Figura 22 - Fluxograma do ensaio RT-LAMP.



Fonte: O autor.

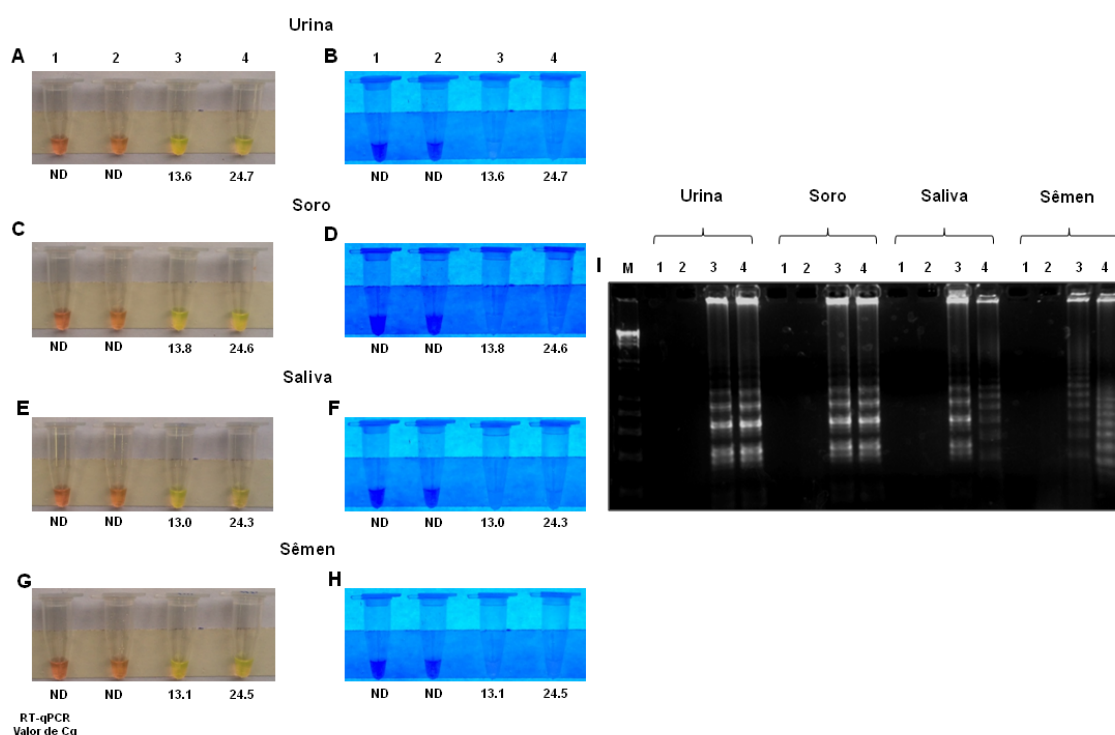
Legenda: Representa33o esquem33tica demonstrando o fluxo de trabalho do ensaio RT-LAMP para detec33o do molecular do ZIKV em amostras biol33gicas humanas. Inicialmente, as amostras incluindo soro, urina, saliva e s33men s33o coletadas a partir de indiv33duos com suspeita de infec33o por arbov33rus. Ap33s a coleta, as amostras foram adicionadas junto ao mix de reagentes necess33rios para o ensaio RT-LAMP e, na sequ33ncia, as rea33es foram incubadas isotermicamente a 72°C durante 20 minutos em um termobloco. O fato de utilizar uma enzima robusta com atividades de RT e DNA polimerase, al33m de manter as suas atividades na presen33a de inibidores de rea33o eliminou a necessidade de extra33o do RNA das amostras. Ap33s o per33odo de incuba33o, basta misturar o corante SYBR Green previamente adicionado na tampa do tubo com o l33quido remanescente no tubo da rea33o. Ao final do processo, o resultado p33de ser facilmente observado atrav33s do olho nu, onde a cor laranja representa uma amostra negativa para o ZIKV e a cor amarelo esverdeado representa uma amostra positiva para o ZIKV.

### 8.1.1 Detecção do ZIKV em amostras biológicas humanas sob condições controladas

Em seguida, foi avaliada a habilidade do RT-LAMP em diagnosticar o ZIKV em amostras biológicas humanas. Para este fim, as amostras incluindo urina, soro, saliva e sêmen foram obtidas de voluntários adultos saudáveis e consentidas e, na sequência, foram infectadas com duas concentrações do ZIKV, sendo uma carga viral alta ( $1 \times 10^6$  PFU/mL) ou baixa ( $1 \times 10^3$  PFU/mL) para simular as concentrações fisiológicas do ZIKV nessas amostras. Após a infecção, as amostras foram mantidas durante 1 h em temperatura ambiente e em seguida foram diretamente testadas através do RT-LAMP sem a necessidade de extração do RNA ou nenhum tratamento prévio das amostras. O ensaio RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV em todas as amostras biológicas (urina, soro, saliva e sêmen) e em ambas as cargas virais testadas. Como esperado, o controle sem *template* (NTC) (água) e o controle negativo (amostras biológicas humanas não infectadas) apresentaram resultados negativos (Figura 23 A-C). Também foi demonstrado através dos ensaios que a extração do RNA não melhorou o limite de detecção do RT-LAMP (dados não mostrados). A fim de comparar os resultados com o método padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV, os resultados do RT-LAMP foram confirmados através da RT-qPCR. Os valores de Cq (*Cycle quantification*) obtidos foram (13,6; 13,8; 13,0; 13,1) e (24,7; 24,6; 24,3; 24,5), para alta carga viral e baixa carga viral na urina, soro, saliva e sêmen, respectivamente.



**Figura 23** - Detecção do ZIKV em amostras biológicas humanas experimentalmente infectadas.



Fonte: O autor.

Legenda: Amostras biológicas incluindo urina, soro, saliva e sêmen foram infectadas artificialmente com uma carga viral alta ( $1 \times 10^6$  PFU/mL) ou baixa ( $1 \times 10^3$  PFU/mL) e diretamente testadas pelo RT-LAMP sem extração de RNA (Fig. 18 A - I). Os resultados do RT-LAMP foram observados por mudança visual de cor dos produtos no tubo de reação e por eletroforese em gel. Os produtos da amplificação foram observados por luz natural a olho nu (A, C, E e G), sob irradiação UV (B, D, F e H) e eletroforese em gel de agarose (I). As legendas na Fig. 18 A-I são: (1) NTC (controle sem molde): água; (2): amostra biológica não infectada (urina, soro, saliva e sêmen); (3): amostra biológica infectada com  $10^6$  PFU / mL; (4): amostra biológica infectada com  $10^3$  PFU / mL. M: marcador de peso molecular. Cor laranja: reação negativa para ZIKV; Cor amarelo esverdeado: reação positiva para ZIKV.

### 8.1.2 Especificidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV

A fim de avaliar a especificidade do ensaio RT-LAMP em detectar apenas o ZIKV em amostras biológicas humanas, os *primers* foram testados frente a outros arbovírus endêmicos no Brasil, incluindo DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95- 3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081), YFV (17DD) e CHIKV (PE2016-480) (Quadro 5). Para tanto, foi realizada uma infecção artificial de todos os arbovírus descritos acima em soro humano e, em seguida, diretamente testados. O RT-LAMP detectou especificamente apenas o ZIKV, conforme determinado por análise a olho nu, observação

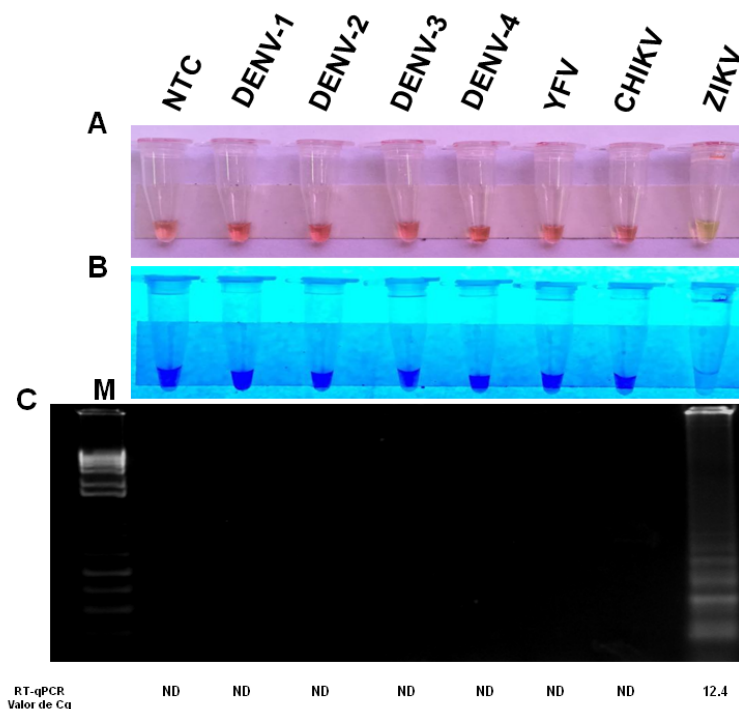
visual sob luz ultravioleta ou eletroforese em gel de agarose (Figura 24). Esses resultados foram confirmados por RT-qPCR, em que o valor de Cq para a amostra positiva para o ZIKV foi de 12,4 (Figura 19). Um problema comum com ensaios RT-LAMP altamente sensíveis é a contaminação cruzada. Para evitar isso, adicionamos 1 µL de diluição 1:10 de corante SYBR Green I diluído em água livre de RNase ao centro das tampas do tubo antes da reação e, misturados logo após o tempo de incubação. Isso reduziu o potencial de introdução de contaminação e no trabalho realizado aqui, nenhuma contaminação foi observada usando a estratégia RT-LAMP de tubos fechados (dados não mostrados). Assim, estes resultados sugerem que o ensaio RT-LAMP descrito ao longo deste trabalho é altamente específico para a detecção do ZIKV frente a outros arbovírus circulantes no Brasil.

**Quadro 9** - Arbovírus utilizados para avaliar a especificidade do ensaio RT-LAMP.

<b>Vírus</b>	<b>Cepa</b>	<b>Código de acesso do GenBank</b>
<i>Flaviviridae, Flavivírus, Zika vírus</i>	PE243	KX197192
<i>Flaviviridae, Flavivírus, Dengue vírus, sorotipo 1</i>	PE/97-42735	EU259529
<i>Flaviviridae, Flavivírus, Dengue vírus, sorotipo 2</i>	PE/95-3808	EU259569
<i>Flaviviridae, Flavivírus, Dengue vírus, sorotipo 3</i>	PE/02-95016	KC425219
<i>Flaviviridae, Flavivírus, Dengue vírus, sorotipo 4</i>	PE/10-0081	Não publicado
<i>Flaviviridae, Flavivírus, Vírus da Febre Amarela</i>	17DD	DQ100292
<i>Togaviridae, Alphavírus, Vírus Chikungunya</i>	PE2016-480	Não publicado
<i>Togaviridae, Alphavírus, Vírus Mayaro</i>	BR/Sinop/H307/2015	MH513597.1

Fonte: O autor.

**Figura 24** - Especificidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em soro humano.



Fonte: O autor.

Legenda: Amostra de soro humano obtida de um paciente saudável foi infectada artificialmente com diferentes arbovírus (DENV 1-4, YFV, CHIKV, ZIKV) endêmicos no Brasil e, na sequência, diretamente testados pelo RT-LAMP sem extração de RNA. Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (A), sob irradiação UV (B) e eletroforese em gel de agarose (C). NTC (controle sem molde): água. M: marcador de peso molecular. Cor laranja: reação negativa para ZIKV; Cor amarelo esverdeado: reação positiva para ZIKV.

### 8.1.3 Sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção do ZIKV em soro humano

Para analisar a sensibilidade analítica (limite de detecção - LOD) do RT-LAMP em amostras biológicas humanas, foi realizada uma diluição seriada do ZIKV na base de 10 vezes em soro humano variando de  $10^5$  PFU a  $10^{-7}$  PFU. Após a diluição, as amostras foram diretamente testadas pelo RT-LAMP sem extração do RNA. O RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV em uma ampla faixa de concentrações de ZIKV no soro humano (de  $10^5$  PFU a  $10^{-6}$  PFU). Em seguida, o RNA viral das mesmas diluições foi extraído e testado através da RT-qPCR. A sensibilidade analítica da RT-qPCR foi observada apenas até  $10^1$  PFU com valor de Cq de 34,2 (Figura 25). Os experimentos foram repetidos 10 vezes de forma independente para permitir a análise de regressão probit a fim de determinar com precisão o limite de detecção de RT-LAMP (Tabela 1). O limite de detecção do ensaio RT-LAMP foi  $-1,07 \log_{10}$  PFU de ZIKV considerando um intervalo

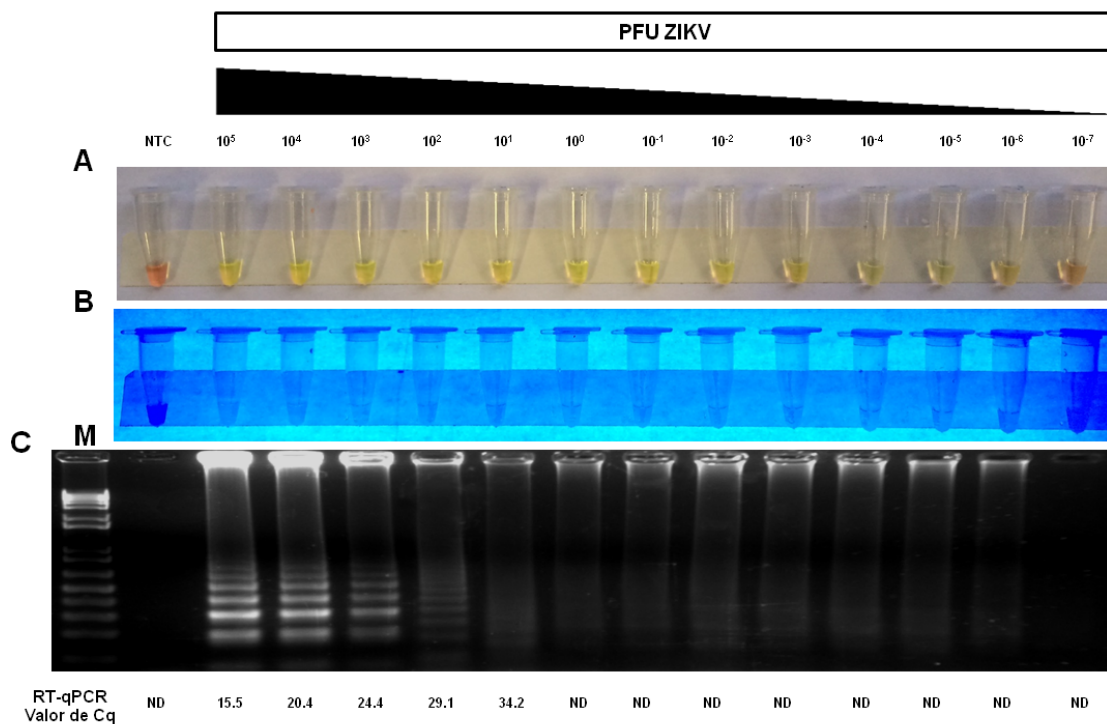
de confiança de 95% (-1,93 a 0,49) (Figura 26). Em conjunto, esses resultados demonstraram que o ensaio RT-LAMP foi 100 vezes mais sensível do que a RT-qPCR, técnica padrão-ouro atualmente utilizada para o diagnóstico molecular do ZIKV em amostras clínicas. Resultados de sensibilidade analítica semelhantes também foram obtidos na urina, saliva e sêmen (dados não mostrados).

**Tabela 1** - Limite de detecção do RT-LAMP calculado através da análise de Probit.

<b>Concentração do ZIKV (PFU)</b>	<b>Número de replicatas</b>	<b>Número de resultados positivos</b>	<b>Prababilidade de detecção %</b>
10 <sup>5</sup>	10	10	100
10 <sup>4</sup>	10	10	100
10 <sup>3</sup>	10	10	100
10 <sup>2</sup>	10	10	100
10 <sup>1</sup>	10	10	100
10 <sup>0</sup>	10	10	100
10 <sup>-1</sup>	10	9	90
10 <sup>-2</sup>	10	9	90
10 <sup>-3</sup>	10	7	70
10 <sup>-4</sup>	10	4	40
10 <sup>-5</sup>	10	3	30
10 <sup>-6</sup>	10	1	10
10 <sup>-7</sup>	10	0	0

Fonte: O autor.

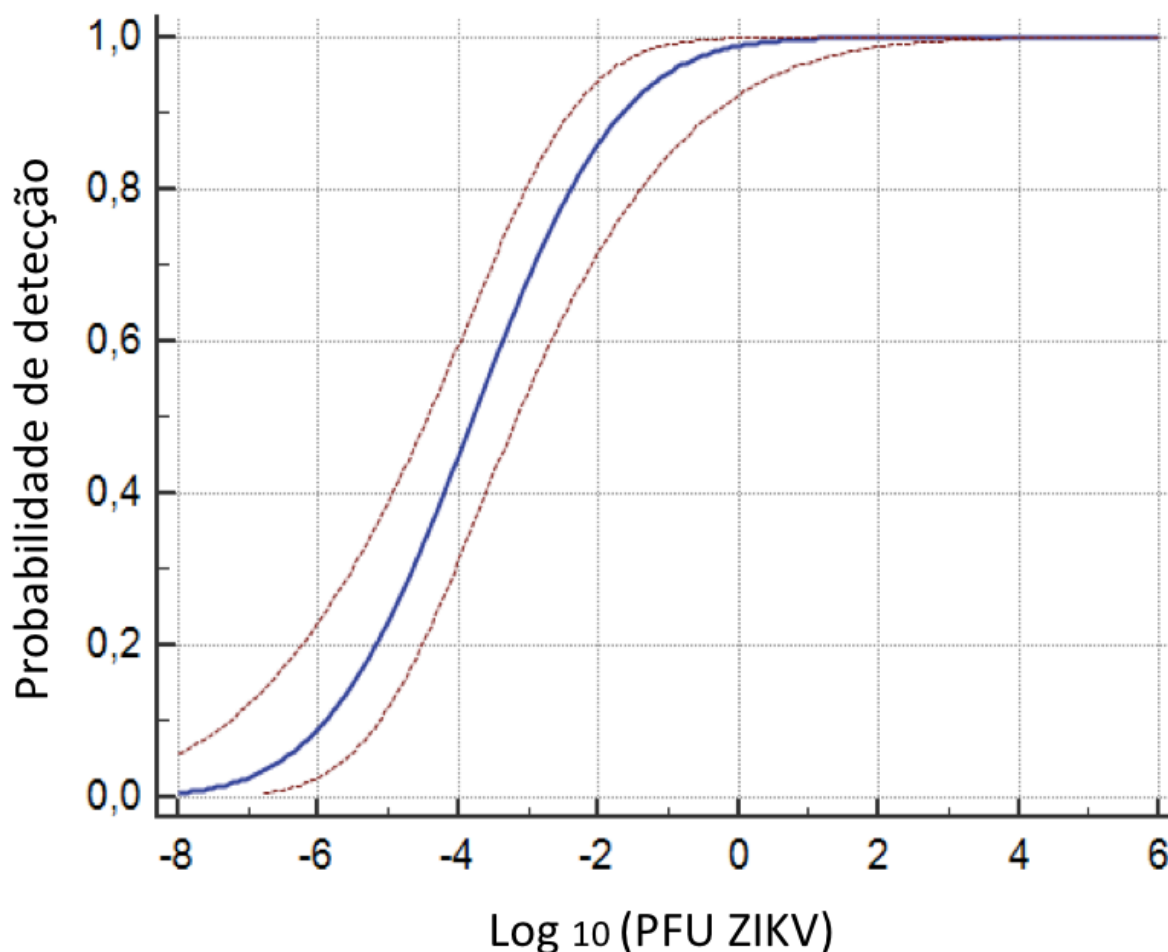
**Figura 25** - Sensibilidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em soro humano.



Fonte: O autor.

Legenda: A sensibilidade do RT-LAMP foi determinada com base na última diluição na qual o genoma viral foi detectado pelo ensaio RT-LAMP. A sensibilidade do RT-LAMP foi determinada a partir de uma diluição seriada na base de 10 vezes ( $10^5$  a  $10^{-7}$  PFU) de ZIKV em amostra de soro humano não infectado e, em seguida, testado pelo RT-LAMP diretamente sem extração de RNA. Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (A), sob irradiação UV (B) e eletroforese em gel de agarose por RT-LAMP (C). M: marcador de peso molecular. NTC (controle sem molde): água. ND (não detectado). Para comparar os resultados de RT-LAMP com a RT-qPCR, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições e, na sequência, testadas. Cor laranja: reação negativa para ZIKV; Cor amarelo esverdeado: reação positiva para ZIKV.

**Figura 26** - Limite de detecção do ensaio RT-LAMP analisado através da análise de Probit.



Fonte: O autor.

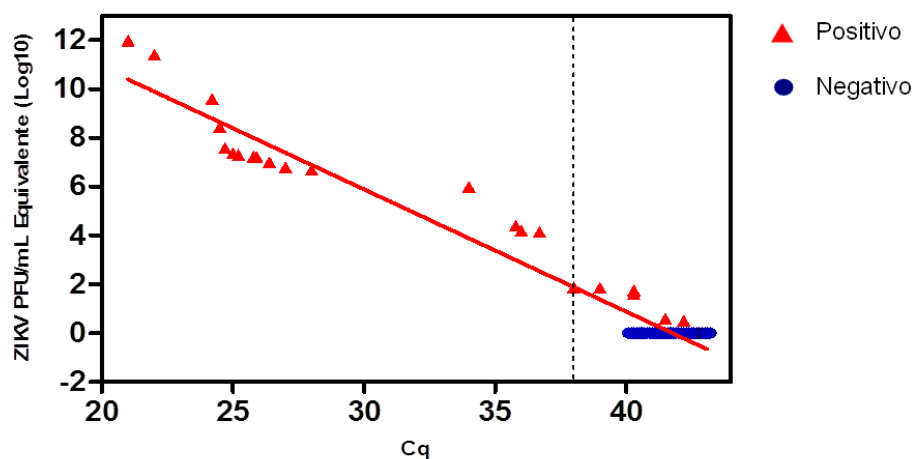
Legenda: A análise de Probit foi calculada utilizando o software MedCalc (versão 18.11), fornecendo um valor de C95 (probabilidade de detecção 95% em todas as repetições) de  $-1,07 \log_{10}$  PFU do ZIKV com intervalo variando entre  $-1,93$  a  $0,49$ . Este valor indica que o limite de detecção do RT-LAMP para detecção do ZIKV é cerca de  $-2 \log_{10}$  (1/100) PFU maior que o limite de detecção da RT-qPCR.

#### 8.1.4 Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para diagnosticar o ZIKV em amostras de pacientes

Por fim, a validação do desempenho diagnóstico do RT-LAMP em detectar o ZIKV foi realizada usando amostras clínicas obtidas de pacientes com suspeita de infecção por arbovírus. Um total de 100 amostras de soro duplamente cegas foram testadas em paralelo através do ensaio RT-LAMP e posteriormente da RT-qPCR. O valor de Cq nessas amostras variou de 21,0 a  $> 40,0$  e as amostras com valores Cq de  $\leq 38,0$  em

poços duplicados foram consideradas positivas para ZIKV pela RT-qPCR. Destas, 75 amostras foram negativas para ZIKV conforme determinado pelo RT-LAMP e 25 foram positivas, incluindo amostras que haviam sido determinadas como negativas através do método padrão-ouro. Do número total de 100 amostras clínicas, a RT-qPCR foi capaz de detectar o ZIKV em 20 amostras, enquanto 80 amostras foram determinadas como negativas (Figura 27).

**Figura 27** - Validação do RT-LAMP para o diagnóstico do ZIKV com amostras de pacientes.



Fonte: O autor.

Legenda: Um total de 100 amostras de soro humano foram testadas para ZIKV através do ensaio RT-LAMP. Destas, 20 foram positivas para ZIKV e 80 foram negativas conforme determinado por RT-qPCR. A linha tracejada representa o limite RT-qPCR Cq para a positividade de ZIKV conforme estabelecido por Lanciotti ( $Cq \leq 38$ ). O triângulo vermelho representa as amostras positivas pelo RT-LAMP e o círculo azul representa as amostras negativas pelo ensaio RT-LAMP.

O desempenho diagnóstico do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras de pacientes foi inferido a partir da análise de vários parâmetros estatísticos usando a RT-qPCR como teste de referência para a comparação. O ensaio RT-LAMP teve uma sensibilidade clínica de 100% (IC 95% 83,16% a 100,00%) e especificidade clínica de 93,75% (IC 95% 86,01% a 97,94%). A prevalência geral de ZIKV nas amostras foi de 20,00% (IC 95% 12,67% a 29,18%). O valor preditivo positivo deste ensaio foi de 80,00% (IC 95% 63,13% a 90,33%) e o valor preditivo negativo foi 100%. A acurácia geral do

ensaio RT-LAMP para detecção do ZIKV foi de 95,00% (IC 95% 88,72% a 98,36%) (Tabela 2), destacando o potencial do ensaio RT-LAMP como uma ferramenta POC para do ZIKV em amostras de pacientes.

**Tabela 2** - Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para o diagnóstico molecular do ZIKV em amostras de pacientes.

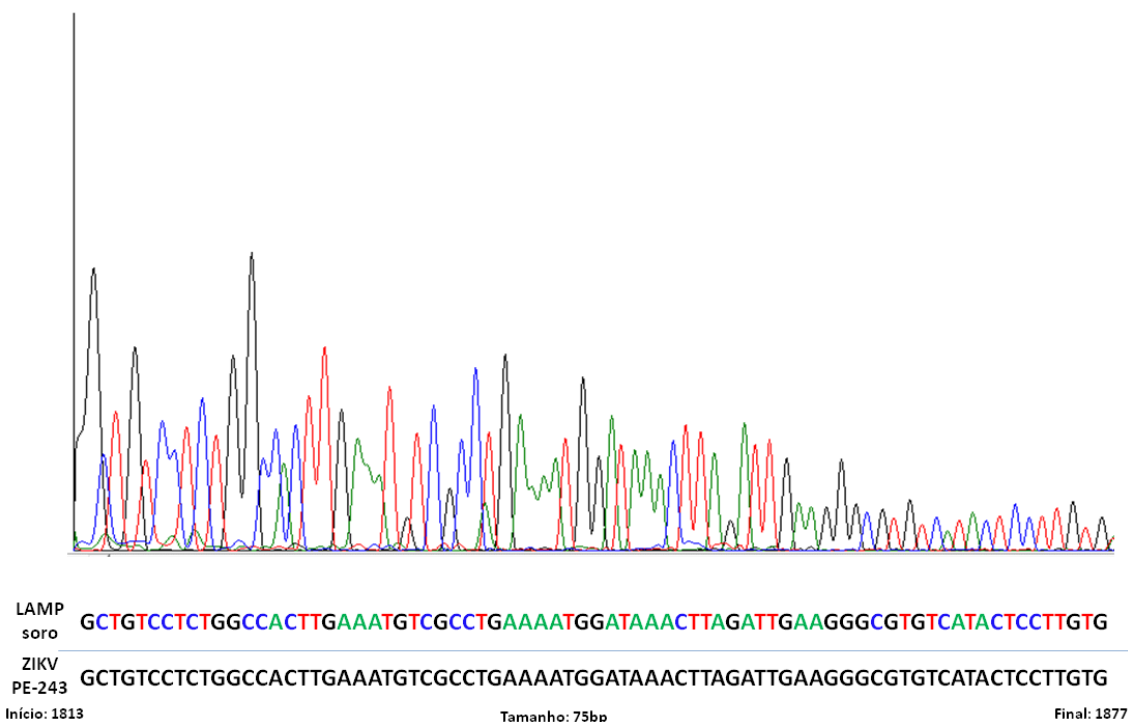
	<b>RT-qPCR +</b>	<b>RT-qPCR -</b>	<b>Total</b>
<b>RT-LAMP +</b>	20	5	25
<b>RT-LAMP -</b>	0	75	75
<b>Total</b>	20	80	100
<b>Sensibilidade</b>	<b>100 %</b> (IC 95% 83.16% a 100.00%)		
<b>Especificidade</b>	<b>93.75 %</b> (IC 95% 86.01% a 97.94%)		
<b>Prevalência do ZIKV</b>	<b>20.00%</b> (IC 95% 12.67% a 29.18%)		
<b>Valor Preditivo Positivo</b>	<b>80.00%</b> (IC 95% 63.13% a 90.33%)		
<b>Valor Preditivo Negativo</b>	<b>100 %</b>		
<b>Acurácia</b>	<b>95.00%</b> (IC 95% 88.72% a 98.36%)		

Fonte: O autor.

Para confirmar a identidade de amostras positivas pelo RT-LAMP para detecção de ZIKV em amostras humanas, foi sequenciado uma amostra positiva de soro humano pelo método de Sanger. As análises obtidas a partir dos *amplicons* sequenciados e, posteriormente, analisados utilizando a ferramenta BLAST demonstraram que os *amplicons* obtidos a partir das reações positivas do RT-LAMP são 100% compatíveis com vírus circulantes no Brasil (Figura 28), comprovando a especificidade do RT-LAMP para detecção apenas de ZIKV. Juntos, esses resultados sugerem que o protocolo RT-LAMP descrito neste trabalho é altamente específico para a detecção de ZIKV.



**Figura 28** - Eletroferograma dos *amplicons* sequenciados pelo método de Sanger a partir reações positivas para o ZIKV de soro humano pelo RT-LAMP.



Fonte: O autor.

Legenda: Os *amplicons* obtidos da reação do RT-LAMP de uma amostra de soro humano positiva para ZIKV foram sequenciados usando o método Sanger para confirmar a identidade do ZIKV. A região amplificada foi entre a posição gênica de 1813 a 1877. As sequências obtidas foram alinhadas contra a cepa de referência ZIKV PE243.

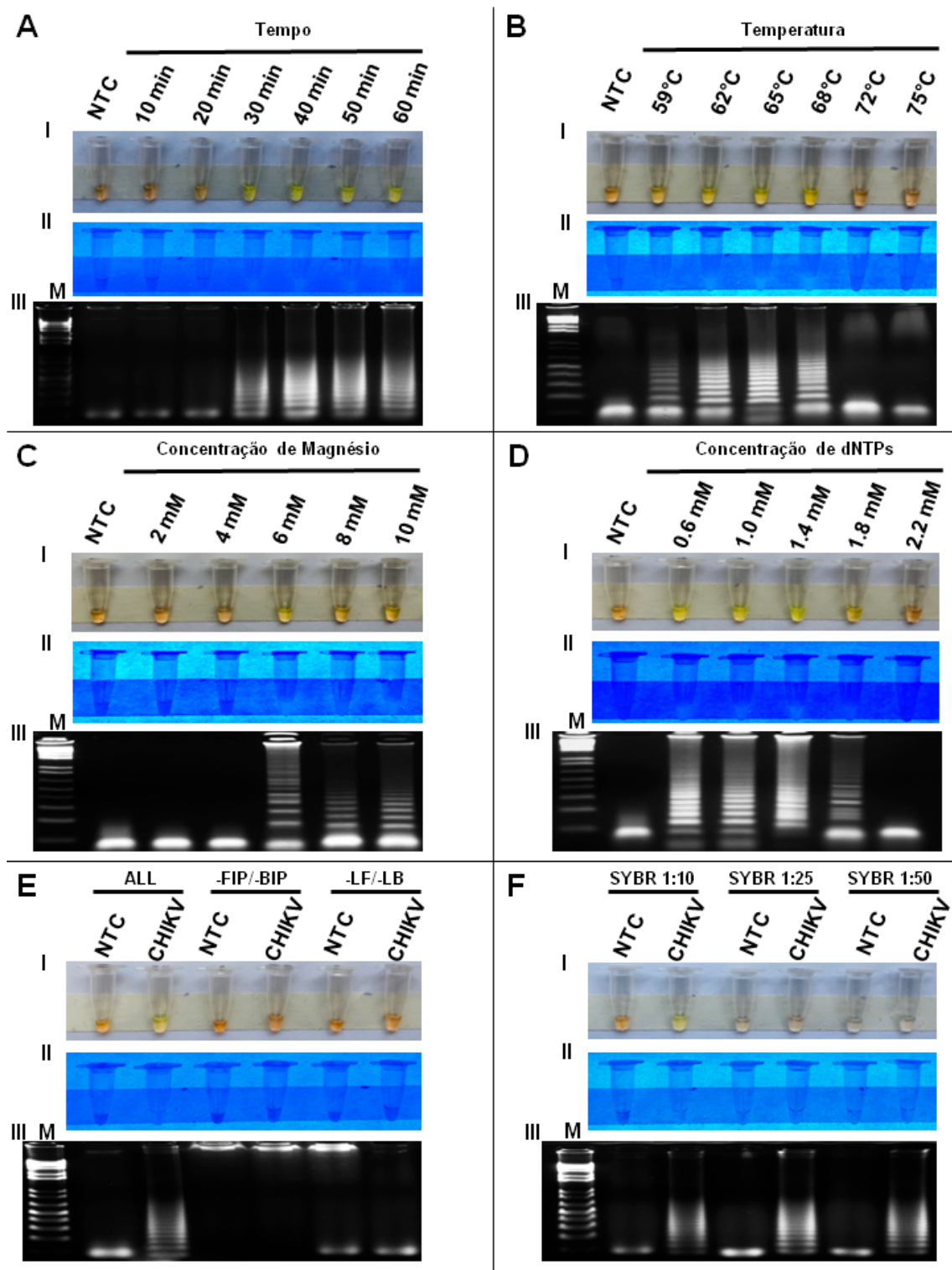
## 8.2 Ensaio RT-LAMP para detecção do CHIKV

A fim de demonstrar a versatilidade do ensaio RT-LAMP como ferramenta promissora para o diagnóstico de agentes etiológicos de natureza viral, nós desenvolvemos um sistema baseado no ensaio RT-LAMP para o diagnóstico de outro arbovírus emergente na América Latina. Para a próxima demonstração diagnóstica, foi escolhido o CHIKV. Assim como o ZIKV, o CHIKV se originou na África e causa sintomas que se sobrepõem aos causados pelo ZIKV nos pacientes infectados.

### 8.2.1 Padronização do ensaio RT-LAMP para detecção do CHIKV

Inicialmente, o ensaio RT-LAMP para a detecção do CHIKV foi otimizado com base no protocolo do ensaio RT-LAMP estabelecido para detecção do ZIKV. As concentrações de todos os reagentes, bem como todas as condições do ensaio RT-LAMP foram inicialmente otimizadas a fim de determinar as melhores condições de cada parâmetro. As reações foram realizadas sob temperaturas variando de 59° C a 75° C e o tempo de incubação variando entre 10 min a 60 min. Quanto aos reagentes, foram otimizadas às concentrações ótimas de Mg<sup>2+</sup> (2 mM a 10 mM) e dNTPs (0.6 mM a 2.2 mM). Além disso, foi avaliado se todos os *primers*, incluindo os externos (F3 e B3), internos (FIP e BIP) e do loop (LF e LB) eram essenciais para a realização do ensaio RT-LAMP. Os resultados com melhor performance de amplificação foram obtidos a 65 ° C por 30 min de incubação (Figura 29 A-B). Quanto aos reagentes da reação, as concentrações ótimas para magnésio e dNTPs foram 8 mM e 1.8 mM, respectivamente (Figura 29 C-D). Através da otimização dos *primers* e da concentração de SYBR, foi observado que todos os *primers* são requeridos para uma excelente performance da reação e que uma simples diluição de 1:10 do SYBR é suficiente para visualizar os resultados através do ensaio RT-LAMP (Figura 29 E-F). Após a otimização de todos os parâmetros, um protocolo padrão foi estabelecido para a realização dos experimentos posteriores.

**Figura 29** - Otimização das concentrações dos reagentes e condições do ensaio RT-LAMP para detecção do CHIKV.



Fonte: O autor.

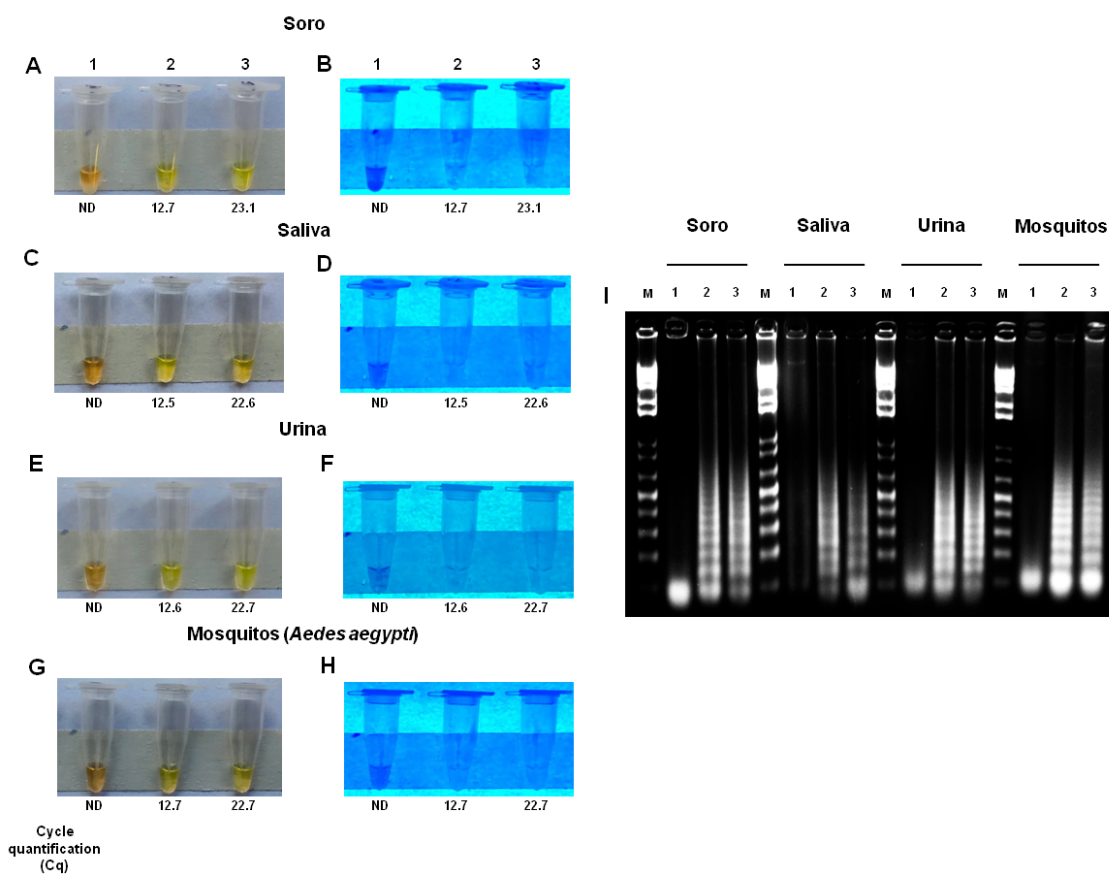
Legenda: Todas os parâmetros e condições do ensaio RT-LAMP foram padronizadas e estabelecidas. As reações foram realizadas sob tempo de incubação variando entre 10 min a 60 min (A) e temperaturas variando de 59°C a 75°C (B). Quanto aos reagentes, foram otimizadas às concentrações ótimas de Magnésio (variando de 2 mM a 10 mM) (C) e dNTPs (variando de 0.6 mM a 2.2 mM) (D). Além disso, foi verificado

que todos os *primers*, incluindo os externos (F3 e B3), internos (FIP e BIP) e do loop (LF e LB) eram essenciais para a realização do ensaio (E). Por fim, foi otimizada a concentração de SYBR (1:10, 1:25, 1:50) necessária para visualizar os resultados do ensaio RT-LAMP. Resumidamente, os resultados do RT-LAMP foram observados por mudança de cor visual dos produtos no tubo de reação e através de eletroforese em gel. Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (A-FI), sob irradiação UV (A-FII) e eletroforese em gel de agarose (A-FIII). Legendas: NTC (controle sem molde): água; M: marcador de peso molecular.

### 8.2.2 Detecção do CHIKV em amostras biológicas humanas e mosquitos sob condições controladas

Para avaliar a capacidade do RT-LAMP em detectar o CHIKV em amostras biológicas humanas e mosquitos sob condições controladas, fluidos biológicos humanos incluindo soro, urina, saliva e macerado bruto de *A. aegypti* foram infectados com uma carga viral alta ( $1 \times 10^6$  PFU/mL) ou baixa ( $1 \times 10^3$  PFU/mL) para mimetizar as concentrações fisiológicas do CHIKV nessas amostras. Após a incubação durante 1 h em temperatura ambiente, as amostras foram diretamente testadas através do RT-LAMP sem a necessidade de extração do RNA das amostras. O ensaio RT-LAMP para o CHIKV foi positivo em ambas as cargas virais e em todas as amostras humanas testadas. Como esperado, os controles negativos: NTC e amostras biológica (amostra bruta de soro, urina e saliva não infectadas) apresentaram resultados negativos (Figura 30 A-C). Resultados similares foram obtidos utilizando o macerado bruto de *A. aegypti* infectado com ambas as concentrações de CHIKV ( $1 \times 10^6$  PFU/mL e  $1 \times 10^3$  PFU/mL (Figura 30 A-C). A fim de comparar os resultados com o método padrão-ouro para o diagnóstico molecular do CHIKV, os resultados do RT-LAMP foram confirmados através da RT-qPCR. Os valores de  $C_q$  (*Cycle quantification*) obtidos foram (12,7; 12,5; 12,6; 12,7) e (23,1; 22,6; 22,7; 22,7), para alta carga viral e baixa carga viral em soro, saliva, urina e macerado de *Aedes aegypti*, respectivamente. Juntos, esses resultados demonstraram que o RT-LAMP é uma ferramenta poderosa para detectar o CHIKV em amostras biológicas humanas e amostras de mosquitos vetores.

**Figura 30** - Detecção do CHIKV em amostras humanas e de mosquitos experimentalmente infectadas.



Fonte: O autor.

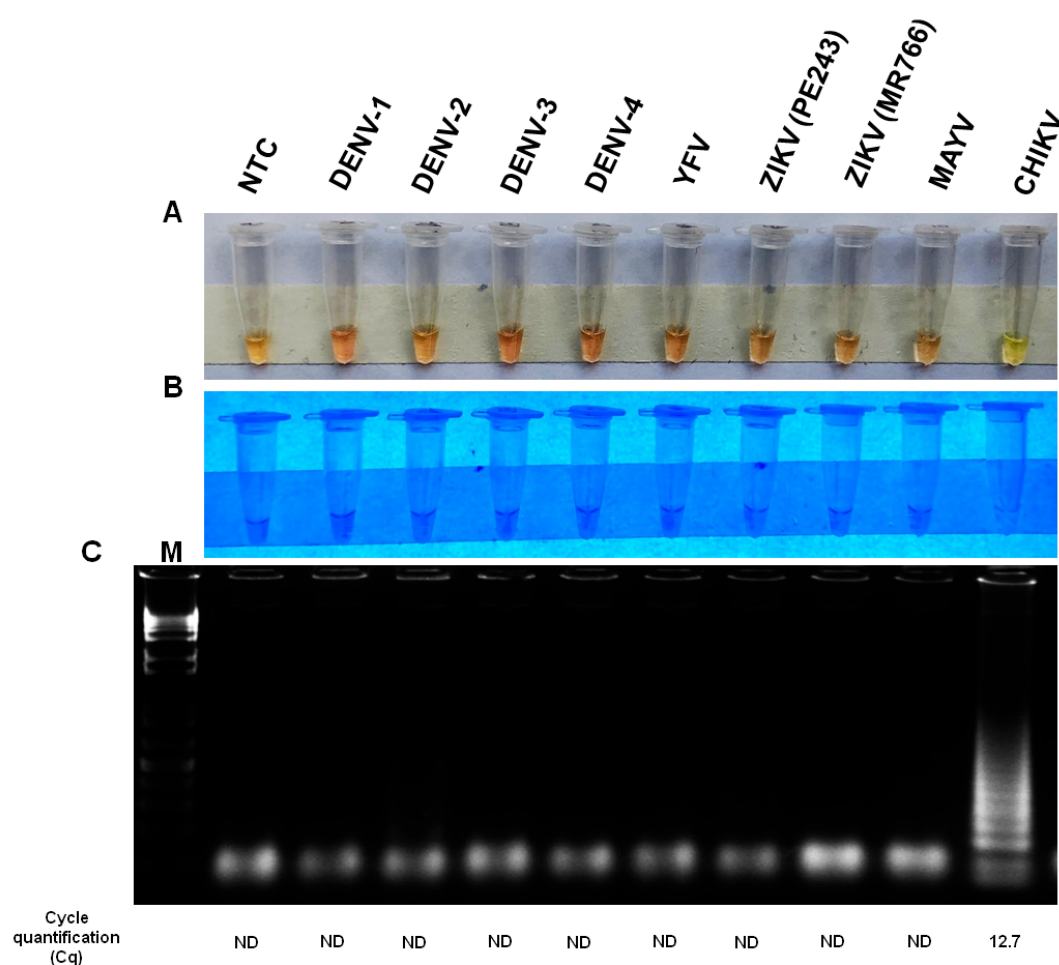
Legenda: As amostras biológicas humanas incluindo soro, urina, saliva foram infectadas com uma carga viral alta ( $1 \times 10^6$  PFU/mL) ou baixa ( $1 \times 10^3$  PFU/mL) e, na sequência, diretamente testadas através do ensaio RT-LAMP sem a necessidade de extração do RNA (Fig. 30 A-F). Fig. 30 G-H representa os resultados RT-LAMP em macerado bruto de *A. aegypti* experimentalmente infectado com ambas as cargas virais ( $1 \times 10^6$  PFU/mL ou  $1 \times 10^3$  PFU/mL). Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (A, C, E e G), sob irradiação UV (B, D, F e G) e eletroforese em gel de agarose (I). Legendas na Fig.30 são: (1): NTC (controle sem molde); (2): amostras experimentalmente infectadas com  $10^6$  PFU/mL; (3): amostras experimentalmente infectadas com  $10^3$  PFU/mL. M: marcador de peso molecular. Cor laranja: reação negativa para CHIKV; Cor amarelo esverdeado: reação positiva para CHIKV.

### 8.2.3 Especificidade analítica do RT-LAMP para detecção do CHIKV

Para avaliar a especificidade do ensaio RT-LAMP em detectar apenas o CHIKV, os *primers* foram avaliados frente a outros arbovírus: DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081), YFV (17DD), ZIKV (PE243), ZIKV (MR766), MAYV (BR/Sinop/H307/2015) e CHIKV (PE2016-480). Foi realizada uma infecção artificial de todos os arbovírus descritos acima em soro humano

coletado a partir de indivíduos saudáveis. Apenas o soro infectado artificialmente com CHIKV foi positivo através do ensaio RT-LAMP, conforme determinado por análise a olho nu, observação visual sob luz UV ou eletroforese em gel de agarose. Esses resultados foram confirmados por RT-qPCR, em que o valor de Cq para a amostra positiva para o ZIKV foi de 12,7 (Figura 31). Juntos, estes achados revelam que o ensaio RT-LAMP reportado ao longo deste trabalho é altamente específico para a detecção do CHIKV frente a outros arbovírus circulantes no Brasil.

**Figura 31** - Especificidade analítica do RT-LAMP para a detecção do CHIKV.



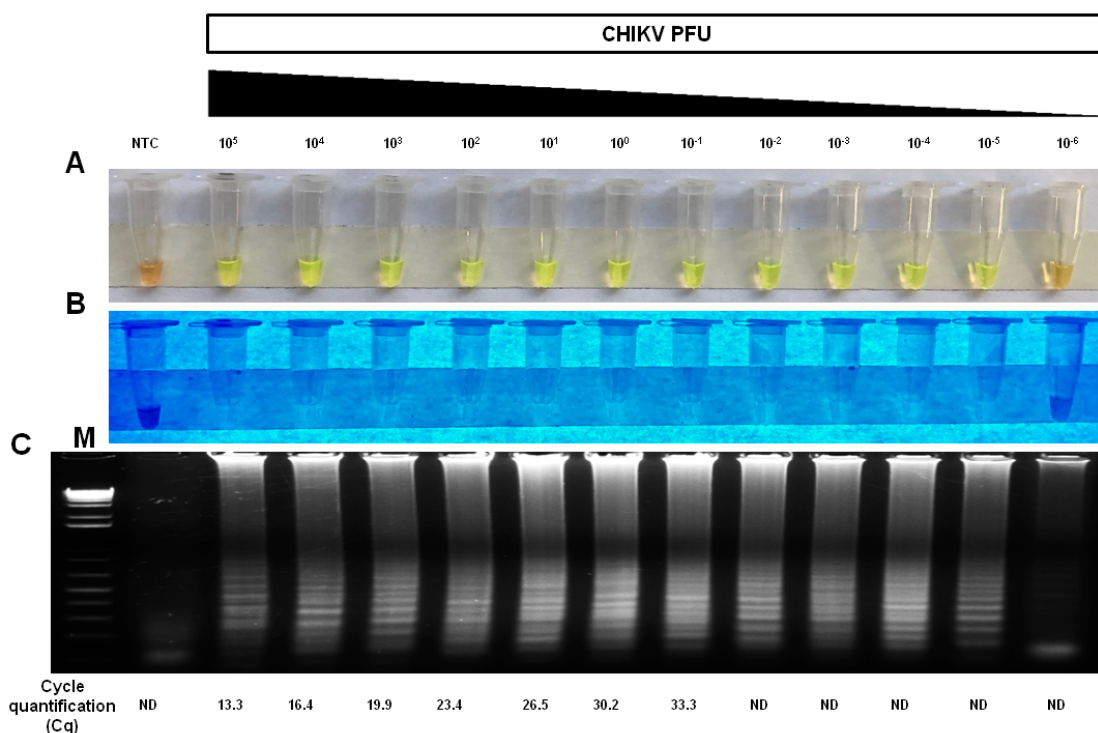
Fonte: O autor.

Legenda: Foi realizada uma infecção artificial de diferentes arbovírus (DENV 1-4, YFV, CHIKV, ZIKV [PE243 e MR766] e MAYV) em soro humano. Na sequência, todas as amostras foram diretamente testadas pelo RT-LAMP para avaliar a especificidade dos *primers* em detectar apenas o CHIKV. Os produtos de amplificação foram visualizados através do olho nu sob luz natural (A), sob irradiação UV (B) e eletroforese em gel de agarose (C). M: marcador de peso molecular. NTC (controle sem molde). Cor laranja: reação negativa para CHIKV; Cor amarelo esverdeado: reação positiva para CHIKV.

### 8.2.4 Sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção do CHIKV

Para calcular a sensibilidade analítica do RT-LAMP, foi realizada uma diluição seriada do CHIKV na base de 10 vezes em soro humano variando de  $10^5$  PFU a  $10^{-6}$  PFU sem extração do RNA. O RT-LAMP foi capaz de detectar o CHIKV em um largo espectro de concentrações de vírus no soro (de  $10^5$  PFU a  $10^{-5}$  PFU). Adicionalmente, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições testadas pelo RT-LAMP e, na sequência, foram testadas pelo método padrão-ouro para o diagnóstico molecular do CHIKV em amostras de pacientes descrito por Lanciotti (2007) (LANCIOTTI *et al.*, 2007). Para o ensaio de RT-qPCR, o limite inferior de detecção do CHIKV foi de  $10^{-1}$  PFU com valor de Cq 33,3 (Figura 32). Em conjunto, esses resultados demonstraram que o ensaio RT-LAMP é mais sensível do que a técnica padrão-ouro atualmente utilizada para o diagnóstico do CHIKV em soro humano.

**Figura 32** - Sensibilidade analítica do RT-LAMP para a detecção do CHIKV em soro humano.



Fonte: O autor.

Legenda: A sensibilidade do RT-LAMP foi determinada com base na última diluição na qual o genoma do CHIKV foi detectado pelo ensaio RT-LAMP. A sensibilidade analítica do RT-LAMP foi determinada a partir de uma diluição seriada na base de 10 vezes ( $10^5$  a  $10^{-6}$  PFU) de ZIKV em amostra de soro humano não infectado e, em seguida, testado pelo RT-LAMP diretamente sem a necessidade da extração de RNA.

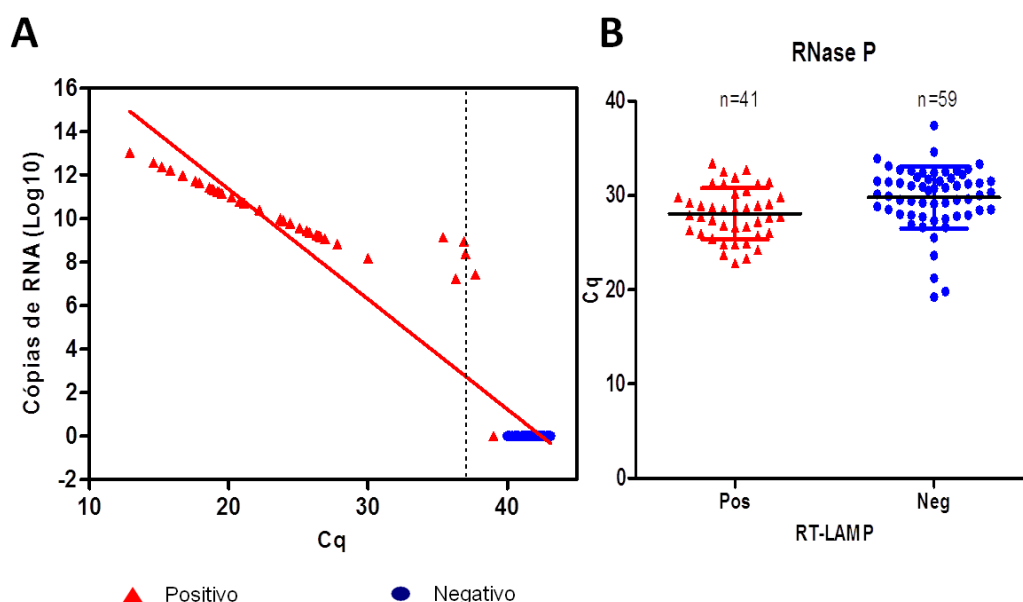


Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (A), sob irradiação UV (B) e eletroforese em gel de agarose por RT-LAMP (C). M: marcador de peso molecular. NTC (controle sem molde): água. ND (não detectado). Para comparar os resultados de RT-LAMP com a RT-qPCR, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições e, na sequência, testadas. Cor laranja: reação negativa para CHIKV; Cor amarelo esverdeado: reação positiva para CHIKV.

### 8.2.5 Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para diagnosticar o CHIKV em amostras de pacientes

Para a validação o desempenho diagnóstico do RT-LAMP em detectar o CHIKV em amostras clínicas, um total de 100 amostras de soro foram obtidas do LACEN-PE e testadas posteriormente para a detecção do CHIKV pelo RT-LAMP em paralelo com a RT-qPCR. Amostras com valores de Ct de  $\leq 37,0$  em poços duplicados foram consideradas positivas para infecção por CHIKV. Destas, 61 amostras foram negativas e 39 foram positivas conforme determinado pela RT-qPCR. O valor de Cq nessas amostras variou de 12,9 a  $>40,0$ . Do número total de 100 amostras, o ensaio RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV em 41 amostras, incluindo duas amostras que haviam sido determinadas como negativas através da RT-qPCR (Figura 33). Em contraste, um total de 59 amostras foram negativas através do RT-LAMP.

**Figura 33** - Validação do RT-LAMP para o diagnóstico do CHIKV com amostras de pacientes.



Fonte: O autor.

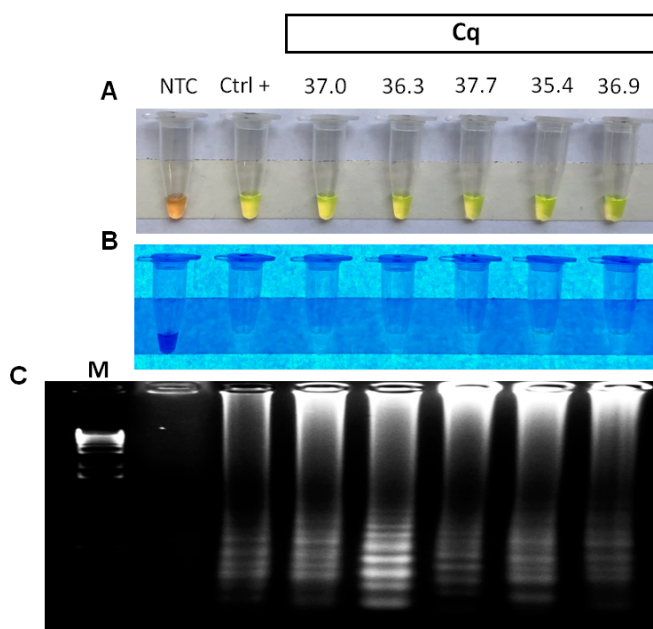
Legenda: Um total de 100 amostras de soro humano foram testadas para CHIKV através do ensaio RT-LAMP. Destas, 39 foram positivas para CHIKV e 61 foram negativas conforme determinado por RT-qPCR. A linha tracejada representa o limite RT-qPCR Cq para a positividade de CHIKV conforme estabelecido por Lanciotti (Cq  $\leq 37$ ). O triângulo vermelho representa as amostras positivas pelo RT-LAMP e o círculo



azul representa as amostras negativas pelo ensaio RT-LAMP (A). Além disso, todas as 100 amostras empregadas para a validação do RT-LAMP também foram testadas para o gene endógeno humano RNase P (Ribonuclease P) a fim de assegurar a qualidade do material genético das amostras clínicas (B).

Além disso, as amostras de soro humano que estavam no limiar de detecção pela RT-qPCR (valores Cq variando de 35,4 a 37,7) foram diagnosticadas como positivas pelo RT-LAMP (Figura 34), destacando a sensibilidade do ensaio RT-LAMP em detectar o CHIKV em amostras que apresentam baixa carga viral.

**Figura 34** - Detecção do CHIKV pelo RT-LAMP em amostras clínicas que estavam no limite de detecção pela RT-qPCR.



Fonte: O autor.

Legenda: Amostras de soro obtidas de pacientes que se encontravam no limiar de detecção quando testadas pela RT-qPCR (valores de Cq variando de 35,4 a 37,7) foram analisadas por RT-LAMP e todas as reações mostraram um resultado positivo. Os produtos de amplificação foram observados através do olho nu sob luz natural (A), sob irradiação UV (B) e eletroforese em gel de agarose (C). M: marcador de peso molecular. NTC (controle sem molde): água.

O desempenho diagnóstico do RT-LAMP para a detecção do CHIKV em amostras de soro obtidas de pacientes foi determinado a partir da análise dos parâmetros estatísticos utilizando a técnica padrão-ouro para o diagnóstico do CHIKV, RT-qPCR, como metodologia referência. A prevalência geral do CHIKV nas amostras foi de 39.00% (IC 95% 29.40% a 49.27%). O ensaio RT-LAMP apresentou sensibilidade clínica de 100%

(IC 95% 90.97% a 100.00%) e especificidade clínica de 91,18% (IC95% 76,32% a 98,14%). O valor preditivo positivo de 95.12% (IC 95% 83.30% a 98.70%), enquanto o valor preditivo negativo foi de 100%. A acurácia geral do teste RT-LAMP foi determinada em 95,24% (IC 95% 86,71% a 99,01%) (Tabela 3), destacando o potencial promissor do RT-LAMP para o diagnóstico molecular do CHIKV em amostras clínicas.

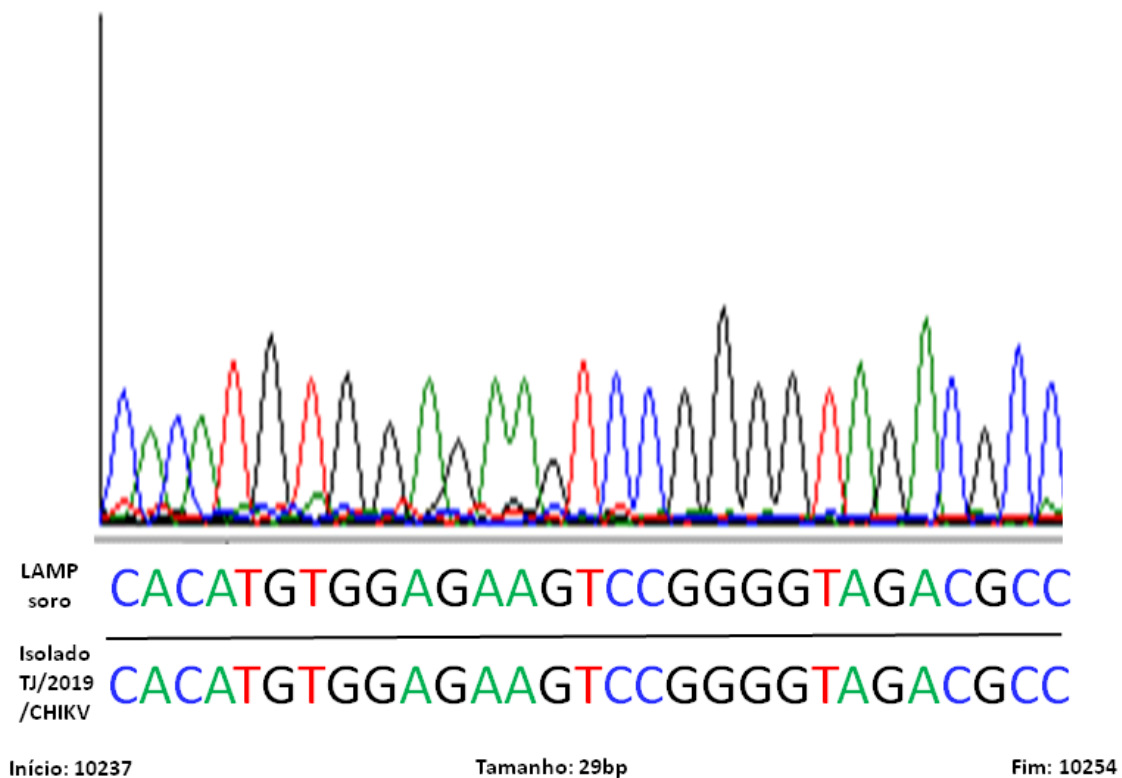
**Tabela 3** - Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para o diagnóstico molecular do CHIKV em amostras de pacientes.

	RT-qPCR +	RT-qPCR -	Total
<b>RT-LAMP +</b>	39	2	41
<b>RT-LAMP -</b>	0	59	59
<b>Total</b>	39	61	100
<b>Sensibilidade</b>	<b>100 % (IC 95% 90.97% a 100.00%)</b>		
<b>Especificidade</b>	<b>96.72 % (IC 95% 88.65% a 99.60%)</b>		
<b>Prevalência do CHIKV</b>	<b>39.00% (IC 95% 29.40% a 49.27%)</b>		
<b>Valor Preditivo Positivo</b>	<b>95.12% (IC 95% 83.30% a 98.70%)</b>		
<b>Valor Preditivo Negativo</b>	<b>100 %</b>		
<b>Acurácia</b>	<b>98.00% (IC 95% 92.96% a 99.76%)</b>		

Fonte: O autor.

Por fim, para confirmar a identidade das amostras de soro positivas através do RT-LAMP, foram sequenciadas duas amostras empregando o método de Sanger. Os resultados do sequenciamento e a análise através da ferramenta do BLAST revelaram que os *amplicons* de CHIKV obtidos pelo RT-LAMP correspondem a 100% de identidade genomas isolados de pacientes (Figura 35), confirmando assim, a especificidade do RT-LAMP em detectar o material genético do CHIKV em amostras obtidas de pacientes.

**Figura 35** - Eletroferograma dos *amplicons* sequenciados pelo método de Sanger a partir reações positivas para o CHIKV de soro humano pelo RT-LAMP.



Fonte: O autor.

Legenda: Os *amplicons* obtidos da reação do RT-LAMP de uma amostra de soro humano positiva foram sequenciados usando o método Sanger para confirmar a identidade do CHIKV. A região amplificada foi entre a posição gênica de 10237 a 10254. As sequências obtidas foram alinhadas contra o genoma do CHIKV isolado de um paciente na Ásia.

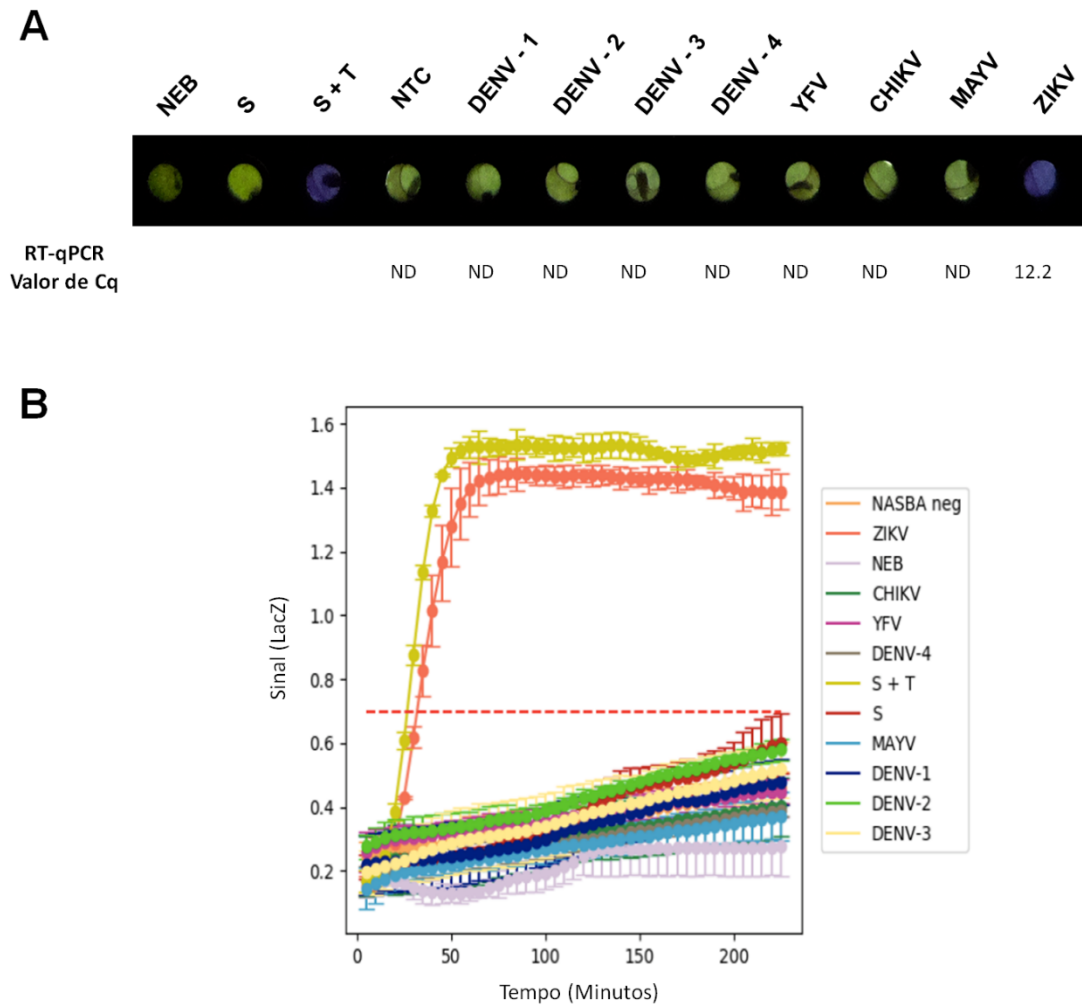
### 8.3 Avaliação dos biossensores moleculares para o diagnóstico molecular do ZIKV

Recentemente, Pardee et al. utilizou os biossensores moleculares para diagnosticar o ZIKV com baixo custo e de forma rápida (PARDEE *et al.*, 2016). Nesta tese, foram estendidos os estudos iniciais de prova de conceito para validar os biossensores moleculares para a detecção molecular do ZIKV com amostras oriundas de pacientes do estado de Pernambuco, epicentro da última epidemia do ZIKV.

#### 8.3.1 Especificidade analítica dos biossensores moleculares para detecção do ZIKV

Para avaliar a habilidade dos biossensores moleculares em detectar apenas o ZIKV (PE243), o ensaio de especificidade foi realizado utilizando vários arbovírus circulantes no Brasil, incluindo o DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081), YFV (17DD), MAYV (BR/Sinop/H307/2015) e CHIKV (PE2016-480). Para tanto, o RNA foi extraído do sobrenadante de células infectadas com os vírus descritos acima. Na sequência, os RNAs foram utilizados como *template* para a reação NASBA e, em seguida, diretamente testados através dos biossensores moleculares. Os biossensores moleculares demonstrou ser altamente específico para detecção do ZIKV, conforme determinado por análise a olho nu (mudança de cor de amarelo para roxo) e com base na análise da conversão do substrato pela enzima LacZ (Figura 36). A análise do sinal de conversão enzimática foi realizada com o auxílio do leitor eletrônico óptico. Adicionalmente, os resultados foram confirmados por RT-qPCR, em que o valor de C<sub>q</sub> para a amostra positiva para o ZIKV foi de 12,2 (Figura 36). Em contraste, todos os outros arbovírus também apresentaram resultados negativos, quando testados pela RT-qPCR. Juntos, estes resultados sugerem que os biossensores moleculares apresentam elevada especificidade para a detecção molecular do ZIKV frente a outros arbovírus endêmicos no Brasil.

**Figura 36** - Especificidade analítica do biossensores moleculares para a detecção do ZIKV.



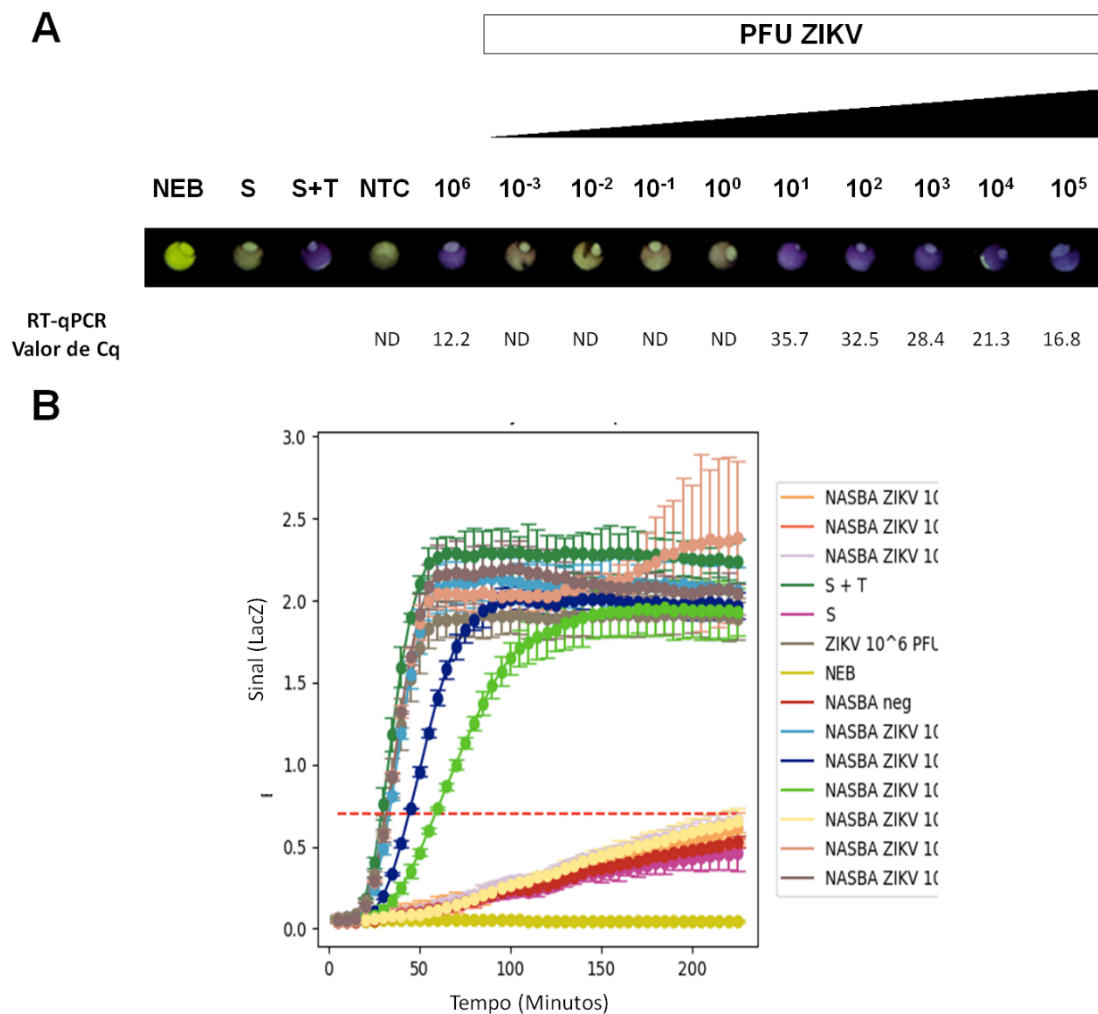
Fonte: O autor.

Legenda: Foi realizada a extração do RNA a partir do sobrenadante celular de diferentes arbovírus circulantes no Brasil incluindo DENV (1-4), YFV, CHIKV, MAYV e ZIKV e, em seguida, os RNAs foram usados para a reação NASBA. Por fim, os produtos da reação NASBA foram usados como *template* para a reação dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”. Os produtos da reação foram observados através da análise com o auxílio do leitor eletrônico óptico portátil (PLUM) acoplado a uma câmera fotográfica para registro dos resultados durante a incubação da reação (A). Adicionalmente, o sinal emitido a partir da conversão enzimática da enzima LacZ -> Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo foi mensurado ao longo do tempo de incubação da reação (B). A fim de comparar os resultados dos biossensores moleculares com a RT-qPCR, as mesmas diluições do RNA foram diretamente testadas. NTC (controle sem molde): água. Cor amarela: amostras negativas para o ZIKV; Cor roxa: amostras positivas para o ZIKV.

### 8.3.2 Sensibilidade analítica dos biossensores moleculares para detecção do ZIKV

Para calcular a sensibilidade analítica dos biossensores moleculares em detectar o ZIKV, foi realizada uma diluição seriada na base de 10 vezes do RNA viral extraído a partir do sobrenadante de células infectadas com o ZIKV. O stock viral do ZIKV empregado para o ensaio de sensibilidade havia sido previamente titulado por ensaio de placa, cujo título foi utilizado como referência para a diluição. Após a extração, o RNA foi diluído e, na sequência, os RNAs foram utilizados como *template* para a reação NASBA e, posteriormente, testados através dos biossensores moleculares. Os biossensores moleculares foram capazes de detectar o ZIKV em um largo espectro de concentrações do vírus (de  $10^6$  PFU a  $10^1$  PFU), incluindo concentrações encontradas em pacientes infectados com baixa carga viral. Adicionalmente, as mesmas diluições do RNA do ZIKV foram diretamente testadas pelo método amplamente utilizado para o diagnóstico molecular do ZIKV descrito por Lanciotti et al. 2008 (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Para a RT-qPCR, o limite de detecção foi de  $10^1$  com valor de Cq 35,7 (Figura 37). Em conjunto, esses resultados demonstraram que os biossensores moleculares apresentam sensibilidade similar quando comparada a RT-qPCR para a detecção molecular do ZIKV em amostras de pacientes.

**Figura 37** - Sensibilidade analítica do biossensores moleculares para a detecção do ZIKV.



Fonte: O autor.

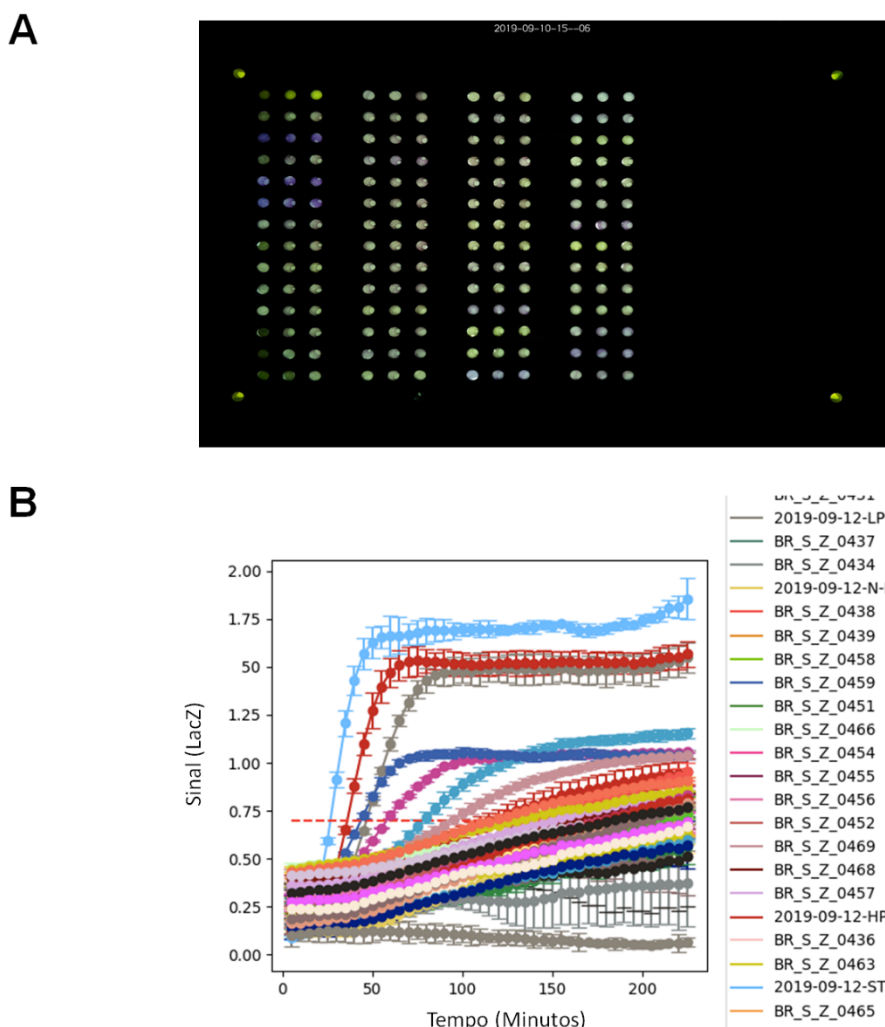
Legenda: A sensibilidade dos biossensores moleculares foi determinada com base na última diluição em que o genoma viral foi detectado através do teste. Para o ensaio de sensibilidade analítica, foi realizada uma diluição seriada do RNA extraído do sobrenadante celular do ZIKV (PE243) na base de 10 vezes ( $10^5$  PFU a  $10^{-3}$  PFU) em água e, na sequência, as diluições foram utilizadas para a reação NASBA. Em seguida, os produtos da reação NASBA foram usados como *template* para a reação dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”. Os produtos da reação foram observados através da análise com o auxílio do leitor eletrônico óptico portátil (PLUM) acoplado a uma câmera fotográfica para registro dos resultados durante a incubação da reação (A). Adicionalmente, o sinal emitido a partir da conversão enzimática da enzima LacZ -> Clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosídeo foi mensurado ao longo do tempo de incubação da reação (B). Para comparar os resultados dos biossensores moleculares com a RT-qPCR, as mesmas diluições do RNA foram diretamente testadas. NTC (controle sem molde): água. Cor amarela: amostras negativas para o ZIKV; Cor roxa: amostras positivas para o ZIKV.

### 8.3.3 Desempenho diagnóstico dos biossensores moleculares para diagnosticar o ZIKV em amostras de pacientes

Para a validação do desempenho diagnóstico dos biossensores moleculares em diagnosticar em amostras de pacientes, um total de 268 amostras de soro humano foram obtidas de pacientes com suspeita de infecção por algum arbovírus e, em seguida, testadas em paralelo através dos biossensores moleculares e RT-qPCR. Amostras com valores de Cq de  $\leq 38,0$  em poços duplicados foram consideradas positivas para infecção por ZIKV pela RT-qPCR. Do universo total de amostras, 195 foram negativas para ZIKV conforme determinado pela RT-qPCR e 73 foram positivas. Destas, os biossensores moleculares foram capazes de detectar o ZIKV em 69 amostras e 199 foram determinadas como negativas (Figura 38). Também foi possível observar que os biossensores moleculares apresentaram quatro amostras com resultados com falso negativos, quando comparado com a técnica padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV.



**Figura 38** - Validação do biossensores moleculares para o diagnóstico do ZIKV utilizando amostras de pacientes.



Fonte: O autor.

Legenda: Um total de 268 amostras de soro humano foi utilizado para a validação dos biossensores moleculares para ZIKV. Os produtos da reação foram visualizados através da análise com o auxílio do leitor eletrônico óptico portátil (PLUM) acoplado a uma câmera fotográfica para registro dos resultados durante a incubação da reação (A). O sinal emitido a partir da conversão enzimática da enzima LacZ -> Clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosídeo foi mensurado ao longo do tempo de incubação da reação (B).

O desempenho diagnóstico dos biossensores moleculares para o diagnóstico molecular do ZIKV em amostras de pacientes foi avaliado a partir na análise de vários parâmetros estatísticos utilizando a técnica de RT-qPCR como método referência. Os biossensores moleculares apresentaram sensibilidade clínica de 94.52% ((IC 95% 88.56%

a 98.49%) e especificidade clínica de 100% (IC 95% 98.13% a 100%). A prevalência do ZIKV nas amostras testadas foi de 27.24% (IC 95% 22.00% a 32.99%). O valor preditivo positivo foi 100% (IC 95% 76.64% a 96.61%), enquanto o valor preditivo negativo foi 97.99% (IC 95% 94.95% a 99.22%). A acurácia geral dos biossensores, quando comparada com a RT-qPCR, foi 95.24% (IC 95% 96.22% a 99.59%) (Tabela 4). Juntos, esses resultados evidenciam o potencial dos biossensores moleculares validados ao longo deste trabalho como uma ferramenta promissora do tipo POC para o diagnóstico do ZIKV em amostras clínicas.

**Tabela 4** - Desempenho diagnóstico do biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” para detecção do ZIKV em amostras de pacientes.

	RT-qPCR +	RT-qPCR -	Total
<b>Biossensores moleculares +</b>	69	0	69
<b>Biossensores moleculares -</b>	4	195	199
<b>Total</b>	73	195	268
<b>Sensibilidade</b>	<b>94.52 %</b> (IC 95% 88.56% a 98.49%)		
<b>Especificidade</b>	<b>100 %</b> (IC 95% 98.13% a 100%)		
<b>Prevalência do ZIKV</b>	<b>27.24%</b> (IC 95% 22.00% a 32.99%)		
<b>Valor Preditivo Positivo</b>	<b>100 %</b> (IC 95% 76.64% a 96.61%)		
<b>Valor Preditivo Negativo</b>	<b>97.99 %</b> (IC 95% 94.95% a 99.22%)		
<b>Acurácia</b>	<b>98.51%</b> (IC 95% 96.22% a 99.59%)		

Fonte: O autor.

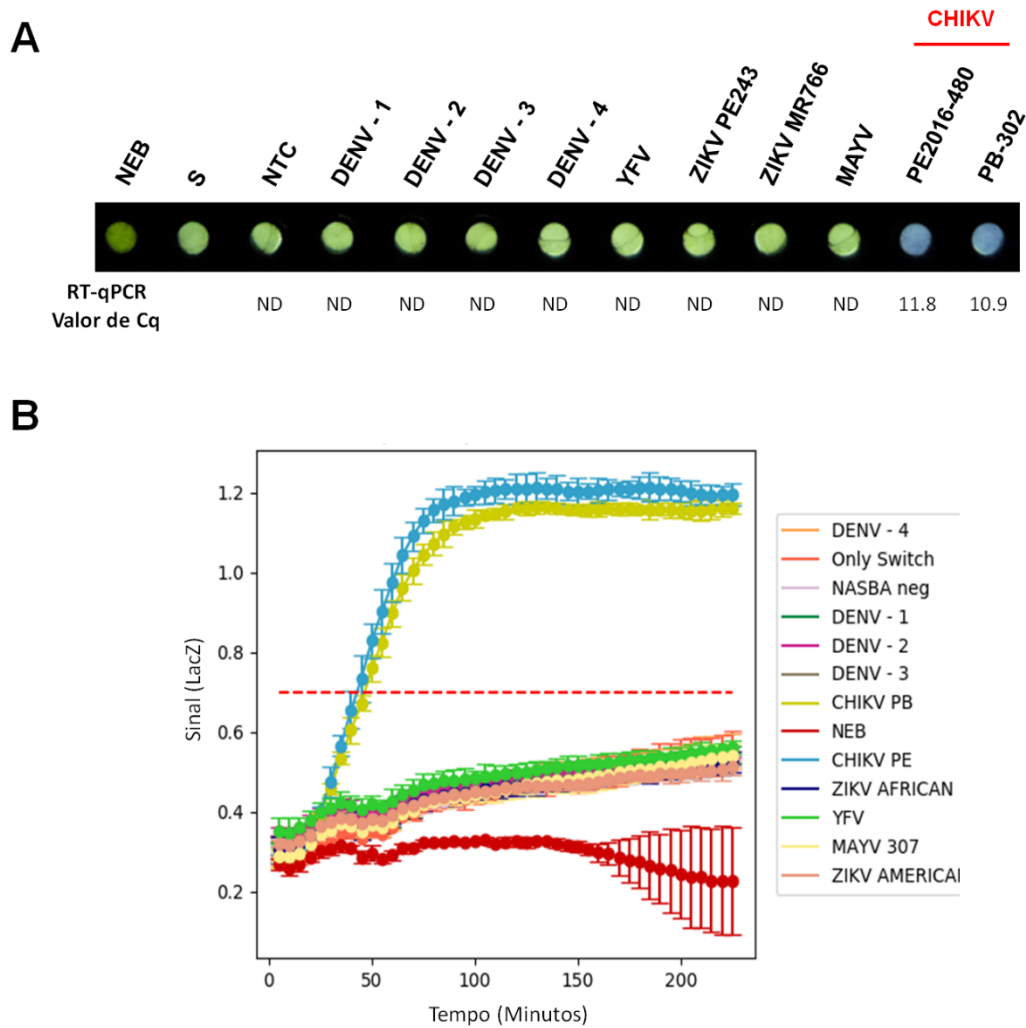
## 8.4 Avaliação dos biossensores moleculares para o diagnóstico molecular do CHIKV

Dado o sucesso dos biossensores moleculares desenvolvidos e validados para o ZIKV, procuramos demonstrar o potencial dos sensores baseados em circuitos de genes programáveis para detectar outros patógenos virais. Como alternativa de demonstração da versatilidade diagnóstica, foi utilizado como alvo o CHIKV, outro arbovírus emergente no Brasil e que têm se espalhado rapidamente pelo globo nos últimos anos, causando surtos e epidemias em larga escala em diversos países do hemisfério sul resultando em uma elevada morbidade, provocando assim, implicações graves para os serviços de saúde dos países acometidos.

### 8.4.1 Especificidade analítica dos biossensores moleculares para detecção do CHIKV

A fim de avaliar a especificidade dos biossensores moleculares em detectar apenas o CHIKV em sobrenadante celular, a plataforma foi testada frente a outros arbovírus endêmicos no Brasil, incluindo DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081), YFV (17DD), MAYV (BR/Sinop/H307/2015), CHIKV (PE2016-480) e CHIKV (PB302). Para tanto, o RNA viral foi extraído a partir do sobrenadante celular de todos os arbovírus descritos acima e, em seguida, diretamente testados. Os biossensores moleculares detectaram especificamente apenas o CHIKV, conforme demonstrado na figura 35. Esses resultados foram confirmados por RT-qPCR, em que o valor de Cq (média de poços testados em duplicata) para a amostra positiva para o CHIKV foi de 11,8 para a cepa PE2016-480 e 10,9 para a cepa PB-302 (Figura 39). Assim, estes resultados sugerem que os biossensores validados ao longo deste trabalho são altamente específicos para a detecção do CHIKV frente a outros arbovírus endêmicos na América Latina.

**Figura 39** - Especificidade analítica dos biossensores moleculares para a detecção do CHIKV.



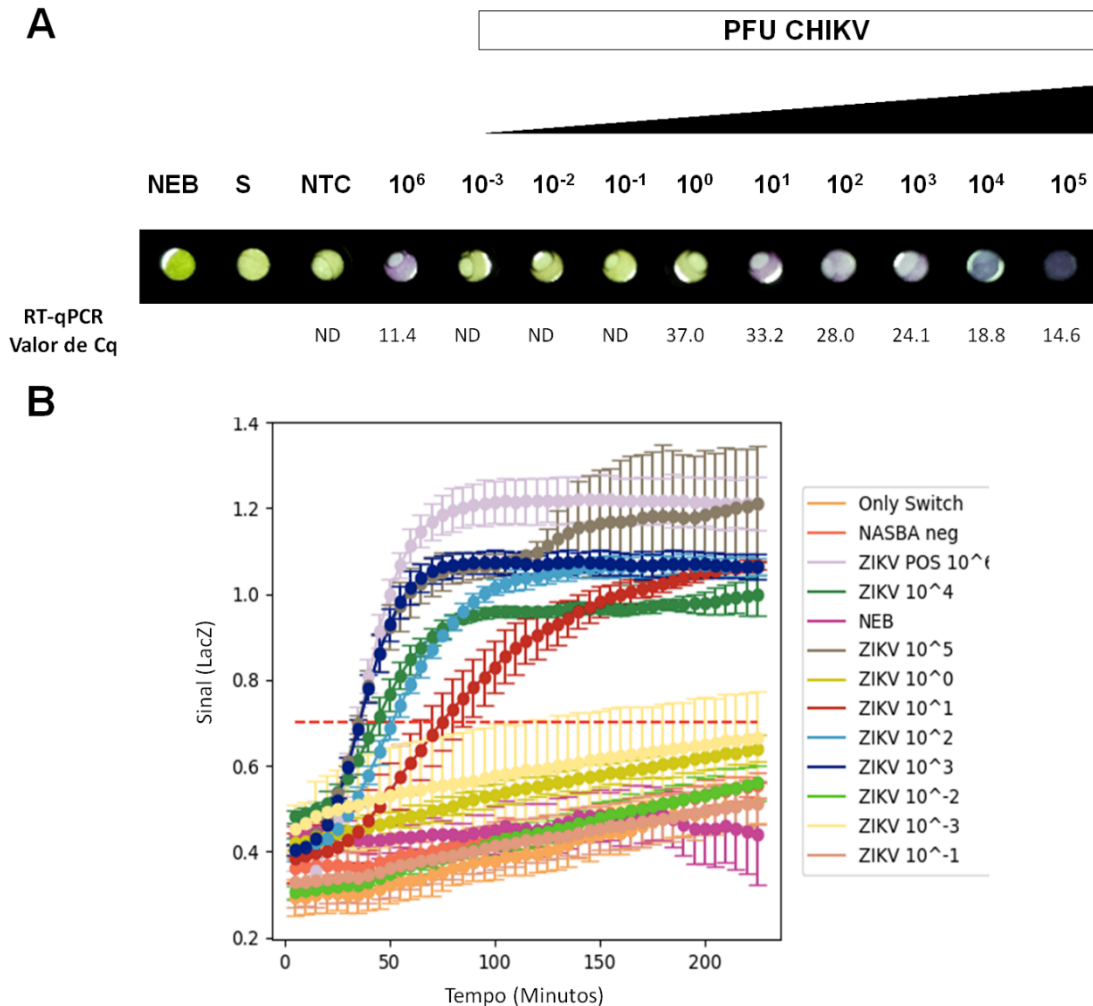
Fonte: O autor.

Legenda: Foi realizada a extração do RNA a partir do sobrenadante celular de diferentes arbovírus circulantes no Brasil incluindo DENV (1-4), YFV, CHIKV, MAYV e ZIKV e, em seguida, os RNAs foram usados para a reação NASBA. Após a reação NASBA, os produtos da reação foram empregados como *template* para a reação dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”. Os produtos da reação foram analisados através da análise com o auxílio do leitor eletrônico óptico portátil (PLUM) acoplado a uma câmera fotográfica para registro dos resultados durante a incubação da reação (A). Adicionalmente, o sinal emitido a partir da conversão enzimática da enzima LacZ -> Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo foi mensurado ao longo do tempo de incubação da reação (B). As mesmas diluições do RNA foram diretamente testadas em paralelo com a RT-qPCR com o objetivo de comparar os resultados dos biossensores moleculares com o método padrão-ouro para o diagnóstico do CHIKV em amostras clínicas. NTC (controle sem molde): água. Cor amarela: amostras negativas para o CHIKV; Cor roxa: amostras positivas para o CHIKV.

#### 8.4.2 Sensibilidade analítica dos biossensores moleculares para detecção do CHIKV

Para analisar a sensibilidade analítica (limite de detecção - LOD) dos biossensores moleculares para detecção do CHIKV, foi realizada uma diluição seriada do RNA viral na base de 10 vezes extraído a partir do sobrenadante celular variando de  $10^5$  PFU a  $10^{-3}$  PFU. Como resultado, os biossensores moleculares foram capazes de detectar o CHIKV em uma ampla faixa de concentrações (de  $10^5$  PFU a  $10^1$  PFU). Em seguida, as mesmas diluições foram testadas através da RT-qPCR. A sensibilidade analítica da RT-qPCR foi observada apenas até  $10^0$  PFU com valor de Cq de 37,0 (Figura 40). Em conjunto, esses resultados demonstraram que os biossensores moleculares são 10 vezes menos sensíveis quando comparados a RT-qPCR, técnica padrão-ouro atualmente utilizada para o diagnóstico molecular do CHIKV em amostras clínicas.

**Figura 40** - Sensibilidade analítica dos biossensores moleculares para a detecção do CHIKV.



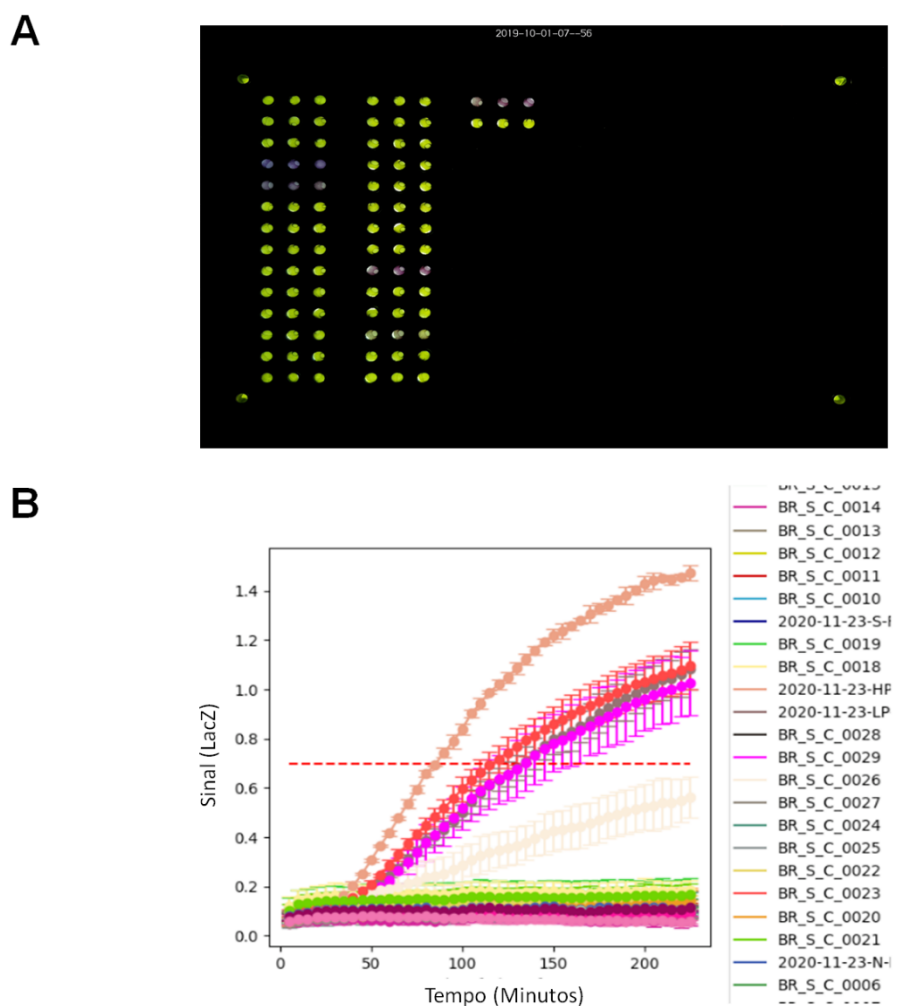
Fonte: O autor.

Legenda: A sensibilidade dos biossensores moleculares para a detecção do CHIKV foi calculada com base na última diluição em que o genoma viral foi detectado através do ensaio. Para o experimento de sensibilidade analítica, foi realizada uma diluição seriada do RNA extraído do sobrenadante celular do CHIKV (PE2016-480) na base de 10 vezes ( $10^5$  PFU a  $10^{-3}$  PFU) em água. Na sequência, as diluições foram utilizadas para a reação NASBA. Após o término, os produtos da reação NASBA foram utilizados como *template* para a reação dos biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*”. Os produtos da reação foram visualizados através da análise com o auxílio do leitor eletrônico óptico portátil (PLUM) combinado a uma câmera fotográfica para registro dos resultados durante a incubação da reação (A). Além disso, o sinal emitido a partir da conversão enzimática da enzima LacZ -> Clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosídeo foi mensurado ao longo do tempo de incubação da reação (B). As mesmas diluições do RNA foram diretamente testadas em paralelo com a RT-qPCR com o intuito de comparar os resultados dos biossensores moleculares com o método padrão-ouro para o diagnóstico do CHIKV em amostras clínicas. NTC (controle sem molde): água. Cor amarela: amostras negativas para o CHIKV; Cor roxa: amostras positivas para o CHIKV.

#### 8.4.3 Desempenho diagnóstico dos biossensores moleculares para diagnosticar o CHIKV em amostras de pacientes

Por fim, a validação do desempenho diagnóstico dos biossensores moleculares em diagnosticar o CHIKV foi realizada usando amostras clínicas obtidas de pacientes com suspeita de infecção por arbovírus no estado de Pernambuco, Brasil. Um total de 65 amostras de soro duplamente cegas foram testadas em paralelo através dos biossensores moleculares e RT-qPCR. O valor de Cq nessas amostras variou de 19,6 a  $> 40,0$  e as amostras com valores Cq de  $\leq 37,0$  em poços duplicados foram consideradas positivas para CHIKV pela RT-qPCR (LANCIOTTI; KOSOY; LAVEN; PANELLA *et al.*, 2007). Destas, 53 amostras foram negativas para CHIKV conforme determinado pelo os biossensores moleculares e 12 foram positivas. Do número total de 65 amostras clínicas, a RT-qPCR foi capaz de detectar o CHIKV em 13 amostras, enquanto 52 amostras foram determinadas como negativas (Figura 41). Em conjunto, esses resultados demonstraram apenas um resultado falso negativo e nenhum resultado falso positivo em todas as amostras testadas durante a validação.

**Figura 41** - Validação do biossensores moleculares para o diagnóstico do CHIKV empregando amostras de pacientes.



Fonte: O autor.

Legenda: Um total de 65 amostras de soro obtidas de pacientes foram empregadas para a validação dos biossensores moleculares para o diagnóstico do CHIKV. Os produtos da reação foram observados através da análise com o auxílio do leitor eletrônico óptico portátil (PLUM) acoplado a uma câmera fotográfica para registro dos resultados durante a incubação da reação (A). O sinal emitido a partir da conversão enzimática da enzima LacZ  $\rightarrow$  Clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosídeo foi mensurado ao longo do tempo de incubação da reação (B).



O desempenho diagnóstico dos biossensores moleculares para a detecção do CHIKV em amostras de pacientes foi inferido a partir da análise de vários parâmetros estatísticos usando a RT-qPCR como teste de referência para a comparação. Os biossensores moleculares apresentaram uma sensibilidade clínica de 92,31% (IC 95% 63,97% a 99,81%) e especificidade clínica de 100% (IC 95% 93,15% a 100%). A prevalência geral de CHIKV nas amostras foi de 20,00% (IC 95% 11,10% a 31,77%). O valor preditivo positivo deste ensaio foi de 100% e o valor preditivo negativo foi 98,11% (IC 95% 88,78% a 99,71%). A acurácia dos biossensores moleculares para detecção do CHIKV foi de 98,46% (IC 95% 91,72% a 99,96%) (Tabela 5), destacando o potencial dos biossensores moleculares como uma ferramenta promissora para o diagnóstico do CHIKV em amostras de pacientes.

**Tabela 5** - Desempenho diagnóstico do biossensores moleculares do tipo “*toehold switch*” para detecção do CHIKV em amostras de pacientes.

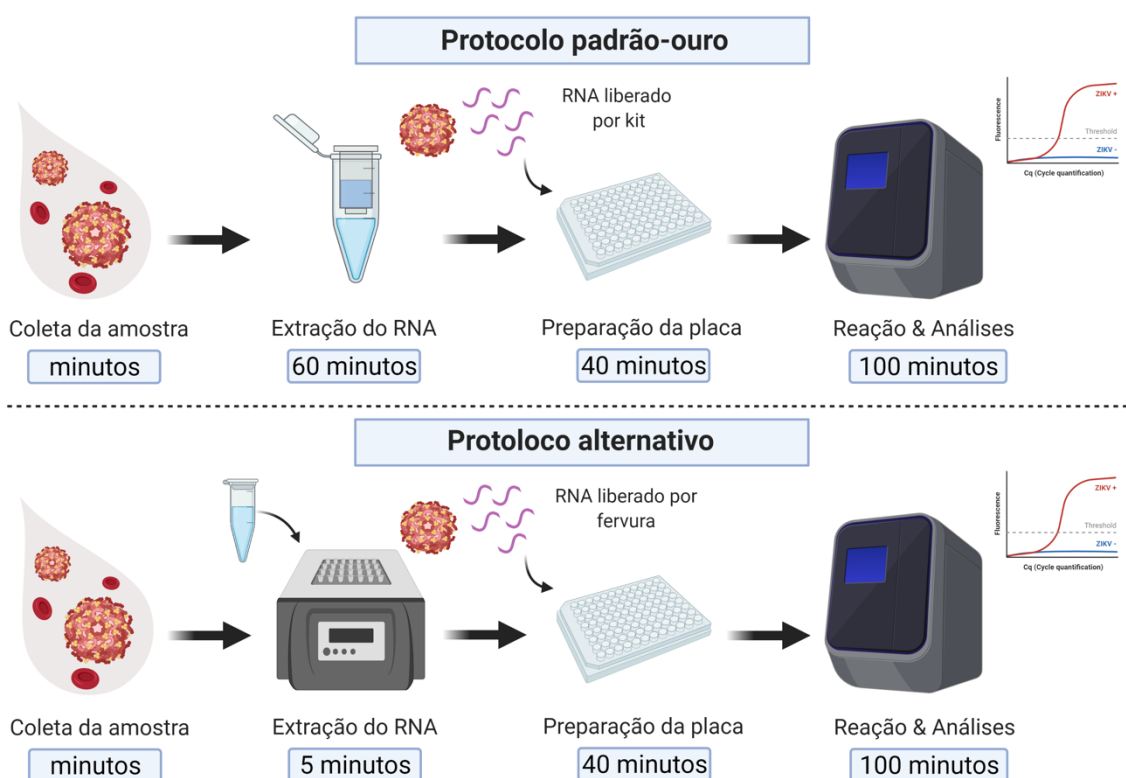
	<b>RT-qPCR +</b>	<b>RT-qPCR -</b>	<b>Total</b>
<b>Biossensores moleculares +</b>	12	0	12
<b>Biossensores moleculares -</b>	1	52	53
<b>Total</b>	13	52	65
<b>Sensibilidade</b>	<b>92.31%</b> (IC 95% 63.97% a 99.81%)		
<b>Especificidade</b>	<b>100 %</b> (IC 95% 93.15% a 100%)		
<b>Prevalência do CHIKV</b>	<b>20.00%</b> (IC 95% 11.10% a 31.77%)		
<b>Valor Preditivo Positivo</b>	<b>100 %</b>		
<b>Valor Preditivo Negativo</b>	<b>98.11%</b> (IC 95% 88.78% a 99.71%)		
<b>Acurácia</b>	<b>98.46%</b> (IC 95% 91.72% a 99.96%)		

Fonte: O autor.

## 8.5 Avaliação do método alternativo de extração do RNA baseado em fervura acoplado a técnica de RT-qPCR para a detecção molecular do ZIKV

A RT-qPCR, é a técnica padrão-ouro utilizada para o diagnóstico molecular do ZIKV em amostras de pacientes. Entretanto, o atual protocolo de testagem de amostras clínicas envolve a etapa de extração do RNA, cujo procedimento é oneroso e demanda bastante tempo para execução, o que acaba limitando a realização deste procedimento em laboratórios que não possuem infraestrutura adequada ou kits disponíveis. Neste contexto, existe a necessidade do desenvolvimento de protocolos de diagnóstico mais simples que tenham como objetivo reduzir etapas de processamento e minimizar custos. A fim de atender esta demanda e acelerar o protocolo de testagem das amostras de pacientes, foi otimizado e validado um método alternativo de extração de RNA baseado em fervura acoplado a técnica de RT-qPCR para o diagnóstico do ZIKV (Figura 42).

**Figura 42** - Esquema do método alternativo de extração do RNA acoplado a técnica de RT-qPCR para a detecção do ZIKV.



Fonte: O autor. Criado com Biorender.com

Legenda: O protocolo padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV através da RT-qPCR exige várias etapas partindo da coleta da amostra, extração do RNA empregando kits comerciais, preparação da placa e

reação através de equipamento. Por outro lado, o protocolo alternativo proposto neste trabalho com o objetivo de acelerar o tempo de liberação do resultado e diminuir o custo do processo elimina a etapa de extração do RNA através de kits comerciais. O processo alternativo envolve a fervura das amostras durante 5 minutos a 65°C. Após esse procedimento, as amostras são inseridas como *template* na placa de reação.

#### 8.5.1 Otimização do método alternativo de extração do RNA do ZIKV baseado em fervura

Inicialmente, foram preparadas várias alíquotas a partir do mesmo estoque do ZIKV (PE243). Na sequência, todos os sobrenadantes foram aquecidos sob diferentes temperaturas (55°C, 65°C, 75°C, 85°C e 95°C) e tempos de incubação (5 min, 15 min, 30 min e 60 min). Após o tratamento térmico, os produtos obtidos foram empregados como *template* para a reação de RT-qPCR e submetidos ao ensaio de placa a fim de avaliar se o tratamento por calor foi capaz de inativar o ZIKV. Os maiores objetivos desta otimização foram: 1) determinar a melhor combinação de tempo e temperatura que pudesse ser garantir a liberação do RNA viral das amostras; 2) avaliar se a condição escolhida seria capaz de inativar o vírus. Baseado nesse pressuposto, a tabela 6 demonstra os valores de Cq para cada condição de tratamento térmico testada. De forma geral, todas as condições avaliadas durante a otimização foram capazes de lizar a partícula viral e liberar o RNA, conforme demonstrado na tabela 6. Além disso, foi demonstrado que dependendo do tempo e da exposição à temperatura, os valores de Cq variaram entre as amostras testadas. Quanto maior a temperatura e tempo de aquecimento, maior foram os valores de Cq reportados através da RT-qPCR. Os valores de Cq nas amostras testadas variaram de 12,88 a 23,00, o que inferir que a condição de tratamento térmico escolhida pode afetar a sensibilidade do ensaio RT-qPCR.

Em relação ao ensaio de placa para avaliar se o ZIKV presente nas amostras havia sido inativado, o título do estoque viral sem nenhum tratamento térmico foi  $1.5 \times 10^7$  PFU/mL. Com exceção das condições (55 °C por 5 minutos e 55 °C por 15 minutos), todas as outras condições testadas foram capazes inativar o ZIKV (Tabela 6). Estes resultados do ensaio de placa para cada condição testadas durante a otimização são reportados na figura 43. Adicionalmente, as amostras que passaram pelo tratamento térmico foram inoculadas em cultura celular (células Vero) durante três passagens. Ao final das três passagens, foi observado efeito citopático apenas no controle positivo (estoque viral sem passar pelo tratamento térmico) e nas condições 55 °C por 5 minutos

e 55 °C por 15 minutos, respectivamente (Tabela 6). Juntos, esses resultados indicam que o ZIKV é muito sensível a inativação térmica.

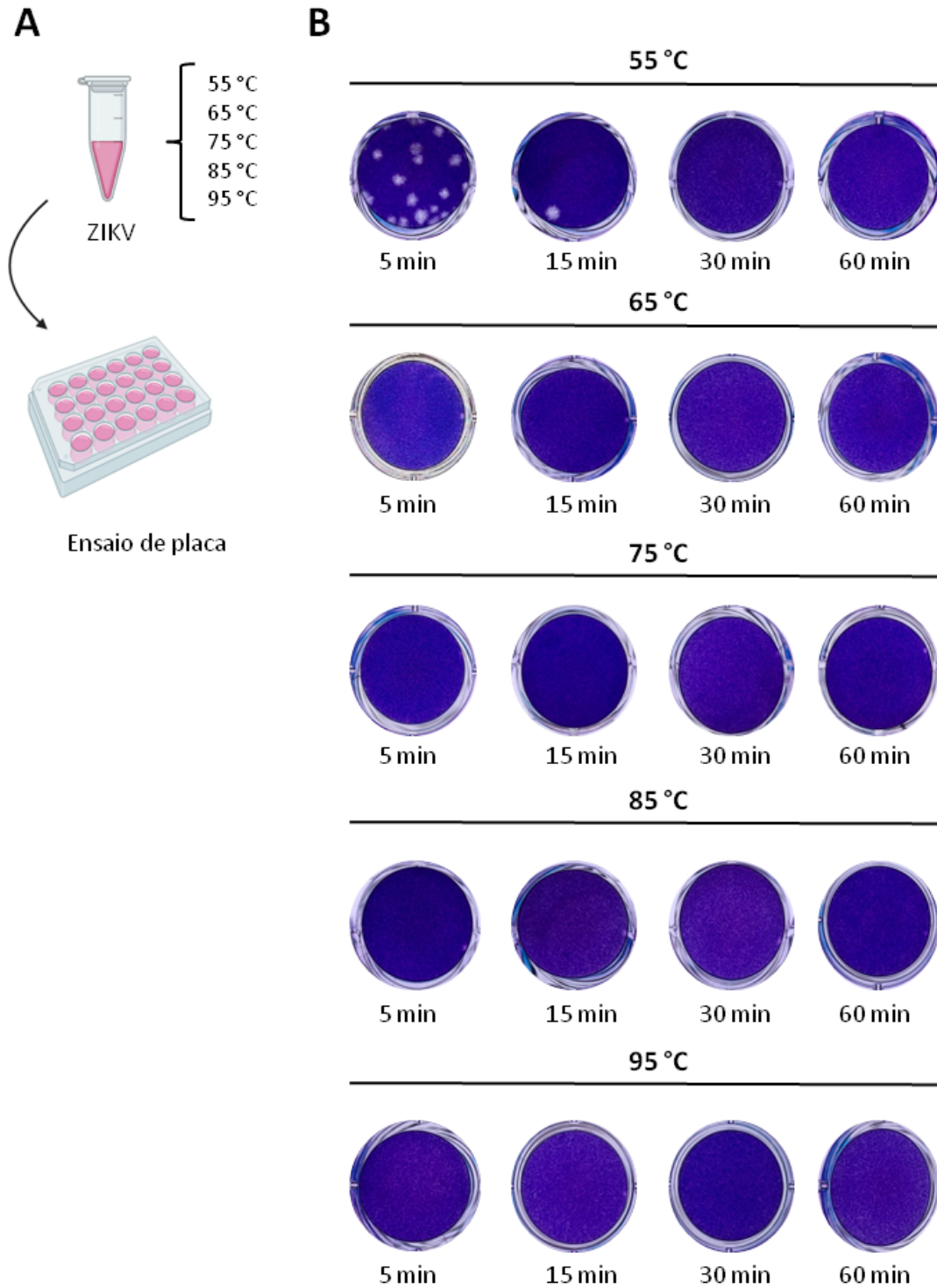
**Tabela 6** - Ensaio de liberação do RNA do ZIKV através do tratamento térmico.

Pré-tratamento	Titulação do ZIKV <sup>a</sup> (PFU/mL)	RT-qPCR – Valor de Cq <sup>b</sup> (Média ± SD)	Células Vero		
			Passagem 1	Passagem 2	Passagem 3
Sem fervura	1.5 x 10 <sup>7</sup>	11.64 ± 0.11	D	D	D
5 min por 55°C	<15	12.88 ± 0.21	D	D	D
15 min por 55°C	<5	13.56 ± 0.32	D	D	D
30 min por 55°C	ND	13.52 ± 0.26	ND	ND	ND
60 min por 55°C	ND	14.19 ± 0.29	ND	ND	ND
5 min por 65°C	ND	13.12 ± 0.05	ND	ND	ND
15 min por 65°C	ND	13.71 ± 0.49	ND	ND	ND
30 min por 65°C	ND	13.62 ± 0.17	ND	ND	ND
60 min por 65°C	ND	14.41 ± 0.20	ND	ND	ND
5 min por 75°C	ND	13.05 ± 0.36	ND	ND	ND
15 min por 75°C	ND	13.51 ± 0.42	ND	ND	ND
30 min por 75°C	ND	14.68 ± 0.24	ND	ND	ND
60 min por 75°C	ND	16.06 ± 0.22	ND	ND	ND
5 min por 85°C	ND	13.08 ± 0.38	ND	ND	ND
15 min por 85°C	ND	14.27 ± 0.37	ND	ND	ND
30 min por 85°C	ND	15.60 ± 0.17	ND	ND	ND
60 min por 85°C	ND	18.20 ± 0.06	ND	ND	ND
5 min por 95°C	ND	13.61 ± 0.31	ND	ND	ND
15 min por 95°C	ND	15.26 ± 0.09	ND	ND	ND
30 min por 95°C	ND	18.04 ± 0.08	ND	ND	ND
60 min por 95°C	ND	23.00 ± 0.27	ND	ND	ND

ND: não detectado

PFU/mL: unidade formadora de placa

**Figura 43** - Inativação por fervura do ZIKV confirmado por ensaio de placa.



Fonte: O autor.

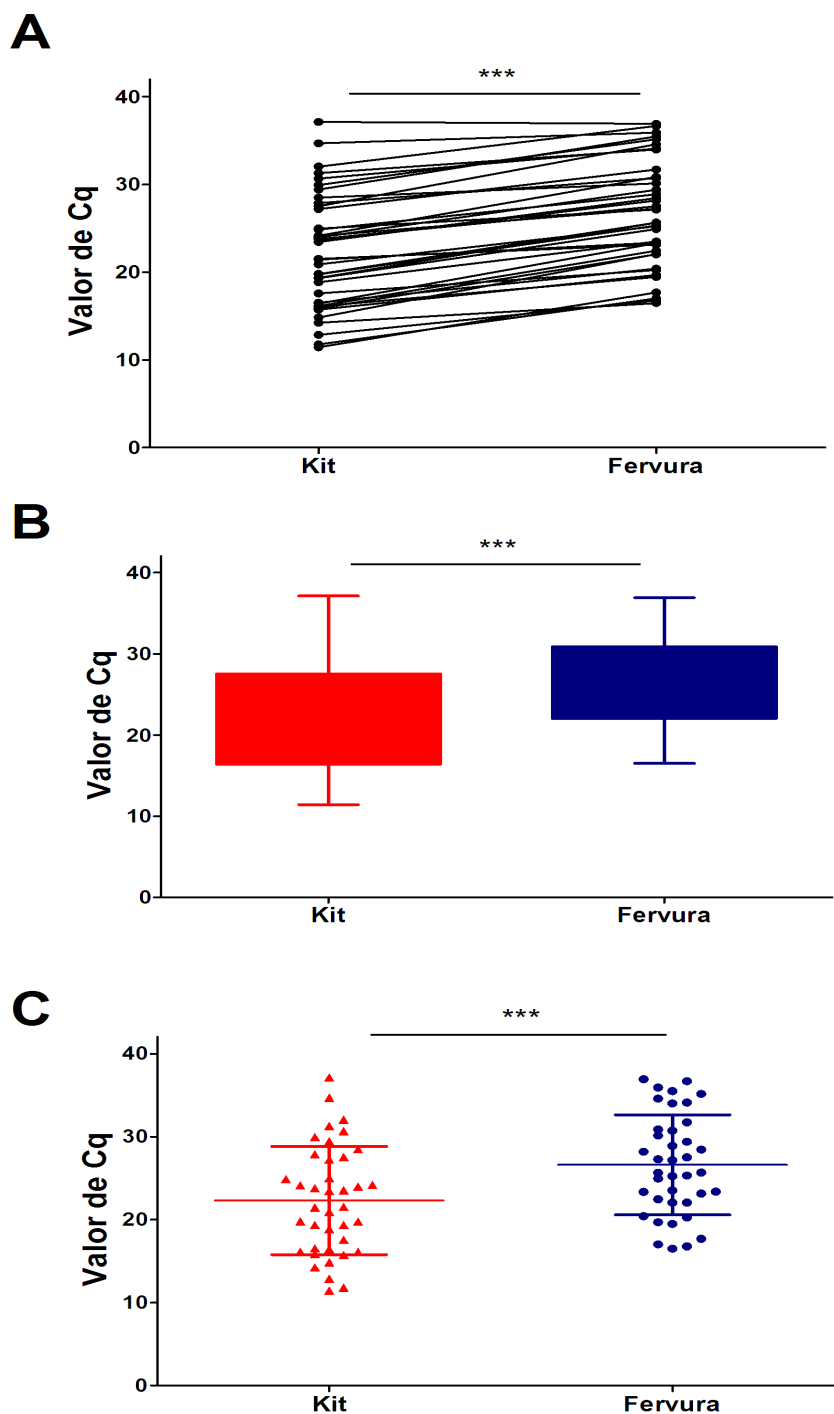
Legenda: Imagens demonstrando o número de unidades formadoras de placa (PFU) observadas após o tratamento prévio do sobrenadante de células infectadas com o ZIKV sob diferentes temperaturas (55°C,

65°C, 75°C, 85°C e 95°C) e tempos de incubação (5 min, 15 min, 30 min e 60 min). Após o tratamento térmico, os produtos obtidos foram submetidos ao ensaio de placa a fim de avaliar se o tratamento por calor foi capaz de inativar o ZIKV.

#### 8.5.2 Desempenho diagnóstico do método alternativo de extração do RNA baseado em fervura para diagnosticar o ZIKV em amostras clínicas

Para a validação do desempenho diagnóstico do método alternativo de extração do RNA baseado em fervura para diagnosticar o ZIKV em amostras de pacientes, um total de 205 amostras foram obtidas de pacientes com suspeita de infecção por algum arbovírus. Na sequência, todas as amostras testadas em paralelo seguindo através dois fluxogramas: 1) tratamento térmico em 65°C durante 5 minutos seguido da reação de RT-qPCR; 2) extração do RNA através do kit comercial (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN) seguido da reação de RT-qPCR. Após ambos os procedimentos, os produtos foram inseridos como *template* na placa de reação. Amostras com valores de Cq de  $\leq 38,0$  em poços duplicados foram consideradas positivas para infecção por ZIKV pela RT-qPCR. Do número total de amostras, 160 foram negativas para o ZIKV e 45 foram positivas conforme determinado pelo protocolo de RT-qPCR utilizando kit de extração de RNA. Destas, quando testadas através do método alternativo de extração baseado em fervura, 40 amostras foram consideradas positivas e 165 foram determinadas como negativas (Figura 44). Em conjunto, esses resultados revelaram apenas seis resultados falso negativos e um resultado falso positivo em todas as amostras testadas durante a validação.

**Figura 44** - Valores de Cq obtidos a partir de amostras submetidas aos dois métodos de extração avaliados (Kit e Fervura).



Fonte: O autor.

Legenda: Um total de 205 amostras de pacientes foram utilizadas para a validação do método alternativo de extração do RNA baseado em fervura (65°C por 5 minutos) para diagnosticar o ZIKV. Para comparação, foi empregado o protocolo padrão-ouro empregando extração do RNA através de kit comercial (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN) seguido da RT-qPCR.

O desempenho diagnóstico do método alternativo baseado em fervura para detecção do ZIKV em amostras de pacientes foi inferido a partir da análise de vários parâmetros estatísticos usando o protocolo RT-qPCR referência empregando kits de extração de RNA comercial para a comparação. O método de extração baseado em fervura apresentou uma sensibilidade clínica de 86.67% (IC 95% 73.21% a 94.95%) e especificidade clínica de 99,38% (IC 95% 96.57% a 99.98%). A prevalência geral do ZIKV nas amostras foi de 21,95% (IC 95% 16.48% a 28.25%). O valor preditivo positivo deste protocolo foi de 97,50% (IC 95% 84.64% a 99.64%) e o valor preditivo negativo foi 96,36% (IC 95% 92.64% a 98.24%). A acurácia geral do método alternativo de extração baseado em fervura para detecção do ZIKV foi de 96,59% (IC 95% 93.09% a 98.62%) (Tabela 7), destacando o potencial do método de extração baseado em fervura como um método alternativo aos kits de extração vendidos comercialmente. Juntos, esses resultados revelam um protocolo de extração promissor com possibilidade de aplicação especialmente em áreas remotas e com baixa infraestrutura laboratorial.

**Tabela 7** - Desempenho diagnóstico do método alternativo baseado em fervura para detecção do ZIKV em amostras de pacientes.

	<b>Kit +</b>	<b>Kit -</b>	<b>Total</b>
<b>Fervura +</b>	39	1	40
<b>Fervura -</b>	6	159	165
<b>Total</b>	45	160	205
<b>Sensibilidade</b>	<b>86.67%</b> (IC 95% 73.21% a 94.95%)		
<b>Especificidade</b>	<b>99.38 %</b> (IC 95% 96.57% a 99.98%)		
<b>Prevalência do CHIKV</b>	<b>21.95%</b> (IC 95% 16.48% a 28.25%)		
<b>Valor Preditivo Positivo</b>	<b>97.50 %</b> (IC 95% 84.64% a 99.64%)		
<b>Valor Preditivo Negativo</b>	<b>96.36%</b> (IC 95% 92.64% a 98.24%)		
<b>Acurácia</b>	<b>96.59%</b> (IC 95% 93.09% a 98.62%)		

Fonte: O autor.



## 9 DISCUSSÃO

Dada a rápida disseminação do ZIKV e CHIKV nas Américas, ensaios do tipo *point-of-care* são urgentemente necessários para auxiliar no monitoramento dos casos de pacientes infectados (SILVA; PARDEE; PENA, 2019). Em áreas que apresentam a circulação de vários arbovírus (ZIKV, DENV e CHIKV), como é o caso do Brasil, monitorar a atividade dos vírus e a incidência das doenças ocasionadas por eles representa uma etapa fundamental para evitar possíveis surtos e epidemias (MUSSO; KO; BAUD, 2019). Além disso, a identificação precoce da infecção do vírus diretamente no campo após a coleta da amostra do paciente é uma etapa crítica para conter a disseminação destes arbovírus (NICOLINI; MCCRACKEN; YOON, 2017). Apesar do ZIKV e CHIKV terem chegado ao Brasil em 2013 e 2014, respectivamente, o país ainda depende de testes baseados na RT-qPCR para diagnosticar a infecção nos pacientes. A disponibilidade de testes para o diagnóstico de arboviroses foi ainda mais desafiadora durante a pandemia de COVID-19, uma vez que a maior parte dos reagentes e kits de diagnóstico foram redirecionados para a detecção de SARS-CoV-2, o agente etiológico da COVID-19 (SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021).

Enquanto a epidemia de Zika nas Américas passa, a necessidade de diagnóstico do ZIKV permanece e, de acordo com um relatório do Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas, espera-se que o ZIKV se torne endêmico na América Latina (UNDP, 2017). Essa previsão é apoiada por casos confirmados de Zika em 2020, que, somente no Brasil, totalizaram aproximadamente 7.000 indivíduos (SAÚDE, 2020). A transmissão continua em baixas taxas em todas as Américas e atualmente também é uma preocupação no Sul da Ásia<sup>44</sup>. Embora a disseminação do vírus não seja atualmente uma preocupação urgente, estima-se que 2,6 bilhões de pessoas vivam em regiões do mundo que poderiam estabelecer a transmissão local do Zika (BOGOCH *et al.*, 2016), com base na presença de mosquitos vetores competentes e clima adequado. Em 2050, espera-se que quase metade da população mundial viva em regiões de transmissão de arbovírus como resultado da disseminação do *Aedes aegypti* devido à urbanização, ações antrópicas e às mudanças climáticas (KRAEMER *et al.*, 2019). Portanto, a necessidade contínua de testes para o ZIKV e CHIKV e o risco de surtos futuros de infecção tornam esses vírus excelentes exemplos para o desenvolvimento de plataformas do tipo POC.

O diagnóstico clínico da infecção do ZIKV e CHIKV com base apenas nos sinais clínicos é muito difícil, especialmente em países onde vários arbovírus são considerados

endêmicos e a confirmação definitiva requer testes laboratoriais. Atualmente, a RT-qPCR é considerada o método molecular padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial do ZIKV e CHIKV. Entretanto, a RT-qPCR possui várias limitações que impedem a sua aplicação em ambientes remotos ou que possuem baixa infraestrutura laboratorial. Neste trabalho, desenvolvemos e validamos duas plataformas de diagnóstico do tipo POC (RT-LAMP e biossensores moleculares) para o diagnóstico de ZIKV que pode ser implantado em ambientes com poucos recursos. Demonstrando a programabilidade e extensibilidade de ambas as plataformas de diagnóstico, alcançamos um desempenho de diagnóstico semelhante para a detecção do CHIKV em soro, saliva, urina e amostras de mosquitos. As plataformas demonstraram alta sensibilidade e especificidade, permitindo assim, o diagnóstico rápido do ZIKV e CHIKV mesmo na ausência de extração de RNA ou pré-tratamento da amostra.

Os ensaios sorológicos são outra alternativa para o diagnóstico laboratorial do ZIKV e CHIKV, mas carecem de especificidade devido à reatividade cruzada do anticorpo com outros flavivírus, especialmente o DENV no caso do ZIKV (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Aqui, nosso ensaio RT-LAMP não mostrou reatividade cruzada com outros arbovírus, incluindo CHIKV, YFV e DENV 1–4. Resultados similares foram encontrados nas plataformas desenvolvidas para ambos os arbovírus, ZIKV e CHIKV. A confirmação adicional da especificidade foi fornecida pelo sequenciamento Sanger dos *amplicons* RT-LAMP, que confirmou 100% de compatibilidade com o ZIKV ou CHIKV.

Desde o surgimento do ZIKV e CHIKV no hemisfério ocidental, muitos ensaios LAMP foram desenvolvidos para o diagnóstico destes arbovírus emergentes por grupos de pesquisa em todo o mundo, incluindo procedimentos de uma e duas etapas (LOPEZ-JIMENA *et al.*, 2018; SILVA; PARDEE; PENA, 2019). O protocolo LAMP de duas etapas requer a adição de uma enzima transcriptase reversa (RT) junto com a DNA polimerase para amplificação e detecção do genoma viral. Além disso, o protocolo de duas etapas necessita de tempos mais longos de processamento, requer amostras adicionais e manipulação de reagentes, o que aumenta a probabilidade de erros de pipetagem e contaminação (SILVA *et al.*, 2019; SILVA; PARDEE; PENA, 2019). A fim de superar estas desvantagens do protocolo de duas etapas, nós empregamos a Bst 3.0 DNA polimerase 3.0 WarmStart devido ao fato de ser uma enzima que permite que o ensaio seja realizado em um protocolo de uma etapa sem extração de RNA ou pré-tratamento da amostra. Isto é possível porque a enzima Bst 3.0 tem atividades de

transcriptase reversa e DNA polimerase na incubação em temperatura fixa. Além disso, essa enzima mantém seu desempenho mesmo na presença de inibidores de amplificação e permanece estável à temperatura ambiente em comparação com outros protótipos da enzima Bst (DNA polimerase Bst de tipo selvagem ou DNA polimerase Bst 2.0) (SILVA; PARDEE; PENA, 2019; TIAN *et al.*, 2016). Apesar de sua resistência à presença de inibidores, descobrimos que as amostras com alta concentração de sêmen parecem ter um efeito na amplificação do alvo, o que pode ser devido à presença de inibidores no sêmen que são conhecidos por afetar outras polimerases de DNA (LERUEZ-VILLE *et al.*, 2000).

Outra potencial limitação dos métodos moleculares é detectar cargas virais baixas em amostras infectadas pelo ZIKV e CHIKV. Isso torna muito mais difícil confirmar a infecção pelo ZIKV em amostras de pacientes, mesmo usando o RT-qPCR (KUROSAKI *et al.*, 2017). Wang *et al.* desenvolveu um teste diagnóstico baseado em RT-LAMP para detecção de ZIKV em amostras humanas. O limite de detecção deste ensaio foi determinado em 0,02 PFU/mL utilizando soro, urina e saliva (WANG *et al.*, 2016). Tian *et al.* também relataram um ensaio baseado em RT-LAMP combinado com susceptometria AC em uma reação portátil e o LOD foi determinado como sendo 1 aM (aM:  $10^{-18}$  mol por litro) usando soro humano com oligonucleotídeos sintéticos de ZIKV (TIAN *et al.*, 2016). Estes ensaios foram capazes de detectar baixas concentrações de ZIKV, mas os experimentos e a avaliação do desempenho do ensaio foram realizados apenas com amostras infectadas experimentalmente.

Além disso, vários estudos baseados no ensaio RT-LAMP relataram que a sensibilidade analítica é menor ou semelhante quando comparada a RT-qPCR (KUROSAKI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016). Em contraste, desenvolvemos um ensaio RT-LAMP para detecção de ZIKV em amostras de mosquitos do Brasil, que foi capaz de detectar até  $10^{-5}$  PFU. Isso representou uma sensibilidade analítica 10.000 vezes maior em comparação com a RT-qPCR (SILVA *et al.*, 2019). Em amostras humanas, nosso ensaio foi 100 vezes mais sensível do que RT-qPCR. No último trabalho, o vírus foi diluído em soro, enquanto no primeiro trabalho o vírus foi adicionado em lisado de mosquito e então diluído seriadamente em água antes de executar o RT-LAMP. As razões para a diminuição da sensibilidade do ensaio em amostras humanas em comparação com amostras de mosquitos não são claras, mas moléculas presentes no soro, como IgG, hemoglobina e lactoferrina, são conhecidas por inibirem diretamente as DNA polimerases (AL-SOUD; RÅDSTRÖM, 2001). No entanto, os resultados obtidos ao longo deste

trabalho demonstraram que a sensibilidade analítica do ensaio RT-LAMP é superior a RT-qPCR, corroborando com resultados encontrados em outros estudos (ESCALANTE-MALDONADO *et al.*, 2019; LAMB *et al.*, 2018). Semelhante ao ZIKV, também foi demonstrado que o nosso sistema baseado no RT-LAMP para detecção do CHIKV também é mais sensível do que a RT-qPCR para a detecção do CHIKV. Há uma série de razões que podem explicar a variação na sensibilidade analítica dos ensaios RT-LAMP em diferentes estudos, incluindo diferenças em protocolos (protocolo de uma e duas etapas), *primers*, enzimas e fornecedores de reagentes de pesquisa, métodos de leitura e tipo de amostra biológica (SILVA; PARDEE; PENA, 2019).

O desempenho dos ensaios LAMP para detecção de ZIKV em amostras de pacientes foi avaliado e comparado ao método padrão-ouro (RT-qPCR) em diversos estudos (CALVERT *et al.*, 2017; CHOTIWAN *et al.*, 2017; KUROSAKI *et al.*, 2017) 54,57,61,62. Aqui, validamos o ensaio RT-LAMP utilizando 100 amostras de soro obtidas de pacientes com casos suspeitos de infecção pelo ZIKV no estado de Pernambuco, Brasil, que foi considerado o epicentro da última epidemia de Zika. O ensaio RT-LAMP desenvolvido neste estudo apresentou sensibilidade clínica de 100%, especificidade clínica de 93,75% e acurácia geral de 95,00% em comparação com a RT-qPCR. Utilizando 100 amostras clínicas para a validação do RT-LAMP para o diagnóstico do CHIKV, foi observado uma acurácia geral de 95,24%, destacando assim, o potencial promissor do RT-LAMP para o diagnóstico molecular de qualquer patógeno viral em amostras clínicas. Juntos, estes resultados apontam que a nossa plataforma tem potencial para ser usado como uma alternativa de diagnóstico para a detecção de ZIKV e CHIKV em amostras humanas e amostras de mosquitos.

Apesar das vantagens do RT-LAMP para o diagnóstico de POC, a possibilidade de contaminação cruzada de produtos é considerada um grande desafio com este sistema (PARIDA *et al.*, 2008). A razão para esta possível contaminação cruzada ainda não foi totalmente elucidada, mas a chance de contaminação é maior quando as tampas dos tubos de reação são abertas no final do tempo de incubação para adicionar corante para visualização do resultado (LAU *et al.*, 2010). Além disso, vários estudos relataram que SYBR, quando adicionado antes da incubação junto com os outros reagentes, pode inibir as reações LAMP (GUDNASON *et al.*, 2007; SALANT; ABBASI; HAMBURGER, 2012). Para superar isso, a Uracil DNA Glicosilase (UDG) ou cápsula de corante de ágar têm sido utilizadas (KARTHIK *et al.*, 2014; TANG; CHEN; DIAO, 2016). Porém, essas

estratégias aumentam o custo da reação e tornam a técnica mais trabalhosa. Para resolver essas questões, realizamos reações RT-LAMP adicionando 1  $\mu\text{L}$  de SYBR Green I ao centro das tampas dos tubos antes do tempo de incubação com base no tubo fechado. Não tivemos resultados falso-positivos durante o processo de desenvolvimento e validação. Além disso, a fim de produzir resultados confiáveis e reduzir os resultados falso-positivos, otimizamos todos os parâmetros e condições do ensaio ZIKV RT-LAMP, incluindo concentração de  $\text{Mg}^{2+}$ , concentração de dNTPs, concentração de enzima, *primers*, reação em tempo e reação em temperatura.

Aqui, padronizamos e validamos um ensaio RT-LAMP de uma etapa combinado com a estratégia baseada em tubo fechado e demonstramos que o ensaio é sensível, específico e prático para a detecção de ZIKV. Empregando o sistema desenvolvido para o ZIKV como modelo, nós também desenvolvemos e validamos um sistema baseado no RT-LAMP para a detecção do outro arbovírus emergente no Brasil, o CHIKV. A simplicidade e a alta eficiência do ensaio RT-LAMP para amplificar rapidamente o DNA/RNA em condições isotérmicas sugere que o RT-LAMP pode ser uma alternativa promissora para o diagnóstico de doenças virais. Além disso, nossa estratégia é capaz de reduzir drasticamente a contaminação cruzada, quando em relação aos métodos anteriores. O custo por reação foi inferior a \$ 1 USD, que é consideravelmente mais barato do que RT-qPCR (\$ 10 USD). Nosso ensaio POC é adequado e representa uma ótima alternativa para o diagnóstico de pacientes infectados pelo ZIKV e CHIKV, especialmente em áreas remotas e com baixa infraestrutura laboratorial.

Ao longo desta tese, também relatamos a validação biossensores moleculares baseados em papel como uma plataforma de diagnóstico para o ZIKV e demonstramos o potencial para aplicações mais amplas com validação de teste de campo adicional do CHIKV (GREEN *et al.*, 2014; PARDEE *et al.*, 2014). Este trabalho também estende o conceito de hardware com o desenvolvimento de um leitor eletrônico portátil e de baixo custo denominado PLUM (Portable, Low-cost, User-friendly, Multimode) para auxiliar nas análises dos resultados gerados pelo os biossensores moleculares. O PLUM fornece um sistema autônomo, automatizado e de utilização para aplicações amplas, o que inclui coleta e análise de dados, incubação isotérmica e armazenamento de dados baseado em nuvem (via Internet).

Essas tecnologias moleculares e de hardware combinadas de propósito específico se reúnem para ajudar a mover um ensaio de prova de conceito baseado em laboratório

para fornecer diagnósticos de baixo custo do tipo POC. Utilizando 268 amostras de pacientes, descobrimos que o diagnóstico do ZIKV em papel poderia fornecer especificidade e sensibilidade clínica equivalente a RT-qPCR, com uma precisão diagnóstica de 98,5%. Desempenho semelhante para os biossensores desenvolvidos para o CHIKV, o que aponta para uma plataforma facilmente adaptável. O leitor PLUM adiciona significativamente ao ensaio de diagnóstico molecular, fornecendo a opção de uso portátil e, por meio de limiar de sinal, análise para a discriminação automática de amostras positivas e negativas. Isso se traduz em resultados tão cedo quanto 2,5 horas de tempo de reação (70 minutos NASBA + mínimo 75 minutos de reações livres de células), que se compara bem com RT-qPCR tradicional (1,5 horas). É importante ressaltar que o potencial de detecção no ponto de necessidade pode reduzir funcionalmente o tempo necessário para o diagnóstico do paciente de uma escala de dias para horas.

A natureza dos nossos biossensores moleculares baseados em papel também oferecem benefícios importantes e tem o potencial de servir como um substituto imediato para RT-qPCR em áreas remotas. Como vimos com a crise COVID-19, a natureza centralizada da RT-qPCR pode limitar o acesso aos diagnósticos e está sujeita a interrupções na cadeia de suprimentos durante surtos de infecção (SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021). Estas mesmas características, juntamente com os desafios de custo e logística do transporte, também geralmente limitam o acesso a diagnósticos em países de baixa e média renda. Embora não seja usada aqui, nossa tecnologia baseada em papel mostrou anteriormente ser passível de liofilização, para distribuição sem refrigeração, e reações internas à base de lisado de células de *E. coli*, para teste de baixo custo (PARDEE *et al.*, 2014; PARDEE *et al.*, 2016; TAKAHASHI *et al.*, 2018). Vemos diagnósticos emergentes, como biossensores moleculares apresentados aqui, como tendo um enorme potencial de curto prazo para aumentar a capacidade existente de RT-qPCR, melhorar a equidade no acesso aos cuidados de saúde e ajudar na resposta a crises de saúde pública.

Outros desafios também precisam ser enfrentados para a implementação dos biossensores moleculares como ferramenta de diagnóstico. Isso inclui garantir que a tecnologia de diagnóstico em papel seja acessível. Nosso custo estimado por teste é de \$ 5,48 (USD) utilizando o preço de reagentes necessários para a reação. No entanto, prevemos que esse custo será reduzido ainda mais em escalas maiores. Isso se compara bem ao preço do RT-qPCR, que é de \$ 11 / reação (DA SILVA *et al.*, 2021). É importante

ressaltar que também vemos a implementação da fabricação local e distribuída de reagentes necessários para os biossensores moleculares (por exemplo, componentes do NASBA e componentes para expressão de proteínas bacterianas) como crucial para a realização de muitas das vantagens logísticas e econômicas de ferramentas de diagnóstico. O trabalho nisso já está em andamento por outros grupos de pesquisa e os esforços de prova de conceito mostram um caminho claro para reagentes de diagnóstico de custo ultrabaixo (ARCE *et al.*, 2021; MCNERNEY *et al.*, 2019; SILVERMAN *et al.*, 2019). Um recente trabalho de prova de conceito demonstrado no Chile, indicou que o custo de produção da reação de expressão de proteína livre de células (5 L) era de 6,9 centavos (USD), que, aqui, substituiria PURExpress e o custo de \$ 2,54 relacionado (USD) (ARCE *et al.*, 2021). É importante ressaltar que o acesso ao diagnóstico não é apenas uma consideração de custo. Reduzir a carga dos testes diagnósticos por meio da criação de tecnologias que podem ser feitas usando insumos e conhecimentos locais, e que não exigem capital intensivo, será um grande passo para melhorar a equidade na saúde pública em futuros agravos de saúde pública.

Apesar do potencial de grande impacto, desafios técnicos importantes ainda precisam ser resolvidos antes da implementação prática dos biossensores moleculares e da RT-qPCR em áreas remotas. Assim como para a RT-qPCR, o protocolo empregado para a validação dos biossensores requer que a amostra seja processada antes da reação, o que inclui o manuseio de reagentes por usuários treinados para preparar amostras (extração de RNA) e o preparo das reações moleculares. Logo, o desenvolvimento de técnicas que podem diminuir a preparação de amostras e as etapas de manuseio de líquidos para diagnósticos também são essenciais para a aplicação prática das plataformas de diagnóstico desenvolvidas. Com isso em mente, nós desenvolvemos e validamos um protocolo de extração do RNA baseado em fervura. Este protocolo baseado em fervura possibilita a lise viral “sem custo” e, conseqüentemente, a liberação do material genético para a maquinaria da reação atuar. Protocolos baseados em fervura tem sido empregados para outros patógenos virais como CHIKV e SARS-CoV-2 (PASTORINO; BESSAUD; GRANDADAM *et al.*, 2005; SMYRLAKI *et al.*, 2020). Utilizando o protocolo baseado em fervura para processamento das amostras antes da execução dos ensaios através dos biossensores moleculares e da RT-qPCR, foi possível observar uma ótima performance do procedimento proposto, sugerindo assim, uma alternativa aos kits de extração de RNA vendidos comercialmente. Juntos, estes resultados que o nosso protocolo é promissor para

aplicação em áreas com poucos recursos financeiros e com baixa infraestrutura laboratorial. Importante destacar que o custo por cada extração de RNA através de coluna é de \$ 4,96 USD, o que representa um gargalo para a testagem em massa das amostras clínicas.

Outro fator importante para o diagnóstico do tipo POC é a incorporação de um controle endógeno para o RNA do paciente (por exemplo, RNase P). Este controle serve para proteger contra resultados diagnósticos falsos negativos, garantindo que as amostras diagnósticas contenham RNA de qualidade e quantidade suficientes. Embora tivéssemos seguido os protocolos padrão-ouro baseados na RT-qPCR (LANCIOTTI *et al.*, 2007; LANCIOTTI *et al.*, 2008). No momento de nosso estudo com pacientes em 2019, o controle endógeno não fazia parte da prática padrão e, portanto, não foi incluído. Resultados falsos negativos não foram um fator significativo neste trabalho. No entanto, daqui para frente, prevemos que a implementação de tais ferramentas no campo aumentará a complexidade e a robustez dos diagnósticos distribuídos. Juntos, esses são desafios solucionáveis, e que à medida que as tecnologias avancem para aplicação no campo.

À medida que o campo da biologia sintética avance cada vez mais em direção à aplicação prática das biotecnologias, este trabalho também contém lições potenciais para aqueles que buscam validar outras plataformas de diagnóstico (TAN *et al.*, 2021). Como uma demonstração inicial de diagnósticos baseados em circuitos de genes no campo, este trabalho serve para informar a comunidade emergente de pesquisas de novas ferramentas de diagnóstico de baixo custo sobre os desafios de levar tecnologias da bancada para a aplicação prática no campo. Esta transição e a transferência de tecnologia, como nós e outros descobrimos, traz muitos desafios (KUMAR *et al.*, 2015; NG *et al.*, 2018). Um deles era como trazer a caracterização óptica de alta capacidade para novos ambientes para testes distribuídos. Resolvemos isso com o desenvolvimento de um leitor eletrônico portátil (PLUM) e prevemos que esta solução de hardware ajudará nos esforços futuros para validar e implementar tecnologias em configurações de poucos recursos. Também houve desafios logísticos significativos em trazer a tecnologia de nosso laboratório para os locais de campo. Os estudos que enfocam a validação de tecnologias no ponto de necessidade serão cada vez mais importantes à medida que a comunidade da biologia sintética enfrenta os desafios de mover uma tecnologia além do estágio de prova de conceito e em direção a uma ferramenta prática que pode impactar o mundo. Dado o baixo



custo projetado e a baixa carga técnica para operação, visualizamos essas e outras tecnologias semelhantes como uma nova geração de ferramentas que irão melhorar o acesso global aos serviços de diagnóstico (GOOTENBERG *et al.*, 2017; JUNG *et al.*, 2020).

## 10 CONCLUSÕES

Esse trabalho demonstrou o desenvolvimento e validação de duas plataformas do tipo *point of care* (RT-LAMP e biossensores moleculares) capaz de detectar o ZIKV em apenas em amostras de pacientes experimentalmente e naturalmente infectadas sem a necessidade de nenhum tratamento prévio ou extração do RNA das amostras. Utilizando os sistemas desenvolvidos para o ZIKV como moldes, esse trabalho também possibilitou o desenvolvimento e validação de duas plataformas capaz de detectar o CHIKV em amostras clínicas. As ferramentas de diagnóstico descrita ao longo desta tese demonstraram ser específicas, sensíveis, simples, baixo custo e com performance similar a técnica padrão-ouro (RT-qPCR) para o diagnóstico do ZIKV e CHIKV, respectivamente. Por fim, esse estudo também possibilitou o desenvolvimento e validação de um método alternativo de extração do RNA baseado em fervura acoplado a técnica de RT-qPCR para a detecção molecular do ZIKV. Juntas, essas ferramentas moleculares e protocolos descritos ao longo desta tese possuem grande potencial de aplicação na rotina laboratorial a fim de trazer melhorias e acessibilidade no diagnóstico do ZIKV e CHIKV, especialmente para áreas com baixa infraestrutura laboratorial, como é o caso do Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ABBINK, P. *et al.* Zika virus vaccines. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 16, n. 10, p. 594-600, Out. 2018.
- ADEBANJO, T. *et al.* Update: Interim Guidance for the Diagnosis, Evaluation, and Management of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection - United States, October 2017. **MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.**, Atlanta, v. 66, n. 41, p. 1089-1099, Out. 2017.
- AFSAHI, S. *et al.* Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection. **Biosens. Bioelectron.**, Barking, v. 100, p. 85-88, Fev. 2018.
- AL-SOUD, W. A.; RÅDSTRÖM, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 2, p. 485-493, Fev. 2001.
- ALERA, M. T. *et al.* Zika virus infection, Philippines, 2012. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 4, p. 722-724, Abr. 2015.
- ALTHOUSE, B. M. *et al.* Potential for Zika Virus to Establish a Sylvatic Transmission Cycle in the Americas. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. e0005055, Dez. 2016.
- AMALFITANO, E. *et al.* A glucose meter interface for point-of-care gene circuit-based diagnostics. **Nat. Commun.**, London, v. 12, n. 1, p. 724, Fev. 2021.
- ARAUJO, A. Q.; SILVA, M. T.; ARAUJO, A. P. Zika virus-associated neurological disorders: a review. **Brain**, London, v. 139, n. Pt 8, p. 2122-2130, Aug. 2016.
- ARCE, A. *et al.* Decentralizing Cell-Free RNA Sensing With the Use of Low-Cost Cell Extracts. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, Lausanne, v. 9, p. 727584, Ago. 2021.
- AZEREDO, E. L. *et al.* Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. **PLoS Curr.**, San Francisco, v. 10, Fev. 2018.
- BARJAS-CASTRO, M. L. *et al.* Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, Arlington, v. 56, n. 7, p. 1684-1688, Jul. 2016.
- BARONTI, C. *et al.* Complete coding sequence of zika virus from a French polynesia outbreak in 2013. **Genome Announc**, Washington, v. 2, n. 3, Jun. 2014.
- BASURKO, C. *et al.* Maternal and fetal consequences of dengue fever during pregnancy. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, Amsterdam, v. 147, n. 1, p. 29-32, Nov. 2009.
- 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, Set. 2012.
- BERNATCHEZ, J. A. *et al.* Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 63, n. 2, p. 470-489, Jan. 2020.

BERTHET, N. *et al.* Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, Larchmont, v. 14, n. 12, p. 862-865, Dez. 2014.

BESNARD, M. *et al.* Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill.**, Stockholm, v. 19, n. 13, Abr. 2014.

BOEHME, C. C. *et al.* Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 45, n. 6, p. 1936-1940, Jun. 2007.

BOGOCH, I. I. *et al.* Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. **Lancet**, London, v. 387, n. 10016, p. 335-336, Jan. 2016.

BRASIL, P. *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 375, n. 24, p. 2321-2334, Dez. 2016.

BRITO FERREIRA, M. L. *et al.* Guillain-Barré Syndrome, Acute Disseminated Encephalomyelitis and Encephalitis Associated with Zika Virus Infection in Brazil: Detection of Viral RNA and Isolation of Virus during Late Infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v. 97, n. 5, p. 1405-1409, Nov. 2017.

BRITO FERREIRA, M. L. *et al.* Neurological disease in adults with Zika and chikungunya virus infection in Northeast Brazil: a prospective observational study. **Lancet Neurol.**, London, v. 19, n. 10, p. 826-839, Out. 2020.

BUATHONG, R. *et al.* Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012-2014. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 93, n. 2, p. 380-383, Aug. 2015.

CALVERT, A. E. *et al.* Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 9, p. e0185340, Set. 2017.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1885-1886, Out. 2015.

CAMPOS, T. L. *et al.* Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. **Int. J. Genomics**, New York, v. 2018, p. 6941735, Out. 2018.

CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**, London, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, Abr. 2016.

CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 20, n. 6, p. 1085-1086, Jun. 2014.

CASAL, P. E. *et al.* Evidence for homologous recombination in Chikungunya Virus. **Mol Phylogenet. Evol.**, San Diego, v. 85, p. 68-75, Abr. 2015.

CASTANHA, P. M. S. *et al.* Perinatal analyses of Zika- and dengue virus-specific neutralizing antibodies: A microcephaly case-control study in an area of high dengue endemicity in Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 13, n. 3, p. e0007246, Mar. 2019.

- CASTRO, T. *et al.* Rapid diagnosis of Zika virus through saliva and urine by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **J. Oral. Microbiol.**, Jarfalla, v. 10, n. 1, p. 1510712, Set. 2018.
- CDC. New Zika and Dengue Testing Guidance (Updated November 2019). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/testing-guidance.html>>. Acesso em 27 de Outubro de 2021.
- CDC. Research use only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR primers and probes. **WHO**, Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>>. Acesso em 15 de Agosto de 2021.
- CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 44, p. 649-688, 1990.
- CHAN, J. F. *et al.* Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **J. Infect.**, London, v. 72, n. 5, p. 507-524, Mai. 2016.
- CHANDER, Y. *et al.* A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 5, p. 395, Ago. 2014.
- CHARREL, R. N. *et al.* Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. **Bull World Health Organ**, Geneva, v. 94, n. 8, p. 574-584D, Aug. 2016.
- CHEN, L. H.; HAMER, D. H. Zika Virus: Rapid Spread in the Western Hemisphere. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 164, n. 9, p. 613-615, Mai. 2016.
- CHOTIWAN, N. *et al.* Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. **Sci. Transl. Med.**, Washington, v. 9, n. 388, Mai. 2017.
- CHUA, H. H. *et al.* A fatal case of chikungunya virus infection with liver involvement. **Med. J. Malaysia**, Kuala Lumpur, v. 65, n. 1, p. 83-84, Mar. 2010.
- COLT, S. *et al.* Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 11, n. 4, p. e0005528, Abr. 2017.
- CORDEIRO, M. T. *et al.* Results of a Zika Virus (ZIKV) Immunoglobulin M-Specific Diagnostic Assay Are Highly Correlated With Detection of Neutralizing Anti-ZIKV Antibodies in Neonates With Congenital Disease. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 214, n. 12, p. 1897-1904, Dez. 2016.
- CORDEIRO, M. T. *et al.* Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. **Lancet**, London, v. 387, n. 10030, p. 1811-1812, Abr. 2016.
- COSTA, L. C. *et al.* New Insights on the Zika Virus Arrival in the Americas and Spatiotemporal Reconstruction of the Epidemic Dynamics in Brazil. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 1, Dez. 2020.
- COUNOTTE, M. J. *et al.* Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. **PLoS Med.**, San Francisco, v. 15, n. 7, p. e1002611, Jul. 2018.

- CUNHA, M. S. *et al.* First Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an Autochthonous Transmission in Brazil. **Genome Announc.**, Washington, v. 4, n. 2, Mar. 2016.
- CUNHA, R. V. D.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 8, p. 523-531, Aug. 2017.
- D'ORTENZIO, E. *et al.* Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 374, n. 22, p. 2195-2198, Jun. 2016.
- DA SILVA, S. J. R.; DE MAGALHÃES, J. J. F.; MENDES, R. P. G.; PENA, L. J. Has Zika Virus Established a Sylvatic Cycle in South America? **Acta Trop.**, Basel, p. 105525, Mai. 2020.
- DA SILVA, S. J. R.; PARDEE, K.; BALASURIYA, U. B. R.; PENA, L. Development and validation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in patient samples from Brazil. **Sci. Rep.**, London, v. 11, n. 1, p. 4111, Fev. 2021.
- DA SILVA, S. J. R. *et al.* Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. **ACS Infect. Dis.**, Washington, v. 6, n. 9, p. 2319-2336, Ago. 2020.
- DAO THI, V. L. *et al.* A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. **Sci. Transl. Med.**, Washington, v. 12, n. 556, Ago. 2020.
- DE ARAÚJO, T. V. B. *et al.* Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. **Lancet Infect. Dis.**, London, v. 18, n. 3, p. 328-336, Mar. 2018.
- DE CARVALHO, O. V. *et al.* The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptopurine riboside (6MMP<sub>r</sub>) effectively blocks Zika virus replication. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 50, n. 6, p. 718-725, Dez. 2017.
- DE LIMA, S. T. S. *et al.* Fatal Outcome of Chikungunya Virus Infection in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 73, n. 7, p. e2436-e2443, Out. 2021.
- DE OLIVEIRA, W. K. *et al.* Zika Virus Infection and Associated Neurologic Disorders in Brazil. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 376, n. 16, p. 1591-1593, Abr. 2017.
- DE OLIVEIRA, W. K. *et al.* Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. **Lancet**, London, v. 390, n. 10097, p. 861-870, Aug. 2017.
- DE OLIVEIRA-FILHO, E. F. *et al.* Seroprevalence of selected flaviviruses in free-living and captive capuchin monkeys in the state of Pernambuco, Brazil. **Transbound. Emerg Dis**, Berlin, v. 65, n. 4, p. 1094-1097, Aug. 2018.
- DIALLO, D. *et al.* Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e109442, Out. 2014.
- DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 46, n. 5, p. 509-520, Set. 1952.

DIGOUTTE, J. P. *et al.* Continuous cell lines and immune ascitic fluid pools in arbovirus detection. **Res. Virol.**, Amsterdam, v. 143, n. 6, p. 417-422, 1992 Nov-Dec 1992.

DIRLIKOV, E. *et al.* Clinical Features of Guillain-Barré Syndrome With vs Without Zika Virus Infection, Puerto Rico, 2016. **JAMA Neurol.**, Chicago, v. 75, n. 9, p. 1089-1097, Set. 2018.

DONALD, C. L. *et al.* Full Genome Sequence and sRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. e0005048, Out. 2016.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Rev. Saude. Publica.**, São Paulo, v. 51, p. 30, Abr. 2017.

DOS SANTOS, T. *et al.* Zika Virus and the Guillain-Barré Syndrome - Case Series from Seven Countries. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 375, n. 16, p. 1598-1601, Out. 2016.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, Jun. 2009.

DUGGAL, N. K. *et al.* Frequent Zika Virus Sexual Transmission and Prolonged Viral RNA Shedding in an Immunodeficient Mouse Model. **Cell Rep.**, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 1751-1760, Fev. 2017.

DÉNES, A. *et al.* Impact of weather seasonality and sexual transmission on the spread of Zika fever. **Sci. Rep.**, London, v. 9, n. 1, p. 17055, Nov. 2019.

EBOIGBODIN, K. E.; BRUMMER, M.; OJALEHTO, T.; HOSER, M. Rapid molecular diagnostic test for Zika virus with low demands on sample preparation and instrumentation. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 86, n. 4, p. 369-371, Dez. 2016.

ELIZONDO-QUIROGA, D. *et al.* Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. **Sci. Rep.**, London, v. 8, n. 1, p. 7887, Mai. 2018.

ESCALANTE-MALDONADO, O. *et al.* Development and validation of loop-mediated isothermal amplification for the detection of the Zika virus. **Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica**, Lima, v. 36, n. 3, p. 442-447, Jul-Sep 2019.

FARIA, A. M.; MAZON, T. Early diagnosis of Zika infection using a ZnO nanostructures-based rapid electrochemical biosensor. **Talanta**, Amsterdam, v. 203, p. 153-160, Out. 2019.

FARIA, H. A. M.; ZUCOLOTTI, V. Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification. **Biosens. Bioelectron.**, Barking, v. 131, p. 149-155, Abr. 2019.

FARIA, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, New York, v. 352, n. 6283, p. 345-349, Abr. 2016.

FAVORETTO, S. R. *et al.* Zika Virus in Peridomestic Neotropical Primates, Northeast Brazil. **Ecohealth**, New York, v. 16, n. 1, p. 61-69, Mar. 2019.

- FAYE, O. *et al.* Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Viol. J.**, London, v. 10, p. 311, Oct. 2013.
- FAYE, O. *et al.* Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e2636, Jan. 2014.
- FERNANDES, R. S. *et al.* Low vector competence in sylvatic mosquitoes limits Zika virus to initiate an enzootic cycle in South America. **Sci. Rep.**, London, v. 9, n. 1, p. 20151, Dez. 2019.
- FIGUEIREDO, L. T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect.**, Paris, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, Nov. 2000.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Human Urban Arboviruses Can Infect Wild Animals and Jump to Sylvatic Maintenance Cycles in South America. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, Lausanne, v. 9, p. 259, Jul. 2019.
- FOLEGATTI, P. M. *et al.* A single dose of ChAdOx1 Chik vaccine induces neutralizing antibodies against four chikungunya virus lineages in a phase 1 clinical trial. **Nat. Commun.**, London, v. 12, n. 1, p. 4636, Jul. 2021.
- FONSECA, K. *et al.* First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 91, n. 5, p. 1035-1038, Nov. 2014.
- FOY, B. D. *et al.* Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 17, n. 5, p. 880-882, Mai. 2011.
- FRITEL, X. *et al.* Chikungunya virus infection during pregnancy, Reunion, France, 2006. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 16, n. 3, p. 418-425, Mar. 2010.
- GANGULI, A. *et al.* Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care. **Biomed. Microdevices**, Boston, v. 19, n. 4, p. 73, Aug. 2017.
- GAO, S.; SONG, S.; ZHANG, L. Recent Progress in Vaccine Development Against Chikungunya Virus. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 10, p. 2881, Dez. 2019.
- GATHERER, D.; KOHL, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **J. Gen. Virol.**, London, v. 97, n. 2, p. 269-273, Fev. 2016.
- GIRON, S. *et al.* Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. **Euro. Surveill.**, Stockholm, v. 24, n. 45, Nov. 2019.
- GOOTENBERG, J. S. *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. **Science**, New York, v. 356, n. 6336, p. 438-442, Abr. 2017.
- GOURINAT, A. C. *et al.* Detection of Zika virus in urine. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 1, p. 84-86, Jan. 2015.
- GREEN, A. A.; SILVER, P. A.; COLLINS, J. J.; YIN, P. Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. **Cell**, Cambridge, v. 159, n. 4, p. 925-939, Nov. 2014.



- GREGORY, C. J. *et al.* Modes of Transmission of Zika Virus. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 216, n. suppl\_10, p. S875-S883, Dez. 2017.
- GUDNASON, H.; DUFVA, M.; BANG, D. D.; WOLFF, A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 35, n. 19, p. e127, Out. 2007.
- GUEDES, D. R. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerg. Microbes Infect.**, New York, v. 6, n. 8, p. e69, Aug. 2017.
- GUO, X. G. *et al.* Rapid and reliable diagnostic method to detect Zika virus by real-time fluorescence reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **AMB Express**, Heidelberg, v. 8, n. 1, p. 60, Abr. 2018.
- GUO, X. X. *et al.* *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerg. Microbes Infect.**, New York, v. 5, n. 9, p. e102, Set. 2016.
- GUTIÉRREZ-BUGALLO, G. *et al.* Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nat Ecol Evol**, London, v. 3, n. 4, p. 561-569, Abr. 2019.
- GÉRARDIN, P. *et al.* Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **PLoS Med.**, San Francisco, v. 5, n. 3, p. e60, Mar. 2008.
- HADDOW, A. D. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e1477, Fev. 2012.
- HALPIN, A. L. *et al.* Post-Campylobacter Guillain Barré Syndrome in the USA: secondary analysis of surveillance data collected during the 2009-2010 novel Influenza A (H1N1) vaccination campaign. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 146, n. 13, p. 1740-1745, Out. 2018.
- HAYASHIDA, K. *et al.* Field diagnosis and genotyping of chikungunya virus using a dried reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and MinION sequencing. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 13, n. 6, p. e0007480, Jun. 2019.
- HAZIN, A. N. *et al.* Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 374, n. 22, p. 2193-2195, Jun. 2016.
- HEANG, V. *et al.* Zika virus infection, Cambodia, 2010. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 18, n. 2, p. 349-351, Fev. 2012.
- HERRADA, C. A.; KABIR, M. A.; ALTAMIRANO, R.; ASGHAR, W. Advances in Diagnostic Methods for Zika Virus Infection. **J. Med. Device.**, New York, v. 12, n. 4, p. 0408021-4080211, Dez. 2018.
- HILLS, S. L. *et al.* Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 65, n. 8, p. 215-216, Mar. 2016.
- HOAD, V. C. *et al.* First reported case of transfusion-transmitted Ross River virus infection. **Med. J. Aust.**, Sydney, v. 202, n. 5, p. 267-270, Mar. 2015.

- HOEN, B. *et al.* Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 378, n. 11, p. 985-994, Mar. 2018.
- HONEIN, M. A. *et al.* Birth Defects Among Fetuses and Infants of US Women With Evidence of Possible Zika Virus Infection During Pregnancy. **JAMA**, Chicago, v. 317, n. 1, p. 59-68, Jan. 2017.
- HOZ, J. M. *et al.* Fatal cases of Chikungunya virus infection in Colombia: Diagnostic and treatment challenges. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 69, p. 27-29, Ago. 2015.
- IOOS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Med. Mal. Infect.**, Paris, v. 44, n. 7, p. 302-307, Jul. 2014.
- JAVELLE, E. *et al.* Inflammation of the external ear in acute chikungunya infection: Experience from the outbreak in Johor Bahru, Malaysia, 2008. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 59, n. 4, p. 270-273, Abr. 2014.
- JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; GOODMAN, C. H. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 214, n. suppl 5, p. S471-S474, Dez. 2016.
- JUNG, J. K. *et al.* Cell-free biosensors for rapid detection of water contaminants. **Nat. Biotechnol.**, London, 3. 8, n. 12, p. 1451-1459, Dez. 2020.
- KAARJ, K.; AKARAPIPAD, P.; YOON, J. Y. Simpler, Faster, and Sensitive Zika Virus Assay Using Smartphone Detection of Loop-mediated Isothermal Amplification on Paper Microfluidic Chips. **Sci. Rep.**, London, v. 8, n. 1, p. 12438, Ago. 2018.
- KARTHIK, K. *et al.* New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. **MethodsX**, Amsterdam, v. 1, p. 137-143, Ago. 2014.
- KHRISTUNOVA, E. *et al.* Label-Free Label-Free Electrochemical Biosensors for the Determination of Flaviviruses: Dengue, Zika, and Japanese Encephalitis **Sensors**, Basel, v. 20, n. 16, Ago. 2020.
- KRAEMER, M. U. G. *et al.* Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nat. Microbiol.**, London, v. 4, n. 5, p. 854-863, Mai. 2019.
- KUMAR, A. A. *et al.* From the bench to the field in low-cost diagnostics: two case studies. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, Weinheim, v. 54, n. 20, p. 5836-5853, Mai. 2015.
- KUNO, G.; CHANG, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Arch. Virol.**, Wien, v. 152, n. 4, p. 687-696, Jan. 2007.
- KUROSAKI, Y. *et al.* Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **Sci. Rep.**, London, v. 7, n. 1, p. 13503, Out. 2017.
- LAMB, L. E. *et al.* Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitos by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Sci. Rep.**, London, v. 8, n. 1, p. 3803, Fev. 2018.

- LAMB, L. E.; BARTOLONE, S. N.; WARD, E.; CHANCELLOR, M. B. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. **PLoS One**, San Francisco, v. 15, n. 6, p. e0234682, Jun. 2020.
- LANCIOTTI, R. S. *et al.* Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 13, n. 5, p. 764-767, Mai. 2007.
- LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, Ago. 2008.
- LAU, Y. L. *et al.* Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 48, n. 10, p. 3698-3702, Out. 2010.
- LEAL, M. C. *et al.* The Prevalence of Adenoid Hypertrophy among Children with Zika Related Microcephaly. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 1, Jan. 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, Dez. 2016.
- LEE, S. H. *et al.* One-Pot Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Detecting MERS-CoV. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 7, p. 2166, Jan. 2017.
- LERUEZ-VILLE, M. *et al.* Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men. **Lancet**, London, v. 356, n. 9223, p. 42-43, Jul. 2000.
- LIMA, S. T. S. *et al.* Fatal outcome of chikungunya virus infection in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 73, n. 7, p. e2436–e2443, Out. 2020.
- LIU, R. *et al.* Prevalence of Zika virus in blood donations: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infect. Dis.**, London, v. 19, n. 1, p. 590, Jul. 2019.
- 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, Mai. 2018.
- LUMSDEN, W. H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 49, n. 1, p. 33-57, Jan. 1955.
- MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 48, n. 2, p. 139-145, Mar. 1954.
- MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. **Vet. J.**, London, v. 195, n. 1, p. 33-40, Jan. 2013.
- MAGALHAES, T. *et al.* Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 11, n. 11, p. e0006055, Nov. 2017.

- MAGALHAES, T. *et al.* Follow-up household serosurvey in Northeast Brazil for Zika virus: sexual contacts of index patients have the highest risk for seropositivity. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 223, n. 4, p. 673-685, Fev. 2021.
- MARTINET, J. P. *et al.* Mosquitoes of North-Western Europe as Potential Vectors of Arboviruses: A Review. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 11, Nov. 2019.
- MASMEJAN, S.; BAUD, D.; MUSSO, D.; PANCHAUD, A. Zika virus, vaccines, and antiviral strategies. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.**, London, v. 16, n. 6, p. 471-483, Jun. 2018.
- MATTHEWS, Q. *et al.* Adaptive, diverse and de-centralized diagnostics are key to the future of outbreak response. **BMC Biol.**, London, v. 18, n. 1, p. 153, Out. 2020.
- MCCARTHY, M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. **BMJ**, London, v. 352, p. i720, Fev. 2016.
- MCNERNEY, M. P. *et al.* Point-of-care biomarker quantification enabled by sample-specific calibration. **Sci. Adv.**, Washington, v. 5, n. 9, p. eaax4473, Set. 2019.
- MEAD, P. S. *et al.* Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 378, n. 15, p. 1377-1385, Abr. 2018.
- MENESES, J. D. A. *et al.* Lessons Learned at the Epicenter of Brazil's Congenital Zika Epidemic: Evidence From 87 Confirmed Cases. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 64, n. 10, p. 1302-1308, Mai. 2017.
- MENEZES-NETO, A. *et al.* Zika virus RNA excretion in sweat with concomitant detection in other body fluid specimens. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 115, p. e200339, Jan. 2021.
- MIER-Y-TERAN-ROMERO, L.; DELOREY, M. J.; SEJVAR, J. J.; JOHANSSON, M. A. Guillain-Barré syndrome risk among individuals infected with Zika virus: a multi-country assessment. **BMC Med.**, London, v. 16, n. 1, p. 67, Mai. 2018.
- MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host Microbe**, Cambridge, v. 21, n. 2, p. 134-142, Fev. 2017.
- MIRANDA-FILHO, D. E. B.; MARTELLI, C. M.; XIMENES, R. A.; ARAÚJO, T. V. *et al.* Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. **Am. J. Public Health**, New York, v. 106, n. 4, p. 598-600, Abr. 2016.
- MOORE, C. A. *et al.* Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. **JAMA Pediatr.**, Chicago, v. 171, n. 3, p. 288-295, Mar. 2017.
- MORO, M. L. *et al.* Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: a prognostic cohort study. **J. Infect.**, London, v. 65, n. 2, p. 165-172, Ago. 2012.
- MOULIN, E. *et al.* Simultaneous outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections: diagnosis challenge in a returning traveller with nonspecific febrile illness. **New Microbes New Infect.**, London, v. 11, p. 6-7, Mai. 2016.

- MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1887, Out. 2015.
- MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **Lancet**, London, v. 386, n. 9990, p. 243-244, Jul. 2015.
- MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 29, n. 3, p. 487-524, Jul. 2016.
- MUSSO, D.; KO, A. I.; BAUD, D. Zika Virus Infection - After the Pandemic. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 381, n. 15, p. 1444-1457, Out. 2019.
- MUSSO, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveill.**, Stockholm, v. 19, n. 14, Abr. 2014.
- MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin. Microbiol. Infect.**, Washington, v. 20, n. 10, p. O595-596, Out. 2014.
- MUSSO, D. *et al.* Detection of Zika virus in saliva. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 68, p. 53-55, Jul. 2015.
- MUSSO, D. *et al.* Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 2, p. 359-361, Fev. 2015.
- MUSSO, D. *et al.* Zika virus: a new challenge for blood transfusion. **Lancet**, London, v. 387, n. 10032, p. 1993-1994, Mai. 2016.
- MUÑOZ, L. S.; PARRA, B.; PARDO, C. A.; STUDY, N. E. I. T. A. Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 216, n. suppl\_10, p. S897-S905, Dez. 2017.
- NACHER, M. *et al.* Simultaneous dengue and COVID-19 epidemics: Difficult days ahead? **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 14, n. 8, p. e0008426, Ago. 2020.
- NASRIN, F.; TSURUGA, K.; UTOMO, D. I. S.; CHOWDHURY, A. D. *et al.* Design and Analysis of a Single System of Impedimetric Biosensors for the Detection of Mosquito-Borne Viruses. **Biosensors**, Basel, v. 11, n. 10, Out. 2021.
- NEMOTO, M. *et al.* Detection of equine rotavirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 72, n. 6, p. 823-826, Jun. 2010.
- NEVES ESTRELA, P. F. *et al.* Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, p. 113675, Jun. 2019.
- NG, A. H. C. *et al.* A digital microfluidic system for serological immunoassays in remote settings. **Sci. Transl. Med.**, Washington, v. 10, n. 438, Abr. 2018.
- NICOLINI, A. M.; MCCRACKEN, K. E.; YOON, J. Y. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. **J. Biol. Eng.**, London, v. 11, p. 7, Jan. 2017.

- NOTOMI, T.; MORI, Y.; TOMITA, N.; KANDA, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. **J. Microbiol.**, Seoul, v. 53, n. 1, p. 1-5, Jan. 2015.
- NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 28, n. 12, p. E63, Jun. 2000.
- NUNES, M. R. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Med.**, London, v. 13, p. 102, Abr. 2015.
- OEHLER, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill.**, Stockholm, v. 19, n. 9, Mar. 2014.
- OSTER, A. M. *et al.* Interim Guidelines for Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus - United States, 2016. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 65, n. 5, p. 120-121, Fev. 2016.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Health Zika virus infection. Washington, 2016.
- PARDEE, K. *et al.* Paper-based synthetic gene networks. **Cell**, Cambridge, v. 159, n. 4, p. 940-954, Nov. 2014.
- PARDEE, K. *et al.* Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. **Cell**, Cambridge, v. 165, n. 5, p. 1255-1266, Mai. 2016.
- PARIDA, M. *et al.* Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Rev. Med. Virol.**, Chichester, v. 18, n. 6, p. 407-421, 2008 Nov-Dec 2008.
- PARIDA, M. M. *et al.* Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 45, n. 2, p. 351-357, Fev. 2007.
- PASTORINO, B. *et al.* Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v. 124, n. 1-2, p. 65-71, Mar. 2005.
- PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **West J. Emerg. Med.**, Orange, v. 17, n. 6, p. 671-679, Nov. 2016.
- PAUVOLID-CORRÊA, A. *et al.* Zika Virus Surveillance at the Human-Animal Interface in West-Central Brazil, 2017-2018. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 12, Dez. 2019.
- PEALER, L. N. *et al.* Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 349, n. 13, p. 1236-1245, Set. 2003.
- PESSÔA, R. *et al.* Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. **Medicine**, Baltimore, v. 95, n. 12, p. e3201, Mar. 2016.

- PETERSEN, L. R.; JAMIESON, D. J.; POWERS, A. M.; HONEIN, M. A. Zika Virus. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 374, n. 16, p. 1552-1563, Abr. 2016.
- POMAR, L. *et al.* Maternal-fetal transmission and adverse perinatal outcomes in pregnant women infected with Zika virus: prospective cohort study in French Guiana. **BMJ**, London, v. 363, p. k4431, Out. 2018.
- POWERS, A. M.; BRAULT, A. C.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **J. Gen. Virol.**, London, v. 81, n. Pt 2, p. 471-479, Fev. 2000.
- POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **J. Gen. Virol.**, London, v. 88, n. Pt 9, p. 2363-2377, Set. 2007.
- PRIYE, A. *et al.* A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. **Sci. Rep.**, London, v. 7, p. 44778, Mar. 2017.
- RAMFUL, D. *et al.* Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v. 26, n. 9, p. 811-815, Set. 2007.
- RAO, G.; KHAN, Y. Z.; CHITNIS, D. S. Chikungunya infection in neonates. **Indian Pediatr.**, Bombay, v. 45, n. 3, p. 240-242, Mar. 2008.
- RASMUSSEN, S. A.; JAMIESON, D. J.; HONEIN, M. A.; PETERSEN, L. R. Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 374, n. 20, p. 1981-1987, Mai. 2016.
- REYNOLDS, M. R. *et al.* Vital Signs: Update on Zika Virus-Associated Birth Defects and Evaluation of All U.S. Infants with Congenital Zika Virus Exposure - U.S. Zika Pregnancy Registry, 2016. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 66, n. 13, p. 366-373, Abr. 2017.
- REZZA, G. *et al.* Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, London, v. 370, n. 9602, p. 1840-1846, Dez. 2007.
- RICE, M. E. *et al.* Vital Signs: Zika-Associated Birth Defects and Neurodevelopmental Abnormalities Possibly Associated with Congenital Zika Virus Infection - U.S. Territories and Freely Associated States, 2018. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 67, n. 31, p. 858-867, Ago. 2018.
- ROBIN, S. *et al.* Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection. **J. Child. Neurol.**, Littleton, v. 23, n. 9, p. 1028-1035, Set. 2008.
- ROBIN, S. *et al.* Severe bullous skin lesions associated with Chikungunya virus infection in small infants. **Eur. J. Pediatr.**, Berlin, v. 169, n. 1, p. 67-72, Jan. 2010.
- ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 49, n. 1, p. 28-32, Jan. 1955.
- ROSS, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **J. Hyg.**, London, v. 54, n. 2, p. 177-191, Jun. 1956.
- ROSSI, S. L. *et al.* Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 94, n. 6, p. 1362-1369, Jun. 2016.

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

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 Cells**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 615-625, Set. 2020.

SALANT, H.; ABBASI, I.; HAMBURGER, J. The development of a loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for *Echinococcus granulosus* [corrected] coprodetection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 87, n. 5, p. 883-887, Nov. 2012.

SALINAS, N. R.; LITTLE, D. P. Electric LAMP: Virtual Loop-Mediated Isothermal Amplification. **ISRN Bioinform.**, Cairo, v. 2012, p. 696758, 2012.

SANTIAGO, G. A. *et al.* Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. **Nat. Commun.**, London, v. 9, n. 1, p. 1391, Abr. 2018.

SANTIAGO-FELIPE, S. *et al.* Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors. **Biosens. Bioelectron.**, Oxford, v. 79, p. 300-306, Mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 29. Brasília, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde declara fim da emergência nacional para Zika. Brasília, 2017.

SCHILTE, C. *et al.* Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e2137, Mar. 2013.

SCHUFFENECKER, I. *et al.* Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Med.**, San Francisco, v. 3, n. 7, p. e263, Jul. 2006.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 8, n. 7, p. 491-500, Jul. 2010.

SHAPIRO-MENDOZA, C. K. *et al.* Pregnancy Outcomes After Maternal Zika Virus Infection During Pregnancy - U.S. Territories, January 1, 2016-April 25, 2017. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 66, n. 23, p. 615-621, Jun. 2017.

SILVA, J. V. J. *et al.* A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta Trop.**, Amsterdam, 188, p. 213-224, Dez. 2018.

SILVA, S. J. R. D.; MAGALHÃES, J. J. F.; PENA, L. Simultaneous Circulation of DENV, CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 in Brazil: an Inconvenient Truth. **One Health**, Amsterdam, v. 12, p. 100205, Jun. 2021.

SILVA, S. J. R. D. *et al.* Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil. **Sci. Rep.**, London, v. 9, n. 1, p. 4494, Mar. 2019.



- SILVA, S. J. R. D.; PARDEE, K.; PENA, L. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review. **Viruses**, Basel, v. 12, n. 1, Dez. 2019.
- SILVA, S. J. R. D.; PENA, L. J. A word of caution in interpreting COVID-19 diagnostics tests. **J. Med. Virol.**, New York, v. 93, n. 2, p. 717-718, Fev. 2021.
- SILVERMAN, A. D.; KELLEY-LOUGHNANE, N.; LUCKS, J. B.; JEWETT, M. C. Deconstructing Cell-Free Extract Preparation for in Vitro Activation of Transcriptional Genetic Circuitry. **ACS Synth. Biol.**, Washington, v. 8, n. 2, p. 403-414, Fev. 2019.
- SINGHAL, C. *et al.* Detection of chikungunya virus DNA using two-dimensional MoS. **Sci. Rep.**, London, v. 8, n. 1, p. 7734, Mai. 2018.
- SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 216, n. suppl\_10, p. S935-S944, Dez. 2017.
- SMARTT, C. T.; SHIN, D.; KANG, S.; TABACHNICK, W. J. (Diptera: Culicidae) From Florida Transmitted Zika Virus. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 9, p. 768, Abr. 2018.
- SMYRLAKI, I. *et al.* Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. **Nat. Commun.**, London, v. 11, n. 1, p. 4812, Set. 2020.
- SOLOMON, T. *et al.* Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**, London, v. 355, n. 9209, p. 1053-1059, Mar. 2000.
- SONG, J. *et al.* Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. **Anal. Chem.**, Washington, v. 88, n. 14, p. 7289-7294, Jul. 2016.
- STAIKOWSKY, F. *et al.* Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Réunion during the 2005-2006 outbreak. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 10, p. e7603, Out. 2009.
- STEWART, R. D.; BRYANT, S. N.; SHEFFIELD, J. S. West Nile virus infection in pregnancy. **Case Rep. Infect. Dis.**, Cairo, v. 2013, p. 351872, Mar. 2013.
- STRAMER, S. L. *et al.* West Nile virus among blood donors in the United States, 2003 and 2004. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 353, n. 5, p. 451-459, Ago. 2005.
- STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 58, n. 3, p. 491-562, Set. 1994.
- SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M. C.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses-an overview. **Nat. Rev. Rheumatol.**, London, v. 8, n. 7, p. 420-429, Mai. 2012.
- TAKAHASHI, M. K. *et al.* A low-cost paper-based synthetic biology platform for analyzing gut microbiota and host biomarkers. **Nat. Commun.**, London, v. 9, n. 1, p. 3347, Ago. 2018.
- TAMBAYAH, P. A. *et al.* Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 359, n. 14, p. 1526-1527, Out. 2008.
- TAN, X.; LETENDRE, J. H.; COLLINS, J. J.; WONG, W. W. Synthetic biology in the clinic: engineering vaccines, diagnostics, and therapeutics. **Cell**, Cambridge, v. 184, n. 4, p. 881-898, Fev. 2021.

TANABE, I. S. B. *et al.* Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, Lausanne, v. 8, p. 345, 2018.

TANG, Y.; CHEN, H.; DIAO, Y. Advanced uracil DNA glycosylase-supplemented real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (UDG-rRT-LAMP) method for universal and specific detection of Tembusu virus. **Sci. Rep.**, London, v. 6, p. 27605, Jun. 2016.

TAYLOR, R. M. Studies on certain viruses isolated in the tropics of Africa and South America; their growth and behavior in the embryonated hen egg. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 68, n. 4, p. 473-494, Abr. 1952.

TEOH, B. T. *et al.* A reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for broad coverage detection of Asian and African Zika virus lineages. **BMC Infect. Dis.**, London, v. 20, n. 1, p. 947, Dez. 2020.

TERZIAN, A. C. B. *et al.* Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. **Sci. Rep.**, London, 8, n. 1, p. 16034, Out. 2018.

THIBERVILLE, S. D. *et al.* Chikungunya fever: a clinical and virological investigation of outpatients on Reunion Island, South-West Indian Ocean. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e2004, Jan. 2013.

THIBERVILLE, S. D. *et al.* Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Res.**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 345-370, Set. 2013.

TIAN, B. *et al.* Ferromagnetic Resonance Biosensor for Homogeneous and Volumetric Detection of DNA. **ACS Sens.**, Washington, v. 3, n. 6, p. 1093-1101, Jun. 2018.

TIAN, B.; QIU, Z. *et al.* Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. **Biosens. Bioelectron.**, Oxford, v. 86, p. 420-425, Dez. 2016.

TOIVANEN, A. Alphaviruses: an emerging cause of arthritis? **Curr. Opin. Rheumatol.**, Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 486-490, Jul. 2008.

TOMASHEK, K. M.; MARGOLIS, H. S. Dengue: a potential transfusion-transmitted disease. **Transfusion**, Arlington, v. 51, n. 8, p. 1654-1660, Ago. 2011.

UNDP, I. Socio-economic Impact Assessment of the Zika Virus in Latin America and the Caribbean: with a focus on Brazil, Colombia and Suriname - World. **ReliefWeb**, Disponível em: <<https://reliefweb.int/report/world/socio-economic-impact-assessment-zika-virus-latin-america-and-caribbean-focus-brazil>>. Acesso em: 17 de Fevereiro de 2021.

VALENTINE, M. J.; MURDOCK, C. C.; KELLY, P. J. Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. **Parasit. Vectors**, London, v. 12, n. 1, p. 463, Out. 2019.

VANNICE, K. S. *et al.* Demonstrating vaccine effectiveness during a waning epidemic: A WHO/NIH meeting report on approaches to development and licensure of Zika vaccine candidates. **Vaccine**, Amsterdam, v. 37, n. 6, p. 863-868, Fev. 2019.

VERAS GONÇALVES, A. *et al.* Endocrine Dysfunction in Children with Zika-Related Microcephaly Who Were Born during the 2015 Epidemic in the State of Pernambuco, Brazil. **Viruses**, Base, v. 13, n. 1, Dez. 2020.

- WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 54, n. 4, p. 860-867, Abr. 2016.
- WAHID, B.; ALI, A.; RAFIQUE, S.; IDREES, M. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **Int. J. Infect. Dis.**, Hamilton, v. 58, p. 69-76, Mai. 2017.
- WANG, X. *et al.* Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v. 238, p. 86-93, Dez. 2016.
- WEAVER, S. C. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e2921, Jun. 2014.
- WEAVER, S. C.; CHARLIER, C.; VASILAKIS, N.; LECUIT, M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annu. Rev. Med.**, Palo Alto, v. 69, p. 395-408, Jan. 2018.
- WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 372, n. 13, p. 1231-1239, Mar. 2015.
- WIELANEK, A. C. *et al.* Guillain-Barré syndrome complicating a Chikungunya virus infection. **Neurology**, Minneapolis, v. 69, n. 22, p. 2105-2107, Nov. 2007.
- WIKAN, N.; SMITH, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. **Lancet Infect. Dis.**, London, v. 16, n. 7, p. e119-e126, Jul. 2016.
- WILDER-SMITH, A. *et al.* Zika vaccines and therapeutics: landscape analysis and challenges ahead. **BMC Med.**, London, v. 16, n. 1, p. 84, Jun. 2018.
- WONG, Y. P. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 124, n. 3, p. 626-643, Mar. 2018.
- WU, W. *et al.* Development of multiplex real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Zika, dengue, yellow fever, and chikungunya viruses in a single tube. **J. Med. Virol.**, New York, v. 90, n. 11, p. 1681-1686, Nov. 2018.
- YAREN, O. *et al.* Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. **BMC Infect. Dis.**, London, v. 17, n. 1, p. 293, Abr. 2017.
- ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569-572, Jun. 2015.
- ZHAO, J.; FENG, R. Sensitive and rapid detection of Zika virus by loop-mediated isothermal amplification. **Virus Genes**, Boston, v. 55, n. 1, p. 43-50, Nov. 2018.
- ZHAO, L. Z.; HONG, W. X.; WANG, J.; YU, L. *et al.* Kinetics of antigen-specific IgM/IgG/IgA antibody responses during Zika virus natural infection in two patients. **J. Med. Virol.**, New York, v. 91, n. 5, p. 872-876, Mai. 2019.

ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 382, n. 8, p. 727-733, Fev. 2020.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

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

Após a leitura desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, dou meu consentimento de livre e espontânea vontade, para participar como voluntário, deste

estudo, assinando esse termo em duas vias, pois uma cópia pertencerá a mim e a outra a pesquisadora.

Recife, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /2018.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome  
completo: \_\_\_\_\_

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

Pesquisador \_\_\_\_\_ -  
Assinatura: \_\_\_\_\_  
Nome \_\_\_\_\_ completo \_\_\_\_\_ do  
Pesquisador: \_\_\_\_\_

**Para qualquer esclarecimento entrar em contato com:**

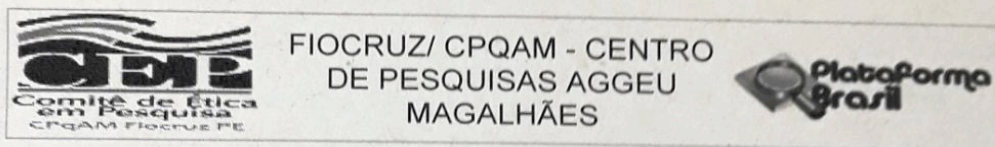
**Pesquisadora: Dr. Lindomar José Pena**

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

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

**Telefone:** 081-2123-7849

## ANEXO A - Aprovação no Comitê de Ética



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.647.260

#### Apresentação do Projeto:

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

#### Objetivo da Pesquisa:

Validar o uso de sensores moleculares para a detecção Zika vírus em amostras de humanos.

#### Objetivo Secundário:

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

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão devidamente descritos no documento "Informações Básicas do Projeto" e no TCLE.

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





FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO  
DE PESQUISAS AGGEU  
MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.647.260

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

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

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

**Recomendações:**

Não há.

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

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

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

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

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

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

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-420

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2101-2639

**Fax:** (81)2101-2639

**E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br





FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO  
DE PESQUISAS AGGEU  
MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.647.260

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

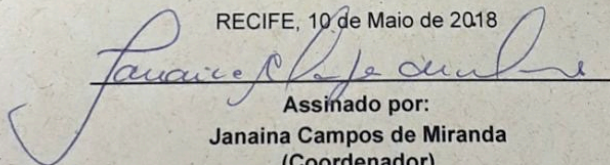
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 10 de Maio de 2018



Assinado por:

Janaina Campos de Miranda  
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

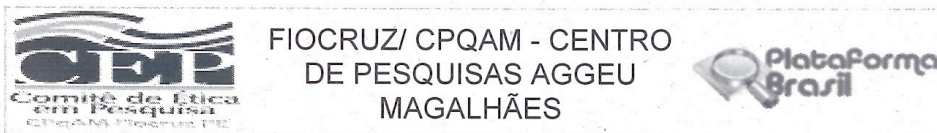
Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



## ANEXO B - Aprovação no Comitê de Ética



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** Lindomar José Pena

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 67404117.7.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

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

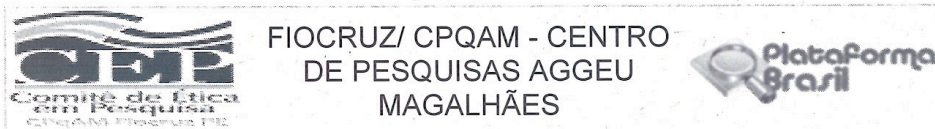
#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.402.486

#### Apresentação do Projeto:

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

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



Continuação do Parecer: 2.402.486

#### Objetivo da Pesquisa:

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

#### Objetivos Secundários:

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

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

##### Riscos:

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

##### Benefícios:

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

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

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





FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO  
DE PESQUISAS AGGEU  
MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.402.486

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

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

**Recomendações:**

Não há.

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

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

**Considerações Finais a critério do CEP:**

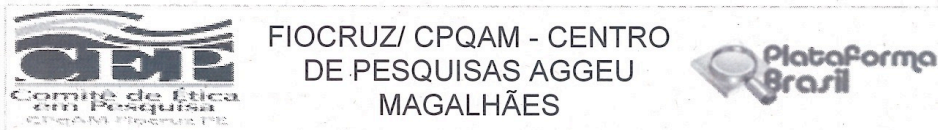
O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

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

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

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

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



Continuação do Parecer: 2.402.486

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

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 28 de Novembro de 2017

Assinado por:  
Janaina Campos de Miranda  
(Coordenador)

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

## ANEXO C - 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 CIENCIA 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.

<b>Endereço:</b> Rua Joaquim Nabuco, 171	
<b>Bairro:</b> Graças	<b>CEP:</b> 52.011-000
<b>UF:</b> PE	<b>Município:</b> RECIFE
<b>Telefone:</b> (81)3182-4771	<b>Fax:</b> (81)3182-4660
	<b>E-mail:</b> 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_dispensa_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

## ANEXO D – Minuta da patente depositada

Número do INPI: BR 10 2019 027711 4

Data do depósito: 23/12/2019

### MÉTODO PARA DETECTAR VÍRUS ZIKA E KIT

#### CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se enquadra no campo dos métodos de diagnósticos moleculares. Particularmente, a invenção fornece método de RT-LAMP, em etapa única, para detectar vírus da Zika em uma amostra. Um kit com os componentes para concretizar o referido método também é descrito.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus* (Família *Flaviviridae*), identificado pela primeira vez em um macaco *rhesus* de Uganda em 1947 e isolado de mosquitos *Aedes africanus* em 1948. Por quase 60 anos, poucos casos de ZIKV em humanos foram relatados. De modo geral, infecções por ZIKV são assintomáticas ou apresentam sintomatologia leve que inclui febre, erupções cutâneas, dor de cabeça e artralgia. Entretanto, em 2015, infecções por ZIKV em mulheres grávidas foram associadas a um surto de microcefalia e outras complicações neurológicas em recém-natos no Brasil.

[003] Mosquitos do gênero *Aedes* são difundidos em regiões tropicais e subtropicais do mundo e têm sido postulados como o principal vetor para o ZIKV. No entanto, diferentes estudos sugerem que os mosquitos *Culex quinquefasciatus* poderiam agir como outro importante vetor do ZIKV. Além disso, muitas cepas de ZIKV foram isoladas dos mosquitos *Anopheles*, *Mansonia*, *Culex* e *Aedes*. Outras pesquisas têm sugerido outras vias de transmissão, incluindo relações sexuais, transplacentária, perinatal e transfusão de sangue.

[004] O Gênero *Flavivirus* (Família *Flaviviridae*) inclui o vírus do Nilo Ocidental, o vírus da dengue, o vírus da encefalite transmitido por carrapatos, o vírus da febre amarela, o Zika vírus e outros.

[005] A vigilância do ZIKV em insetos vetores constitui importante estratégia para identificar a circulação viral e potenciais pontos de entrada, contribuindo para prevenir surtos de doenças. Esse vírus se espalhou rapidamente, particularmente em países que carecem de infraestrutura de saneamento adequada e abriga várias espécies de mosquitos competentes para transmitir o ZIKV. Nestas áreas, melhorar o controle do mosquito deve ser uma prioridade, mas ocorre de forma ineficiente em países onde o ZIKV é endêmico, como o Brasil. A vigilância do ZIKV em mosquitos revela a dinâmica do vírus e permite a detecção precoce antes que o vírus se propague em vetores e populações de hospedeiros. Ademais, dados de vigilância permitem avaliar tendências e o impacto de programas de controle do vetor.

[006] Atualmente, a reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR) é o método padrão-ouro para o diagnóstico molecular do Zika vírus (ZIKV) em amostras humanas e de mosquitos. No entanto, a técnica apresenta elevado custo e inúmeras limitações para o diagnóstico *point of care* (POC), o que dificulta sua aplicação e utilização para muitas amostras em programas de vigilância entomológica, como também dificulta a sua utilização para muitas amostras clínicas capaz de atender a demanda hospitalar.

[007] Sob um aspecto mais amplo, o problema enfrentado pela presente invenção situa-se no campo da saúde pública, particularmente, no diagnóstico do Zika e simultâneo monitoramento da circulação do vírus na população de vetores potenciais em uma determinada região. A invenção fornece um método de detecção do ZIKV simplificado, aplicável a amostras de diversas fontes, em maior escala e significativamente mais barato do que padrão ouro atual.

[008] A presente invenção descreve uma plataforma de Transcrição Reversa sucedida por Amplificação Isotérmica Mediada por Circuito (RT-LAMP) de um único passo para a detecção de ZIKV em amostras de hospedeiros, reservatórios e vetores, particularmente, aquelas derivadas de humanos e mosquitos. O ensaio RT-LAMP foi altamente específico para detecção do ZIKV e se mostrou até 10.000 vezes mais sensível que a qRT-PCR para detectar o ZIKV em soro de pacientes e em amostras de mosquito.

[009] A aplicação de métodos de RT-LAMP para detectar o ZIKV é conhecida. Por exemplo, o documento WO2018204175 descreve um método para detecção de ZIKV em soro e urina de pacientes utilizando a técnica de RT-LAMP. Apesar de ser declarado como um método de etapa única, o processo divulgado requer uma etapa

de extração de RNA da amostra, assim sujeita à contaminação da amostra – maior entrave na técnica de LAMP – e perda de material por conta da manipulação adicional. Ademais, em WO2018204175, as etapas de formação de cDNA e sua subsequente replicação são realizadas por enzimas diferentes, com taxas de erro próprias, que reduzem a eficiência do processo.

[0010] De maneira similar, Song e colaboradores descrevem um sistema diagnóstico microfluídico para detecção de ZIKV em amostras de saliva através de RT-LAMP (Song *et al.*, 2016. *Analytical Chem.* 2016, 88, 7289–7294. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b01632). O método emprega um conjunto de seis *primers*, específicos para uso em RT-LAMP, que reconhecem oito locais diferentes ao longo do gene que codifica o envelope viral da cepa brasileira do vírus.

[0011] A presente invenção se constrói além da contribuição de Song, combinando os *primers* descritos na referência citada a outros insumos e sob parâmetros técnicos distintos, que tornam o resultado da aplicação dos referidos *primers* inesperado e vantajoso. O método ora descrito apresentou sensibilidade de 100%, especificidade de 88,46% e acurácia geral de 93,48% quando utilizado para analisar amostras clínicas. Já em amostras de mosquito, o mesmo protocolo apresentou sensibilidade de 100%, especificidade de 91,18% e acurácia geral de 95,24%.

[0012] Em suma, a invenção ora descrita avança sobre o estado da técnica ao proporcionar um método de detecção do ZIKV que: (1) não requer extração de RNA; (2) pode ser conduzido em sistema de banho maria, permitindo o processamento de várias amostras simultaneamente e em local de pouca infraestrutura laboratorial; (3) permite leitura do resultado a olho nu; (4) apresenta risco de contaminação significativamente reduzido por requerer apenas um passo de manipulação das amostras; e (5) é aplicável a amostras derivadas de saliva, urina, sangue ou sêmen de pacientes, que são facilmente obtíveis.

[0013] Tomados conjuntamente, os atributos da presente invenção oferecem método de detecção de ZIKV que pode ser realizado rapidamente, com mínima infraestrutura laboratorial, empregando amostras de pacientes e/ou mosquitos e a um custo por amostra aproximadamente 26 vezes inferior ao método, por exemplo, de WO2018204175 – R\$ 26,00 contra R\$1,00.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0014] A presente invenção fornece um método *point-of-care*, com apenas um passo de manipulação, para detectar vírus Zika (ZIKV) em uma amostra através de reação de transcrição reversa sucedida por amplificação isotérmica mediada por circuito (RT-LAMP).

[0015] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um método para detectar vírus Zika (ZIKV) em uma amostra, compreendendo as etapas de submeter uma amostra, sem prévio processamento para extração de RNA, à reação de transcrição reversa sucedida por amplificação isotérmica mediada por circuito (RT-LAMP) em um tubo fechado contendo um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores e um corante e detectar o produto de amplificação do RNA do ZIKV por inspeção visual e/ou leitura espectrofotométrica.

[0016] Em uma concretização, o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores compreende pelo menos quatro das seis sequências SEQ ID NO: 1 a 6. Em uma concretização, a reação de RT-LAMP é realizada em uma temperatura selecionada da faixa entre 59 °C e 75 °C, sendo conduzida por 10 a 60 minutos. Em outra concretização, o período de incubação da reação de RT-LAMP é de 20 minutos. Em outra modalidade, a reação de RT-LAMP é realizada em uma temperatura de 72 °C.

[0017] Em algumas concretizações, o método é aplicado para identificar o ZIKV em amostras de diferentes matrizes biológicas, que podem derivar de um vetor de transmissão, de um reservatório ou de hospedeiro. Em certas modalidades, a amostra deriva de um vetor ou de um hospedeiro. Em certas modalidades, as amostras são derivadas de um lisado de mosquito. Em outras modalidades, as amostras são derivadas de um mamífero e, em tais modalidades, as amostras podem ser de sangue, sêmen, saliva ou urina.

[0018] Em outro aspecto, a presente invenção fornece kits para detectar o ZIKV em uma amostra através de RT-LAMP. Em algumas modalidades, o kit compreende um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores e, em concretizações particulares, o kit pode ainda compreender uma enzima e um marcador colorimétrico. Em um aspecto, o marcador colorimétrico é SYBR green.

[0019] O método ora descrito se afasta do estado da arte por não requer etapa de extração de RNA da amostra e ser realizado com apenas uma etapa de manipulação, assim reduzindo significativamente o risco de contaminação do ensaio. Ademais, permite detecção a olho nu.

[0020] Somadas, as vantagens técnicas se traduzem em menor custo e a possibilidade de aplicação no leito ou próximo ao leito do paciente; aspectos altamente relevantes para o diagnóstico de doenças tropicais, cujo peso recai essencialmente sobre sistemas públicos de saúde. De um lado, a detecção do ZIKV pode ser realizada sem necessidade de equipamentos especiais, permitindo a aplicação do método em regiões cuja infraestrutura de saúde é precária. De outro, menos etapas significam um método mais rápido e barato, propiciando aplicação em larga escala como em situações de suspeita de surto de infecções por ZIKV.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0021] O objetivo da invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma, poderá ser melhor entendido mediante referência às figuras em anexo e às seguintes descrições:

**FIGURA 1. Otimização das concentrações dos reagentes e condições do ensaio RT-LAMP.** Legendas: NTC (controle sem molde): água; M: marcador de peso molecular.

**FIGURA 2. Detecção do ZIKV em amostras biológicas humanas infectadas com ZIKV.** Legendas: (1) NTC (controle sem template): água; (2): amostra biológica não infectada (urina, soro, saliva e sêmen); (3): amostra biológica infectada com 106 PFU/mL; (4): amostra biológica infectada com 103 PFU/mL. M: marcador de peso molecular.

**FIGURA 3. Detecção do ZIKV em amostras de mosquitos naturalmente infectados e macerado bruto de *Aedes aegypti* experimentalmente infectado com ZIKV.** Legendas: NTC (controle sem template): água; (-): macerado de *Aedes aegypti* não infectado; (+): macerado do *Aedes aegypti* experimentalmente infectado pelo ZIKV. M: marcador de peso molecular.

**FIGURA 4. Especificidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV.** Legendas: M: marcador de peso molecular. NTC (controle sem *template*): água.

**FIGURA 5. Sensibilidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em soro.** Legendas: M: marcador de peso molecular; NTC (controle sem molde): água; ND (não detectado).

**Figura 6. Sensibilidade analítica do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos.** Legendas: M: marcador de peso molecular; NTC (controle sem molde): água; ND (não detectado).

**FIGURA 7. Diagnóstico de amostras clínicas humanas e amostras de mosquitos pelo RT-LAMP.** A linha tracejada representa o valor do limiar do ciclo qRT-PCR (valor de Ct) para a positividade do ZIKV ( $Ct \leq 38$ ). Triângulo vermelho indica amostras positivas pelo RT-LAMP e o círculo azul indica amostras negativas pelo RT-LAMP.

**FIGURA 8. Detecção do ZIKV pelo RT-LAMP em amostras de mosquitos que estavam no limite de detecção pela qRT-PCR.** Legendas: M: marcador de peso molecular; NTC (controle sem molde): água.

**FIGURA 9. Eletroferograma dos produtos de RT-LAMP sequenciados pelo método de Sanger.** Os produtos de reação do RT-LAMP de mosquitos *Aedes aegypti* (A) e *Culex quinquefasciatus* (B) coletados no campo foram sequenciados pelo método de Sanger e as sequências obtidas foram alinhadas com a cepa de referência ZIKV PE243.

## DESCRIÇÃO DETALHADA

### Definições

[0022] Salvo indicação em contrário, todos os termos aqui empregados têm o mesmo significado que teriam para um versado na técnica da presente invenção.

[0023] Diagnóstico *point-of-care*: teste de diagnóstico médico conduzido no leito ou próximo ao leito, isto é, aquele realizado no horário e no local do atendimento ao paciente.

[0024] Os termos “ácido nucleico”, “polinucleotídeo”, “sequência de polinucleotídeo” e “sequência de ácido nucleico” referem-se a polímeros de desoxirribonucleotídeo ou ribonucleotídeo de filamento único ou de filamento duplo ou quimeras ou análogos destes. A menos que de outro modo indicado, uma sequência particular de ácido nucleico desta invenção abrange sequências degeneradas e sequências complementares, além da sequência explicitamente indicada.

[0025] O termo “gene” é amplamente usado para se referir a qualquer ácido nucleico associado com uma função biológica. Assim, os genes incluem sequências codificadoras e/ou as sequências reguladoras requeridas para sua expressão. O termo “gene” aplica-se a uma sequência genômica específica, assim como a um cDNA ou um mRNA codificados por aquela sequência genômica.

[0026] Iniciadores (*primers*): iniciadores, amplamente conhecidos pelo termo em inglês *primers*, são ácidos nucleicos curtos, geralmente oligonucleotídeos de DNA, com 10 ou mais nucleotídeos de comprimento (como 10-60, 15-50, 20-40, 20-50, 25-50 ou 30-60 nucleotídeos de comprimento). Iniciadores podem ser anelados em uma fita de

DNA alvo complementar por hibridação de ácido nucleico para formar um híbrido entre o primer e a fita de DNA alvo e, em seguida, ser estendido ao longo da cadeia de DNA alvo por uma enzima DNA polimerase.

[0027] Pares ou conjuntos de iniciadores (2, 3, 4, 5, 6 ou mais iniciadores) podem ser usados para amplificação de um ácido nucleico alvo, por exemplo, por PCR, LAMP, RT-LAMP ou outros métodos de amplificação de ácidos nucleicos conhecidos na técnica. Para uso específico em métodos de LAMP, o conjunto de iniciadores usualmente inclui um primer externo *forward* (F3), um primer externo reverso (B3), um primer interno *forward* (FIP) e um primer interno reverso (BIP). Podem ser incluídos, ainda, um iniciador de circuito *forward* (*Loop F* ou LF) e/ou um iniciador de circuito reverso (*Loop B* ou LB).

[0028] Amplificação: Aumentar o número de cópias de uma molécula de ácido nucleico, como um gene ou fragmento de um gene, por exemplo, pelo menos uma porção de uma molécula de ácido nucleico de ZIKV. Os produtos de uma reação de amplificação podem ser designados pelo nome “*amplicon*”. Um exemplo de amplificação *in vitro* é a reação em cadeia da polimerase (PCR), na qual uma amostra (como uma amostra biológica de um sujeito) é exposta a um par de iniciadores oligonucleotídicos, sob condições que permitem o anelamento dos iniciadores com uma molécula de ácido nucleico alvo na amostra. Os iniciadores anelados à molécula de ácido nucleico alvo são estendidos em condições adequadas, dando origem a cópias da molécula de ácido nucleico alvo.

[0029] Amplificação isotérmica: Amplificação de ácido nucleico que não é dependente de alterações significativas na temperatura (em contraste com a PCR, por exemplo). Assim, é realizado substancialmente a aproximadamente à mesma temperatura. Em alguns exemplos, a amplificação isotérmica é substancialmente isotérmica, por exemplo, pode incluir pequenas variações na temperatura, tais como mudanças na temperatura não superiores a 1-2 ° C durante a reação de amplificação.

[0030] Amplificação isotérmica mediada por circuito (LAMP): Um método para amplificar o ácido nucleico. O método é uma reação de amplificação de passo único utilizando uma polimerase de DNA com atividade de deslocamento de fita (eg, Notomi et al., Nucl. Acids. Res. 28: E63, 2000; Nagamine et al., Mol. Cell. Probes 16: 223 -229, 2002; Mori et al., J. Biochem. Biophys. Methods 59: 145-157, 2004). Pelo menos quatro iniciadores, que são específicos para oito regiões dentro de uma sequência de ácido



nucleico alvo, são tipicamente utilizados para LAMP. No entanto, em alguns exemplos, dois iniciadores podem ser utilizados para LAMP. Para amplificar sequências de RNA usando LAMP, uma enzima transcriptase reversa (RT) é adicionada à reação. Essa variação é conhecida como RT-LAMP. Em contraste com a PCR, LAMP e RT-LAMP são realizados a uma temperatura constante e não requerem um termociclador.

[0031] Amostra biológica: uma amostra obtida de um sujeito (como um ser humano ou um sujeito veterinário). As amostras biológicas incluem, por exemplo, amostras de fluidos corporais, células e/ou tecidos. Por exemplo, uma amostra de fluido corporal inclui, mas não é limitada a sangue, soro, plasma, urina, saliva, líquido cefalorraquidiano e líquido de lavagem broncoalveolar (BAL). Amostras biológicas podem ser também lisadas de um inseto inteiro, como, por exemplo, um mosquito; particularmente um mosquito do gênero *Anopheles*, *Mansonia*, *Culex* ou *Aedes*.

[0032] Sujeito: organismos vivos multicelulares. Sujeitos de particular interesse para os fins desta invenção são humanos, animais não humanos (e.g. camundongos, ratos, coelhos, ovelhas, cavalos, vacas e primatas não humanos) e insetos.

[0033] Um técnico versado na arte conseguirá depreender que o método da presente invenção é aplicável à detecção do ZIKV de interesse em amostras de diferentes fontes, a saber: (1) de um vetor, (2) de um reservatório natural ou (3) de um hospedeiro final. O vetor pode ser um mosquito do gênero *Anopheles*, *Mansonia*, *Culex* ou *Aedes*. Particularmente, as amostras de vetores podem derivar de mosquitos das espécies *Aedes aegypt*, *Aedes albopictus*, ou *Culex quinquefasciatus*.

[0034] Marcador colorimétrico: Um composto que responde a alterações nas condições ambientais de uma solução (como pH ou concentração de íons metálicos), emitindo fluorescência ou mudando o comprimento de onda emitido quando excitado por luz do espectro visível ou UV.

[0035] O marcador colorimétrico pode ser detectado por qualquer método adequado, inclusive visualmente (por exemplo, sob luz ambiente ou ultravioleta) ou usando instrumentação para detecção de fluorescência quando o marcador for fluorescente (como um fluorímetro ou sistema de PCR em tempo real). Exemplos de marcadores colorimétricos incluem, por exemplo, calceína, SYBR Green, Mag-Fura-2 e Magnesium Green (Life Technologies, Grand Island, NY) e Fluo-2 Mg, Fura-2 Mg, Indo-1 Mg e Asante Magnesium Green (TEF Labs, Austin, TX). Em alguns exemplos, a

mudança de cor do marcador colorimétrico útil nos métodos aqui divulgados é visivelmente detectável (por exemplo, a olho nu).

[0036] Em algumas modalidades, a detecção do produto de amplificação de ácido nucleico do ZIKV compreende detectar uma alteração visível da cor, a olho nu. Em outras modalidades, a detecção do produto de amplificação do ácido nucleico do ZIKV compreende a mensuração de fluorescência emitida pela amostra amplificada. Em outras modalidades, detectar o produto de amplificação de ácido nucleico do ZIKV compreende uma medição da turbidez da amostra amplificada.

[0037] Em algumas modalidades, a amostra biológica é uma amostra de fluido biológico. Em alguns exemplos, a amostra de fluido biológico compreende soro, urina, sangue, plasma, fezes, saliva e/ou líquido cefalorraquidiano. Em outras modalidades, a amostra biológica é um lisado de mosquito. Em alguns exemplos, o lisado de mosquito compreende um mosquito do gênero *Anopheles*, *Mansonia*, *Culex* ou *Aedes*. Em exemplos específicos, a amostra biológica compreende, soro, urina ou o lisado de um mosquito do gênero *Aedes*.

[0038] Identidade/similaridade de sequência: a identidade ou similaridade entre duas ou mais sequências de ácidos nucleicos é expressa em percentual de identidade ou semelhança entre as sequências. Quanto maior a porcentagem, mais idênticas são as sequências. Homólogos ou ortólogos de uma sequência de ácido nucleico possuem um grau relativamente alto de identidade/semelhança de sequência quando alinhadas usando métodos padrão.

[0039] Os métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na técnica. Vários programas e algoritmos de alinhamento são descritos em: Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet *et al*, *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang *et al*. *Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992; and Pearson *et al*, *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. Altschul *et al*, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990.

[0040] A ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), do NCBI (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, 1990), está disponível em várias fontes, incluindo o *National Center for Biological Information* (NCBI, Biblioteca Nacional de Medicina, Edifício 38A, Sala 8N805, Bethesda, MD 20894) e na Internet, para uso em

conexão com os programas de análise de sequência blastp, blastn, blastx, tblastn e tblastx. Informações adicionais podem ser encontradas no site da NCBI. Se duas sequências comparadas compartilharem homologia, o arquivo resultante da análise apresentará essas regiões da homologia como sequências alinhadas. Se as duas sequências comparadas não compartilham homologia, o arquivo de saída designado não apresentará sequências alinhadas.

[0041] Embora a presente invenção possa ser suscetível a diferentes concretizações, é mostrada nos desenhos e na seguinte discussão detalhada, uma concretização preferida com o entendimento de que a presente descrição deve ser considerada uma exemplificação dos princípios da invenção e não pretende limitar a presente invenção ao que foi ilustrado e descrito aqui.

#### **Método para detectar o vírus Zika**

[0042] A presente invenção se refere a um método para detecção de um ácido nucleico de ZIKV em amostras biológicas usando amplificação por RT-LAMP. O ensaio de detecção de ZIKV divulgado fornece um meio rápido, sensível e específico para diagnosticar infecção por ZIKV em diferentes amostras biológicas, incluindo fluidos biológicos de pacientes e lisados de mosquitos.

[0043] O método fornecido compreende submeter a amostra biológica a uma reação de RT-LAMP usando um conjunto de iniciadores específicos para o ácido nucleico do ZIKV para produzir um produto de amplificação de ácido nucleico de ZIKV; e detectar o ácido nucleico do ZIKV produto de amplificação.

[0044] Iniciadores adequados para uso nos métodos e kits divulgados são aqui descritos. Em alguns exemplos, os iniciadores são adequados para a detecção de nucleotídeos ZIKV ácidos por RT-LAMP, como o teste aqui descrito. Tais iniciadores como os utilizados na concretização do método da presente invenção podem ser elaborados com auxílio da plataforma Primer Explorer (<https://primerexplorer.jp/e/>).

[0045] Os conjuntos de iniciadores para RT-LAMP normalmente incluem um iniciador externo *forward* (F3), um iniciador externo reverso (B3), um iniciador interno *forward* (FIP), um iniciador interno reverso (BIP), um iniciador de circuito *forward* (Loop F ou LF) e/ou um iniciador de circuito reverso (Loop B ou LB).

[0046] Em algumas modalidades, o conjunto de iniciadores inclui seis iniciadores cada respectivamente, com uma sequência de pelo menos 90%, pelo menos

95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idêntica às seguintes sequências (indicadas no sentido 5'-3'):

GGCGACATTTCAAGTGGCCAGAGAGCTCTRGAGGCTGAGA

(FIP; SEQ ID NO:1);

AGGGCGTGTTCATACTCCTTGTGAGTGTTTCAGCCGGGATCT

(BIP; SEQ ID NO: 2);

CAGTTCACACGGCCCTTG (F3; SEQ ID NO: 3);

TGTACCTCCACTGTGACTGT (B3; SEQ ID NO: 4);

CCTTCCCTTTGCACCATCCA (LF; SEQ ID NO: 5); e

TACCGCAGCGTTCACATTCA (LB; SEQ ID NO: 6).

[0047] Em algumas modalidades, a reação RT-LAMP é realizada em cerca de 59 °C a cerca de 75 °C, tais como cerca de 60 °C a cerca de 65 °C, cerca de 66 °C a cerca de 70 °C ou cerca de 71 °C a cerca de 74 °C. Em alguns exemplos, o RT-LAMP a reação é realizada a cerca de 65 °C, cerca de 66 °C, cerca de 67 °C, cerca de 68 °C, cerca de 69 °C, cerca de 70 °C, cerca de 71 °C, cerca de 72 °C, cerca de 73 °C, cerca de 74 °C ou cerca de 75 °C. Em exemplos específicos, a reação RT-LAMP é realizada a 72 °C.

[0048] Em algumas modalidades, a reação RT-LAMP pode ser conduzida por cerca de 15 a cerca de 45 minutos, como cerca de 20 minutos a cerca de 40 minutos ou cerca de 25 minutos a cerca de 35 minutos. Em alguns exemplos, a reação RT-LAMP pode continuar por cerca de 30 minutos. No Em alguns exemplos, a reação RT-LAMP pode continuar por não mais que 20 minutos, não mais de 25 minutos, não mais que 30 minutos, não mais que 35 minutos, não mais que 40 minutos ou no máximo 45 minutos.

[0049] Em algumas modalidades, os iniciadores divulgados têm entre 10 e 60 nucleotídeos de comprimento (por exemplo, 15-50, 20-50, 30-60 ou 25-40 nucleotídeos de comprimento). Em alguns exemplos, os primers são 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 29, 30, 31, 32, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 ou 60 nucleotídeos de comprimento e são capazes de hibridar com moléculas de ácido nucleico do ZIKV. Em alguns exemplos, os iniciadores têm pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ou 60 nucleotídeos de comprimento. Em outros exemplos,

os iniciadores podem ter no máximo 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ou 60 nucleotídeos de comprimento.

[0050] A enzima DNA polimerase usada na reação RT-LAMP pode ser qualquer enzima apropriada para o ensaio, que pode ser selecionado por um especialista na técnica. Em algumas modalidades, a reação RT-LAMP inclui uma polimerase de DNA com alta atividade de deslocamento de cadeia. Em alguns exemplos, a DNA polimerase é um fragmento longo de DNA polimerase (LF) de uma bactéria termófila, como *Bacillus stearothermophilus* (BST), *Bacillus Smithii* (Bsm), *Geobacillus sp. M* (GspM) ou *Thermodesulfatator indicus* (Tin), uma variante engenheirada a partir de uma destas ou uma variante de Taq DNA polimerase. Em alguns exemplos, a DNA polimerase é a BST LF DNA polimerase, GspM LF DNA polimerase, GspSSD LF DNA polimerase, estanho exo-LF DNA polimerase ou SD DNA polimerase (ver, por exemplo, WO 2016189490).

[0051] Em algumas modalidades, a transcriptase reversa (RT) usada na reação RT-LAMP pode ser qualquer enzima RT apropriada para o ensaio, que pode ser selecionado por um especialista na técnica. Em algumas modalidades, o RT é do vírus da mieloblastose aviária (AMV) ou do vírus da leucemia murina Moloney (MMLV). Em modalidades preferências, uma enzima BST modificada, exibindo funções catalíticas de RT e DNA Polimerase como, por exemplo, a BST 3.0 DNA polymerase (WarmStart; New England Biolabs (NEB)), pode ser utilizada.

[0052] Em uma modalidade preferencial a BST 3.0 é a enzima DNA Polimerase utilizada. Tal enzima pode ser adicionada no tubo de ensaio em diferentes concentrações, variando entre 2 e 32 Unidades (U) como, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a 20, 21 a 25, ou 26 a 32 U.

[0053] A função da DNA Polimerase utilizada na reação RT-LAMP depende da adição do cofator magnésio ( $Mg^{2+}$ ). Em algumas modalidades, o  $Mg^{2+}$  pode ser fornecido através da adição de  $MgSO_4$  à reação. Em algumas modalidades o  $MgSO_4$  pode ser adicionado em diferentes concentrações, como, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 mM. Concretizações preferenciais podem ser alcançadas com pelo menos 6 mM de  $MgSO_4$ .

[0054] A amplificação do ácido nucleico alvo depende da presença de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) em quantidade suficiente. Nas modalidades do método, os dNTPs podem estar presentes em uma concentração superior a 1 mM. Em

certas concretizações, a concentração de dNTPs está entre 1,4 e 2,5 mM. Modalidades preferenciais são alcançadas com a adição de dNTPs a 1,4, 1,8 ou 2,2 mM.

[0055] As reações RT-LAMP geralmente resultam na síntese de grandes quantidades de ácido nucleico alvo, permitindo a detecção do ácido nucleico alvo a partir de volumes de amostra relativamente pequenos. Além disso, a grande quantidade de produto de amplificação permite a detecção visual ou por simples detectores. Por exemplo, qualquer um dos seguintes métodos pode ser usado para detectar produtos de amplificação RT-LAMP: (i) fluorescência, usando corantes intercalantes de DNA, sondas moleculares fluorescentes ou um indicador de metal fluorescente tal como calceína; (ii) colorimetria, usando um indicador colorido para íons de metais alcalinos, como azul de hidróxi-naftol (Goto et al., *BioTechniques* 46 (3): 167-172, 2009) ou indicadores de pH (Tanner et al., *BioTechniques* 58 (2): 59-68, 2015); (iii) turbidez, pois a reação RT-LAMP produz grandes quantidades de pirofosfato de magnésio (um precipitado branco) e dsDNA, que permitem inspeção dos resultados usando um turbidímetro (Mori et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 289 (1): 150- 154, 2001); (iv) eletroquimicamente, usando um medidor de pH para medição direta do hidrogênio liberado íons durante o procedimento RT-LAMP (Xie et al., *Chem Commun* 50 (100): 15932-15935, 2014) ou usando eletrodos integrados para medir diminuições de corrente resultantes do aumento da ligação de repórteres redox de ligação a DNA eletroquimicamente ativos, como o azul de metileno, para RT-LAMP produtos de reação (Xie et al., *Biosens Bioelectron* 55: 324-329, 2014).

#### **Kit para detecção de vírus Zika por RT-LAMP**

[0056] A presente invenção também fornece kits para detectar ZIKV em uma amostra biológica. Os kits incluem um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores específicos para ácido nucleico do ZIKV. Em algumas modalidades, os kits incluem um conjunto de seis iniciadores com uma sequência pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idêntica às seguintes sequências (indicadas no sentido 5'-3'):

GGCGACATTTCAAGTGGCCAGAGAGCTCTRGAGGCTGAGA

(FIP; SEQ ID NO:1);

AGGGCGTGTTCATACTCCTTGTGAGTGTTTCAGCCGGGATCT

(BIP; SEQ ID NO: 2);

CAGTTCACACGGCCCTTG (F3; SEQ ID NO: 3);  
TGTACCTCCACTGTGACTGT (B3; SEQ ID NO: 4);  
CCTTCCCTTTGCACCATCCA (LF; SEQ ID NO: 5); e  
TACCGCAGCGTTCACATTCA (LB; SEQ ID NO: 6).

[0057] Em algumas modalidades, o kit inclui ainda um ou mais componentes para executar uma Reação de RT-LAMP. Em alguns exemplos, o kit inclui tampão, transcriptase reversa, DNA polimerase, um corante indicador sensível ao pH, dNTPs, master mix ou qualquer combinação dos mesmos. Nos kits divulgados, um ou mais dos iniciadores oligonucleotídicos (como um ou mais dos SEQ ID NOs: 1-18) ou um ou mais conjuntos de iniciadores oligonucleotídicos (como SEQ ID NOs: 1-6; SEQ ID NOs: 7-12; e / ou SEQ ID NOs: 13-18), são fornecidas em um ou mais contêineres ou em um ou mais poços individuais de uma placa ou cartão de vários poços. Podem ser fornecidos iniciadores de ácido nucleico suspenso em uma solução aquosa ou como um pó liofilizado ou liofilizado, por exemplo.

[0058] O(s) recipiente(s) em que o(s) ácido(s) nucleico(s) é(são) fornecido(s) pode ser qualquer recipiente convencional que seja capaz de manter a forma fornecida, por exemplo, tubos de microcentrífuga, placas de vários poços, ampolas ou garrafas. Os kits podem incluir iniciadores de ácido nucleico marcados ou não marcados para uso em amplificação e/ou detecção de ácidos nucleicos do ZIKV, como por RT-LAMP.

[0059] Um ou mais *primers* de controle positivo e/ou negativo e/ou ácidos nucleicos também podem ser fornecidos no kit. Controles negativos exemplares incluem ácidos nucleicos não-ZIKV (tais ácidos nucleicos de outros flavivírus). Exemplos de controles positivos incluem ácido nucleico do ZIKV purificado ou um vetor ou plasmídeo incluindo a sequência alvo de ZIKV. Um especialista na técnica pode selecionar resultados positivos e controles negativos para os ensaios aqui divulgados. Em alguns exemplos, são fornecidos um ou mais *primers* (como um ou mais conjuntos de *primers*) em quantidades de uso único pré-estabelecidas em tubos individuais, normalmente descartáveis, tubos, poços, placas, cartões, ou recipientes equivalentes.

[0060] Em alguns exemplos, um conjunto de iniciadores (como cada um dos SEQ ID NOs: 1-6) está incluída em um único recipiente. Por exemplo, a amostra a ser

testada quanto à presença dos ácidos nucleicos alvo pode ser adicionada ao recipientes individuais e amplificação e / ou detecção podem ser realizados diretamente.

[0061] O kit pode também incluem reagentes adicionais para a detecção e/ou amplificação de ácidos nucleicos do ZIKV, como tampão (s), dNTPs, enzimas (como DNA polimerase e/ou transcriptase reversa) ou outros reagentes adequados. Os reagentes adicionais podem estar em recipientes separados a partir de um ou mais *primers* ou podem ser incluídos no mesmo recipiente que o primer (s).

[0062] Em alguns exemplos, o kit inclui um ou mais compostos para detectar uma amplificação produto, como corante indicador sensível ao pH, um intercalador de DNA (por exemplo, iodeto de propídio, SYBR green PICOGREEN), um reagente cromogênico ou colorimétrico (como azul de hidroxinaftol) ou um indicador fluorescente (como a calceína).

[0063] A presente invenção é descrita pelos exemplos não limitantes abaixo, que são meramente ilustrativas. Várias modificações e variações das concretizações são evidentes ao técnico no assunto, sem se afastar do espírito e do escopo da invenção.

#### EXEMPLOS

#### **EXEMPLO 1: desenvolvimento de método RT-LAMP para detecção de ZIKV em amostras de humanos e mosquitos vetores**

##### **Células e vírus**

[0064] As células Vero (células primárias de rins de macaco verde africano) foram mantidas em meio de DMEM - *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro fetal inativado (SFI) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco) a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. A cepa ZIKV PE243 (código de acesso do GenBank: KX197192.1) utilizada neste trabalho foi isolada em linhagem C6/36 utilizando amostra de soro de um paciente brasileiro infectado pelo ZIKV em 2015. Após isolamento, o vírus foi propagado e armazenado a -80 ° C até o momento do uso. O vírus foi titulado por ensaio de placa e possui o título de 8,0 x10<sup>7</sup> unidades formadoras de placa por mililitro de sobrenadante celular (PFU/mL). Outros arbovírus, incluindo DENV-1 (PE / 97-42735), DENV-2 (PE / 95-3808), DENV-3 (PE / 02-95016), DENV-4 (PE / 10-0081), YFV (17DD) e CHIKV (PE2016-480) foram similarmente propagados em células Vero e utilizados para determinar a especificidade do RT-LAMP. Com exceção do YFV (17DD), que é uma



cepa vacinal, todos os outros vírus foram isolados de humanos em Pernambuco, Brasil.

### Ensaio RT-LAMP

[0065] Inicialmente, foram padronizadas todas as concentrações dos reagentes, bem como todas as condições do ensaio RT-LAMP. A otimização da temperatura de reação foi avaliada sobre as seguintes temperaturas (59°C, 62°C, 65°C, 68°C, 72°C e 75°C) e o tempo de incubação sobre os seguintes tempos (10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min e 60 min). Quanto aos reagentes, foram otimizadas às concentrações ótimas de  $Mg^{2+}$  (2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM e 10 mM), enzima Bst 3.0 (2 U, 4 U, 8 U, 12 U, 16 U e 32 U) e dNTPs (0.6 mM, 1.0 mM, 1.4 mM, 1.8 mM e 2.2 mM). Além disso, foi verificado se todos os *primers*, incluindo os externos (F3 e B3), internos (FIP e BIP) e do loop (LF e LB) eram necessários para a execução do ensaio RT-LAMP. Após a otimização de todos os parâmetros e condições do RT-LAMP, os experimentos foram realizados conforme descrito abaixo.

[0066] As reações de RT-LAMP foram realizadas em triplicata em um volume total de 25 µl contendo 1x Tampão de Amplificação Isotérmica, 8 mM  $MgSO_4$ , 4 U de Bst DNA polimerase [versão 3.0 WarmStart; New England Biolabs (NEB)], trifosfatos de desoxinucleotídeos 1,8 mM (dNTPs) (ThermoFisher Scientific), 1.6 µM de FIP (5'-GGCGACATTTCAAGTGGCCAGAGAGCTCTRGAGGCTGAGA-3'), 1.6 µM de BIP (5'-AGGGCGTGTCTACTCCTTGTGAGTGTTTCAGCCGGGATCT-3'), 0.2 µM de F3 (5'-CAGTTCACACGGCCCTTG-3'), 0.2 µM de B3 (5'-TGTACCTCCACTGTGACTGT-3'), 0.4 µM de LF (5'-CCTTCCCTTTGCACCATCCA-3'), 0.4 µM de LB (5'-TACCGCAGCGTTCACATTCA) e 5 µL de amostra (controle sem molde (NTC), RNA extraído ou amostras sem extração de RNA). Estes *primers* foram descritos anteriormente (SONG; MAUK; HACKETT; CHERRY *et al.*, 2016). 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 do tubo de reação antes do período de incubação. Após o término do tempo de incubação, o SYBR contido na tampa do tubo foi misturado com a amostra.

[0067] As reações foram incubadas a 72°C durante 20 minutos em um termobloco e em seguida foram inativadas a 80°C durante 5 minutos. Para avaliar a

robustez do ensaio para aplicações de *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 designadas. O registro e análise das imagens ocorreu em salas separadas. Todos os experimentos foram replicados independentemente pelo menos três vezes.

[0068] Após a incubação, as reações dos produtos RT-LAMP foram detectadas usando três métodos diferentes. No primeiro, os produtos foram observados através do olho nu sob luz natural e fotografados usando uma câmera convencional de celular (iPhone, Apple). Uma mudança de cor de laranja para amarelo esverdeado foi usada para identificar a amostra positiva, enquanto uma amostra negativa permaneceu laranja. O segundo método foi 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. Neste método, as amostras negativas foram azuis escuras e as reações positivas foram fluorescentes. No terceiro método, os *amplicons* do RT-LAMP foram analisados por eletroforese em gel de agarose (2,0%) em tampão TAE 1x, seguido de coloração com brometo de etídio e visualização do gel com transiluminador. Para a análise por eletroforese, utilizou-se o DNA Ladder de 1 kb Plus (ThermoFisher Scientific) como marcador de peso molecular do DNA.

### **qRT-PCR**

[0069] As amostras com ZIKV foram testadas quanto à positividade da infecção pela técnica de qRT-PCR, padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV, de acordo com protocolos estabelecidos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças - CDC EUA, com pequenas modificações (*Lanciotti et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis, v. 14, n. 8, p. 1232-9, Aug 2008. ISSN 1080-6059 (Electronic) 1080-6040*). Resumidamente, o RNA das amostras foi extraído usando o kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen) para as amostras clínicas humanas e o reagente Trizol para as amostras de mosquitos (Invitrogen Carlsbad, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A qRT-PCR foi realizada utilizando o Kit QuantiTect Probe RT-PCR (QIAGEN, Valência, CA, EUA) com amplificação no sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) conforme protocolo do fabricante. A mistura da

reação (volume total, 15 µL) continha 7,5 µL de Mistura Mestre RT-PCR QuantiNova Probe 2 x, 0.9 µM de cada primer Zika1087 (5'- CCGCTGCCCAACACAAG-3'), Zika1163C (5'- CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3'), e 0.9 µM FAM-labelled 1108 (5'- AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-3') sonda para ZIKV, 0.1 µL de QuantiNova RT Mix, 0.08 µL de QuantiNova ROX Reference Dye, 5 µL das amostras de RNA e água livre de RNase. O programa da reação consistiu em um único ciclo de transcrição reversa por 15 min a 45 ° C, seguido por 5 min a 95 ° C para inativação da transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase, e então 45 ciclos de 5 s a 95 ° C e 45 s a 60°C. A quantidade de RNA viral em cada amostra foi estimada comparando-se os valores do limiar do ciclo (*cycle threshold*; Ct) com a curva padrão feita por diluições seriadas na base de 10 vezes do ZIKV BRPE243/2015 previamente titulado.

#### **Detecção do ZIKV em amostras biológicas humanas e amostras de mosquito sob condições controladas**

[0070] Inicialmente, para avaliar a capacidade do RT-LAMP em diagnosticar o ZIKV em amostras biológicas incluindo soro, urina, saliva e sêmen. As amostras biológicas obtidas a partir de doadores saudáveis foram infectadas com  $1 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^3$  PFU/mL do ZIKV, mimetizando uma situação fisiológica de alta e baixa carga viral, respectivamente. Após incubação a 37° C durante 1 hora, as amostras foram diretamente diagnosticadas através do RT-LAMP sem a necessidade de extração do RNA ou nenhum tratamento prévio da amostra.

[0071] Em seguida, para avaliar a habilidade do RT-LAMP em detectar o ZIKV em amostras de mosquitos, pools de mosquitos obtidos de *A. aegypti* ou *C. quinquefasciatus* (n = 10) foram homogeneizados em 300 µL de água livre de RNase e, em seguida, infectados com  $1 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^3$  PFU/mL do ZIKV. simulando uma situação de alta e baixa carga viral, respectivamente. Após incubação a 37 ° C durante 1 hora, as amostras foram diretamente testadas através do RT-LAMP seguindo o mesmo procedimento realizado com as amostras humanas conforme descrito anteriormente.

[0072] A fim de avaliar a detecção do ZIKV pelo RT-LAMP em mosquitos infectados, foram usadas amostras de mosquitos fêmeas de *A. aegypti* experimentalmente infectados. Resumidamente, a colônia Rec-Lab foi mantida sob condições padronizadas (temperatura, 26°C ± 1°C, umidade relativa de 60 a 80% e fotoperíodo 12:12 h C/E) no Laboratório de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM). Para a alimentação

artificial, o sobrenadante celular contendo  $10^6$  PFU/mL de ZIKV foi misturado em sangue de coelho desfibrinado na proporção de 1:1 e posteriormente fornecido aos mosquitos por 90 minutos, como descrito anteriormente (Guedes *et al.* *Zika virus replication in the mosquito Culex quinquefasciatus in Brazil. Emerg Microbes Infect*, v. 6, n. 8, p. e69, Aug 9 2017a. ISSN 2222-1751 (Eletrônico) 2222-1751). As etapas de infecção e manutenção dos mosquitos infectados foram realizadas seguindo as normas internacionais de biossegurança e o procedimento de infecção oral de *Aedes aegypti* seguiu o protocolo descrito previamente por Carvalho-Leandro (Carvalho-Leandro *et al.* *Immune transcript variations among Aedes aegypti populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. Acta Trop*, v. 124, n. 2, p. 113-9, Nov 2012. ISSN 1873-6254). Os mosquitos fêmeas foram coletados 18 dias após a infecção, homogeneizados em 300  $\mu$ L de água livre de RNase e processados para a realização do RT-LAMP. Os mosquitos alimentados apenas com o sangue de coelho desfibrinado na ausência do ZIKV foram utilizados como controle do experimento.

### **Especificidade analítica e sensibilidade analítica do RT-LAMP**

[0073] Para avaliar a especificidade do RT-LAMP para detectar o ZIKV, os *primers* foram validados testando a reatividade cruzada com outros arbovírus circulantes no Brasil, incluindo o ZIKV (PE243), quatro sorotipos diferentes de dengue DENV-1 (PE / 97-42735), DENV-2 (PE / 95-3808), DENV-3 (PE / 02-95016), DENV-4 (PE / 10-0081), YFV (17DD) e CHIKV (PE2016-480).

[0074] A sensibilidade analítica (limite de detecção) do ensaio RT-LAMP em amostras humanas e amostras de mosquito foi calculada com base na última diluição em que o genoma viral foi detectado em todas as repetições do teste. Primeiramente, para analisar o limite de detecção em amostras humanas, a cepa ZIKV PE243 foi diluída em série na base de 10 vezes em soro, urina, saliva e sêmen. Por outro lado, para mensurar o limite de detecção do RT-LAMP em amostras de mosquito, a cepa ZIKV PE243 foi diluída em série na base de 10 vezes em macerado bruto de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* não infectados. A concentração de vírus nas amostras infectadas variou de  $10^5$  PFU/mL a  $10^{-7}$  PFU/mL. Após a diluição, as amostras foram diretamente analisadas por RT-LAMP sem a necessidade de extração do RNA. Para comparar os resultados do RT-LAMP com a técnica padrão-ouro atualmente utilizada para o diagnóstico do ZIKV, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições e posteriormente

testadas por qRT-PCR (*Lanciotti et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis, v. 14, n. 8, p. 1232-9, Aug 2008. ISSN 1080-6059 (Electronic) 1080-6040*).

### **Validação de RT-LAMP para detecção de ZIKV em amostras clínicas humanas e amostras de mosquito**

[0075] Primeiramente, para validar a performance do RT-LAMP em diagnosticar o ZIKV em amostras clínicas humanas em relação ao qRT-PCR, foram utilizadas 40 amostras de soro obtidas de pacientes com suspeita de infecção pelo vírus zika. O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram diagnosticadas por qRT-PCR conforme o protocolo descrito por Lanciotti e colaboradores (*Lanciotti et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis, v. 14, n. 8, p. 1232-9, Aug 2008. ISSN 1080-6059 (Electronic) 1080-6040*)).

[0076] Para validar o desempenho do RT-LAMP para o diagnóstico do ZIKV em amostras de mosquitos em relação ao qRT-PCR, 60 amostras de *A. aegypti* (n = 32) e *C. quinquefasciatus* (n = 28) previamente diagnosticadas por qRT-PCR (*Guedes et al. Zika virus replication in the mosquito Culex quinquefasciatus in Brazil. Emerg Microbes Infect, v. 6, n. 8, p. e69, Aug 9 2017a. ISSN 2222-1751 (Eletrônico) 2222-1751; Paiva et al. Sensitivity of RT-PCR method in samples shown to be positive for Zika virus by RT-qPCR in vector competence studies. Genet Mol Biol, v. 40, n. 3, p. 597-599, Jul-Sep 2017. ISSN 1415-4757 (Print) 1415-4757*) foram obtidas do Departamento de Entomologia e testadas pelo RT-LAMP. A utilidade diagnóstica intrínseca do teste RT-LAMP foi determinada usando vários parâmetros estatísticos.

### **Sequenciamento dos produtos do RT-LAMP**

[0077] A caracterização genética dos produtos do RT-LAMP de duas amostras de campo positivas, respectivamente de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* foi realizada através do método de sequenciamento de Sanger. Os produtos da reação de RT-LAMP foram diretamente purificados usando o Illustra GFX PCR DNA e o Kit de Purificação em Banda de Gel de acordo com as instruções do fabricante e eluídos em 30 µL de água. Os produtos purificados foram sequenciados diretamente usando o primer FIP e o kit de

sequenciamento de ciclo BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA) estabelecido pelo fabricante e executado em um sequenciador automático (ABI Prism 3100 Capillary Automatic DNA Analyzer). As sequências de fragmentos foram analisadas usando o software Bioedit, v7.0.5 e submetidas ao banco de dados NCBI - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) para identificar a linhagem de ZIKV mais próxima.

### **Comparação dos custos do RT-LAMP e do qRT-PCR**

[0078] Para analisar os custos entre os reagentes de ambas as técnicas, incluindo aqueles utilizados para visualização dos resultados, foi realizado o cálculo do valor, em reais, para realização de cada teste (reação). Os cálculos foram baseados nos valores de compra de cada reagente no mercado brasileiro (Real R\$).

### **Análise estatística**

[0079] Os gráficos foram gerados usando o software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). A estimativa dos parâmetros de diagnóstico (sensibilidade, especificidade, prevalência do ZIKV, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia) do RT-LAMP para detecção de ZIKV foi calculada utilizando-se a ferramenta online gratuita denominada *MedCalc's Diagnostic Test Evaluation Calculator*, disponível em: [https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php). Esta análise foi baseada nos resultados das 40 amostras clínicas humanas, bem como nos resultados das 60 amostras de mosquitos previamente diagnosticadas por qRT-PCR.

### **Aspectos éticos**

[0080] Os estudos envolvendo amostras de pacientes seguiram estritamente as normas vigentes estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fiocruz-PE e cumpriram todas as exigências da Resolução nº466/12 Conselho Nacional de Saúde (CNS). Foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para todos os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa. O projeto do RT-LAMP foi aprovado pelo CEP da Fiocruz/PE sob o número CAAE 67404117.7.0000.5190.

## Resultados

### Detecção do ZIKV em amostras humanas e *Aedes aegypti* sob condições controladas

[0081] Inicialmente, foram otimizadas todas as concentrações dos reagentes, bem como todas as condições do ensaio RT-LAMP. As reações foram realizadas sob temperaturas variando de 59° C a 75° C e o tempo de incubação variando entre 10 min a 60 min. Quanto aos reagentes, foram otimizadas às concentrações ótimas de Mg<sup>2+</sup> (variando de 2 mM a 10 mM), enzima Bst 3.0 (variando de 2 U a 32 U) e dNTPs (variando de 0.6 mM a 2.2 mM). Além disso, foi verificado se todos os *primers*, incluindo os externos (F3 e B3), internos (FIP e BIP) e do loop (LF e LB) eram necessários para a execução do ensaio RT-LAMP. Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (A-FI), sob irradiação UV (A-FII) e eletroforese em gel de agarose (A-FIII).

[0082] Os melhores resultados de amplificação foram obtidos a 72 ° C por 20 min de incubação (Fig. 1A-D). Em relação aos reagentes, as concentrações ótimas foram 8 mM, 4U da enzima e 1.8 mM, respectivamente para os reagentes Mg<sup>2+</sup>, enzima Bst 3.0 e dNTPs (Fig. 1B-C-E). Também foi observado que todos os *primers* são requeridos para um bom desempenho do ensaio RT-LAMP (Fig.1E).

[0083] Em seguida, foi avaliada a capacidade do RT-LAMP em diagnosticar o ZIKV em amostras biológicas incluindo urina, soro, saliva e sêmen. Para este fim, os fluidos corporais humanos foram infectados com uma carga viral alta (1x10<sup>6</sup> PFU/mL) ou baixa (1x10<sup>3</sup> PFU/mL) para mimetizar as concentrações fisiológicas do ZIKV nessas amostras. Após a incubação durante 1 h em temperatura ambiente, as amostras foram diretamente testadas através do RT-LAMP sem a necessidade de extração do RNA das amostras. Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (Fig. 2A-D), sob irradiação UV (Fig. 2E-H) e eletroforese em gel de agarose (Fig. 2I). Como resultado, todas as amostras foram positivas em ambas as cargas virais testadas. Como esperado, amostras de controle sem molde (NTC) (água) e controle negativo (amostra biológica não infectada com o ZIKV) apresentaram resultados negativos.

[0084] Posteriormente, foi avaliada a habilidade do RT-LAMP em detectar o ZIKV em amostras de mosquitos. Para este fim, o macerado bruto de mosquitos foi infectado com uma carga viral alta (1x10<sup>6</sup> PFU / mL) ou baixa (1 x10<sup>3</sup> PFU/mL) para simular as concentrações fisiológicas do ZIKV nesses vetores. As amostras foram

incubadas a temperatura ambiente durante 1 h e em seguida foram testadas através do RT-LAMP. Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (Fig. 3A e D), sob irradiação UV (Fig. 3B e E) e eletroforese em gel de agarose (Fig. 3C e F).

[0085] O ensaio RT-LAMP para o ZIKV foi positivo em ambas as cargas virais testadas. Como esperado, amostras de controle não modelo (NTC) (água) e controle negativo (macerado bruto de *A. aegypti* infectado) apresentaram resultados negativos (Fig. 3A-C). Também foi observado que a extração do RNA não melhorou o limite de detecção do RT-LAMP (dados não mostrados). Os resultados do RT-LAMP foram confirmados por qRT-PCR, através dos quais o valor de Ct foi de 12,1 e 26,8, para alta carga viral e baixa carga viral, respectivamente. Resultados similares foram obtidos utilizando o macerado bruto de *C. quisquefasciatus* infectado com ZIKV (dados não mostrados).

[0086] A fim de mimetizar um cenário real de vigilância do ZIKV em mosquitos, foi avaliada capacidade do RT-LAMP em detectar ZIKV em mosquitos *A. aegypti* experimentalmente infectados por via oral com sangue de coelhos infectados com ZIKV. Neste experimento, os mosquitos alimentados apenas o com sangue de coelho na ausência do vírus também foram incluídos como controle. Utilizaram-se macerados de mosquito bruto para o ensaio RT-LAMP sem a extração do RNA. Após a incubação, o RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV somente em mosquitos infectados, mas não nos mosquitos alimentados com sangue na ausência do vírus e conseqüentemente não estavam infectados (Fig. 3D-F), sugerindo assim, que o teste pode ser útil para a detecção do ZIKV como uma ferramenta de vigilância entomológica.

### **Especificidade analítica do RT-LAMP para detecção de ZIKV**

[0087] Para avaliar a especificidade do ensaio RT-LAMP em detectar apenas o ZIKV, os *primers* foram testados frente a outros arbovírus circulantes no Brasil: DENV-1 (PE / 97-42735), DENV-2 (PE / 95- 3808), DENV-3 (PE / 02-95016), DENV-4 (PE / 10-0081), YFV (17DD) e CHIKV (PE2016-480) (Tabela 1). Apenas a amostra contendo ZIKV foi positiva na reação do RT-LAMP, conforme determinado por análise a olho nu sob luz natural (Fig. 4A), observação visual sob luz UV (Fig. 4B) ou eletroforese em gel de agarose (Fig. 4C). Assim, estes resultados sugerem que o ensaio RT-LAMP descrito aqui é altamente específico para a detecção do ZIKV.



Tabela 1. Vírus utilizados neste estudo para avaliar a especificidade do ensaio RT-LAMP.

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

#### Sensibilidade analítica do RT-LAMP para detecção de ZIKV

[0088] A sensibilidade analítica (limite de detecção) em amostras biológicas humanas foi calculada com base na última diluição em que o genoma viral foi detectado através do ensaio. Para calcular o limite de detecção nas amostras biológicas incluindo soro, urina, saliva e sêmen, foi realizada uma diluição seriada do ZIKV na base de 10 vezes em ambas as amostras biológicas variando de  $10^5$  PFU/mL a  $10^{-7}$  PFU/mL. O RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV em uma ampla gama de concentrações de vírus na amostra de soro (de  $10^5$  PFU/mL a  $10^{-6}$  PFU/mL) sem extração do RNA. Resultados similares no limite de detecção também foram encontrados em amostras de urina, saliva e sêmen (dados não mostrados). Além disso, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições testadas pelo RT-LAMP e posteriormente foram testadas pela qRT-PCR.

[0089] Para calcular a sensibilidade analítica do RT-LAMP em amostras de mosquitos, foi realizada uma diluição seriada do ZIKV na base de 10 vezes em macerado de *A. aegypti* e amostras de soro variando de  $10^5$  PFU/mL a  $10^{-7}$  PFU/mL sem extração do RNA. O RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV em um largo espectro de concentrações de vírus no macerado de *A. aegypti* (de  $10^5$  PFU/mL a  $10^{-5}$  PFU/mL), incluindo cargas virais encontradas em mosquitos naturalmente infectados no campo (*Guedes et al. Zika*

*virus replication in the mosquito Culex quinquefasciatus in Brazil. Emerg Microbes Infect, v. 6, n. 8, p. e69, Aug 9 2017a. ISSN 2222-1751 (Eletrônico) 2222-1751).* Os produtos da reação foram observados a olho nu sob luz natural (Fig. 5A) e sob irradiação UV (Fig. 5B) além de eletroforese em gel de agarose (Fig. 5C).

[0090] A análise de regressão Probit foi calculada utilizando o software MedCalc e a sensibilidade analítica do RT-LAMP foi determinada como  $-2,98 \log_{10}$  PFU do ZIKV (Tabela 2). Adicionalmente, o RNA viral foi extraído das mesmas diluições testadas pelo RT-LAMP e posteriormente foram testadas pelo método amplamente utilizado para o diagnóstico do ZIKV (qRT-PCR) desenvolvido por Lanciotti e colaboradores (*Lanciotti et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis, v. 14, n. 8, p. 1232-9, Aug 2008. ISSN 1080-6059 (Electronic) 1080-6040*). Para o ensaio de qRT-PCR, o limite inferior de detecção do ZIKV foi de  $10^1$  PFU/mL com valor de Ct 37,2 (Fig. 6). Os produtos de amplificação foram observados a olho nu sob luz natural (Fig. 6A), sob irradiação UV (Fig. 6B) e eletroforese em gel de agarose (Fig. 6C).

[0091] Em conjunto, esses resultados demonstraram que o ensaio RT-LAMP foi 10.000 vezes mais sensível do que a técnica atualmente utilizada para o diagnóstico do ZIKV em amostras de mosquito.

Tabela 2. Limite de detecção do ensaio RT-LAMP para ZIKV em amostras de humanos e mosquitos<sup>a</sup>.

Concentração de ZIKV (PFU)	Nº de Replicatas	Nº de resultados positivos	Taxa de acerto em %
$10^5$	10	10	100
$10^4$	10	10	100
$10^3$	10	10	100
$10^2$	10	10	100
$10^1$	10	10	100
$10^0$	10	10	100
$10^{-1}$	10	10	100
$10^{-2}$	10	10	100
$10^{-3}$	10	9	90
$10^{-4}$	10	7	70
$10^{-5}$	10	6	60

10 <sup>-6</sup>	10	0	0
10 <sup>-7</sup>	10	0	0

<sup>a</sup> A análise de regressão Probit foi calculada utilizando o software MedCalc (versão 18.11), fornecendo um valor de C95 (concentração detectável 95% do tempo) de -2,98 log<sub>10</sub> PFU do ZIKV. Isto indica que o limite de detecção é de cerca de -3 log<sub>10</sub> (1/1000) PFU / reação e que as amostras contendo essa concentração seriam detectadas 95% do tempo.

#### **Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para detectar o ZIKV em amostras humanas e amostras de mosquitos**

[0092] Para a validação do ensaio RT-LAMP para o diagnóstico do ZIKV em amostras clínicas humanas, um total de 40 amostras de soro foram utilizadas. As amostras foram previamente diagnosticadas por qRT-PCR e testadas posteriormente pelo RT-LAMP. Amostras com valores de Ct de  $\leq 38.0$  em poços duplicados foram consideradas positivas para infecção pelo ZIKV (*Duffy et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. N Engl J Med, v. 360, n. 24, p. 2536-43, Jun 11 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793*). Do número total de amostras, 20 amostras foram negativas para ZIKV conforme determinado pela qRT-PCR e 20 foram positivas. O valor de Ct nessas amostras variou de 21.0 a  $>40.0$ . Do total de 40 amostras, o ensaio RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV em 23 amostras e 17 amostras foram determinadas como negativas (Fig. 7A).

[0093] Para a validação o desempenho diagnóstico do RT-LAMP em detectar o ZIKV em amostras de mosquitos, um total de 60 amostras de mosquito *A. aegypti* (n = 32) e *C. quinquefasciatus* (n = 28) foram obtidas do Departamento de Entomologia (*Guedes et al. Zika virus replication in the mosquito Culex quinquefasciatus in Brazil. Emerg Microbes Infect, v. 6, n. 8, p. e69, Aug 9 2017a. ISSN 2222-1751 (Eletrônico) 2222-1751; Paiva et al. Sensitivity of RT-PCR method in samples shown to be positive for Zika virus by RT-qPCR in vector competence studies. Genet Mol Biol, v. 40, n. 3, p. 597-599, Jul-Sep 2017. ISSN 1415-4757 (Print) 1415-4757*) e testadas posteriormente para a detecção do ZIKV pelo RT-LAMP. Amostras com valores de Ct de  $\leq 38.0$  em poços duplicados foram consideradas positivas para infecção por ZIKV, conforme descrito anteriormente para as amostras clínicas humanas (*Duffy et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. N Engl J Med, v. 360, n. 24, p. 2536-43, Jun 11 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793*). Destas, 31 amostras foram negativas para ZIKV conforme determinado por qRT-PCR e 29 foram positivas, incluindo amostras de mosquitos naturalmente e experimentalmente infectados. O valor de Ct nessas

amostras variou de 27,0 a > 40,0. Do número total de 60 amostras, o ensaio RT-LAMP foi capaz de detectar o ZIKV em 32 amostras, incluindo as 29 amostras já determinadas como positivas pela qRT-PCR (Fig. 7B).

[0094] Além disso, as amostras de mosquitos que estavam no limiar de detecção pela qRT-PCR (valores Ct variando de 37.5 a 40.3) foram diagnosticadas como positivas pelo RT-LAMP (Fig. 8), destacando a sensibilidade do teste em detectar o ZIKV em amostras de mosquitos em que o método padrão-ouro não foi capaz de detectar o vírus em decorrência da baixa carga viral da amostra. Os produtos de amplificação foram observados através do olho nu sob luz natural (Fig. 8A), sob irradiação UV (Fig. 8B) e eletroforese em gel de agarose (Fig. 8C).

[0095] O desempenho diagnóstico do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras clínicas foi avaliado a partir da análise dos parâmetros estatísticos usando o método padrão-ouro qRT-PCR como referência. A prevalência geral do ZIKV nas amostras clínicas foi de 43.48% (95% CI 29.44% a 54.44%). O ensaio RT-LAMP apresentou sensibilidade diagnóstica de 100 % (95% CI 83.16% a 100.00%) e especificidade diagnóstica de 88.46 % (95% CI 69.85% a 97.55%). O valor preditivo positivo, que é a probabilidade de o vírus estar presente quando o teste é positivo, foi de 86.96% (95% CI 69.69% a 95.08%), enquanto o valor preditivo negativo, que indica a probabilidade de o vírus estar ausente o teste é negativo, foi de 100%. A precisão geral do teste RT-LAMP foi determinada em 93.48% (95% CI 82.10% a 98.63%) (Tabela 3), destacando o valor prático do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras clínicas humanas.

[0096] Quanto ao desempenho diagnóstico do RT-LAMP em amostras de mosquitos, assim como nas amostras clínicas, a análise estatística também foi realizada usando a qRT-PCR como referência. A prevalência geral do ZIKV nas amostras foi de 46,03% (IC 95% 33,39% a 59,06%). O ensaio RT-LAMP apresentou sensibilidade diagnóstica de 100% (IC95% 88,06% a 100,00%) e especificidade diagnóstica de 91,18% (IC95% 76,32% a 98,14%). O valor preditivo positivo de 90,62% (IC 95% 76,64% a 96,61%), enquanto o valor preditivo negativo foi de 100%. A precisão geral do teste RT-LAMP foi determinada em 95,24% (IC 95% 86,71% a 99,01%) (Tabela 4), destacando o potencial do RT-LAMP para a detecção do ZIKV em amostras de mosquitos que por sua vez poderá ser usada como uma ferramenta de vigilância entomológica.

Tabela 3. Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para detecção do ZIKV em amostras clínicas humanas.

	qRT-PCR +	qRT-PCR -	Total
<b>RT-LAMP +</b>	20	3	23
<b>RT-LAMP -</b>	0	23	23
<b>Total</b>	20	26	
<b>Sensibilidade</b>	<b>100 % (95% CI 83.16% a 100.00%)</b>		
<b>Especificidade</b>	<b>88.46 % (95% CI 69.85% a 97.55%)</b>		
<b>Prevalência do ZIKV</b>	<b>43.48% (95% CI 29.44% a 54.44%)</b>		
<b>Valor Preditivo Positivo</b>	<b>86.96% (95% CI 69.69% a 95.08%)</b>		
<b>Valor preditivo negativo</b>	<b>100 %</b>		
<b>Acurácia</b>	<b>93.48% (95% CI 82.10% a 98.63%)</b>		

Tabela 4. Desempenho diagnóstico do RT-LAMP para detecção do ZIKV em amostras de mosquitos.

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

[0097] Para confirmar a identidade das amostras de mosquito positivas através do RT-LAMP, foram sequenciadas amostras positivas de *Aedes spp.* (1) e *Culex spp.* (1) utilizando o método de Sanger. Os resultados do sequenciamento e a análise através da ferramenta do BLAST demonstraram que os *amplicons* de ZIKV obtidos pelo RT-LAMP correspondem a 100% com o vírus circulante no Brasil (Fig. 9), confirmando a especificidade do RT-LAMP em detectar o ZIKV.

[0098] Juntos, esses resultados indicaram que o nosso teste RT-LAMP para a detecção do ZIKV representa uma plataforma de diagnóstico robusta e acessível que pode ser usada como uma ferramenta de diagnóstico em amostras clínicas humanas, bem como também pode ser utilizada como uma ferramenta de vigilância para mosquitos infectados com ZIKV.

#### **Determinação dos custos para a realização do RT-LAMP e do qRT-PCR**

[0099] Com base nos valores em reais (R\$) de todos os reagentes necessários para a execução de ambas as técnicas, incluindo os reagentes necessários para auxiliar na visualização dos resultados. Foi realizado o cálculo do valor, em reais, do custo para a

realização de cada reação (teste). O valor de cada reação para o ensaio do RT-LAMP foi de aproximadamente R\$ 1,00 e para a realização de cada teste através do qRT-PCR foi de aproximadamente R\$ 43,00 (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que o custo de cada reação através de nossa plataforma de diagnóstico é cerca de 43 vezes mais barato quando comparado ao custo de cada reação através do método padrão-ouro, atualmente utilizado para o diagnóstico do ZIKV no Brasil.

### **Conclusão**

[00100] O ensaio RT-LAMP foi altamente específico para detecção do ZIKV e se mostrou até 10.000 vezes mais sensível que a qRT-PCR para detectar o ZIKV em soro de pacientes e em amostras de mosquito. Em paralelo, o método aqui descrito revelou, de modo surpreendente, igual especificidade e sensibilidade para detectar o ZIKV em amostras de diferentes matrizes biológicas de pacientes. Aqui, cabe destacar a aplicabilidade para testar amostras facilmente obteníveis, caso de urina e saliva.

[00101] Em conjunto, os exemplos demonstrados suportam a alegação de que o método RT-LAMP para detectar ZIKV pode ser utilizado como diagnóstico *point-of-care* e como instrumento às atividades de vigilância do ZIKV em populações de mosquitos.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar vírus Zika (ZIKV) em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a. submeter uma amostra, sem prévio processamento para extração de RNA, à reação de transcrição reversa sucedida por amplificação isotérmica mediada por circuito (RT-LAMP) em um tubo fechado contendo um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores e um corante; e

b. detectar o produto de amplificação do RNA do ZIKV por inspeção visual e/ou leitura espectrofotométrica ou fluorimétrica.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores compreende pelo menos quatro das seis sequências SEQ ID NOs: 1 – 6.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a reação de RT-LAMP é realizada em uma temperatura na faixa entre 59 °C e 75 °C.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a reação de RT-LAMP é realizada em uma temperatura de 72 °C.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o período de incubação da reação de RT-LAMP é de 10 a 60 minutos.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o período de incubação da reação de RT-LAMP é de 20 minutos.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a amostra compreende um lisado de mosquito.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a amostra é de um mamífero.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a amostra é de sangue, saliva ou urina.

10. Kit para realizar o método definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores que correspondem às SEQ ID NOs: 1 – 6;

b. uma enzima BST 3.0; e

c. um marcador colorimétrico.

11. Kit de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o marcador colorimétrico é SYBR green.



## RESUMO

### MÉTODO PARA DETECTAR VÍRUS ZIKA E KIT

A presente invenção fornece um método para detectar o vírus da Zika (ZIKV) em amostras de vetores ou de pacientes utilizando a técnica de Transcrição Reversa sucedida por Amplificação Isotérmica Mediada por Circuito associada a (RT-LAMP). O método é conduzido em única etapa de manipulação, sem a necessidade de extração de RNA da amostra teste, conforme é padrão no estado da arte. A invenção também fornece um kit para a realização do referido método.

## ANEXO E – Artigos referentes a tese de doutorado

**Artigo 1**

Título: **Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review**

Autores: **Severino Jefferson Ribeiro da Silva**, Keith Pardee, Lindomar Pena\*

Revista: Viruses

Data da submissão: 11 de Novembro de 2019


Data do aceite: 04 de Dezembro de 2019

Data da publicação: 23 de Dezembro de 2019



*Review*

## **Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review**

**Severino Jefferson Ribeiro da Silva** <sup>1</sup>, **Keith Pardee** <sup>2</sup> and **Lindomar Pena** <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Virology, Aggeu Magalhaes Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), 50670-420 Recife, Brazil; jeffersonbiotecviro@gmail.com

<sup>2</sup> Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, ON M5S 3M2, Canada; keith.pardee@utoronto.ca

\* Correspondence: lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br; Tel.: +55-81-2123-7849

Received: 11 November 2019; Accepted: 4 December 2019; Published: 23 December 2019



## Artigo 2

Título: **Adaptive, diverse and de-centralized diagnostics are key to the future of outbreak response**

Autores: Quinn Matthews, **Severino Jefferson Ribeiro da Silva**, Masoud Norouzi, Lindomar José Pena, Keith Pardee\*

Revista: BMC Biology

Data da submissão: 18 de Julho de 2020

Data do aceite: 08 de Outubro de 2020

Data da publicação: 28 de Outubro de 2020

Matthews et al. *BMC Biology* (2020) 18:153  
<https://doi.org/10.1186/s12915-020-00891-4>


BMC Biology

COMMENT

Open Access

# Adaptive, diverse and de-centralized diagnostics are key to the future of outbreak response



Quinn Matthews<sup>1</sup>, Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>2</sup>, Masoud Norouzi<sup>1</sup>, Lindomar José Pena<sup>2</sup> and Keith Pardee<sup>1,3\*</sup> 

### **Artigo 3**

**Título: Development and validation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in patient samples from Brazil**

**Autores: Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Keith Pardee, Udeni B.R. Balasuriya, Lindomar Pena\***

Revista: Scientific Reports - Nature

Data da submissão: 05 de Agosto de 2020

Data do aceite: 18 de Janeiro de 2021

Data da publicação: 18 de Fevereiro de 2021

[www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports)

## **scientific** reports

 Check for updates

**OPEN** **Development and validation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in patient samples from Brazil**

Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>1</sup>, Keith Pardee<sup>2</sup>, Udeni B. R. Balasuriya<sup>3</sup> & Lindomar Pena<sup>1✉</sup>

**Artigo 4**

**Título: Field validation of the performance of paper-based tests for the detection of the Zika and chikungunya viruses in serum samples**

Autores: Margot Karlikow\*, Severino Jefferson Ribeiro da Silva\*, Yuxiu Guo\*, Seray Cicek\*, Larissa Krokovsky\*, Paige Homme, Yilin Xiong, Talia Xu, Maria-Angelica Calderón-Peláez, Sigrid Camacho-Ortega, Duo Ma, Jurandy Junior Ferraz de Magalhães, Barbara Nayane, Diego Guerra de Albuquerque Cabral, Katariina Jaenes<sup>1</sup>, Polina Sutyryna, Tom Ferrante, Andrea Denisse Benitez, Victoria Nipaz, Patricio Ponce, Darius G. Rackus, James J. Collins, Marcelo Paiva, Jaime E. Castellanos, Varsovia Cevallos, Alexander A. Green<sup>1</sup>, Constância Ayres, Lindomar Pena, Keith Pardee\*

Revista: Nature Biomedical Engineering

Data da submissão: 25 de Março de 2021

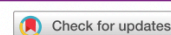
Data do aceite: 24 de Janeiro de 2022

Data da publicação: 07 de Março de 2022

ARTICLES

<https://doi.org/10.1038/s41551-022-00850-0>

nature  
biomedical engineering



OPEN

# Field validation of the performance of paper-based tests for the detection of the Zika and chikungunya viruses in serum samples

Margot Karlikow<sup>1,2,23</sup>, Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>3,23</sup>, Yuxiu Guo<sup>1,4,23</sup>, Seray Cicek<sup>1,4,23</sup>, Larissa Krokovsky<sup>5,23</sup>, Paige Homme<sup>1</sup>, Yilin Xiong<sup>1</sup>, Talia Xu<sup>1</sup>, Maria-Angelica Calderón-Peláez<sup>6</sup>, Sigrid Camacho-Ortega<sup>6</sup>, Duo Ma<sup>7</sup>, Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães<sup>3,8,9</sup>, Bárbara Nayane Rosário Fernandes Souza<sup>3</sup>, Diego Guerra de Albuquerque Cabral<sup>3,8</sup>, Katariina Jaenes<sup>1</sup>, Polina Sutyryna<sup>1</sup>, Tom Ferrante<sup>10</sup>, Andrea Denisse Benitez<sup>11</sup>, Victoria Nipaz<sup>11</sup>, Patricio Ponce<sup>11</sup>, Darius G. Rackus<sup>1,12,13</sup>, James J. Collins<sup>10,14,15,16,17,18</sup>, Marcelo Paiva<sup>5</sup>, Jaime E. Castellanos<sup>6</sup>, Varsovia Cevallos<sup>11</sup>, Alexander A. Green<sup>19,20,21</sup>, Constância Ayres<sup>5</sup>, Lindomar Pena<sup>3</sup> and Keith Pardee<sup>1,22</sup> ✉

## Artigo 5

**Título: Design to Implementation Study for Development and Patient Validation of Paper-Based Toehold Switch-Based Diagnostics**

**Autores:** Katariina Jaenes\*, **Severino Jefferson Ribeiro da Silva\***, Justin R.J. Vigar\*, Kaiyue Wu, Masoud Norouzi, Pouriya Bayat, Margot Karlikow, Seray Cicek, Yuxiu Guo, Alexander A. Green, Lindomar Pena, Keith Pardee\*

**Revista:** Journal of Visualized Experiments (JoVE)

**Data da submissão:** 16 de Agosto de 2021

**Data do aceite:** 08 de Abril de 2022

**Data da publicação:** -



---

## **Design to Implementation Study for Development and Patient Validation of Paper-Based Toehold Switch-Based Diagnostics**

**Katariina Jaenes<sup>\*1</sup>, Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>\*1,2</sup>, Justin R. J. Vigar<sup>\*1</sup>, Kaiyue Wu<sup>3,4</sup>, Masoud Norouzi<sup>1</sup>, Pouriya Bayat<sup>1</sup>, Margot Karlikow<sup>1</sup>, Seray Cicek<sup>1</sup>, Yuxiu Guo<sup>1</sup>, Alexander A. Green<sup>3,4</sup>, Lindomar Pena<sup>2</sup>, Keith Pardee<sup>1,5</sup>**

<sup>1</sup>Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto <sup>2</sup>Laboratory of Virology and Experimental Therapy (LAVITE), Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) <sup>3</sup>Department of Biomedical Engineering, Boston University <sup>4</sup>Molecular Biology, Cell Biology & Biochemistry Program, Graduate School of Arts and Sciences, Boston University <sup>5</sup>Department of Mechanical and Industrial Engineering, University of Toronto

\*These authors contributed equally

**Artigo 6**

**Título: Development and Validation of a Rapid Molecular Diagnostic Test for Chikungunya Virus in Patient and Mosquito Samples by Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)**

**Autores: Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães, Keith Pardee, Lindomar Pena\***

Revista: Scientific Reports

Data da submissão: *Under submission*

Data do aceite: -

Data da publicação: -

**Artigo 7**

**Título: A Protocol for Simple, Rapid, and Direct Detection of ZIKV from Patient and Mosquito Samples using a Direct-RT-qPCR Assay without RNA Extraction Step**

**Autores: Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Renata Pessôa Germano Mendes, Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães, Elisa de Almeida Neves Azevedo, Marília de Albuquerque Sena, Bárbara Nazly Rodrigues Santos, Diego Guerra de Albuquerque Cabral, Keith Pardee, Lindomar Pena\***

Revista: Viruses

Data da submissão: *Under submission*

Data do aceite: -

Data da publicação: -



**ANEXO F – Outros artigos produzidos durante o doutorado****Artigo 8**

**Título: Role of nonstructural proteins in the pathogenesis of SARS-CoV-2**

**Autores: Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Caroline Targino Alves da Silva, Renata Pêsoa Germano Mendes, Lindomar Pena\***

Revista: Journal of Medical Virology

Data da submissão: 25 de Março de 2020

Data do aceite: 08 de Abril de 2020

Data da publicação: 09 de Abril de 2020

---

DOI: 10.1002/jmv.25858

LETTER TO THE EDITOR

JOURNAL OF  
**MEDICAL VIROLOGY** WILEY

**Role of nonstructural proteins in the pathogenesis  
of SARS-CoV-2**

## **Artigo 9**

**Título: Has Zika Virus Established a Sylvatic Cycle in South America?**

**Autores: Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães, Renata Pessôa Germano Mendes, Lindomar Pena\***

Revista: Acta Tropica

Data da submissão: 13 de Março de 2020

Data do aceite: 02 de Maio de 2020

Data da publicação: 22 de Maio de 2020

Acta Tropica 209 (2020) 105525



Contents lists available at ScienceDirect

**Acta Tropica**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)



**Has Zika Virus Established a Sylvatic Cycle in South America?**



## **Artigo 10**

**Título: Insights into SARS-CoV-2, the Coronavirus Underlying COVID-19: Recent Genomic Data and the Development of Reverse Genetics Systems**

**Autores: Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Renata Pessôa Germano Mendes, Caroline Targino Alves da Silva, Alessio Lorusso, Alain Kohl\*, Lindomar Pena\***

Revista: Journal of General Virology

Data da submissão: 22 de Abril de 2020

Data do aceite: 01 de Junho de 2020

Data da publicação: 24 de Junho de 2020

JOURNAL OF  
GENERAL VIROLOGY

INSIGHT REVIEW

Silva et al., *Journal of General Virology* 2020;101:1021–1024  
DOI 10.1099/jgv.0.001458



---

## **Insights into SARS-CoV-2, the Coronavirus Underlying COVID-19: Recent Genomic Data and the Development of Reverse Genetics Systems**

Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>1</sup>, Renata Pessôa Germano Mendes<sup>1</sup>, Caroline Targino Alves da Silva<sup>1</sup>, Alessio Lorusso<sup>2</sup>, Alain Kohl<sup>3,\*</sup> and Lindomar Pena<sup>1,\*</sup>

## **Artigo 11**

**Título: Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19**

**Autores: Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Caroline Targino Alves da Silva, Klarissa Miranda Guarines, Renata Pessôa Germano Mendes, Keith Pardee, Alain Kohl, Lindomar Pena\***

Revista: ACS Infectious Diseases

Data da submissão: 04 de Maio de 2020

Data do aceite: 04 de Agosto de 2020

Data da publicação: 04 de Agosto de 2020

ACS | Infectious  
Diseases

This article is made available via the [ACS COVID-19 subset](#) for unrestricted RESEARCH re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for the duration of the World Health Organization (WHO) declaration of COVID-19 as a global pandemic.



[pubs.acs.org/journal/aidcbc](https://pubs.acs.org/journal/aidcbc)

Review

## **Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19**

Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Caroline Targino Alves da Silva, Klarissa Miranda Guarines, Renata Pessôa Germano Mendes, Keith Pardee, Alain Kohl, and Lindomar Pena\*



Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00274>



Read Online

**Artigo 12**

Título: **A word of caution in interpreting COVID-19 diagnostic tests**

Autores: **Severino Jefferson Ribeiro da Silva**, Lindomar Pena\*

Revista: Journal of Medical Virology

Data da submissão: 18 de Agosto de 2020

Data do aceite: 17 de Setembro de 2020

Data da publicação: 17 de Setembro de 2020

---

DOI: 10.1002/jmv.26531

LETTER TO THE EDITOR

JOURNAL OF  
MEDICAL VIROLOGY WILEY

**A word of caution in interpreting COVID-19 diagnostics tests**

**Artigo 13**

**Título: Epidemiological and clinical characteristics of the first 557 successive patients with COVID-19 in Pernambuco state, Northeast Brazil**

Autores: Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães, Renata Pessoa Germano Mendes, Caroline Targino Alves da Silva, **Severino Jefferson Ribeiro da Silva**, Klarissa Miranda Guarines, Lindomar Pena\*, Others for the Pernambuco COVID-19 Research Group

Revista: Travel Medicine and Infectious Disease

Data da submissão: 30 de Junho de 2020

Data do aceite: 18 de Setembro de 2020

Data da publicação: 21 de Setembro de 2020

Travel Medicine and Infectious Disease 38 (2020) 101884



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

**Travel Medicine and Infectious Disease**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tmaid](http://www.elsevier.com/locate/tmaid)



Original article

**Epidemiological and clinical characteristics of the first 557 successive patients with COVID-19 in Pernambuco state, Northeast Brazil**

Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães <sup>a,b,c,1</sup>, Renata Pessoa Germano Mendes <sup>a,1</sup>,  
 Caroline Targino Alves da Silva <sup>a</sup>, Severino Jefferson Ribeiro da Silva <sup>a</sup>,  
 Klarissa Miranda Guarines <sup>a</sup>, Lindomar Pena <sup>a,\*</sup>, Others for the Pernambuco COVID-19 Research Group

<sup>a</sup> Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup> Department of Virology, Pernambuco State Central Laboratory (LACEN/PE), Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup> University of Pernambuco (UPE), Serra Talhada Campus, Serra Talhada, Pernambuco, Brazil



**Artigo 14****Título: Multiple Introductions Followed by Ongoing Community Spread of SARS-CoV-2 at One of the Largest Metropolitan Areas of Northeast Brazil**

Autores: Marcelo Henrique Santos Paiva, Duschinka Ribeiro Duarte Guedes, Cássia Docena, Matheus Figueira Bezerra, Filipe Zimmer Dezordi, Laís Ceschini Machado, Larissa Krokovsky, Elisama Helvecio, Alexandre Freitas da Silva, Luydson Richardson Silva Vasconcelos, Antonio Mauro Rezende, **Severino Jefferson Ribeiro da Silva**, Kamila Gaudêncio da Silva Sales, Bruna Santos Lima Figueiredo de Sá, Derciliano Lopes da Cruz, Claudio Eduardo Cavalcanti, Armando de Menezes Neto, Caroline Targino Alves da Silva, Renata Pessôa Germano Mendes, Maria Almerice Lopes da Silva, Tiago Gräf, Paola Cristina Resende, Gonzalo Bello, Michelle da Silva Barros, Wheverton Ricardo Correia do Nascimento, Rodrigo Moraes Loyo Arcoverde, Luciane Caroline Albuquerque Bezerra, Sinval Pinto Brandão-Filho, Constância Flávia Junqueira Ayres , Gabriel Luz Wallau\*

Revista: Viruses

Data da submissão: 17 de Outubro de 2020









Data do aceite: 22 de Novembro de 2020

Data da publicação: 09 de Dezembro de 2020



Article

## **Multiple Introductions Followed by Ongoing Community Spread of SARS-CoV-2 at One of the Largest Metropolitan Areas of Northeast Brazil**

Marcelo Henrique Santos Paiva <sup>1,2,†</sup> , Duschinka Ribeiro Duarte Guedes <sup>2,†</sup>, Cássia Docena <sup>3,†</sup>, Matheus Figueira Bezerra <sup>4,†</sup>, Filipe Zimmer Dezordi <sup>2,5,†</sup> , Laís Ceschini Machado <sup>2</sup>, Larissa Krokovsky <sup>2</sup>, Elisama Helvecio <sup>2</sup> , Alexandre Freitas da Silva <sup>2,5</sup>, Luydson Richardson Silva Vasconcelos <sup>6</sup>, Antonio Mauro Rezende <sup>4,5</sup> , Severino Jefferson Ribeiro da Silva <sup>7</sup> , Kamila Gaudêncio da Silva Sales <sup>8</sup>, Bruna Santos Lima Figueiredo de Sá <sup>4</sup>, Derciliano Lopes da Cruz <sup>2</sup>, Claudio Eduardo Cavalcanti <sup>7</sup>, Armando de Menezes Neto <sup>6</sup> , Caroline Targino Alves da Silva <sup>6</sup> , Renata Pessôa Germano Mendes <sup>6</sup>, Maria Almerice Lopes da Silva <sup>6</sup>, Tiago Gräf <sup>9</sup> , Paola Cristina Resende <sup>10</sup>, Gonzalo Bello <sup>11</sup> , Michelle da Silva Barros <sup>8</sup>, Wheverton Ricardo Correia do Nascimento <sup>6,12</sup>, Rodrigo Moraes Loyo Arcoverde <sup>6</sup>, Luciane Caroline Albuquerque Bezerra <sup>13</sup>, Sinval Pinto Brandão-Filho <sup>6</sup> , Constância Flávia Junqueira Ayres <sup>2</sup> and Gabriel Luz Wallau <sup>2,5,\*</sup> 

**Artigo 15****Título: Simultaneous Circulation of DENV, CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 in Brazil: an Inconvenient Truth**

Autores: **Severino Jefferson Ribeiro da Silva\***, Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães, Lindomar Pena\*

Revista: One Health

Data da submissão: 08 de Outubro de 2020

Data do aceite: 13 de Dezembro de 2020

Data da publicação: 16 de Dezembro de 2020

One Health 12 (2021) 100205



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

**One Health**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/onehlt](http://www.elsevier.com/locate/onehlt)

**Simultaneous Circulation of DENV, CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 in Brazil: an Inconvenient Truth**

Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>a</sup>, Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães<sup>a,b,c</sup>, Lindomar Pena<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup> Department of Virology, Pernambuco State Central Laboratory (LACEN/PE), Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup> University of Pernambuco (UPE), Serra Talhada Campus, Serra Talhada, Pernambuco, Brazil



**Artigo 16**

**Título: Collapse of the public health system and the emergence of new variants during the second wave of the COVID-19 pandemic in Brazil**

**Autores: Severino Jefferson Ribeiro da Silva\***, Lindomar Pena\*

Revista: One Health

Data da submissão: 16 de Abril de 2021

Data do aceite: 28 de Junho de 2021

Data da publicação: 29 de Junho de 2021

One Health 13 (2021) 100287



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

**One Health**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/oneht](http://www.elsevier.com/locate/oneht)



**Collapse of the public health system and the emergence of new variants during the second wave of the COVID-19 pandemic in Brazil**

**Severino Jefferson Ribeiro da Silva\***, Lindomar Pena\*

*Laboratory of Virology and Experimental Therapy (LAVITE), Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil*



**Artigo 17**

**Título: Widespread Contamination of SARS-CoV-2 on Highly Touched Surfaces in Brazil During the Second Wave of the COVID-19 Pandemic**

**Autores: Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento, Wendell Palôma Maria dos Santos Reis, Caroline Targino Alves da Silva, Poliana Gomes da Silva, Renata Pessôa Germano Mendes, Allyson Andrade Mendonça, Bárbara Nazly Rodrigues Santos, Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães, Alain Kohl, Lindomar Pena\***

Revista: Environmental Microbiology

Data da submissão: 04 de Agosto de 2021

Data do aceite: 18 de Novembro de 2021

Data da publicação: 04 de Dezembro de 2021

environmental  
microbiology



Environmental Microbiology (2021) 23(12), 7382–7395

doi:10.1111/1462-2920.15855

**Widespread contamination of SARS-CoV-2 on highly touched surfaces in Brazil during the second wave of the COVID-19 pandemic**

**Artigo 18**

**Título: Antiviral Activity of Ouabain Against a Brazilian Zika Virus Strain**

**Autores:** Deyse Cristina Madruga Carvalho, Poliana Gomes da Silva, Willyenne Marília Dantas, **Severino Jefferson Ribeiro da Silva**, Caroline Targino Alves da Silva, Elton José Ferreira Chaves, Demetrius Antônio Machado de Araújo, Ronaldo Nascimento de Oliveira, Sandra Rodrigues-Mascarenhas\*, Lindomar José Pena\*

Revista: Scientific Reports - Nature

Data da submissão: 15 de Outubro de 2021

Data do aceite: 14 de Fevereiro de 2022

Data da publicação: -

**Artigo 19**

**Título: Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned**

**Autores: Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Jéssica Catarine Frutuoso do Nascimento, Renata Pessôa Germano Mendes, Klarissa Miranda Guarines, Caroline Targino Alves da Silva, Poliana Gomes da Silva, Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães, Justin Vigar, Abelardo Silva-Júnior, Alain Kohl, Keith Pardee, Lindomar Pena\***

Revista: ACS Infectious Diseases

Data da submissão: 18 de Abril de 2022

Data do aceite: *Under review*

Data da publicação: -

**Artigo 20**

**Título: Portable sample processing for molecular assays: application to Zika virus diagnostics**

**Autores: Tanya Narahari, Joshua Dahmer, Alexandros Sklavounos, Taehyeong Kim, Monika Satkauskas, Ioana Clotea, Man Ho, Julian Lamanna, Christopher Dixon, Darius G. Rackus, Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Lindomar Pena, Keith Pardee, Aaron R. Wheeler\***

Revista: Lab on a Chip

Data da submissão: 26 de Novembro de 2021

Data do aceite: 18 de Março de 2022

Data da publicação: 31 de Março de 2022

## Lab on a Chip



PAPER

### Portable sample processing for molecular assays: application to Zika virus diagnostics†

Cite this: DOI: 10.1039/d1lc01068a

Tanya Narahari,<sup>‡ab</sup> Joshua Dahmer,<sup>‡a</sup> Alexandros Sklavounos,<sup>id ‡ab</sup> Taehyeong Kim,<sup>id ‡ab</sup> Monika Satkauskas,<sup>‡a</sup> Ioana Clotea,<sup>a</sup> Man Ho,<sup>ab</sup> Julian Lamanna,<sup>ab</sup> Christopher Dixon,<sup>id a</sup> Darius G. Rackus,<sup>id §ac</sup> Severino Jefferson Ribeiro da Silva,<sup>id d</sup> Lindomar Pena,<sup>d</sup> Keith Pardee<sup>ce</sup> and Aaron R. Wheeler<sup>id \*abf</sup>

**Artigo 21**

**Título: Viral Load in COVID-19 Patients: Implications for Prognosis and Vaccine Efficacy in the Context of Emerging SARS-CoV-2 Variants**

**Autores: Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Suelen Cristina de Lima, Ronaldo Celerino da Silva, Alain Kohl, Lindomar Pena\***

Revista: *Frontiers in Medicine*

Data da submissão: 15 de Dezembro de 2021

Data do aceite: 29 de Dezembro de 2021

Data da publicação: 31 de Janeiro de 2022



**REVIEW**  
published: 31 January 2022  
doi: 10.3389/fmed.2021.836826



# **Viral Load in COVID-19 Patients: Implications for Prognosis and Vaccine Efficacy in the Context of Emerging SARS-CoV-2 Variants**

***Severino Jefferson Ribeiro da Silva*<sup>1,2\*</sup>, *Suelen Cristina de Lima*<sup>1</sup>, *Ronaldo Celerino da Silva*<sup>1</sup>, *Alain Kohl*<sup>3</sup> and *Lindomar Pena*<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratory of Virology and Experimental Therapy (LAVITE), Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil,* <sup>2</sup> *Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, ON, Canada,* <sup>3</sup> *MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow, United Kingdom*

**ANEXO G – Material suplementar artigo publicado****Supplementary Information****Development and validation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in patient samples from Brazil**

Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>1</sup>, Keith Pardee<sup>2</sup>, Udeni B.R. Balasuriya<sup>3</sup>, Lindomar Pena<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil;

<sup>2</sup>Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, ON M5S 3M2, Canada;

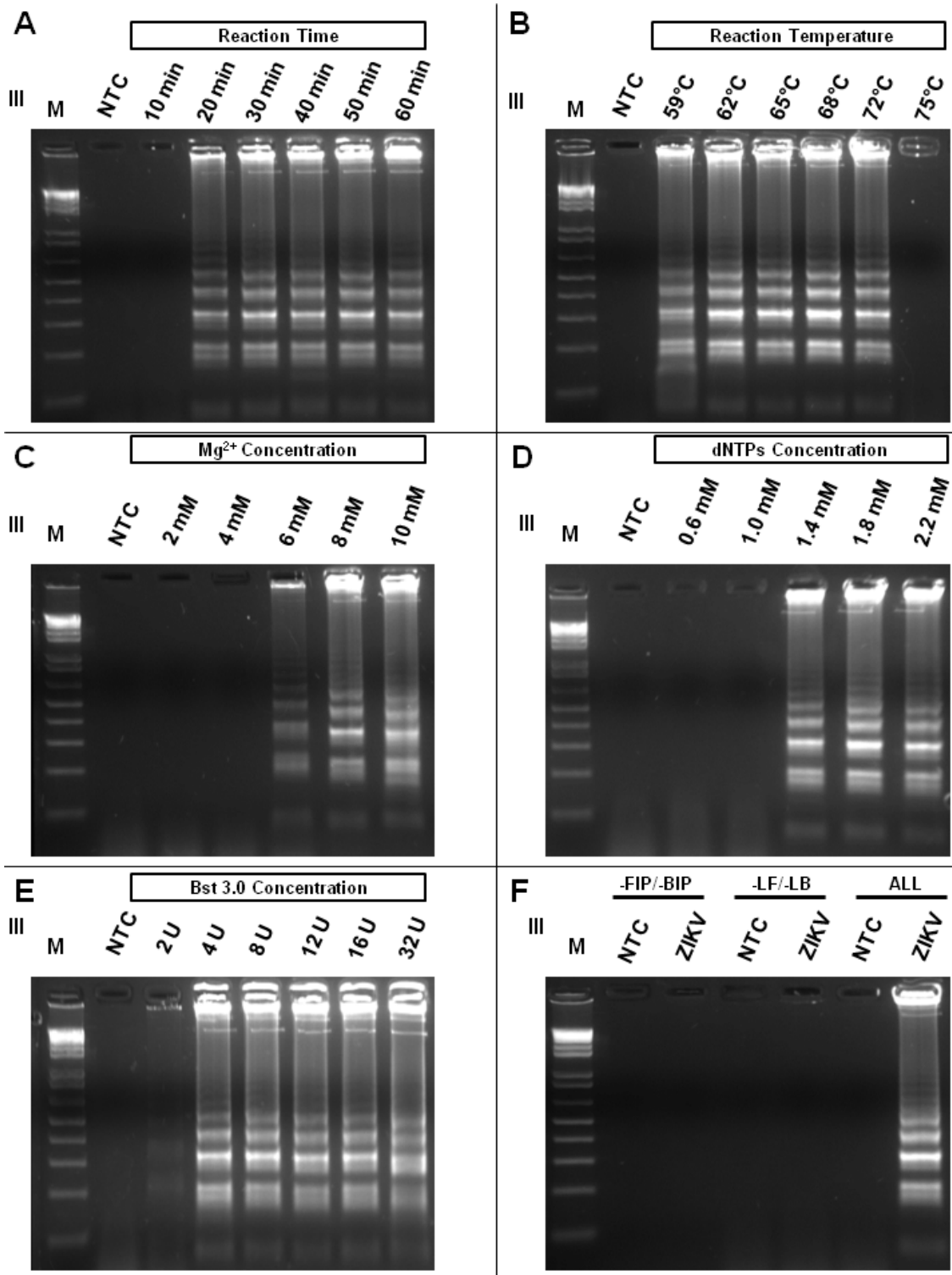
<sup>3</sup>Louisiana Animal Disease Diagnostic Laboratory and Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA;

\*Corresponding author:

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

[lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br](mailto:lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br)

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





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

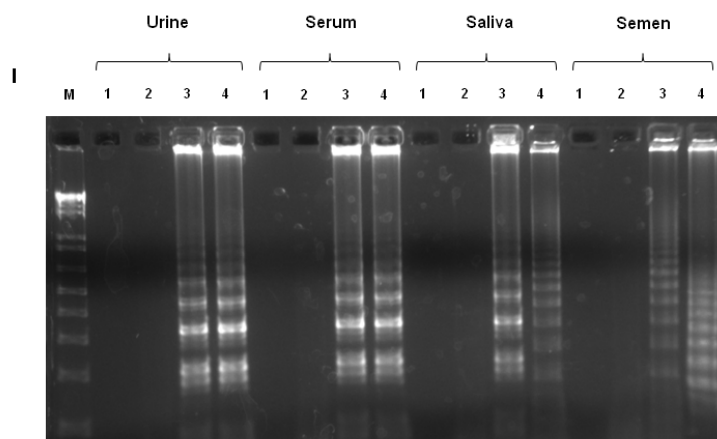
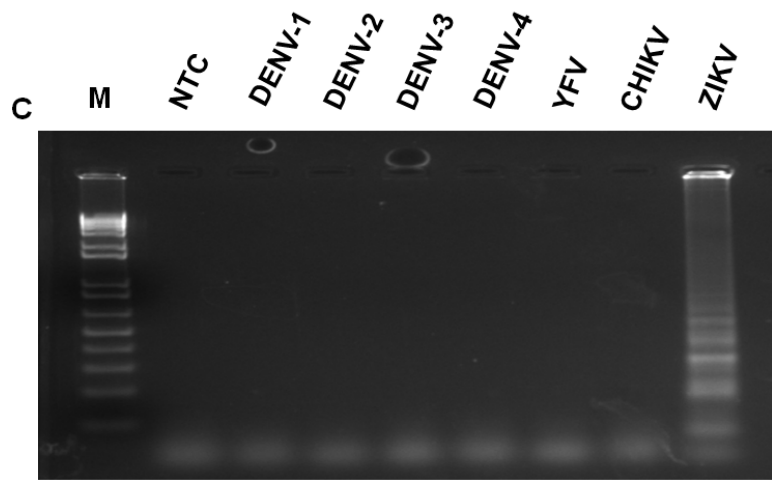
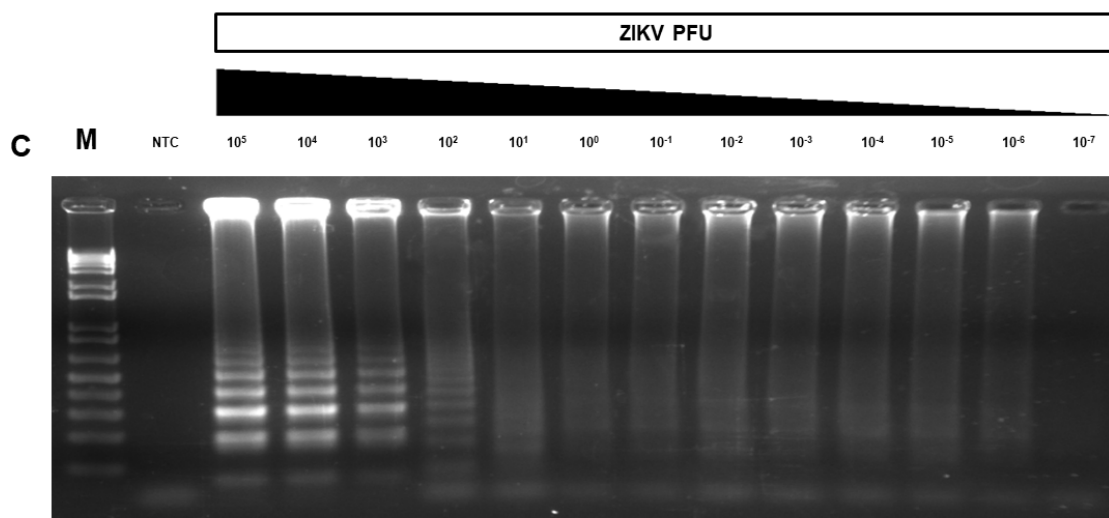


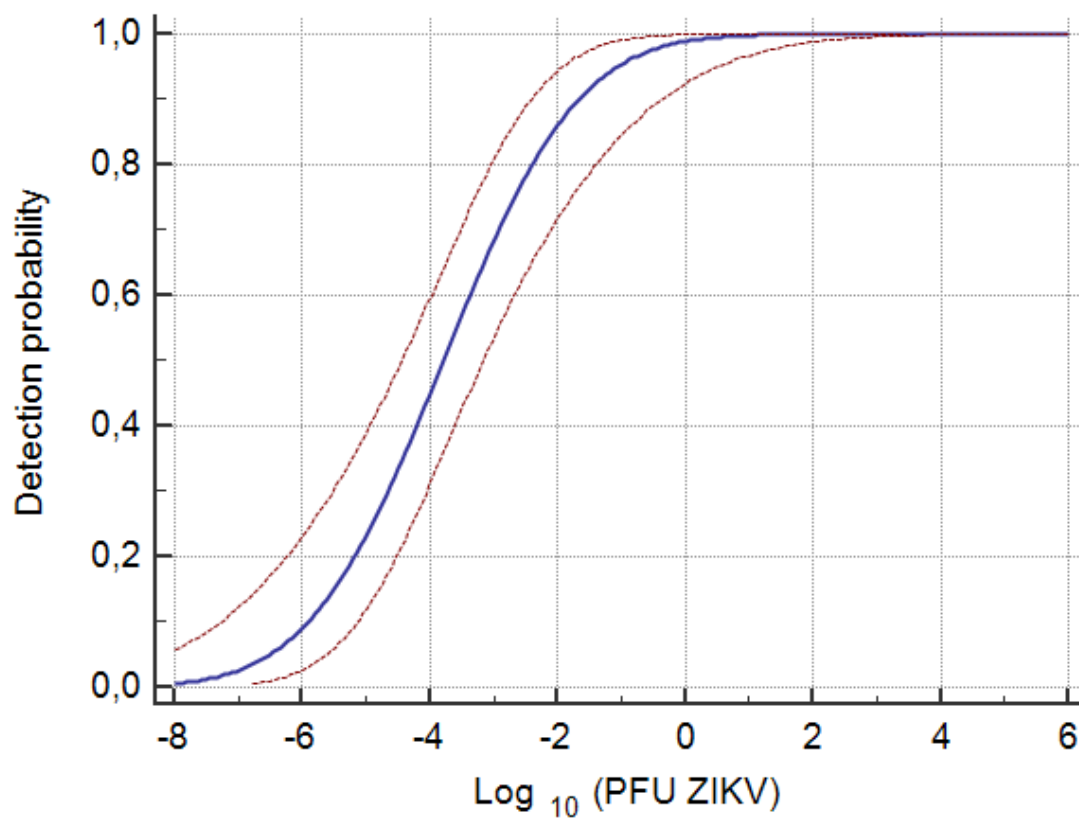
Figure S3. Original image of the gel shown in Figure 3.



**Figure S4. Original image of the gels shown in Figure 4.**



**Figure S5. Limit of detection of the ZIKV RT-LAMP assay.** The probit regression analysis curve was obtained from ten replicates of serial dilutions from human serum ( $10^5 - 10^{-7}$  PFU) using MedCalc software. The limit of detection of RT-LAMP at 95% probability was  $-1.07 \log_{10}$  PFU of ZIKV with confidence interval from  $-1.93$  to  $0.49$ .



**Table S1. Human samples used for RT-LAMP validation.**

<b>Sample (ID)</b>	<b>Ct value</b>	<b>Biological sample</b>	<b>Result of RT-LAMP</b>
1	21.0	Serum	+
2	22.0	Serum	+
3	24.2	Serum	+
4	24.5	Serum	+
5	24.7	Serum	+
6	25.0	Serum	+
7	25.0	Serum	+
8	25.2	Serum	+
9	25.8	Serum	+
10	25.9	Serum	+
11	26.4	Serum	+
12	27.0	Serum	+
13	28.0	Serum	+
14	34.0	Serum	+
15	34.0	Serum	+
16	35.8	Serum	+
17	36.0	Serum	+

18	36.0	Serum	+
19	36.7	Serum	+
20	38.0	Serum	+
21	40.3	Serum	+
22	39.0	Serum	+
23	40.3	Serum	+
24	>40.0	Serum	+
25	>40.0	Serum	+
26	>40.0	Serum	-
27	>40.0	Serum	-
28	>40.0	Serum	-
29	>40.0	Serum	-
30	>40.0	Serum	-
31	>40.0	Serum	-
32	>40.0	Serum	-
33	>40.0	Serum	-
34	>40.0	Serum	-
35	>40.0	Serum	-
36	>40.0	Serum	-

37	>40.0	Serum	-
38	>40.0	Serum	-
39	>40.0	Serum	-
40	>40.0	Serum	-
41	>40.0	Serum	-
42	>40.0	Serum	-
43	>40.0	Serum	-
44	>40.0	Serum	-
45	>40.0	Serum	-
46	>40.0	Serum	-
47	>40.0	Serum	-
48	>40.0	Serum	-
49	>40.0	Serum	-
50	>40.0	Serum	-
51	>40.0	Serum	-
52	>40.0	Serum	-
53	>40.0	Serum	-
54	>40.0	Serum	-
55	>40.0	Serum	-

56	>40.0	Serum	-
57	>40.0	Serum	-
58	>40.0	Serum	-
59	>40.0	Serum	-
60	>40.0	Serum	-
61	>40.0	Serum	-
62	>40.0	Serum	-
63	>40.0	Serum	-
64	>40.0	Serum	-
65	>40.0	Serum	-
66	>40.0	Serum	-
67	>40.0	Serum	-
68	>40.0	Serum	-
68	>40.0	Serum	-
70	>40.0	Serum	-
71	>40.0	Serum	-
72	>40.0	Serum	-
73	>40.0	Serum	-
74	>40.0	Serum	-



75	>40.0	Serum	-
76	>40.0	Serum	-
77	>40.0	Serum	-
78	>40.0	Serum	-
79	>40.0	Serum	-
80	>40.0	Serum	-
81	>40.0	Serum	-
82	>40.0	Serum	-
83	>40.0	Serum	-
84	>40.0	Serum	-
85	>40.0	Serum	-
86	>40.0	Serum	-
87	>40.0	Serum	-
88	>40.0	Serum	-
89	>40.0	Serum	-
90	>40.0	Serum	-
91	>40.0	Serum	-
92	>40.0	Serum	-
93	>40.0	Serum	-

94	>40.0	Serum	-
95	>40.0	Serum	-
96	>40.0	Serum	-
97	>40.0	Serum	-
98	>40.0	Serum	-
99	>40.0	Serum	-
100	>40.0	Serum	-

**Table S2. Costs associated with the RT-LAMP for ZIKV detection developed in this study, per one reaction (prices are based on Brazilian reagent prices at the time of the study, and are converted to US\$).**

<b>Reagent</b>	<b>Price (\$)</b>	<b>No. of reactions</b>	<b>Value per reaction (\$)</b>
Bst 3.0 DNA Polymerase (NEB)	525,23	3,000	0,175
Set of primers (IDT)	72,40	3,611	0,020
SYBR (Invitrogen)	787,69	10,000	0,078
dNTPs (Invitrogen)	201,38	4,545	0,044
RNase free water - 50mL (Promega)	56,00	11,111	0,005
<b>Total</b>			<b>0,322</b>

**Table S3. Costs associated with the RT-qPCR for ZIKV detection used in this study, per one reaction (prices are based on Brazilian reagent prices at the time of the study, and are converted to US\$).**

<b>Reagent</b>	<b>Price (\$)</b>	<b>No. of reactions</b>	<b>Value per reaction (\$)</b>
RNA Extraction Kit (QIAGEN)	1.993,84	250	7,975
Primers and probe (IDT)	759,38	2,125	0,357
One-Step (QuantiNova Probe RT-PCR Kit)	923,07	500	1,846
RNase free water - 50mL (Promega)	56,00	3,787	0,014
96-well Plate (Thermo Fisher Scientific)	98,4	960	0,102
Sealing Tape Optically (Thermo Fisher Scientific)	332,30	9,600	0,034
Total			10,328

**ANEXO H – Material suplementar do artigo publicado****Field validation of the performance of paper-based tests for the detection of the Zika and chikungunya viruses in serum samples**

Margot Karlikow<sup>\*1</sup>, Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>\*2</sup>, Yuxiu Guo<sup>\*1</sup>, Seray Cicek<sup>\*1</sup>, Larissa Krokovsky<sup>\*3</sup>, Paige Homme<sup>1</sup>, Yilin Xiong<sup>1</sup>, Talia Xu<sup>1</sup>, Maria-Angelica Calderón-Peláez<sup>4</sup>, Sigrid Camacho-Ortega<sup>4</sup>, Duo Ma<sup>5</sup>, Jurandy Junior Ferraz de Magalhaes<sup>2,6,7</sup>, Barbara Nayane<sup>2</sup>, Diego Guerra de Albuquerque Cabral<sup>2,6</sup>, Katariina Jaenes<sup>1</sup>, Polina Sutyryna<sup>1</sup>, Tom Ferrante<sup>8</sup>, Andrea Denisse Benitez<sup>9</sup>, Victoria Nipaz<sup>9</sup>, Patricio Ponce<sup>9</sup>, Darius G. Rackus<sup>1,10,11</sup>, James J. Collins<sup>8,12,13,14,15,16</sup>, Marcelo Paiva<sup>3</sup>, Jaime E. Castellanos<sup>4</sup>, Varsovia Cevallos<sup>9</sup>, Alexander A. Green<sup>17</sup>, Constância Ayres<sup>3</sup>, Lindomar Pena<sup>2</sup>, Keith Pardee<sup>1,18\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, ON, Canada M5S3M2.

<sup>2</sup> Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Entomology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>4</sup> Instituto de Virologia, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

<sup>5</sup> Biodesign Center for Molecular Design and Biomimetics, The Biodesign Institute and the School of Molecular Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ, 85287, United States of America.

<sup>6</sup> Pernambuco State Central Laboratory (LACEN/PE), Department of Virology, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>7</sup> University of Pernambuco (UPE), Serra Talhada Campus, Serra Talhada, Pernambuco, Brazil.

<sup>8</sup> Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering, Harvard University, Boston, MA 02115, USA.

<sup>9</sup> Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez", Ecuador.

<sup>10</sup> Department of Chemistry and Biology, Ryerson University, 350 Victoria St., Toronto, ON, M5B 2K3 Canada.

<sup>11</sup> Institute of Biomedical Engineering, Science and Technology, 209 Victoria St., Toronto, ON M5B 1T8, Canada.

<sup>12</sup> Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge, MA 02139, USA.

<sup>13</sup> Institute for Medical Engineering and Science, MIT, Cambridge, MA 02139, USA.

<sup>14</sup> Synthetic Biology Center, MIT, Cambridge, MA 02139, USA.

<sup>15</sup> Harvard-MIT Program in Health Sciences and Technology, Cambridge, MA 02139, USA.

<sup>16</sup> Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA 02142, USA.

<sup>17</sup> Department of Biomedical Engineering, Boston University, Boston, MA 02215, USA.

<sup>18</sup> Department of Mechanical and Industrial Engineering, University of Toronto, Toronto, M5S 3G8 ON, Canada

\* Equal contribution, \* Corresponding author

## **Table of contents**

### **Figures:**

Supplementary Fig. 1: Graphical workflow.

Supplementary Fig. 2: PLUM software application graphical user interface (GUI).

Supplementary Fig. 3: Comparison of the PLUM (left panel) versus the commercial plate reader (right panel) for quantitative readings of the assays.

Supplementary Fig. 4: Schematic comparing the optical design of PLUM versus a conventional plate reader.

Supplementary Fig. 5: RT-qPCR data for Zika virus detection and threshold design.

Supplementary Fig. 6: Data from screening of candidate chikungunya virus toehold switch-based sensors.

Supplementary Fig. 7: RT-qPCR data for CHIKV detection and threshold design.

**Table 1:**

Sequences

**Table 2:**

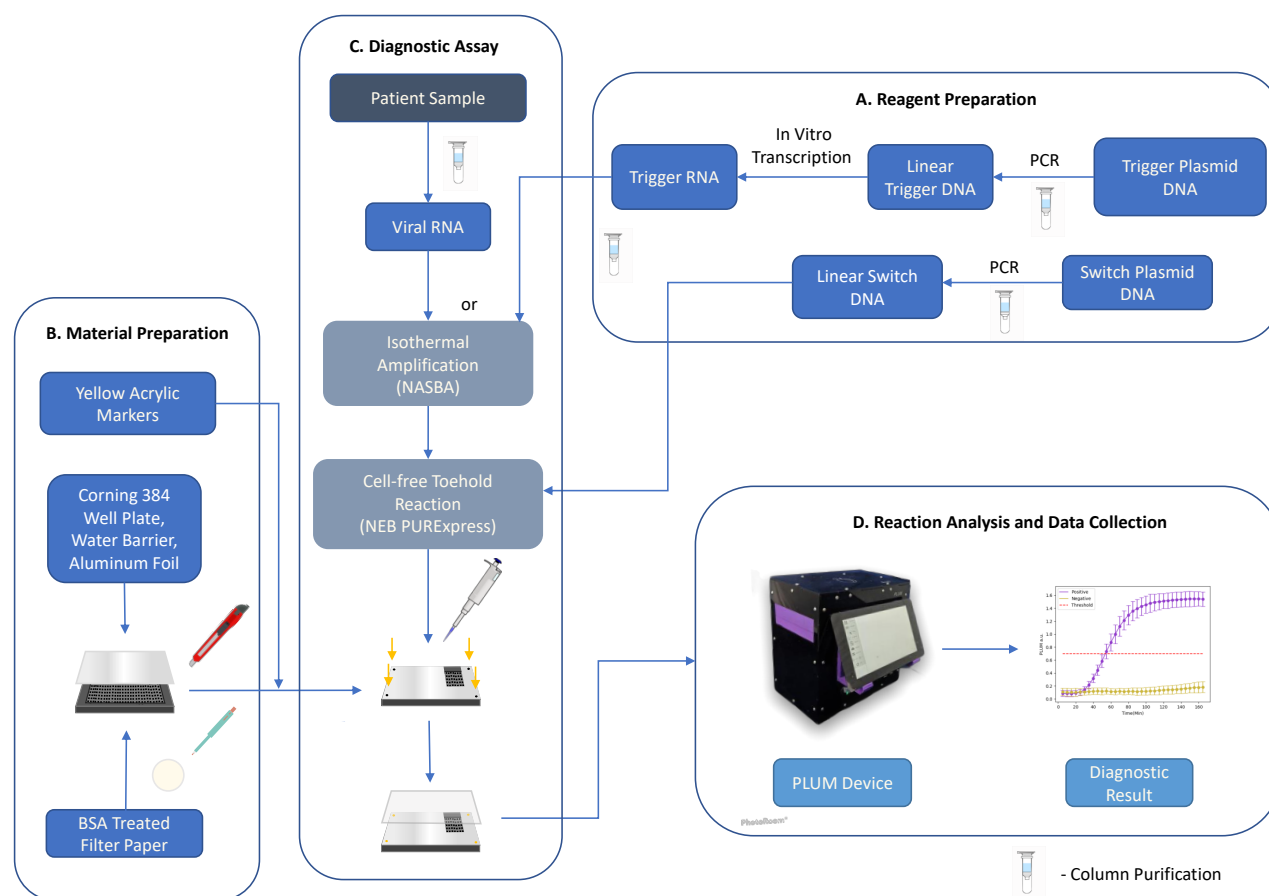
Cost analysis of the test

**SI Toehold switch background information**

**SI RNA copy number calculation**

**SI Documentation for International Field Work**

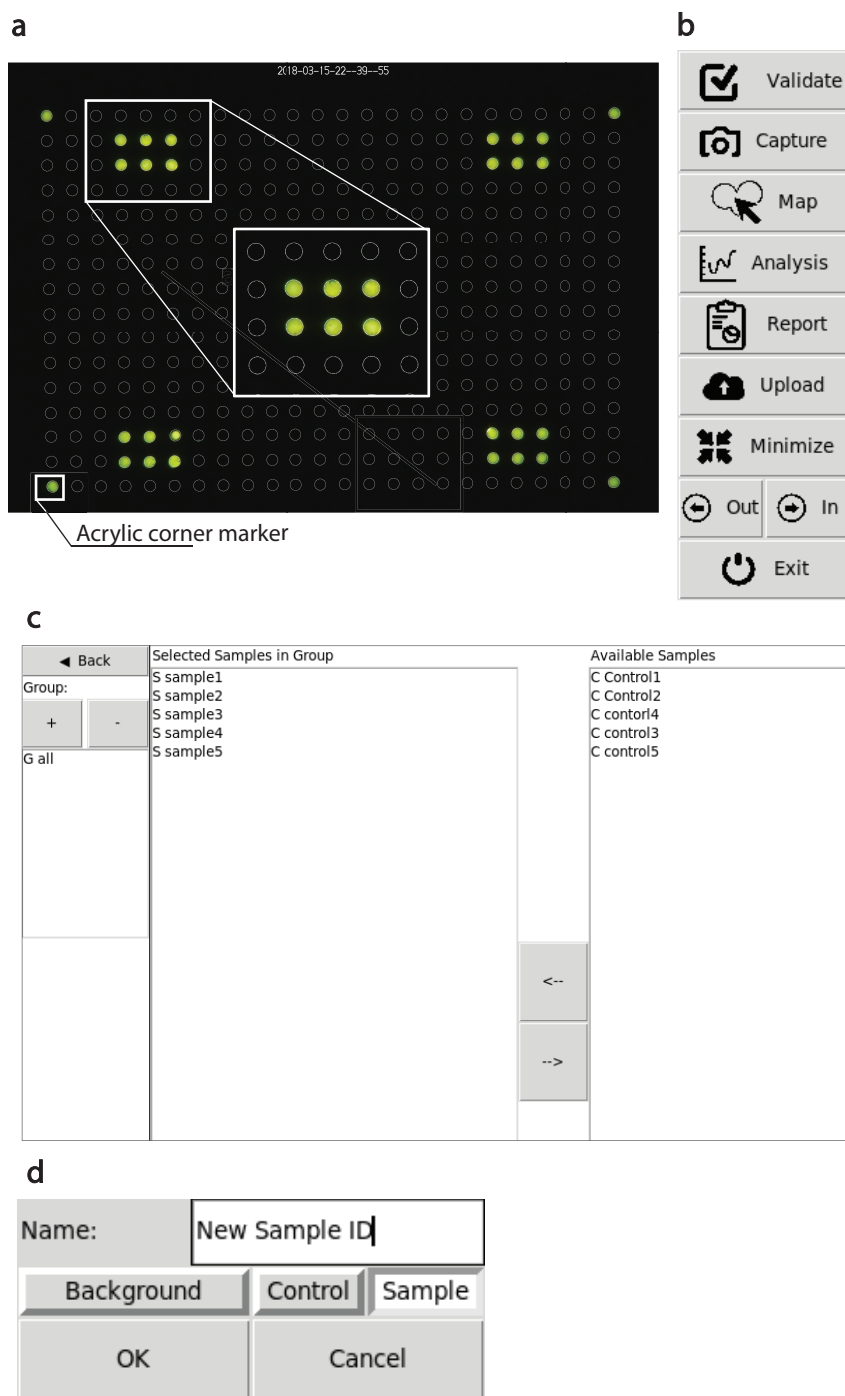
**SI Hardware:** Supplemental Files for Electronic Optical Reader



**Supplementary Fig. 1. Graphical workflow.** **a**, Reagent preparation: Linear DNA for toehold switches is obtained by PCR from a plasmid vector. Similarly, positive control trigger DNA is obtained from plasmids via PCR and subsequently *in vitro* transcribed into RNA. Column purification steps are indicated. **b**, Material preparation: Yellow acrylic markers are laser-cut to fit into the four corners of a 384-well plate. Two mm holes are punched out from BSA-treated filter paper using a 2mm biopsy punch and deposited in the bottom of each reaction well. The wells surrounding the reaction are then filled with water and an aluminum foil seal is placed on the plate. Using a knife, only the reaction wells are cut out. **c**, Diagnostic assay: Viral RNA is extracted from patient samples and then amplified through NASBA isothermal amplification, alongside positive control trigger RNA. The amplification product from NASBA is then added to cell-free reactions

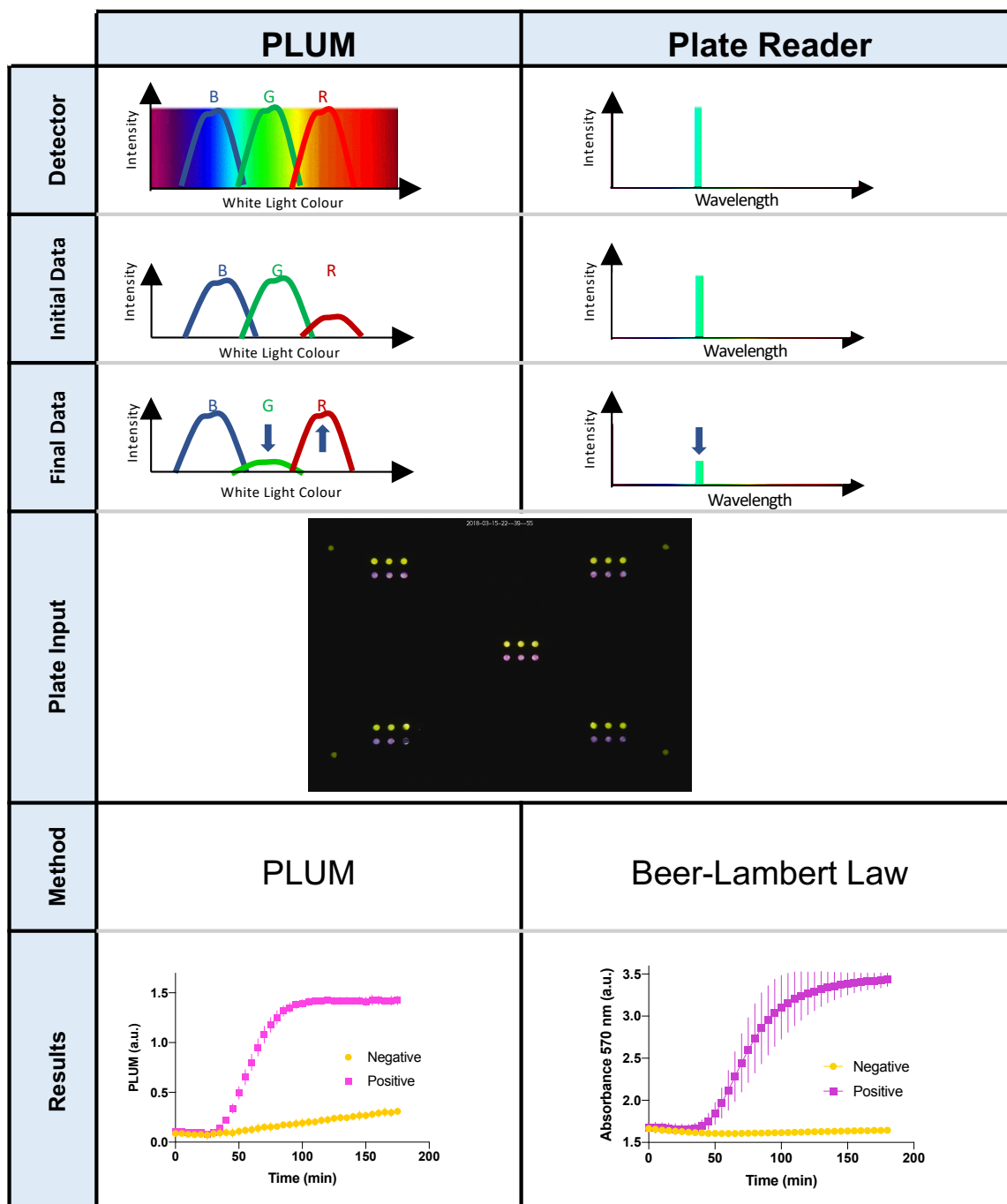


with linear switch DNA. Clear PCR film is applied to the plate to seal the reactions. The plate is placed inside the pre-incubated PLUM device. **d**, Reaction analysis and data collection: The PLUM software recognizes the plate and continues to capture the reaction (5 min intervals) over the next three hours. At the end of the reaction, the software analyzes the images generated, determining whether a purple to yellow color change has occurred in each well. PLUM generates a graphical report, which indicates whether the sample is positive or negative using a pre-determined threshold value.



**Supplementary Fig. 2. PLUM software application graphical user interface (GUI). a,** Automated well alignment. Image of a 384-well plate captured from the bottom by the PLUM camera. Regions of interest (ROIs) are automatically identified by the PLUM software following plate validation. Here, grey circles indicate the ROIs that were identified following alignment of

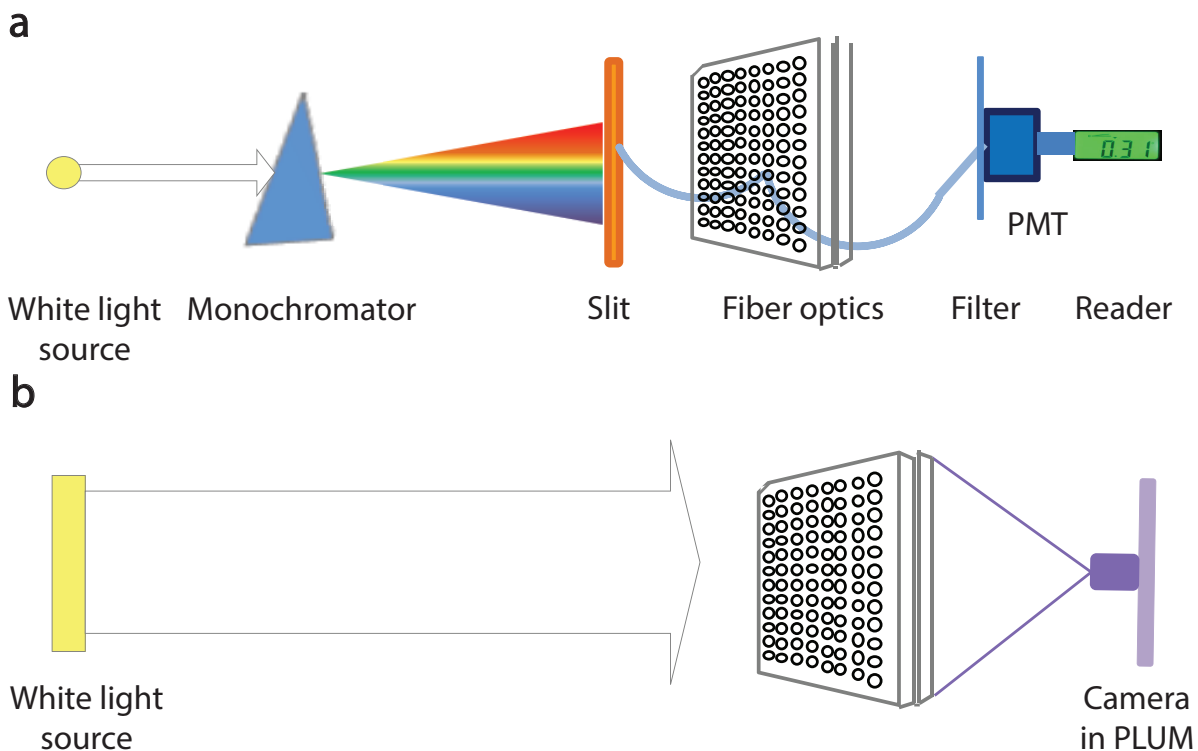
the four yellow acrylic markers in the corner wells of the plate. **b**, Image of the GUI's Launch page in the PLUM software application. The panel contains buttons to initiate tasks including plate validation, image capture, map setup, report generation, cloud upload, window minimization, move tray track and program termination. **c**, Map page of PLUM GUI for subgrouping samples. For automated data analysis and real-time plotting of data on the display, samples can be divided into subgroups (e.g., Sample, Control). New subgroups can be created or deleted using "+" and "-" buttons. Sample ID can be chosen from Available Samples pool (right) and assigned to the Selected Samples in Group pool (left) for subgrouping with arrow buttons. **d**, Map page of PLUM GUI for Sample ID assignment. Here, sample identification and type (i.e., Background, Control and Sample) can be assigned to corresponding well locations (Fig 3b).



**Supplementary Fig. 3. Comparison of quantitative colorimetric analysis methods for the PLUM reader (left panel) versus a conventional plate reader (right panel). PLUM (left column):** Camera-based monitoring of changes in RGB channels for each of the 384 ROIs provides

a summary of color changes in the form of an RGB ratio. The PLUM signal calculator software method places the increasing channel value over the decreasing channel value to provide absorbance-equivalent measurements that can be used to track changes in diagnostic reactions (blue/green). Plate reader (right column): Conventional plate readers monitor transmittance of a narrow band of wavelengths through diagnostic reactions (570 nm). As positive diagnostic samples turn purple, absorbance of the monitored wavelength leads to a decrease in transmitted light from the sample, which can be used to provide a quantitative output.

In order to assess the positional effect of reactions in PLUM, an experiment was performed in biological triplicate, each including a technical triplicate, at five different locations in a plate: four reactions close to the edges of the plate and one at the center of the plate (plate input, and main Fig. 2f,g). Each reaction has a positive (purple) and a negative (yellow) sample. PLUM camera-based monitoring was opposed to a conventional plate reader. As observed in the results (Fig. 2g), sample position in the plate did not introduce significant deviations to positive or negative measurements in either of the methods as demonstrated by the size of the SD. The graph (Fig. 2g) represents one of the biological experiments, including all its technical triplicates at the five different locations (so 15 positives and 15 negatives reactions are plotted). In this Supplementary Fig. 3, only one of the triplicate positive and negative measurements were plotted as the goal was to compare PLUM to a conventional reader.



**Supplementary Fig. 4. Schematic comparing the optical design of PLUM versus a conventional plate reader.** **a**, A conventional plate reader is based on a movable spectrophotometer that is comprised of a monochromator, slit, and fiber optics. This optical monitoring apparatus moves across the plate at each read interval to illuminate and monitor light transmittance from wells. The collected light is filtered and quantified by a photomultiplier tube (PMT) to provide absorbance measurements via a digital reader. **b**, The PLUM device is composed of a white light source with a broad range of wavelengths that cover the visible spectrum and a camera to monitor changes in the light collected from samples. The light box provides even illuminance over the whole plate, which is placed at the focal point of the camera for collection of red, green and blue channel values of all 384 ROIs in parallel.

**a**

Samples	Ct value	Ct value
H <sub>2</sub> O	N.A.	N.A.
DENV-1	N.A.	N.A.
DENV-2	N.A.	N.A.
DENV-3	N.A.	N.A.
DENV-4	N.A.	N.A.
YFV	N.A.	N.A.
ZIKV Am	12.40	12.52
ZIKV Af	N.A.	N.A.
CHIKV	N.A.	N.A.

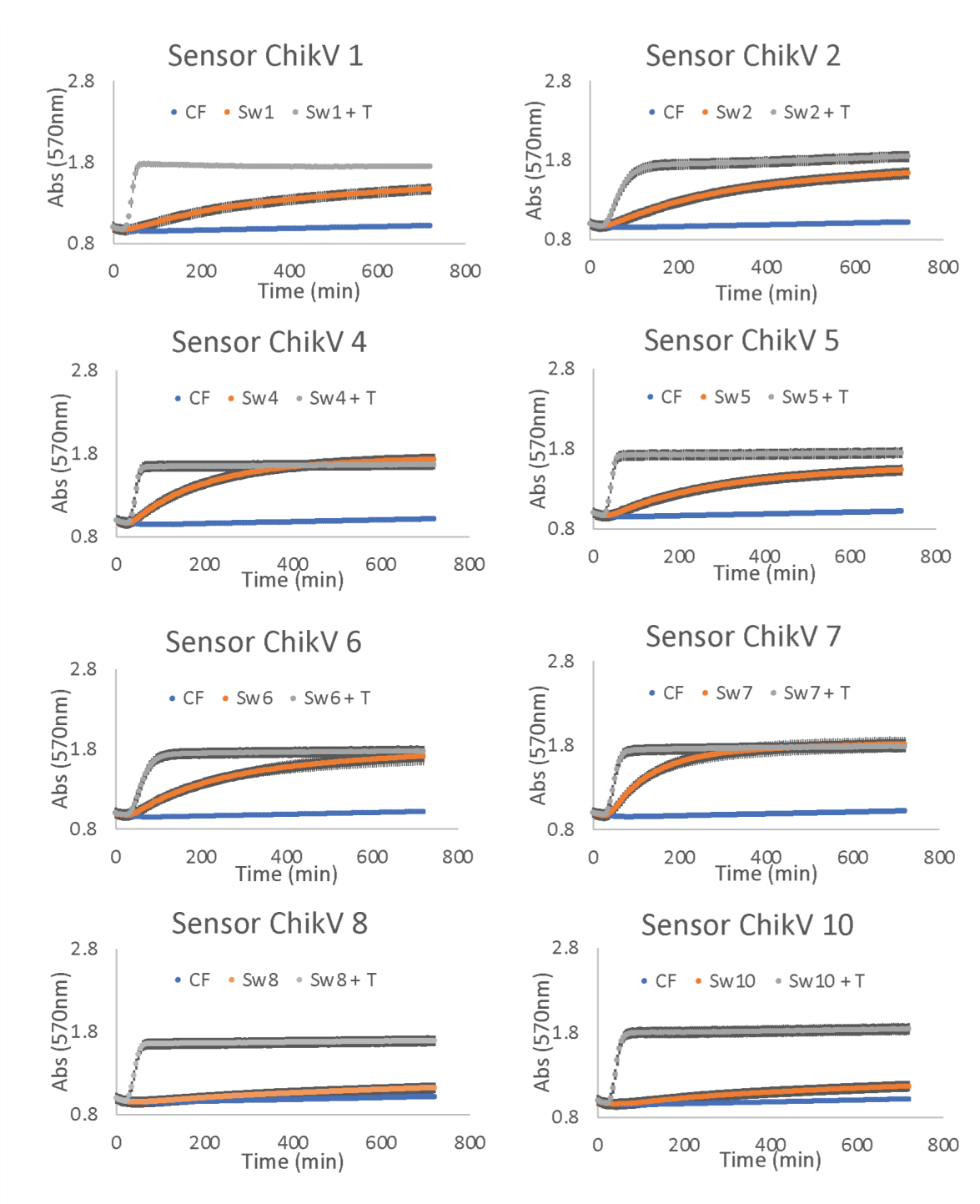
**b**

Samples (PFU/mL)	Ct value	Ct value	Ct mean
H <sub>2</sub> O	N.A.	N.A.	N.A.
10 <sup>-3</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
10 <sup>-2</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
10 <sup>-1</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
10 <sup>0</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
10 <sup>1</sup>	36.07	35.52	35.8
10 <sup>2</sup>	32.71	32.39	32.6
10 <sup>3</sup>	28.45	28.4	28.4
10 <sup>4</sup>	21.37	21.42	21.4
10 <sup>5</sup>	16.75	16.9	16.8

**c**

Time (min)	Threshold in PLUM a.u.	Accuracy	True Positive Samples	False Negative Samples	False Positive Samples	True Negative Samples	Total Samples
70	0.1316676	91.04%	66	7	17	178	268
75	0.1183366	91.04%	68	5	19	176	268
80	0.1280939	92.16%	68	5	16	179	268
85	0.1277769	89.18%	68	5	24	171	268
90	0.1386287	91.42%	68	5	18	177	268
95	0.141508	91.42%	68	5	18	177	268
100	0.1429698	95.15%	68	5	8	187	268
105	0.1616789	95.15%	70	3	10	185	268
110	0.144444	95.15%	68	5	8	187	268
115	0.1486262	96.27%	68	5	5	190	268
120	0.1631186	94.40%	68	5	10	185	268
125	0.1668622	97.39%	68	5	2	193	268
130	0.160333	98.51%	69	4	0	195	268

**Supplementary Fig. 5. RT-qPCR data for Zika virus detection and threshold design.** **a**, RT-qPCR data for analytical specificity of Zika virus detection. **b**, RT-qPCR data for analytical sensitivity of Zika virus detection. Zika virus concentration is reported as PFU/mL. For both (a) and (b), experiments were performed in biological triplicate, each containing a technical duplicate. Ct values displayed are technical duplicates of a representative experiment. **c**, Threshold values of arbitrary unit (a.u.) for Zika virus diagnostics established using normalized readings from analytical sensitivity tests performed in PLUM device. Column 1 and 2 is the time-based threshold value determined in PLUM for Zika Virus detection. Column 3 is the overall accuracy of the detection in PLUM compared to the RT-qPCR that was ran in parallel as listed within column 4 to 8.



**Supplementary Fig. 6. Data from screening of top performing candidate chikungunya virus toehold switch-based sensors.** Time-course monitoring of LacZ expression (570 nm) from eight candidate toehold switch-based sensors (Sw; 33 nM) +/- synthetic trigger RNA (T) containing a fragment corresponding to the chikungunya viral genome (2  $\mu$ M). Sensor ChikV 09 (not displayed



here) was the best performer and was the one used in the study. Each experiment was performed in biological triplicate, each containing a technical triplicate. Graphs are representative experiments of one of the biological triplicates using the mean of the technical triplicate  $\pm$  SD. Absorbance at 570 nm are normalized a t=0 and displayed as arbitrary units.

**a**

Samples	Ct value	Ct value
H2O	N.A.	N.A.
DENV-1	N.A.	N.A.
DENV-2	N.A.	N.A.
DENV-3	N.A.	N.A.
DENV-4	N.A.	N.A.
YFV	N.A.	N.A.
ZIKV Am	N.A.	N.A.
ZIKV Af	N.A.	N.A.
MAYV	N.A.	N.A.
CHIKV-PE	11.8	11.8
CHIKV-PB	10.8	11

**b**

Samples (PFU/mL)	Ct value	Ct value	Ct mean
H2O	N.A.	N.A.	N.A.
10 <sup>-3</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
10 <sup>-2</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
10 <sup>-1</sup>	36.4	37.4	36.9
10 <sup>0</sup>	33.6	33.5	33.6
10 <sup>1</sup>	30.6	30.5	30.6
10 <sup>2</sup>	27.3	26.9	27.1
10 <sup>3</sup>	23.2	23.1	23.2
10 <sup>4</sup>	19.5	19.8	19.7
10 <sup>5</sup>	15.6	15.5	15.6

**c**

Time (min)	Threshold in PLUM a.u.	Accuracy	True Positive Samples	False Negative Samples	False Positive Samples	True Negative Samples	Total Samples
75	0.08	98.46%	12	1	0	52	65
80	0.09	98.46%	12	1	0	52	65
85	0.07	98.46%	12	1	0	52	65
90	0.11	98.46%	12	1	0	52	65
95	0.11	98.46%	12	1	0	52	65
100	0.13	98.46%	12	1	0	52	65
105	0.14	98.46%	12	1	0	52	65
110	0.15	98.46%	12	1	0	52	65
115	0.15	98.46%	12	1	0	52	65
120	0.16	98.46%	12	1	0	52	65

**Supplementary Fig. 7. RT-qPCR data for CHIKV detection and threshold design.** **a**, RT-qPCR data for analytical specificity of chikungunya virus detection. **b**, RT-qPCR data for analytical sensitivity of chikungunya virus detection. Chikungunya virus concentration is reported as PFU/mL. For both (a) and (b), experiments were performed in biological triplicate, each containing a technical duplicate. Ct values displayed are technical duplicates of a representative experiment. **c**, Threshold values of arbitrary unit (a.u.) for chikungunya diagnostics established using normalized readings in analytical sensitivity tests performed in PLUM device. Column 1 and 2 is the time-based threshold value determined in PLUM for CHIKV detection. Column 3 is the overall accuracy of the detection in PLUM compared to the RT-qPCR that was ran in parallel as listed within column 4 to 8.

**Table 1. Sequences.**

<b>NASBA primers</b>	<b>Sequence</b>	<b>Length</b>
NASBA ZIKV_F	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCAC AGTGGGATGATCGTTA	51
NASBA ZIKV_R	CCTGTCCTCGGTTCAACAATCAA	22
NASBA CHIKV_F	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACA CAACTGGTACTGCAGA	51
NASBA CHIKV_R	AATGGTGCTGTGTGCTGCAGCG	22
<b>Sensors</b>		
ZIKV sensor	TTTCGCTCTATTCTCATCAGTTTCATGTCCTGTGTGCG GACTTTAGAACAGAGGAGATAAAGATGGACACAG GACACAACCTGGCGGCAGCGCAAAG	97
CHIKV_s_TA_10	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGCGTTCTTTTAGC CAATACTTGAAGCCAGATGGTGCCGTTATAGTTATG AACAGAGGAGACATAACATGAACGGCACCAACGC CGTTAACCTGGCGGCAGCGCAA	128
<b>Triggers</b>		
ZIKV trigger	CTAATACGACTCACTATAGGGCCAGCACAGTGGGA TGATCGTTAATGACACAGGACATGAAACTGATGAG AATAGAGCGAAAGTTGAGATAACGCCCAATTCACC AAGAGCCGAAGCCACCCTGGGGGGGTTTGGGAAGCC TAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACAGGtagcataacccc ttggggcctctaaacgggtcttgaggggtttttg	215
CHIKV trigger	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGTTCATAGTGGG GCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTCGACAACAA AATCGTGGTGTACAAAGGCGACGTCTACAACATGG ACTACCCGCCCTTCGGCGCAGGAAGACCAGGACAA TTTGGCGACATCAAAGTCGCACGCCTGAGAGCGA	357

	AGACATCTATGCTAACACACAACCTGGTACTGCAGA GACCGTCCGCGGGTACGGTGCACGTGCCGTACTCT CAGGCACCATCTGGCTTCAAGTATTGGCTAAAAGA ACGAGGGGCGTCGCTGCAGCACACAGCACCATTG GCTGTCAAATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGATG AACTGC	
T3T8 lentivirus trigger	GCCAGCACAGTGGGATGATCGTTAATGACACAGGA CATGAAACTGATGAGAATAGAGCGAAAGTTGAGAT AACGCCCAATTCACCAAGAGCCGAAGCCACCCTGG GGGGTTTGAAGCCTAGGACTTGATTGTGAACCG AGGACAGGactcgataaGCTGACCCTAATAGTGGCCATC ATTTTGCTCGTGGCGCACTACATGTACTTGATCCCA GGGCTGCAGGCAGCAGCTGCGCGTGCTGCCAGAA GAGAACGGCAGCTGGCATCATGAAGAACCCTGTTG TGGATGG	292
<b>PCR primers</b>		
<i>in pCOLA-Duet backbone</i>		
PCR sensor F	aattgactctctccggg	20
PCR sensor R	AGTGTGACCGTGTGCTTCTC	20
<i>in pET-15 backbone</i>		
PCR trigger_F	CTCGACGCTCTCCCTTATGC	20
PCR trigger_R	Gcagtcaggcaccgtgatgaaatc	25
<i>dsDNA CHIKV trigger</i>		
PCR CHIKV_F	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGTTCATAGTGG	34
PCR CHIKV_R	GCAGTTCATCGCTCTTACCG	20
<b>qPCR primers</b>		

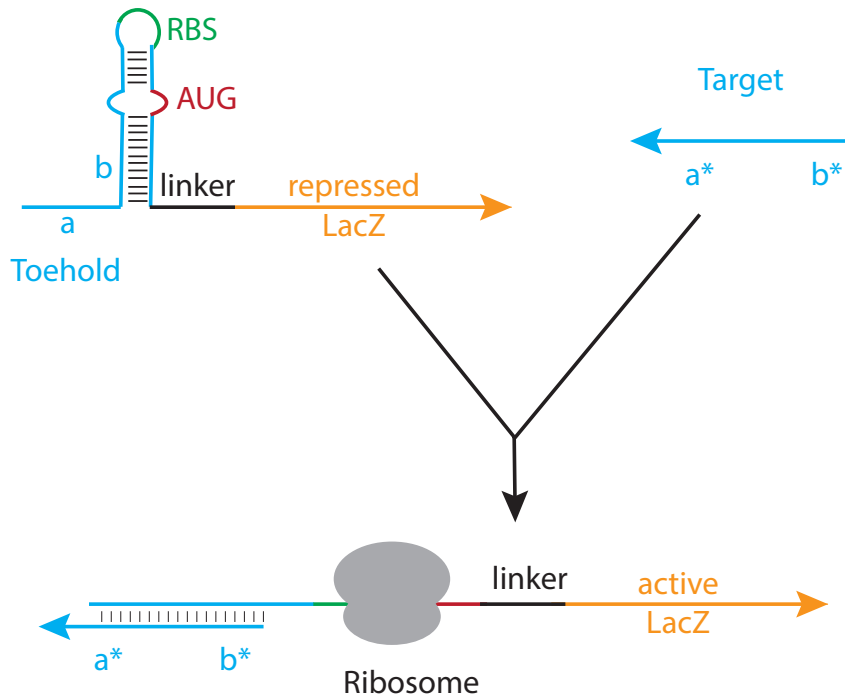
RT-qPCR ZIKV_F 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	17
RT-qPCR ZIKV_R 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	24
RT-qPCR ZIKV_P 1107	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA- MGB	39
RT-qPCR CHIKV_F	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGTTCATAGTGG	34
RT-qPCR CHIKV_R	GCAGTTCATCGCTCTTACCG	20
RT-qPCR CHIKV_P 6919	FAM-AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG	27
<b>Best performing CHIKV sensors</b>		
CHIKV_s_TA_ 01	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGTTTTAGCCAATA CTTGAAGCCAGATGGTGCCTGAGAGTTATAGTTAT GAACAGAGGAGACATAACATGAACTCTCAGAACAG AGTTAACCTGGCGGCAGCGCAA	128
CHIKV_s_TA_ 02	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGAAATTGTCCTG GTCTTCCTGCGCCGAAGGGCGGGTAGTTATAGTTAT GAACAGAGGAGACATAACATGAACTACCCGAACGT AGTTAACCTGGCGGCAGCGCAA	128
CHIKV_s_TA_ 04	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGAATACTTGAAG CCAGATGGTGCCTGAGAGTACGGCAGTTATAGTTA TGAACAGAGGAGACATAACATGAACTGCCGTAACG CAGTTAACCTGGCGGCAGCGCAA	128
CHIKV_s_TA_ 05	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGATAGATGTCTTC GCTCTCAGGCGTGCGACTTTGGATGTTATAGTTATG AACAGAGGAGACATAACATGAACATCCAAAACGAT GTTAACCTGGCGGCAGCGCAA	128

CHIKV_s_TA_06	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGACTTGAAGCCA GATGGTGCCTGAGAGTACGGCACGTGTTATAGTTA TGAACAGAGGAGACATAACATGAACACGTGCAACC GTGTTAACCTGGCGGCAGCGCAA	128
CHIKV_s_TA_07	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGAGCATAGATGT CTTCGCTCTCAGGCGTGCGACTTTGGTTATAGTTAT GAACAGAGGAGACATAACATGAACCAAAGTAACTT GGTTAACCTGGCGGCAGCGCAA	128
CHIKV_s_TA_08	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGCGGACGGTCTC TGCAGTACCAGTTGTGTGTTAGCATGTTATAGTTAT GAACAGAGGAGACATAACATGAACATGCTAAACCA TGTTAACCTGGCGGCAGCGCAA	128
CHIKV_s_TA_10	GCGCTAATACGACTCACTATAGGGCGTTCTTTTAGC CAATACTTGAAGCCAGATGGTGCCGTTATAGTTATG AACAGAGGAGACATAACATGAACGGCACCAACGC CGTTAACCTGGCGGCAGCGCAA	128

**Table 2. Cost analysis of the test.**

	<b>Product cost USD</b>	<b>Product volume (uL)</b>	<b>Volume (uL) per reaction</b>	<b>Number of reactions per product</b>	<b>Cost / reaction - USD</b>
NASBA	254.00	480.00	5.0000	96.00	2.65
NASBA primers	8.52	800.00	0.1000	8000.00	0.00
RNase inhibitors NASBA	51.85	75.00	0.0500	1500.00	0.03
1 well in plate 384	1157.00	19200.00	1.0000	19200.00	0.06
PureExpress	2377.04	1000.00	1.0700	934.58	2.54
Per sensor	1481.48	25	0.0266	939.85	1.58
RNase inhibitors CF	51.85	75.00	0.0133	5639.10	0.01
CPRG	85.93	10000.00	0.1920	52083.33	0.00
Paper	0.20			300.00	0.00
<b>TOTAL cost per reaction</b>					<b>6.88</b>

## SI Toehold switch background information



Toehold switches are a novel class of riboregulators described for the first time in 2014<sup>1</sup>. These programmable regulators enable post-transcriptional activation of protein translation through linear-linear RNA interactions and subsequent strand displacement.

Toehold switches contain:

- Defined regions
  - Ribosomal binding site (RBS) of the mRNA, sequestered in the hairpin
  - AUG start codon, sequestered in the hairpin
  - 21-nt linker between the hairpin and the regulated gene
  - The sequence of the gene being regulated (e.g., LacZ)
- Target-dependent region:
  - A sequence specific region (a,b), complementary to a corresponding trigger RNA ( $a^*,b^*$ )



The riboregulator folds into the hairpin secondary structure depicted in the schematic above and acts as a repressor of translation. In this conformation, the RBS as well as the start codon are sequestered into the hairpin and are not accessible to the ribosome.

Upon binding to its sequence specific trigger RNA (a\*,b\*), the toehold switch linearizes, releasing the RBS sequence and enabling expression of the downstream gene, here LacZ.

Moreover, the toehold switch mechanism is able to tolerate up to 4-nt mismatches between the target sequence and 25-nt toehold domain, allowing it to accommodate the intrinsic virus sequence variability (~11%)<sup>2</sup>.

### SI RNA copy number calculation

In order to determine the RNA copy number per  $\mu\text{L}$  used in each NASBA reaction, the following example calculation was used:

Example calculation of the copy number of synthetic RNA molecule of Zika virus.

$$[C] = A_{260} / \epsilon$$

Where  $[C]$  represents the concentration of the solution,  $A_{260}$  represents the absorbance at 260 nm of the solution, and where  $\epsilon$  represents the extinction coefficients of the molecule present in the solution (here, the synthetic RNA).

$\epsilon$  values for the Zika virus synthetic RNA or chikungunya virus synthetic RNA

$$\epsilon_{\text{ZIKV}} = 1,506,900 \text{ L} / (\text{mol} \times \text{cm})$$

$$\epsilon_{\text{CHIKV}} = 3,433,100 \text{ L} / (\text{mol} \times \text{cm})$$

Following *in vitro* RNA synthesis, absorbance of the solution at 260 nm was determined using a nanodrop. In this case,  $A_{260} = 3.10$

$$\text{So } [C] = 3.10 / 1,506,900 = 2.057 \mu\text{M}$$

$[C]$  can also be expressed as:

$$[C] = n / V$$

Where  $n$  is the moles (mol) and  $V$  is the volume of the system expressed in liters (L).

$$\text{So } n = [C] \times V.$$

$$\text{And in } 1 \mu\text{L}, n = 2.057 \times 10^{-6} \times 10^{-6} = 2.057 \times 10^{-12} \text{ mol.}$$

Finally, the number of molecules ( $m$ ) per mol:

$$m = n \times A$$

Where  $A$  is the Avogadro number and  $A = 6.022 \times 10^{23}$  molecules / mol.

$$\text{In } 1 \mu\text{L}, m = 2.057 \times 10^{-12} \times 6.022 \times 10^{23} = 1.24 \times 10^{12} \text{ molecules.}$$

Serial dilutions of the solution were performed, from  $1.24 \times 10^6$  molecules /  $\mu\text{L}$  to 1.24 molecules /  $\mu\text{L}$  (or  $1.239 \times 10^0$  molecules /  $\mu\text{L}$ ).

## SI Documentation for international field work

The following information and documents are included as an example of what our team prepared in planning for international field work. This information is provided as a guide, and requirements for importation/exportation of instruments, reagents, and samples may vary from country to country. Further, in some cases, the documents we prepared were required and in others, they were not necessary. Documents S1.2-1.6 were kept on person during travel and duplicate copies were stored in the luggage. We include templates for these documents that can be used as a guide when preparing for international field work. It is important to always check the local laws and requirements for customs before travelling.

In this section, the “Guest” refers to the research team (and/or their institution) travelling to conduct the field work and “Host” refers to the researchers (and/or their institution) in the country where the field work was conducted.

Table S1: List of documents kept on person for travel with scientific instruments and reagents

File ID	Document	Justification	Prepared by	
			Guest	Host
S1.1	Ethics approval	Work involving collection of patient samples requires research ethics board approval.	x	x
S1.2	Letter of donation	Explains that the consumables and reagents used in the field work constitute a donation from the Guest institution to the Host institution, that the nature of the work is non-commercial, and	x	

		that no money was given in consideration.		
S1.3	Letter of importation	Explains what the equipment, consumables, and reagents are and the purpose of the field work. One copy in English and one copy in the Host country's official language.		x
S1.4	Bill of materials (BOM) for PLUM	Details the components of the PLUM instrument and gives the costs of each item.	x	
S1.5	Manifest of equipment, consumables, and reagents	An itemized inventory to account for all the laboratory materials travelling to the Host country. The items listed should correspond with the Letter of donation.	x	
S1.6	Supporting documents	Past research papers, press releases, grant award letters, and other documents to demonstrate that the field work is part of sustained and legitimate academic research work.	x	

*S1.2 Letter of Donation Template*

(On Guest institutional letterhead)

From: Associate Dean of Research (or equivalent role) at Guest institution

### **Certificate of Donation**

Please be advised that the equipment and supplies listed on the attached document constitute a gift to [Host institution] in [city, country] from [Guest institution] in [city, country] for the ongoing research project entitled “[title of research project].”

It is my understanding that the items will be used for the express purpose of [...] by [Host institution] and their collaborating partners. The items will be brought in by [name(s) of traveller(s)], a [role of traveller(s)] as carry-on and check-in luggage [date of flight]. As outlined in the attached document, the consumables will be used during experiments by the team at [Host institution] and the [names of instruments] will return to [Guest country] at the end of the trip.

No money was received or given for these items. These items will not be resold by [Host institution] and have no commercial value.

If you have any questions concerning the donation, please feel free to e-mail me at [email address].

Sincerely,

[Signature]

*SI.3 Letter of importation*

(On Host institutional letterhead)

(Duplicate copy in Host country official language)

From: Host Principal Investigator, Department Chair, or Faculty Dean

To Whom It May Concern:

[Introduction to who the writer is, their role in the research project, the title of the research project, and the dates of the research project. Identification of the travellers from the Guest institution and their role in the research project. Identification of the funding and sponsoring organizations.]

[Lay background of the research project and its relationship to the Host institution's work. Description of the equipment, reagents, and consumables being brought into the country.]

[Request for permission to bring the items into the country. Declaration of the safety and non-toxicity of the reagents. Declaration of the non-commercial value and research-only use of the transported equipment and reagents.]

Sincerely,

[Signature]

*SI.4 Bill of Materials (BOM) for PLUM instrument*

PART	VENDOR SPECIFICATION/CODE	VENDOR	COST (CAD)
Incubator	INCUKIT™ MINI	Incubator Warehouse	\$ 62.49
Strip LEDs	YJ-VTC-RB-5730-12V-56	YUJI LED	\$ 48.88
Servo Motor (Continuous Rotation)	HSR-1425CR	Robotshop	\$ 21.51
Servo Gear	RB-ScT-458	Robotshop	\$ 20.18
Temperature Sensor	DS18B20	Robotshop	\$ 8.85
DC-DC Converter to 5V	5V/3A Step Down Voltage Module 12V to 5V Power Supply with USB Interface	Amazon	\$ 12.99
Micro USB to Mini USB 2.0 Converter	StarTech.com Micro USB to Mini USB 2.0 Adapter M/F UUSBMUSBMF	Amazon	\$ 6.99
DC-DC Converter 5-11V to 12V 2A	DIGITEN DC 6V 5-11V to 12V 2A Step up Converter Regulator	Amazon	\$ 14.19
Keyboard		Amazon	\$ 19.99
Mouse	Edota 2.4G Professional Rechargeable Wireless Gaming Mouse	Amazon	\$ 11.99
Power Bar	12 Volt Power Supply - 7 Amp Standard (12V 7A DC) Adapter	Amazon	\$ 25.51
Power Adapter Head		Digikey	\$ 1.40
Black Acrylic for enclosure	Black 3mm thick Acrylic by 4 foot by 8 foot cut in 12 by 20	McMaster Carr	\$ 21.41
Clear Acrylic	8560K171	McMaster Carr	\$ 1.32
Diffuser Sheets (Matte dura-lar and matte mylar)		Above ground art supplies	\$ 3.29
Raspi 3	Raspberry Pi 3 Model B Board	Amazon	\$ 52.99
Raspi Camera	Raspberry Pi Camera Module V2 - 8 Megapixel,1080p	Amazon	\$ 32.99
Flex Cable	Flex Cable for Raspberry Pi Camera - 24" / 610mm	Amazon	\$ 7.99
Raspi Touch Screen	TOUCHSCREEN LCD DISPLAY	Amazon	\$ 102.95
Solderless Connectors	LED Light Strip Connector	Amazon	\$ 5.00
SD Card	Extreme Pro 32GB	Amazon	\$ 45.03
Screws for display		McMaster Carr	\$ 3.86
Nuts for display		McMaster Carr	\$ 1.00
Hex Stand-off 18-8 Stainless Steel, 1/4" Hex, 1-3/4" Long, 4-40 Thread Size		McMaster Carr	\$ 10.68
Hex stand-off 6/6 Nylon, 1/4" Hex Size, 5/8" Long, 4-40 Thread Size		McMaster Carr	\$ 12.24
4-40 screw 3/16"		McMaster Carr	\$ 0.83
4-40 screw 3/8"		McMaster Carr	\$ 0.90
4-40 screw 7/16"		McMaster Carr	\$ 0.15
4-40 screw 1/2"		McMaster Carr	\$ 1.01
18-8 Stainless Steel Hex Nut		McMaster Carr	\$ 0.29
Rocker Switch		McMaster Carr	\$ 1.26
Power Plug		McMaster Carr	\$ 1.07
Angle brackets		Digikey	\$ 6.40
3d print parts		Shop3d	\$ 2.40
PCB		Active Surplus	\$ 1.95
Adafruit t-cobbler head		Adafruit	\$ 9.94
Wires			\$ 12.00
Microswitch		Digikey	\$ 6.50
Connectors			\$ 4.50
Solder			\$ 1.00

*SI.5 Manifest of equipment, consumables, and reagents*

Materials, Reagents, Equipment List				
Item				
Materials	Quantity Recife	Quantity Toronto	Product ID	Vendor
Corning 384 Well Plates		1 case (50)	CLS3544	Sigma Aldrich
Aluminum Sealing Tape		1 box	95.1995	Sarstedt
PCR Tape		1 box	95.1994	Sarstedt
Biopsy punches		1 box of 15-20	33-31-P/25	McKesson
Tweezers		4	Non-surgical,ex	Amazon
Cutting Pad		3	Any, ex:	Amazon
blades		3		
Whatman® quantitative filter paper, ashless, Grade 42		2 boxes	WHA1442042	Sigma Aldrich
yellow acrylic markers		a tube		
PCR Tubes (Strip/Individual) (0.2mL)			Any	
1.5mL Tubes	1500		Any	
50mL Falcon Tubes	20 tubes		Any	
QIAamp Viral RNA Mini Kit			#52904/52906	Qiagen
Qiagen PCR purification kits	2		28106	Qiagen
Q5 Polymerase		2	M0491L	New England Biolabs
dNTP set		2	N0446S	New England Biolabs
T7 transcribe-RNA Synthesis kit		2	E2040S	New England Biolabs
Reagents				
BSA	0	w filter paper	CAS#9048-46-8	Bioshop Canada
CPRG	1	1	10884308001	Sigma Aldrich
NASBA Liquid Kits		14 kits	SKU: NWK-1	Life Sciences Advanced Technologies Inc.
Rnase Inhibitor		3	M0314S	New England Biolabs
NEB PURExpress kits		5 kits + 2	-	
Nuclease Free Water			Any	
Equipment				
Thermal Cyclers	2			
Nanodrop/Nucleic Acid quantification equipment				
PLUM	1 to 2	1	-	
DNA				
NASBA Primers	2	3		
qPCR Primers		3		
Trigger Linearization Primers		3		
Switch Linearization Primers	2	3		
Switch Linear DNA	50ug	Linearization for 50-75 (2-3 DAYS) PCR		
Switch Plasmid DNA	10ug	1 miniprep		
Trigger Plasmid DNA	10ug	1 miniprep		



### *SI.6 Supporting documents*

To provide support for the legitimate nature of our research project, we brought along copies of the following documents:

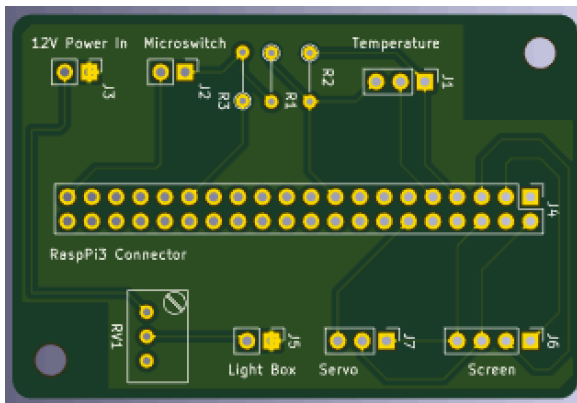
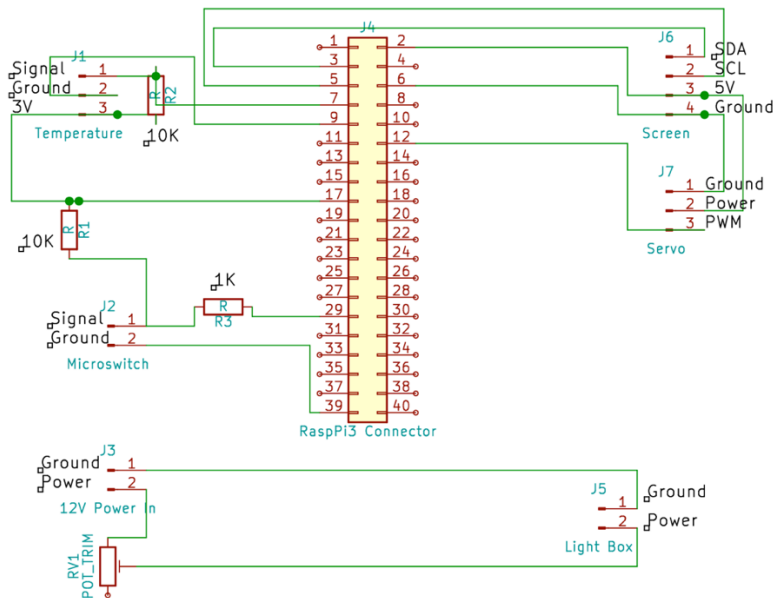
- Previous publications relating to the ongoing research
- Funding announcements
- Press releases and news stories related to the project
- Printed slides from research presentations

### SI Hardware: Supplemental Files for Electronic Optical Reader

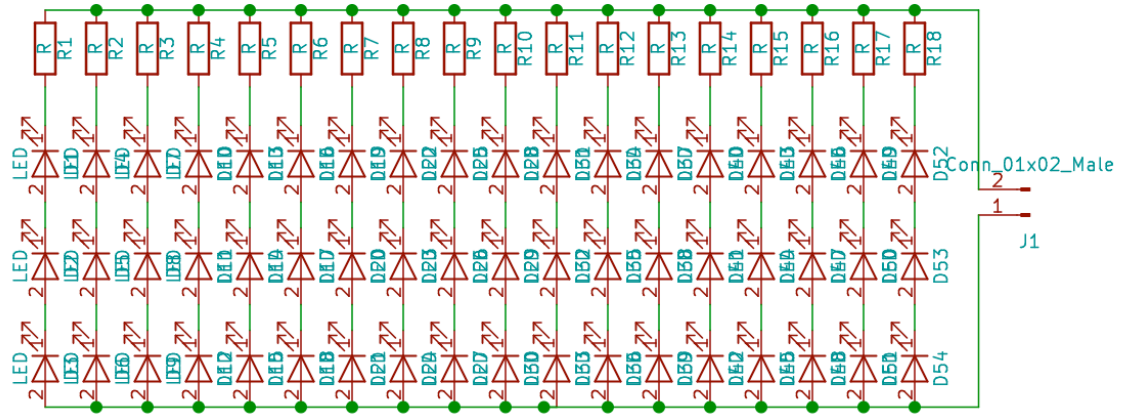
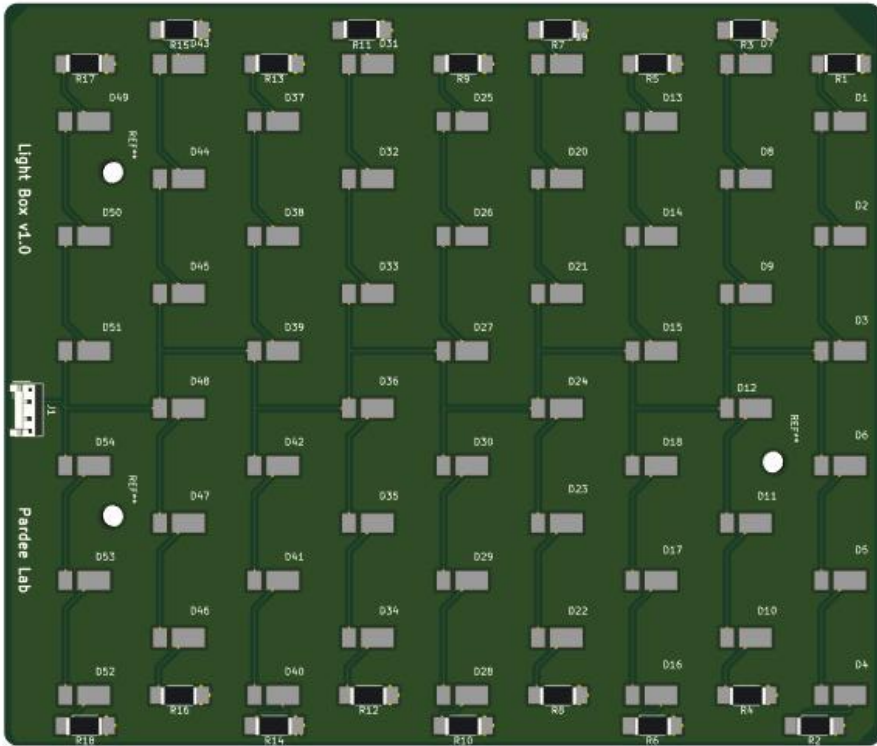
A. Original Manufacturing files can be accessed here as a zip file ([https://github.com/PardeeLab/zikaproject\\_hardware.git](https://github.com/PardeeLab/zikaproject_hardware.git)) with the following information:

- a. Laser Cut Files.
- b. 3D Print Files.
- c. KiCad Circuit Board Files.
- d. PLUM Assembly FreeCAD File.
- e. PLUM Bill of Materials (BOM).

### B. Motherboard Schematic and 3D View



### C. Backlit Lightbox Controller Schematic and 3D View



### D. 3D Printed Part Cost

PrusaSlicer-2.2.0+-202003211132 based on Slic3r

Plater | Print Settings | Filament Settings | Printer Settings

Feature type

- Perimeter
- External perimeter
- Overhang perimeter
- Internal infill
- Solid infill
- Top solid infill
- Bridge infill
- Gap fill
- Skirt
- Support material
- Support material interface
- Wipe tower
- Custom

33.95 (608)

0.20 (1)

Print settings: **Simple** | Advanced | Expert

Print settings: 0.15mm QUALITY (modified)

Filament: Prusa PLA

Printer: Original Prusa i3 MK3S & MK3S+

Supports: Everywhere

Infill: 15% | Brim:

Object manipulation

Name: Plum\_Microswitch.stl

	X	Y	Z	mm
Position:	36.59	78.41	12.5	
Rotate:	0	0	0	°
Scale factors:	100	100	100	%
Size:	17	10	25	mm

Sliced Info

Used Filament (m)	44.64
Used Filament (mm <sup>3</sup> )	107373.73
Used Filament (g)	133.14
Cost	2.79
Estimated printing time:	
- normal mode	14h 13m
- stealth mode	14h 26m

View: Feature type | Show: Feature types |  Travel |  Retractions |  Unretractions |  Shells |  Legend

Export G-code

PrusaSlicer-2.2.0+-202003211132 based on Slic3r

Plater | Print Settings | Filament Settings | Printer Settings

Feature type

- Perimeter
- External perimeter
- Overhang perimeter
- Internal infill
- Solid infill
- Top solid infill
- Bridge infill
- Gap fill
- Skirt
- Support material
- Support material interface
- Wipe tower
- Custom

39.05 (438)

0.20 (1)

Print settings: **Simple** | Advanced | Expert

Print settings: 0.15mm QUALITY (modified)

Filament: Prusa PLA

Printer: Original Prusa i3 MK3S & MK3S+

Supports: Everywhere

Infill: 15% | Brim:

Sliced Info

Used Filament (m)	33.71
Used Filament (mm <sup>3</sup> )	81090.92
Used Filament (g)	100.55
Cost	2.11
Estimated printing time:	
- normal mode	11h 44m
- stealth mode	11h 54m

View: Feature type | Show: Feature types |  Travel |  Retractions |  Unretractions |  Shells |  Legend

Export G-code

## ANEXO I – Material suplementar do artigo publicado

### SUPPLEMENTARY INFORMATION

#### Design to Implementation Study for Development and Patient Validation of Paper-Based Toehold Switch-Based Diagnostics

Katariina Jaenes<sup>1\*</sup>, Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>2\*</sup>, Justin R.J. Vigar<sup>1\*</sup>, Kaiyue Wu<sup>3,4</sup>, Masoud Norouzi<sup>1</sup>, Pouriya Bayat<sup>1</sup>, Margot Karlikow<sup>1</sup>, Seray Cicek<sup>1</sup>, Yuxiu Guo<sup>1</sup>, Alexander A. Green<sup>3,4</sup>, Lindomar Pena<sup>2</sup>, Keith Pardee<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, ON M5S 3M2, Canada.

<sup>2</sup>Laboratory of Virology and Experimental Therapy (LAVITE), Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Biomedical Engineering, Boston University, Boston, MA, USA.

<sup>4</sup>Molecular Biology, Cell Biology & Biochemistry Program, Graduate School of Arts and Sciences, Boston University, Boston, MA, USA.

<sup>5</sup>Department of Mechanical and Industrial Engineering, University of Toronto, Toronto, ON, Canada.

#### 1. Agarose Gel Electrophoresis

3.4. Perform agarose gel electrophoresis<sup>1</sup> to determine the quality of PCR products. We typically run 1  $\mu$ L from each sample on a 1 % agarose gel (Figure 2). If PCR products are of low quality in some samples, fresh PCR reactions can be set up for these samples and different annealing temperatures (typically between 50 - 65 °C) can be screened.

#### 2. Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Urea is a chaotropic denaturant and urea-PA gels are used to verify the quality of *in vitro* transcribed target RNA fragments. A typical 6 % urea-PA gel, containing 7 M urea, is prepared using according to table 6 the following recipe (adopted from Summer *et al* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3329804/>):

[Place **Table S1** here]

**Table S1.** 6% urea-PA gel recipe for analysis of the IVT products

2.1. The gel mixture is cast and allowed to set for 30 minutes before placing in 1X TBE running buffer (pH 8.4).

2.2. Gels are pre-run at a constant 20 Watts for 30 minutes to warm up.

2.3. RNA samples in 1X RNA loading dye are then heated at 70 °C for 10 minutes, chilled on ice and loaded onto the gel.

2.4. Gels are run at 10 V/cm for 60 minutes or until the bromophenol blue dye front reaches the bottom of the gel.

2.5. Gels are then stained for 10 minutes in 1X TBE containing 1X SYBR Gold and visualized in a UV transilluminator.

### 3. Determining RNA Concentration

Online tools such as Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) can be used to determine the molecular weight of RNA sequences. Follow the steps below for molarity and copy number calculation:

$$RNA \text{ molarity } (M) = \frac{RNA \text{ concentration } (\mu g/\mu L)}{Molecular \text{ Weight } (grams/mole)}$$

$$RNA \text{ copy number } (copies/\mu L) = RNA \text{ molarity } (M) \times (6.022 \times 10^{23}) \times 10^{-6}$$

### 4. Preparation of Paper Discs for Cell-free Paper-based Reactions

Cellulose paper discs serve as a solid matrix for biosafe and deployable housing of cell-free diagnostic reactions. Prepare 5% w/v BSA blocked filter paper according to the guidelines below:

4.1. Using tweezers, place 5 paper discs (Whatman, 1442-042) in a 50- mL conical tube and fill with 50 mL of a solution of 5 % w/v Bovine Serum Albumin (BSA), incubating at room temperature with shaking overnight. BSA will block the cellulose paper surface and prevent non-specific binding of cell-free reaction components to the paper.

4.2. The following day, wash the paper discs with nuclease-free water to remove excess BSA. Three water washes (50 mL) will be sufficient.

4.3. Overlay the blocked and washed paper discs in a single layer on an aluminium foil and place on a heat block (50-60 °C) until dry. Blocked paper can be stored at room temperature in a sealed 50 mL tube for several months.

4.4. Use a 2 mm biopsy punch to cut 2 mm paper discs from the blocked filter papers and insert in 384-well plates either by ejecting or using tweezers. The plate is now ready for cell-free reaction set up.

## 5. Determining ON/OFF Ratio

5.1. To do this, at each 10-minute time point we calculate the rate of change of OD<sub>570</sub> using the following formula:

$$S_n = \frac{(T_{n+1} - T_n)}{10}$$

Where  $T$  is normalized data at time point  $T_n$  and 10 minutes later  $T_{n+1}$  and  $S_n$  is the slope for  $T_n$

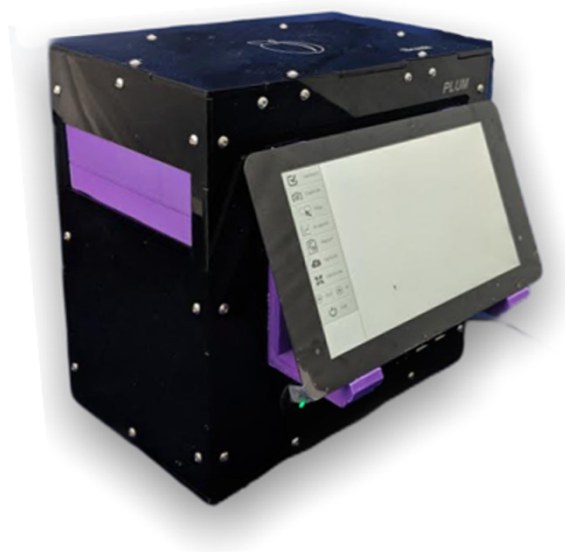
5.2. Subsequently, the ON/OFF ratio is determined by dividing the average of each triplicate at a time point by the average of the ‘switch alone’ at that time point.

$$\text{Switch ON/OFF fold change} = \frac{S_n \text{ Switch \& Target}}{S_n \text{ Switch Alone}}$$

## 6. PLUM Instruction Manual for Users

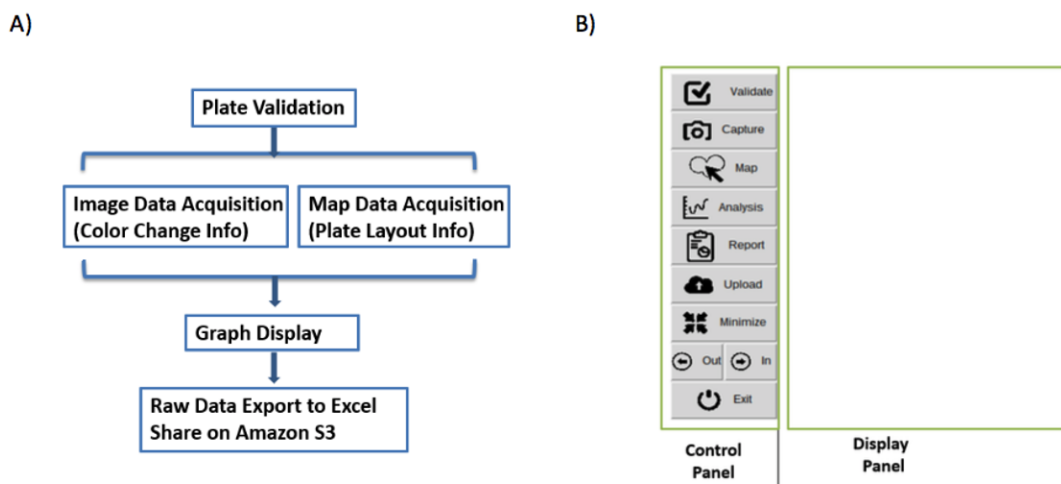
PLUM is a low cost, camera-based reader developed from the Pardee lab that is capable of incubating and reading colorimetric reactions in a 384-well plate format (Figure S1). Here, PLUM will be used to measure the colorimetric output of toehold switch-based RNA sensors in response to Zika virus RNA. At the end of every experiment, the raw data (.csv file) from the PLUM is uploaded to a secure database on Amazon Web Services (AWS). PLUM will also generate a PDF report indicating whether samples were positive or negative for Zika virus.

Below we describe the user interface for PLUM, and demonstrate how to use the instrument and manage the data.



**Figure S1: PLUM companion reader.** Schematic of the PLUM (**P**ortable, **L**ow-cost, **U**ser-friendly, **M**ultimode) device, which is essentially a "lab-in-a-box" and serves as a temperature-controlled plate reader (384-well format). This portable device provides quantitative and high-throughput measurements of the paper-based Zika sensors on-site.





**Figure S2. PLUM workflow and layout of the PLUM software interface.** A) The workflow process for using the PLUM begins with the user defining a map that corresponds to their sample information and incubation of the reader to reach optimal temperature. This is followed by plate validation and subsequent image capturing as the reaction proceeds. PLUM performs an analysis on the captured images and displays the results as graphs depicting color change as increase in signal intensity over time. Users then have the option to upload the raw data to the AWS servers, or to obtain the files via USB. B) The PLUM user interface consists of the “control panel” on the left, where users select instrument commands, and the “display panel” on the right where the 384-well plate mapping and data grouping is performed. The “display panel” is also where captured images of the plate validation stage and reaction stage are displayed.

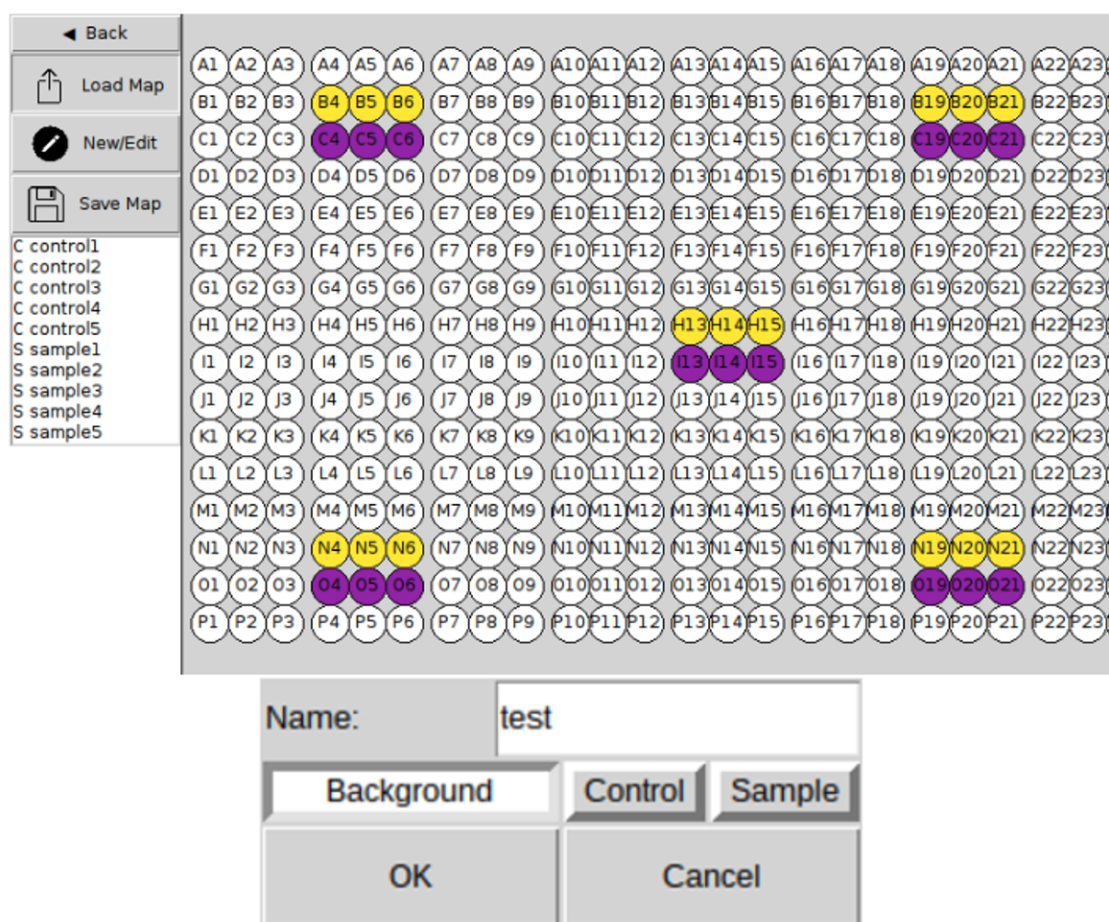
### 6.1 Launch the PLUM software from the desktop by double clicking on the PLUM icon

The following steps are performed through the graphical user interface on the PLUM instrument. To insert the 384-well plate into the device, single click on the “Out” button and wait until the tray is fully open. The user then places the plate onto the tray with well “A1” oriented to the left upper corner. Single click on the “In” button; this will return the tray to the closed position. If the tray does not fully close, the user may click the “In” button a second time. Do not close the program while the tray is moving. Unlike conventional plate readers, PLUM uses a camera and computer vision software to monitor color change in each well during the assay.

## 6.2. Mapping

In this step, the user defines the map for the 384-well plate and provides the PLUM analysis tool with the information (e.g. well/sample identity) needed to normalize the data and generate graphs. The map can be set up before, during, or after the image acquisition step, although it is best practice to define the map before an assay begins to make sure the sample/well information is not lost.

6.2.1. Single click on the “Map” button to enter the mapping page. Click on the “New/Edit” button to create a new map. Click the “+” button to add a sample, and choose the reaction category (e.g. Background, Control, Sample), then provide a name for the sample (Figure 3). Click “OK” and then select the wells that correspond to the sample on the display panel. The triplicate sample is now highlighted using a color code (blue for background, yellow for control and purple for sample). Double-click on the wells to remove replicates from wells. To remove any unwanted samples from the map, click the sample name in the list to highlight it and click the “-” button.

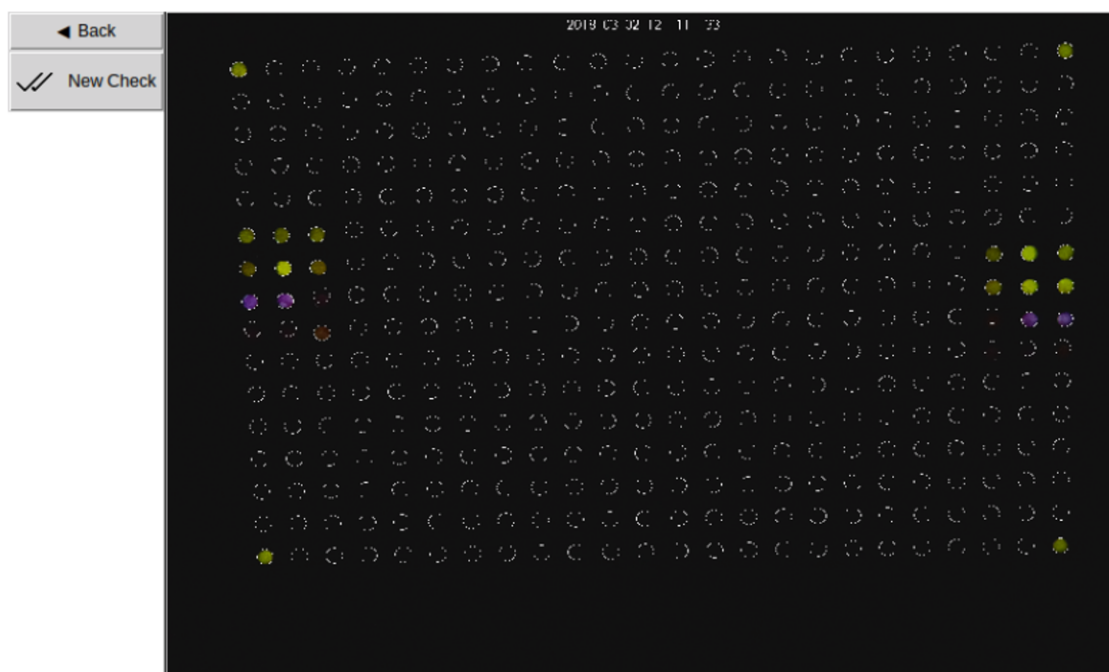


**Figure S3. Defining the experimental map in PLUM.** While in the mapping stage, users will see the control panel on the left with commands and the list of entered samples. On the right of the screen, users will see a color-coded map of the 384-well plate and where the samples are located. This user-defined map will be used for downstream analysis of the experiment.

### 6.3. Plate validation

Once the experiment map has been defined and the plate has been inserted, single click on the “Validate” button in the Control Panel to begin plate validation. Single clicking on the “New Check” button in the Control Panel will start the plate validation process. A real-time image will then be displayed on the screen, overlaid by an outline of the 384-well plate generated by an algorithm that uses the four corner wells as guides (e.g. recall CPRG markers for image alignment). Plate validation is dependent on the successful alignment of the image to the digital template of the 384-well plate and indicates image recognition of the wells. Following a positive validation result (Figure S4.), users can proceed with the experiment.

NOTE: In the event of an error message, the users need to ensure that the four CPRG corners are visible to the camera and that any empty wells have been covered with PCR foil to prevent image overexposure.



**Figure S4. Successful plate validation in PLUM.** This image shows the captured live image of the 384-well plate aligned with the validation outline, marked by a white dotted lines.

#### 6.4. Image Capture

To begin, using the graphical user interface, click on the “Capture” button and then click on “New Image” to begin reading the 384-well plate (3 hour run time). During this period, the PLUM software will record measurements from all 384 wells every five minutes. A translucent real-time image shows up on the screen during data collection so that users can follow assay progress. The last image taken by the camera will be shown in the display panel at the end of the capture process. In the event of a power outage or accidental end to the PLUM session, the last image and measurements from all-time points will have been saved.

NOTE: To load previous data, click on the “Load Image” button. The last picture from the desired data set will be displayed in the display panel, along with the associated 384-plate map and image. Users can also find the excel file with the raw experimental data in the validate-timestamp folder.

## 6.5. Results

Once the diagnostic assay is finished, and with map data having been entered into the system, users can click the “Analysis” button to view the results of the experiment, as well as generate graphs of the data.

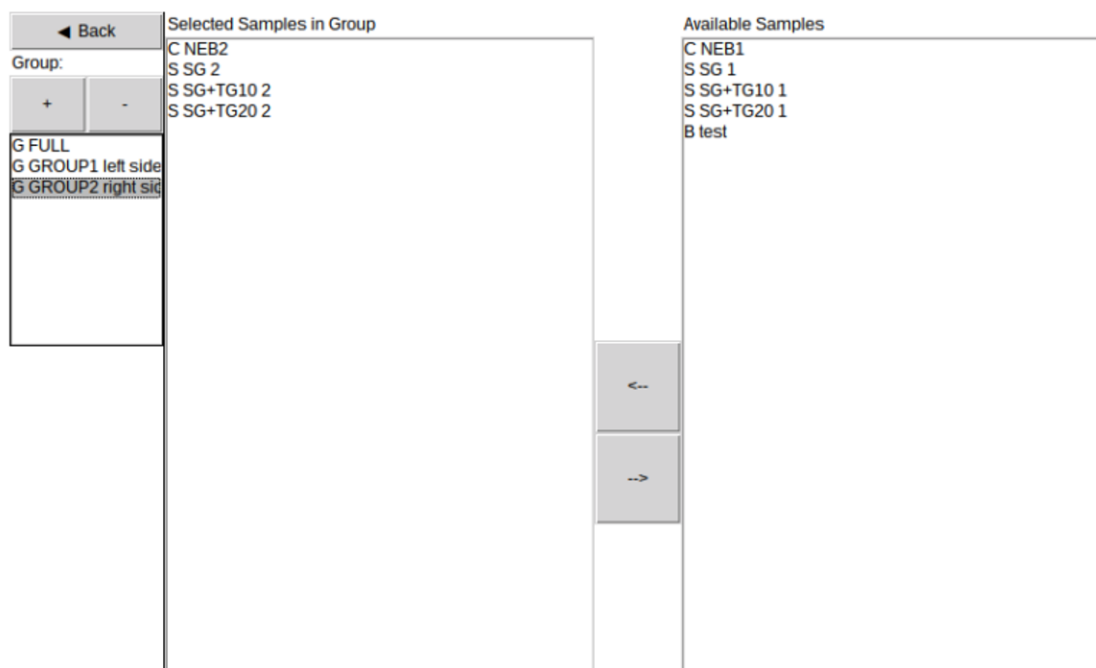
## 6.6. Grouping data into sets for analysis

For further analysis, users can organize the background, control and sample data sets into groups that they would like to compare on graphs (Figure S5).

6.6.1. Click the “Edit Group” button to begin organizing the sample list. Click the “+” button to create a new group. Name the group in the pop-up window and click ok.

6.6.2. Pick the samples of interest by selecting them and then use the “→” button to move the selected samples to the left panel. To remove the samples, select the “←” button. The “save map” button allows the user to save the map as an excel file with the sample name listed in any folder. The map is saved in the Excel file with sample names that were defined.

NOTE: The user has the option to load an older map from another folder with “Load Map” button.



**Figure S5. The group edit page allows users to select data to be graphed together.** On the group edit page, users can select samples from the available list on the right and move them to the left “selected samples” window using the arrows. All of the samples in the same “selected samples group” window will be graphed together during analysis. At the far left of the screen is the complete list of groups for an experiment. In this example a group called “GROUP2” has been selected, samples included are: C NEB2, S SG2, S SG+TG10 2 and S SG+TG20 2.

## 6.7. Accessing Data and Cloud Storage

After each run, users can upload their data files to cloud storage, providing a secure backup of all raw data collected for the project, and allowing collaborating groups access to the data in real time. Each PLUM device has its own AWS cloud storage account that users can login to and check the content (users can set their own password on the first-time login).

6.7.1. To upload experimental data to AWS, click the “Upload” button and users will then receive a message indicating if the upload has been successful.

NOTE: A successful upload of the capture data requires that the corresponding map file has been created.

6.7.2. The data package uploaded to the cloud will include a zip file that contains: a) map data csv file (for the user); b) map files end in “pmap” (for PLUM); c) capture data csv file (for the user); d) capture files end in imap file (for PLUM); e) a picture taken from the validation stage with highlighted regions of interest; and f) the last picture taken from capture process.

## 6.8. Generating a Report

The PLUM device also generates a report that contains a graph containing the time course temperature data and images of all the graphs defined in the ‘group edit’ page.

To generate a report, at the end of every experiment click on the “Report” button to save the report on the local PLUM.

NOTE: Users can also transfer files from PLUM to their own computer via USB.

## 7. Oligo sequences used in this protocol

[Place **Table S2** here]

**Table S2.** DNA sequences of switch and trigger.

[Place **Table S3** here]

**Table S3.** Primer sequences for generating linear DNA from plasmid DNA using PCR.

[Place **Table S4** here]

**Table S4.** NASBA primers for the Zika virus detection.

[Place **Table S5** here]

**Table S5.** RT-qPCR primers for the Zika virus detection.

**ANEXO J – Material suplementar do artigo em fase de submissão**

Supplementary information for:

**Development and validation of a rapid molecular diagnostic assay for chikungunya virus in patient and mosquito samples by reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP)**

Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>1</sup>, Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães<sup>1,2,3</sup>, Keith Pardee<sup>4,5</sup>, Lindomar Pena<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Virology and Experimental Therapy (Lavite), Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Virology, Pernambuco State Central Laboratory (LACEN/PE), Recife, Pernambuco, Brazil;

<sup>3</sup>University of Pernambuco (UPE), Serra Talhada Campus, Serra Talhada, Pernambuco, Brazil;

<sup>4</sup>Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, ON M5S 3M2, Canada;

<sup>5</sup>Department of Mechanical and Industrial Engineering, University of Toronto, Toronto, ON, Canada;

\*Corresponding author:

Lindomar Pena, PhD. Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz). Address: Avenida Professor Moraes Rego, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil. Email: lindomar.pena@cpqam.fiocuz.br



**Figure S1.** Workflow for testing patient and mosquito samples.

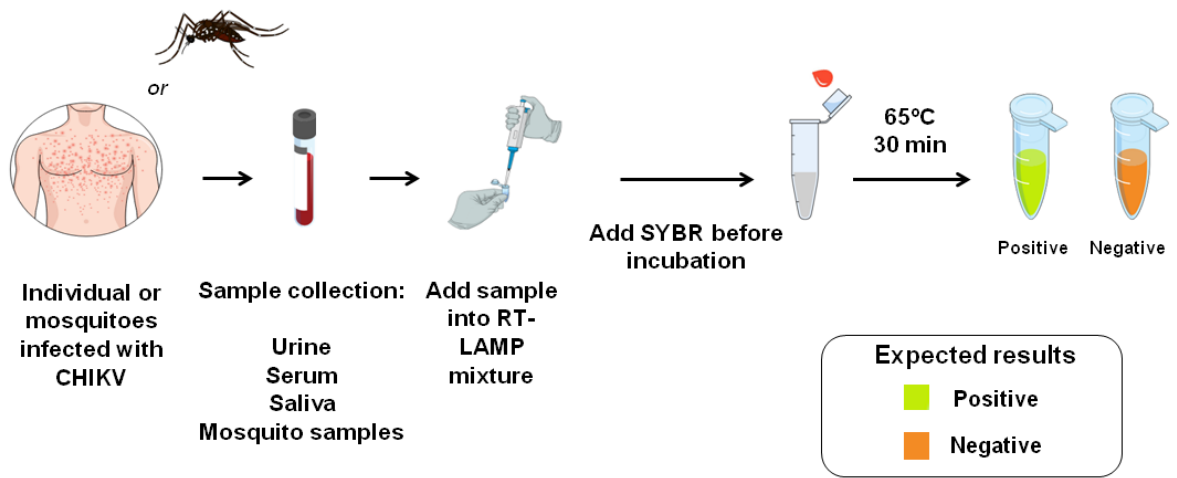
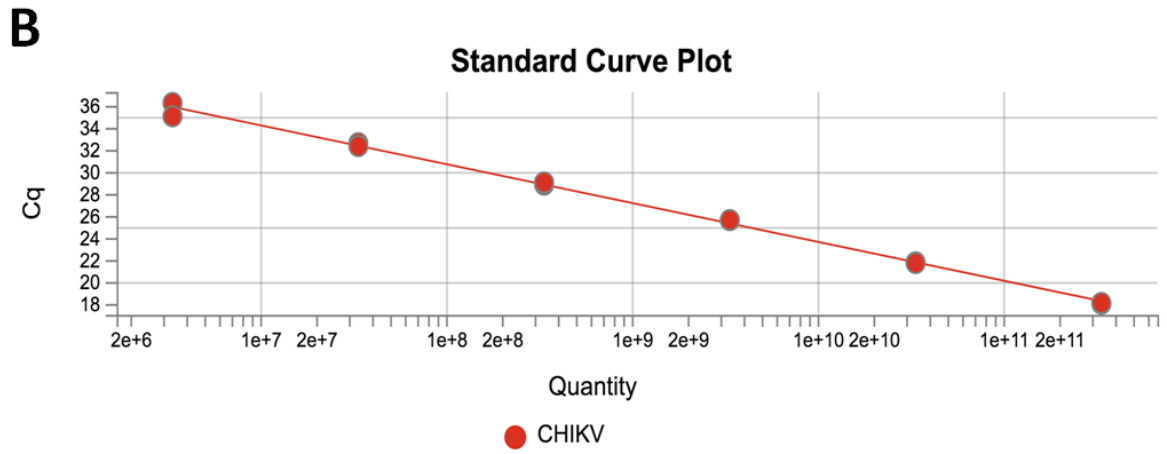
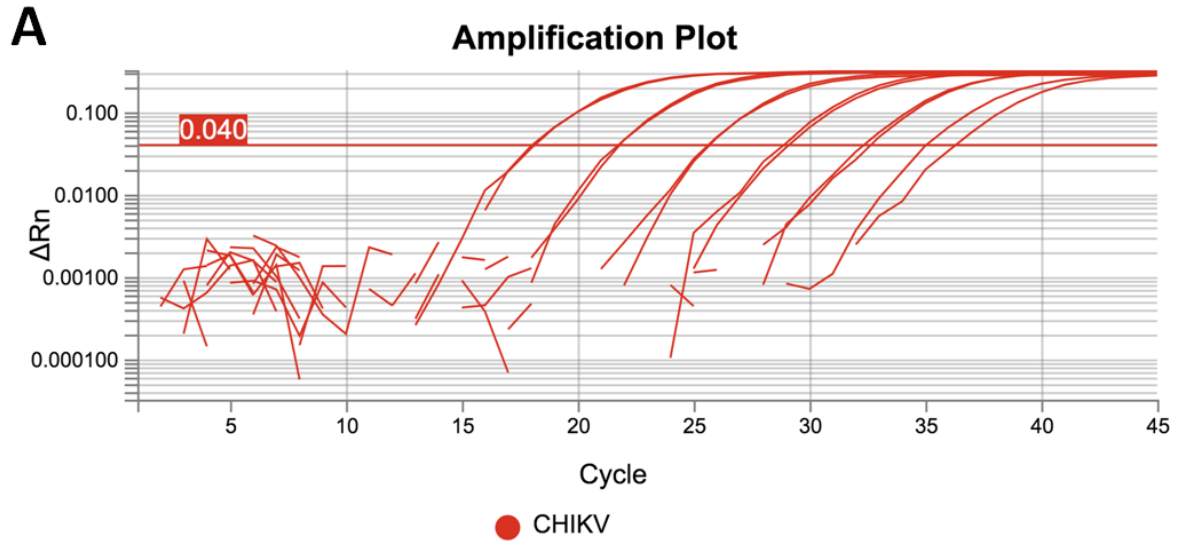


Figure S2. Amplification plot.



Target: CHIKV Slope: -3.528 R<sup>2</sup>: 0.997 Y-Inter: 58.926 Eff%: 92.084 Error: 0.059

Figure S3. Amplification plot.

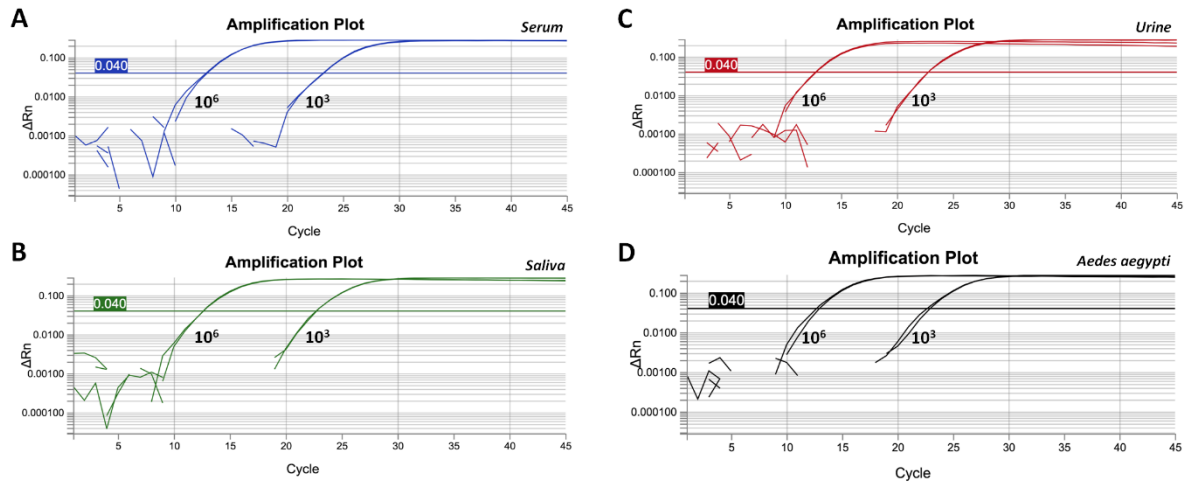


Figure S4. Amplification plot.

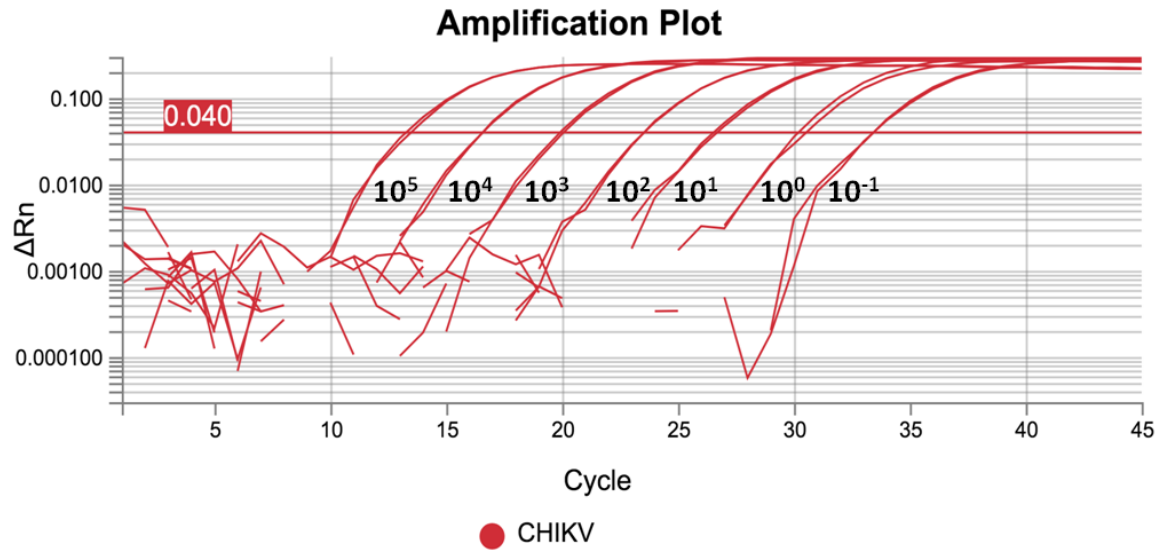


Figure S5. Specificity.

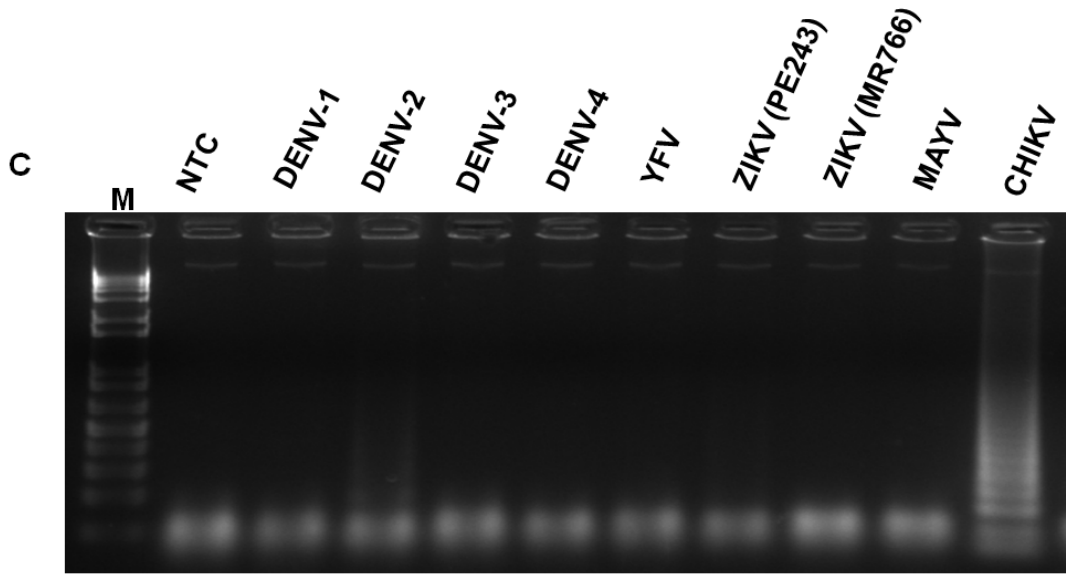
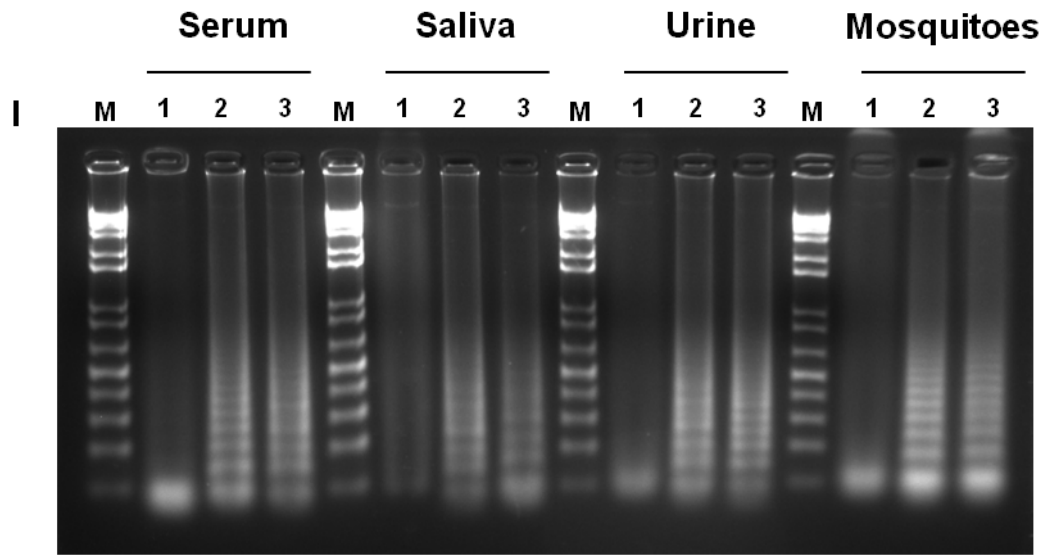


Figure S6. Spike.



**Figure S7.** Samples with high cq value.

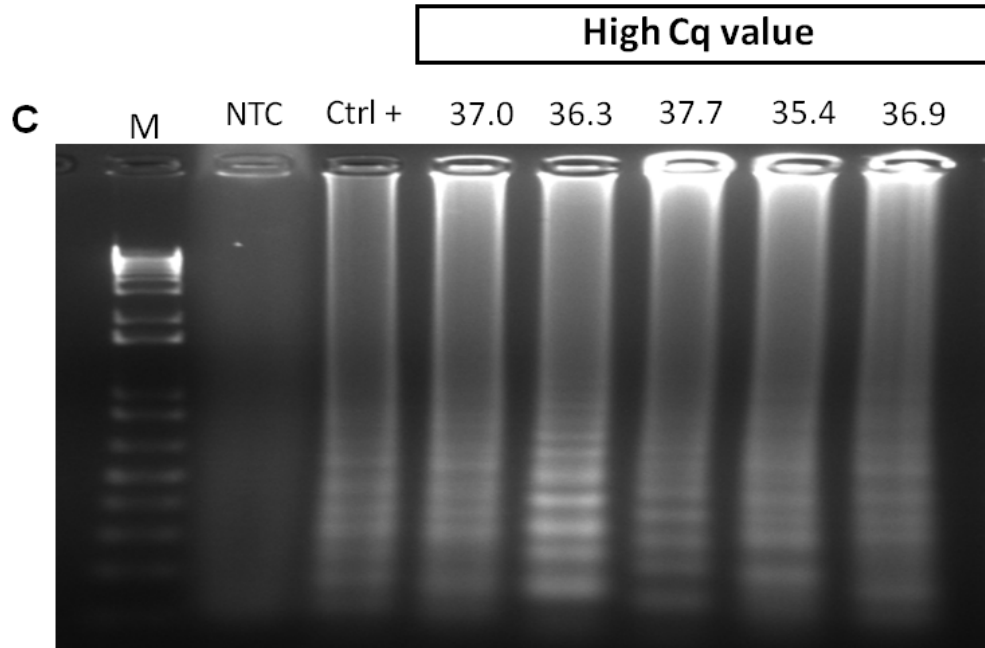


Figure S8. Sensitivity.

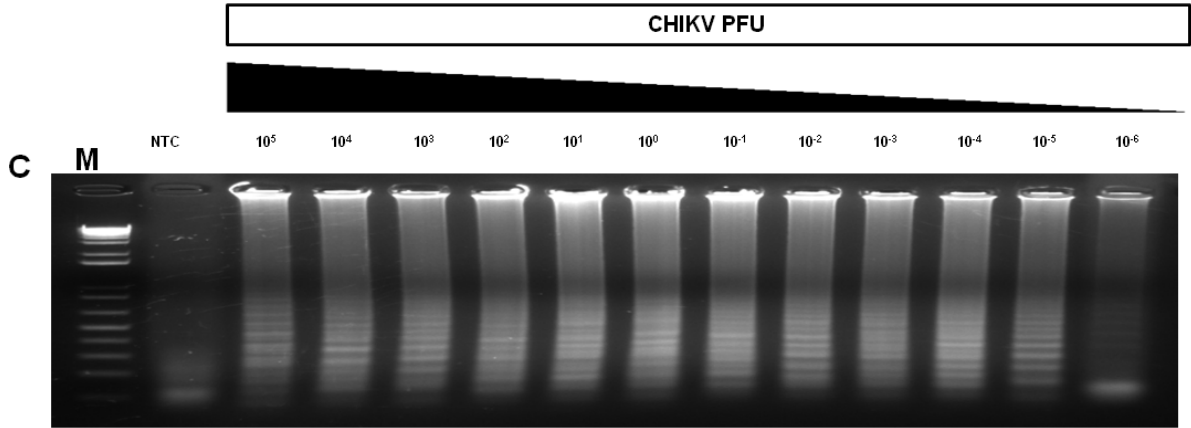
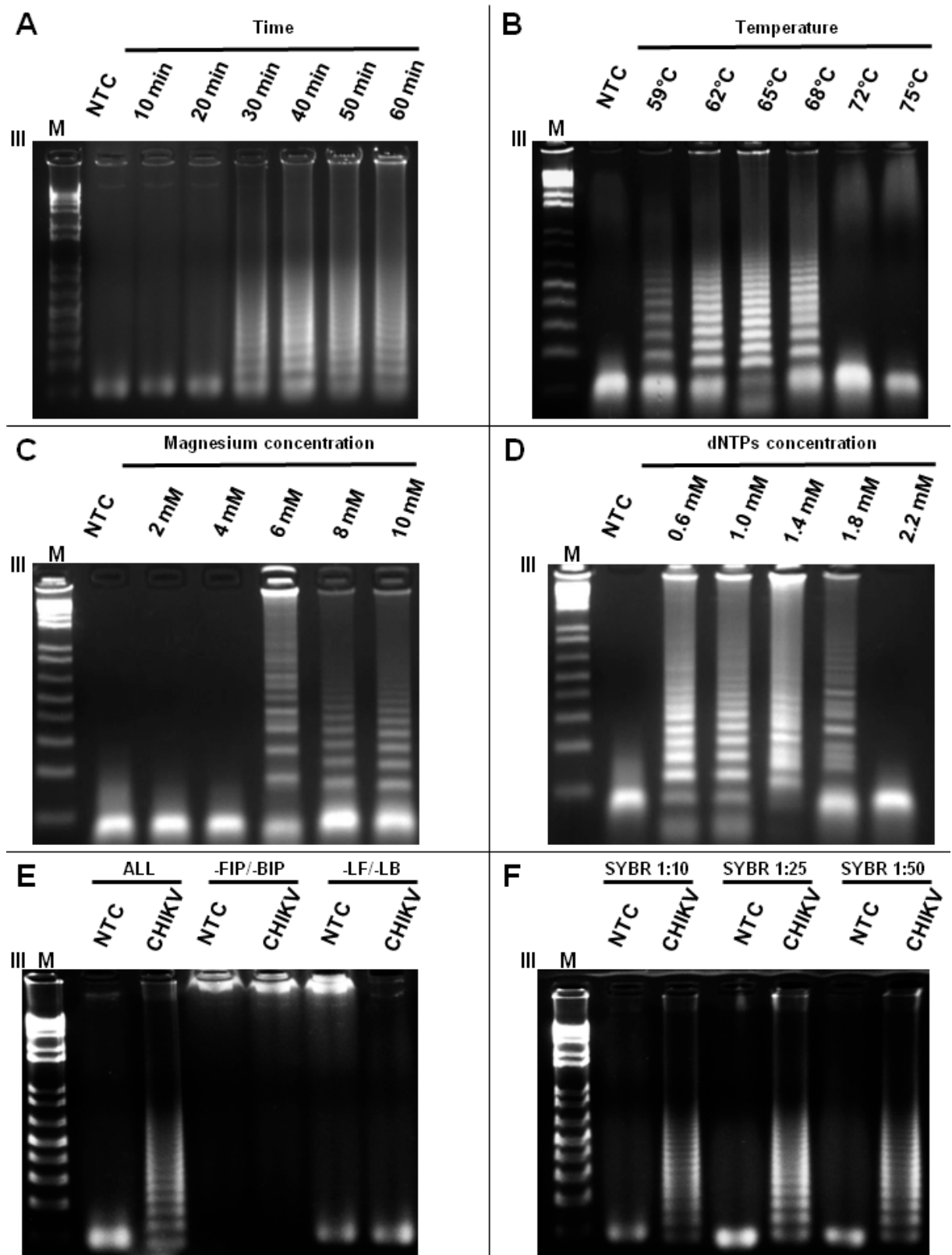
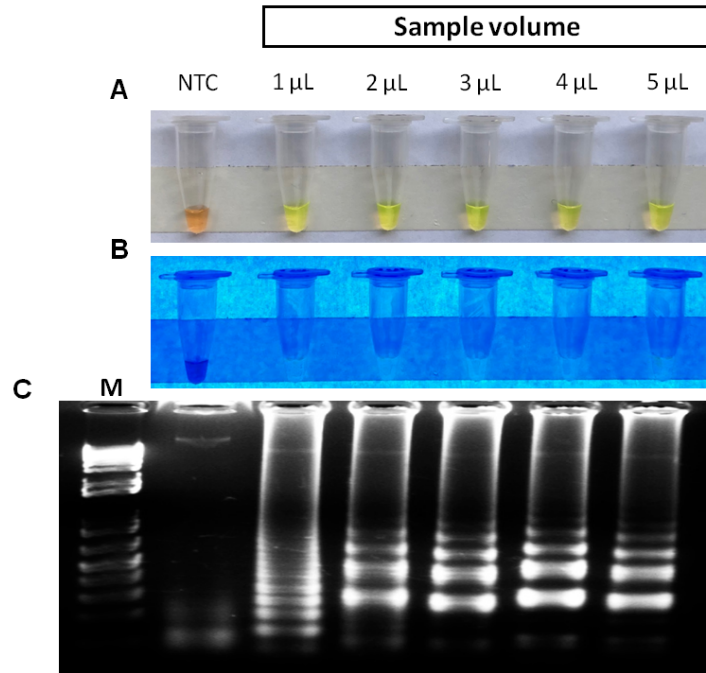




Figure S9. Optimization.



**Figure S10.** Sample volume.

## **ANEXO K – Artigos completos relacionados ao doutorado**

Artigo 1: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus:  
A Review

Artigo 2: Adaptive, diverse and de-centralized diagnostics are key to the future of outbreak  
response

Artigo 3: Development and validation of a one-step reverse transcription loop-mediated  
isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in patient samples from  
Brazil

Artigo 4: Field validation of the performance of paper-based tests for the detection of the Zika  
and chikungunya viruses in serum samples

Artigo 5: Design to Implementation Study for Development and Patient Validation of Paper-  
Based Toehold Switch-Based Diagnostics

Review

# Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review

Severino Jefferson Ribeiro da Silva <sup>1</sup>, Keith Pardee <sup>2</sup> and Lindomar Pena <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Virology, Aggeu Magalhaes Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), 50670-420 Recife, Brazil; jeffersonbiotecviro@gmail.com

<sup>2</sup> Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, ON M5S 3M2, Canada; keith.pardee@utoronto.ca

\* Correspondence: lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br; Tel.: +55-81-2123-7849

Received: 11 November 2019; Accepted: 4 December 2019; Published: 23 December 2019



**Abstract:** The recent outbreak of Zika virus (ZIKV) in the Americas and its devastating developmental and neurological manifestations has prompted the development of field-based diagnostics that are rapid, reliable, handheld, specific, sensitive, and inexpensive. The gold standard molecular method for lab-based diagnosis of ZIKV, from either patient samples or insect vectors, is reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The method, however, is costly and requires lab-based equipment and expertise, which severely limits its use as a point-of-care (POC) tool in resource-poor settings. Moreover, given the lack of antivirals or approved vaccines for ZIKV infection, a POC diagnostic test is urgently needed for the early detection of new outbreaks and to adequately manage patients. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a compelling alternative to RT-qPCR for ZIKV and other arboviruses. This low-cost molecular system can be freeze-dried for distribution and exhibits high specificity, sensitivity, and efficiency. A growing body of evidence suggests that LAMP assays can provide greater accessibility to much-needed diagnostics for ZIKV infections, especially in developing countries where the ZIKV is now endemic. This review summarizes the different LAMP methods that have been developed for the virus and summarizes their features, advantages, and limitations.

**Keywords:** diagnostic; point-of-care; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); Zika virus (ZIKV)

## 1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne virus from the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae* and consists of two genetically distinct lineages: Asian and African [1,2]. Other notable viruses within this genus include dengue virus (DENV), Japanese encephalitis virus (JEV), West Nile virus (WNV), and yellow fever virus (YFV) [3]. Like most flaviviruses, the ZIKV is an enveloped virus with a capsid 50 nm in diameter and an RNA genome of approximately 11 Kb in length. The genome is translated as a single long open reading frame (ORF) and encodes ten proteins. This includes seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), which mediate viral replication for synthesis of new viral particles, and three structural proteins (C, prM, and E), which comprise the capsid and play a key role in host immune evasion [4,5].

First identified in 1947 in the Zika Forest of Uganda, ZIKV infections in humans remained sporadic for 60 years, with very few cases reported, until April 2007 when the ZIKV caused an outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia [6–8]. In 2013, the ZIKV was identified in French Polynesia and spread rapidly across the Pacific, including New Caledonia and Cook Islands [9–11]. Coincidentally, during those outbreaks, the link between Guillain–Barré syndrome (GBS) and ZIKV was reported,

raising concerns about the neurological tropism of the virus [12]. In May 2015, the first case of ZIKV infection was reported in Brazil [13] and the virus rapidly spread throughout the country and much of Latin America, causing the largest recorded epidemic of the virus to date [14]. The Brazilian epidemic raised great international concern because of severe birth defects, including microcephaly, in neonates born to mothers infected by ZIKV during pregnancy [3,15,16].

ZIKV is transmitted mainly through the bite of infected mosquitoes from the genus *Aedes*, although other vectors may also be involved in the transmission [17–21]. Additionally, other routes of ZIKV transmission have been identified, including blood transfusions, transplacental, perinatal, and sexual intercourse [22–24]. ZIKV infection usually causes a self-limiting and a mild illness, where the majority of cases are asymptomatic and, when present, symptoms include fever, headache, rash, conjunctivitis, and arthralgia [25]. In regions where there is a circulation of other arboviruses, such as DENV and chikungunya (CHIKV), the clinical diagnosis of ZIKV infection becomes extremely difficult because of common symptoms. Therefore, laboratory-based molecular diagnosis is of fundamental importance to correctly identify the etiologic agent [3,26].

Given the lack of approved vaccines and antivirals against ZIKV, a rapid and reliable point-of-care (POC) diagnostic test for detection of ZIKV is urgently required for control and prevention measures and to increase the diagnostic capacity of ZIKV-affected, mainly in low-resource areas [27,28]. ZIKV infection is diagnosed in the laboratory by nucleic acid amplification tests or serological methods, including enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), plaque reduction neutralization tests (PRNT), and lateral flow assays (rapid tests) [6,7,29–32]. Currently, RT-qPCR is considered the gold standard method to detect ZIKV from patient and mosquito samples [6,7,29]. Although RT-qPCR provides high-quality results, the test requires extensive sample preparation, RNA extraction, expensive equipment, and technical expertise to run and interpret the amplification of the viral RNA. Moreover, available serological methods are prone to produce false-positive results due to cross-reaction with other flaviviruses in circulation, such as DENV, and are therefore of limited value [6,7,33].

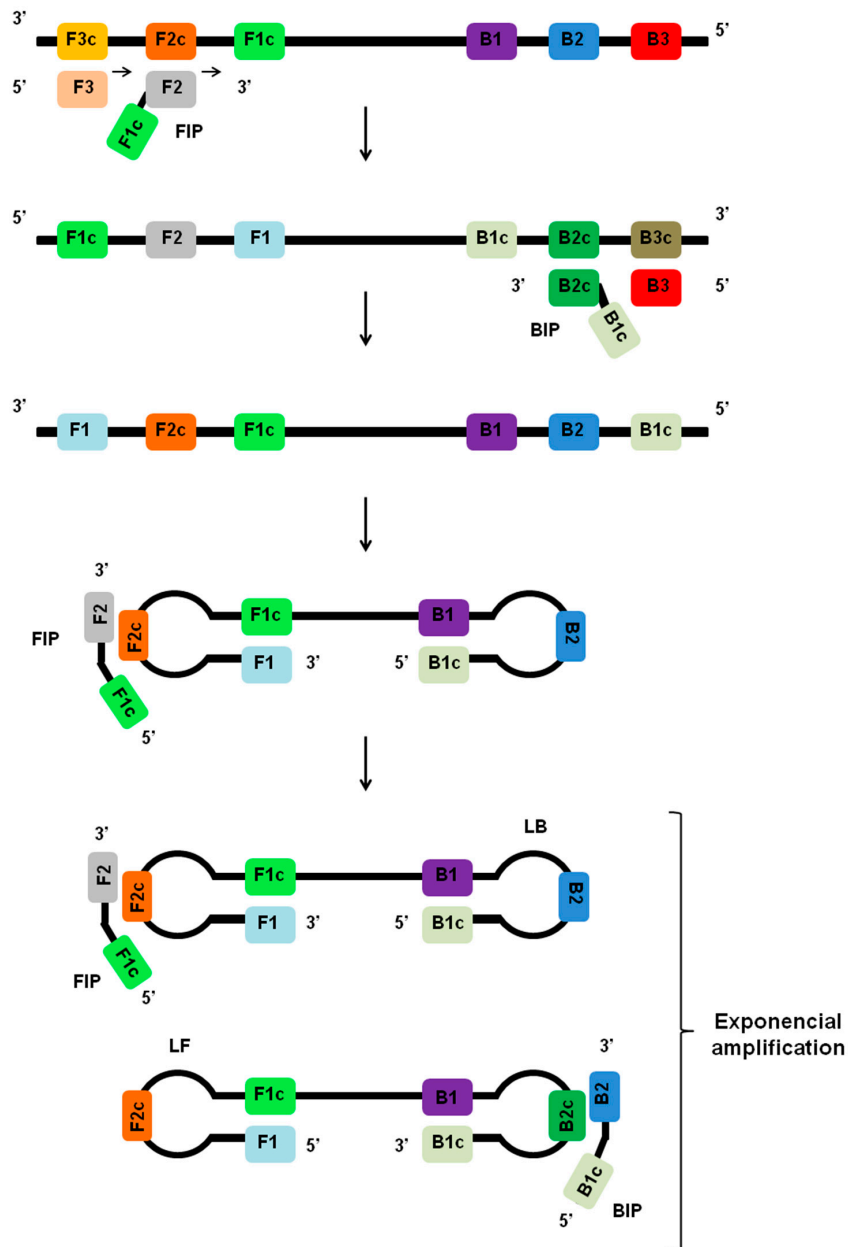
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a powerful alternative POC assay for the virus as it allows rapid, robust, and simple amplification of nucleic acid targets at a single and fixed temperature [34]. The assay has many advantages over RT-qPCR, including rapidity, low cost, high sensitivity, and high specificity. LAMP results can also be easily read with the naked eye through color-based reporters that can be added to the reaction mixture [35]. Importantly, the simple, single-temperature incubation allows LAMP reactions to be performed without expensive equipment, directly in the field [36]. Since the 2015 emergence of the ZIKV in Brazil, many LAMP assays have been developed for diagnosis by research groups across the world [27,37–45]. These diagnostic platforms based on LAMP have proven to be specific, sensitive and inexpensive POC tools that can be applied even in resource-limited regions of the world. Here we review the development and application of LAMP methods for the diagnosis of ZIKV and explore the next steps to bring this assay into mainstream use.

## 2. Principles of LAMP Assay

LAMP was first reported in 2000 by Notomi et al. (2000) and has since undergone many adaptations and has been put into practice for the detection of pathogens in samples ranging from animals, plants, and humans [34,46]. Some highlights from adaptations of LAMP include multiplexed LAMP, electrochemical LAMP, and disc-based LAMP [46–48]. For RNA viruses, such as ZIKV, DENV, and CHIKV, it is necessary to perform a reverse transcription reaction LAMP (RT-LAMP) [27,39,42,49–52] which includes the enzymes that first convert RNA → DNA upstream of the LAMP process, unless a LAMP enzyme with both reverse transcriptase and DNA polymerase is used [53].

LAMP is an isothermal nucleic acid amplification method that generally employs a set of four or six different primers, which specifically bind to complementary sequences on the molecular target (Figure 1) [34]. Primer sets for the LAMP assay include the forward outer primer (F3), the backward outer primer (B3), the forward inner primer (FIP), the backward inner primer (BIP), and two other

primers designed to accelerate the amplification, including the forward loop primer (LF) and the backward loop primer (LB). With the primers in hand, the LAMP assay can be performed with simple and readily available incubation sources like a water bath or heating block for isothermal heating [35,54,55].

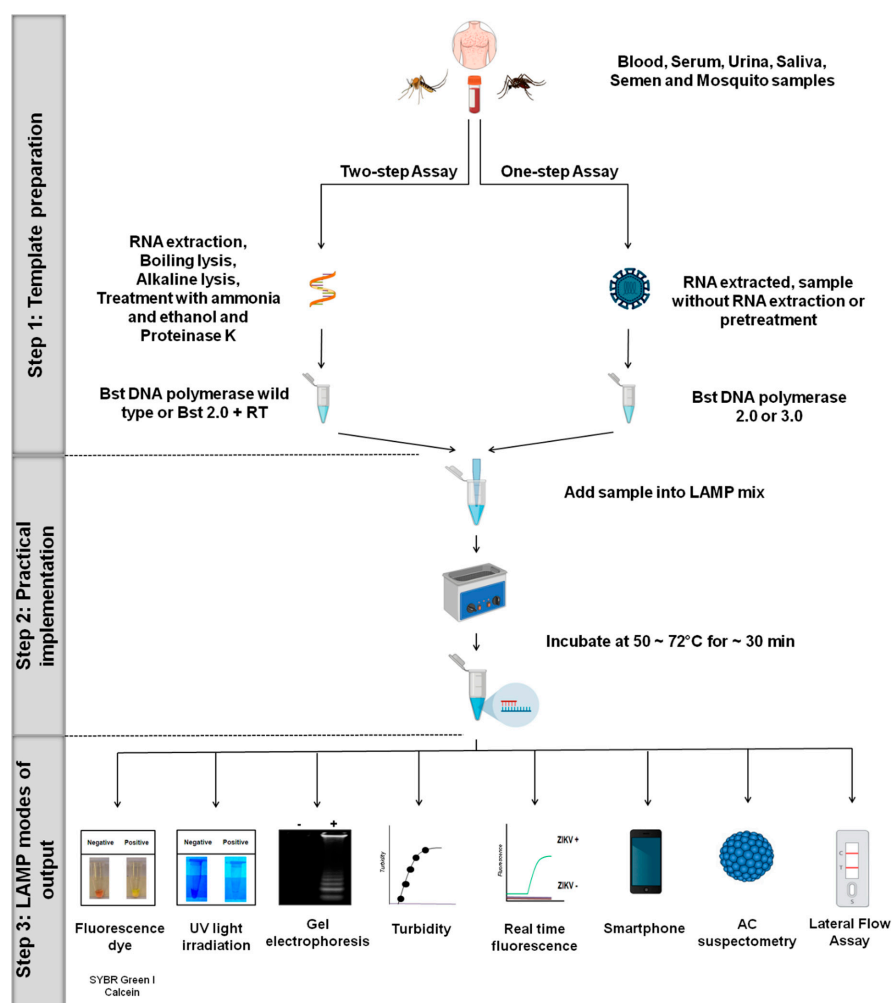


**Figure 1.** Principles of LAMP assay. During the initial stages of the LAMP reaction, the inner primers (FIP or BIP) anneal to regions F2c or B2c within the target region. The LAMP reaction is initiated by strand invasion by the inner primers, and a strand displacement DNA polymerase extends the primer and separates the target DNA duplex. The outer primers (F3 or B3) then hybridizes to region F3c or B3c on the target and initiates the formation of self-hybridizing loop structures by the strand invasion. This results in the formation of a dumbbell-shaped DNA, which becomes a seed for exponential amplification. As a result of this process, various sized structures consisting of stem-loop DNA with various stem lengths and various cauliflower-like structures with multiple loops are formed. The addition of loop primers (LF and LB) can accelerate the process.

During the initial stages of the LAMP reaction, the inner primers (FIP or BIP) anneal by Watson–Crick complementarity to regions F2c or B2c within the target region. The outer primers (F3 or B3) then hybridizes to region F3c or B3c on the target and initiates the formation of self-hybridizing loop structures by the invasion of strands of DNA sequences already extended from the inner primers, including FIP and BIP. This results in the formation of a dumbbell-shaped DNA, and the same dumbbell structure then becomes a seed for exponential amplification (Figure 1). The addition of loop primers (LB and LB) can accelerate the process for exponential amplification of the target sequence [56]. The final products obtained are a mixture of cauliflower-like structures with multiple loops and concatemers of the DNA with various stem lengths [27,34]. The amplified products can be detected by a variety of methods, including dsDNA binding dyes, turbidity measurement, UV light irradiation, real-time fluorescence, gel electrophoresis, smartphone camera, AC susceptometry, and systems based on lateral flow assays [38,39,44,46,53,57,58].

### 3. Principles LAMP Platforms for ZIKV

Different LAMP platforms have been developed for ZIKV detection in both patient samples and arthropod vectors and are summarized in Table 1 [27,28,37–42,44,45,53,57–64]. In this section, we provide an overview highlighting the different LAMP systems, including one-step and two-step protocols (Figure 2).



**Figure 2.** LAMP platforms for ZIKV. Overview of the different LAMP systems for ZIKV, including one-step and two-step protocols. In general, LAMP assays include variations in one of the major three steps: (1) Template preparation, (2) practical implementation, and (3) LAMP modes of output.

**Table 1.** LAMP platforms for Zika virus (ZIKV) diagnostics.

Procedure	Samples	ZIKV Strains Used	Target Region of the Primers	Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	Pretreatment or Need for RNA Extraction from the Sample	Validation with Clinical Samples	Reference
One-step RT-LAMP Detection: development of a tape based on lateral flow assay (LFA)	Human blood spiked with RNA ZIKV	MR 766 Uganda (AY632535)	Envelope Protein	10° ZIKV RNA Copy	No	No	[40]
Development of a microfluidic cassette based on RT-LAMP Detection: through the naked eye with the aid of leuco crystal violet (LCV)	Saliva spiked with ZIKV	MEX 2-81 (Mosquito/2016/México)	Envelope Protein	5 PFU	Yes	No	[37]
One-step LAMP Detection: development of LAMP protocol coupled with AC susceptometry	Human serum spiked with synthetic oligonucleotides of ZIKV	Synthetic oligonucleotides of ZIKV	NS5	1 aM	No	No	[38]
One-step RT-LAMP Detection: turbidity monitoring coupled to RT-qPCR. Through the naked eye with calcein and UV light	Saliva, urine, and serum experimentally infected with ZIKV	ZIKV_SMGC-1 China (KX266255)	NS1	0.02 PFU/test	Yes	No	[39]
One-step RT-LAMP Detection: through the colorimetric technology	Clinical samples including urine and human serum	Puerto Rico (PRVABC 59)	Envelope Protein	1.2 RNA copies/ $\mu$ L	Yes	Yes	[59]
One-step RT-LAMP Detection: monitoring of fluorescence coupled to RT-qPCR platform and through the naked eye	Clinical samples including serum, plasma, and human semen. In addition to blood, plasma, saliva, urine, semen and <i>Aedes</i> mosquito spiked with ZIKV	Puerto Rico (PRVABC59), P6-740 (HQ234449), 41525 (KU955591) and MR 766 Uganda (AY632535)	NS2A	0.43 PFU	No	Yes	[41]
Development of a Trioplex assay to detect ZIKV, DENV, and CHIKV Detection: development of RT-LAMP protocol coupled with a smartphone for detecting fluorescence	Human blood spiked with ZIKV	Puerto Rico (PRVABC59),	NS1	1.56 PFU/mL	Yes	No	[60]



Table 1. Cont.

Procedure	Samples	ZIKV Strains Used	Target Region of the Primers	Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	Pretreatment or Need for RNA Extraction from the Sample	Validation with Clinical Samples	Reference
Development of a platform based on RT-LAMP assay Detection: fluorescence monitoring coupled to RT-qPCR platform	Clinical samples, including serum and human urine. In addition to human serum and urine spiked with ZIKV	PRABC59, 976 Uganda, ArD157995, P6-740, CPC-0740*, 41525-DAK*	Envelope Protein	14.5 TCID <sub>50</sub> /mL	Yes	Yes	[28]
Development of a Trioplex assay to detect ZIKV, DENV, and CHIKV Detection: monitoring of fluorescence coupled to quenching of unincorporated amplification signal reporters (QUASR) and smartphone	Blood, urine, and saliva spiked with ZIKV	Puerto Rico (PRVABC59), Honduras (R103451), and Brazilian strain;	NS5	2 PFU/mL	Yes	No	[58]
Development of a Trioplex kit trial to detect ZIKV, DENV, and CHIKV Detection: monitoring of fluorescence coupled to RT-qPCR platform and through the naked eye	Urine, saliva, plasma and <i>Aedes</i> mosquito spiked with ZIKV	Puerto Rico, (PRVABC59, KU501215.1)	NS5	~ 0.71 PFU equivalent viral RNAs	Yes	No	[27]
One-step RT-LAMP Detection: through the naked eye with SYBR Green I	Urine, serum, and infected mosquito samples	MR 766 Uganda (AY632535); MEX20 (ZK-HU 0165 P), Puerto Rico (PRVABC 59) and PB81 (H815744)	NS5	1 copy of the genome/rxn	No	No	[62]
Development of a platform based on RT-LAMP Detection: monitoring of fluorescence coupled to RT-qPCR platform	Clinical samples, including saliva and urine. In addition to saliva and urine spiked with ZIKV	(PRVABC59 – NR-50240)	Capsid	2.2 × 10 <sup>3</sup> RNA copies/mL	Yes	No	[61]
Development of a platform based on RT-LAMP Detection: monitoring of fluorescence coupled to RT-qPCR	Viral RNA	MR 766 Uganda	NS5	3.3 ng/μL	Yes	No	[57]

Table 1. Cont.

Procedure	Samples	ZIKV Strains Used	Target Region of the Primers	Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	Pretreatment or Need for RNA Extraction from the Sample	Validation with Clinical Samples	Reference
Development of RT-LAMP platform coupled with on paper microfluidic chips Detection: the color change is monitored in situ with a smartphone	Plasma and urine spiked with ZIKV	Purified ZIKV particles	NS5	1 copy/ $\mu$ L	Yes	No	[44]
One-step RT-LAMP Detection: through the naked eye with SYBR Green I	Clinical samples, including human urine. In addition to urine and <i>Aedes</i> mosquito spiked with ZIKV	MR 766 Uganda (AY632535), MEX20 (ZK-HU 0165 P), Puerto Rico (PRVABC 59), and PB81 (H815744)	NS5	1 copy of the genome/rxn	No	No	[42]
Development of an RT-LAMP platform coupled with reverse dot blot analysis (RDB) Detection: monitoring of fluorescence and reverse dot-blot for detection	Saliva spiked with ZIKV	Thailand (PLCaI_ZV), Puerto Rican (NR-50244), Thailand (NR-50242), Florida (NR5024), and Honduras (NR-50358)	Capsid	$2.10^3$ RNA copies /mL	Yes	No	[63]
Development of a LAMP Detection: a calcein/Mn2+ complex chromogenic method and real-time turbidity monitoring	Viral RNA	Recombinant plasmids containing NS5 gene or E (ZIKV strain Natal RGN)	NS5 and envelope protein	$0.5 \times 10^{-9}$ pmol/ $\mu$ L DNA for NS5 and $1.12 \times 10^{-11}$ pmol/ $\mu$ L DNA for envelope protein	Yes	No	[43]
One-step RT-LAMP Detection: through the naked eye with SYBR Green I	Mosquito samples including experimentally and naturally infected mosquitoes ( <i>Aedes aegypti</i> and <i>Culex quinquefasciatus</i> )	PE-243 (KX197192)	Envelope protein	$10^{-5}$ PFU	No	Yes	[53]
One-step RT-LAMP Detection: through the naked eye with SYBR Green I	Serum spiked with ZIKV and patient samples including human serum	-		$10^{-3}$ copies of RNA (20 zepto-molar)	No	Yes	[64]
One-step RT-LAMP Detection: turbidity monitoring	Serum and urine spiked with ZIKV	PRVABC59 (KX601168), MRS_OPY_Martinique_Pari_2015 (KU647676), H/PF/2013 (KJ776791), and MR766 (LC002520)	Envelope protein/NS4A	0.17 FFU/mL– $2.3 \times 10^2$ FFU/mL	Yes	No	[45]

Abbreviations: aM, attomolar; PFU, plaque-forming unit; FFU, focus forming units; TCID<sub>50</sub>, 50% tissue culture infective dose.

### 3.1. Step 1: Template Preparation

The LAMP assay can be performed using either a one-step or two-step protocol directly from sample matrices, including serum, semen, urine, saliva, and mosquitoes homogenate. The use of Bst 2.0 polymerase, Bst 3.0 polymerase or OmniAmp polymerase enables the test to be performed in a one-step protocol [38,40–42,53,65] (Figure 2). These enzymes have both reverse transcriptase (RT) and DNA polymerase activities at a fixed temperature (50–72 °C), and so can be run isothermally for the direct detection of RNA or DNA targets. It is the robust nature of these enzymes, which are capable of maintaining their activities even in the presence of reaction inhibitors, that enables the assay to be performed in the field without the need to extract the genetic material from the samples [38,40,65]. Based on this advantage, several one-step LAMP assays have been developed for the detection of ZIKV [41,42,53].

Bst 2.0 DNA polymerase is an *in silico* designed enzyme homologue of *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase I. The enzyme contains 5′-3′ DNA polymerase activity and strong strand displacement activity, but lacks 5′-3′ exonuclease activity. Compared to its wild-type homologue, Bst 2.0 DNA polymerase has improved thermostability, salt tolerance, yield, and provides faster amplification [66,67]. Although Bst 2.0 exhibits RT activity [41], it is recommended to also add a dedicated reverse transcriptase to LAMP reactions for more consistent and robust amplification of RNA targets [27,39].

Similar to the Bst DNA polymerase 2.0, Bst DNA polymerase 3.0 is an *in vitro* derivative of *Bacillus stearothermophilus* Bst DNA polymerase and features further improved amplification reaction properties compared to Bst 2.0. The enzyme has been successfully used for rapid ZIKV detection in both human and mosquito samples [40,53]. Bst DNA polymerase 3.0 exhibits DNA polymerase activity 5′-3′ with either DNA or RNA targets, strong strand displacement activity, improved RT activity compared to Bst DNA polymerase 2.0 and lacks both 5′-3′ and 3′-5′ exonuclease activity. Importantly, Bst DNA polymerase 3.0 displays robust performance even in high concentrations of reaction inhibitors, which has enabled LAMP applications for the ZIKV even without sample pre-treatment or RNA extraction [40,53]. These advantages make Bst DNA polymerase 3.0 an excellent candidate for POC platforms and the rapid detection of ZIKV and other pathogens. OmniAmp is an alternate engineered DNA polymerase, derived from PyroPhage 3173, that has shown strong RT activity and excellent performance in LAMP assays but has yet to be exploited for ZIKV detection [65].

In contrast, the two-step LAMP protocol needs the addition of a reverse transcriptase enzyme together with the DNA polymerase (Figure 2). The use of the two-step LAMP protocol to detect ZIKV has been described by several groups [27,28,57,59]. However, the two-step protocol does carry some disadvantages that make it less practical than a one-step LAMP. The two-step method is more expensive, requires longer times, including additional samples and reagents handling steps, which increases the probability of contamination and error [53]. Taken together, these aspects limit the practical use of two-step LAMP for POC applications.

Recently, Wang et al. (2016) developed an RT-LAMP assay to detect ZIKV using the commercially available Loopamp RNA Amplification Kit (Eiken Chemical Co., Ltd., Japan) [39]. The kit contains a mixture of Bst DNA polymerase and AMV reverse transcriptase for the reaction. Furthermore, the study evaluated three different sample processing methods (proteinase K treatment, alkaline lysis, and boiling lysis) and compared them with RNA extraction using a commercial kit (QIAmp viral RNA mini kit). They showed that the RT-LAMP assay using proteinase K treatment had similar sensitivity compared to RNA extracted using the commercial kit and better than the other two methods.

In another study, Yaren et al. (2017) reported a multiplexed system based on RT-LAMP capable of detecting ZIKV, DENV, and CHIKV in human samples and mosquito homogenate [27]. Their assay was able to detect ZIKV directly in urine and plasma without RNA extraction or pretreatment. In contrast, for reactions using mosquito samples, it was necessary to treat samples with ammonia and ethanol before applying them to the LAMP reaction mixture [27].

### 3.2. Step 2: Practical Implementation

With the fundamentals of LAMP established, we now turn our attention to the practical aspects of designing and running reactions. Most LAMP reactions are carried out in plastic microtubes using a mixture of a buffer,  $Mg^{2+}$  ions, enzyme, dNTP, which are generally supplied as part of the kit. This is combined with custom primers and the sample of interest that may contain the target genome. The design of ZIKV primers begins with performing multiple alignments of ZIKV and other arbovirus sequences to identify unique and conserved regions within the ZIKV genome that do not share homology with the related flaviviruses. After choosing the target region, the design of LAMP primers can be carried out using online software such as PrimerExplorer (<https://primerexplorer.jp/e/>), LAMP Designer Optigene ([www.optigene.co.uk/lamp-designer/](http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/)) or Premier Biosoft (<http://www.premierbiosoft.com/isothermal/lamp.html>). LAMP primers for ZIKV have been successfully designed to target the genes encoding NS1, NS2A, NS4A, NS5, the capsid and envelope proteins of the ZIKV genome [37–39,41,45,63].

In establishing a new LAMP diagnostic assay, it is important to optimize the protocol and include the proper controls to limit the risk of false positives or non-target amplification [40]. Variables to consider in LAMP optimization include  $Mg^{2+}$  concentrations, dNTP mix concentrations, primers, time reaction, and temperature reaction, which all have a key role in producing reliable results [40,42,44,64]. Lower LAMP temperatures and excessive free  $Mg^{2+}$  ions are associated with non-target amplification [27], and, indeed, previous studies have reported false-positive results in RT-LAMP assays [40,41,44,64].

These parameters have recently been explored by Lee et al. (2016) in their work that optimized RT-LAMP for a ZIKV lateral flow assay (LFA) using Bst 3.0 DNA polymerase [40]. In doing so, they found that optimization of  $Mg^{2+}$ , dNTP, and the reaction time could provide detection of the ZIKV RNA in 30 min without non-target amplification. In a similar work, Kaarj et al. (2018) optimized an RT-LAMP assay combined with a paper microfluidic chip and smartphone to detect ZIKV in only 15 min. Varying only reaction temperature, they found that no amplification occurred at 70 °C, while non-specific amplification in non-template control (NTC) occurred at the sub-optimal temperature of 65 °C, which, as mentioned above, is known to allow off-target amplification. However, by placing the reaction at 68 °C, the target template was successfully amplified from samples without false positives [44].

Neves et al. (2019) developed a simple system based on an RT-LAMP assay using Bst DNA polymerase 3.0 without RNA extraction or sample pre-treatment [64]. They reported that the reaction time was the most important factor to avoid non-target amplification. Evaluating four reaction durations (5, 10, 15, and 20 min), they found that 10-min incubations were sufficient to detect ZIKV from serum samples, whereas 20-min incubations resulted in false-positive amplifications in non-template control (NTC) using water [64].

### 3.3. Step 3: LAMP Modes of Output

An incredible array of outputs has been designed to allow users to detect positive LAMP reactions. For ZIKV alone, this includes colorimetric detection using fluorescent dyes, UV light irradiation, agarose gel electrophoresis, turbidity, real-time fluorescence, smartphone, lateral flow assay, and AC susceptometry. Below we review each of these output modes, beginning with the fluorescent dyes calcein and SYBR green I dyes, which are some of the most widely used for the detection of LAMP amplicons. Here as target sequences are amplified; the dye binds becoming fluorescent and creating an optical readout of LAMP-mediated detection [42,53,64]. Although it presents adequate sensitivity, SYBR green I could inhibit LAMP reaction if the dye is added during the set-up of the LAMP reaction mixture, and when added after incubation, there is a real risk of cross-contamination between LAMP reaction tubes [68]. Recognizing this challenge, we set out to develop a method to address the issue of cross-contamination following incubation, which is a key limitation of the LAMP assay [53,68]. A few studies have reported closed tube methods to minimize cross-contamination in

the LAMP result [69–71]. However, our approach was to pre-load reaction tube lids with 1  $\mu\text{L}$  of 1:10 dilution of SYBR green I dye to the center of the tube caps before the reaction. By simply inverting the reactions after isothermal incubation, the SYBR green I mixes with the sample, allowing the results to be observed immediately by eye based on the change in color [53].

As mentioned, calcein has also been used to visualize LAMP products in assays for the detection of ZIKV [39]. Calcein dye is a metal ion binding fluorophore, which can be added prior to incubation, where it forms a complex with magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$  obtained from LAMP reaction). Here the positive generation of LAMP products leads to a change in color from orange to green, which can be visualized by eye under natural light or UV irradiation. ZIKV-negative samples are indicated by an orange color, whereas ZIKV-positive samples are indicated by a green color. More recently, several research groups have reported the use of other dyes for end-point reads of LAMP assays, with potential applications for ZIKV. These include malachite green dye [72,73], hydroxynaphthol blue dye [74,75], evagreen dye [76,77], Goldview II dye [78], Gelred dye [79,80], SYTO fluorescent dye [81,82], and berberine dye [83].

Detection of amplified products in LAMP assays can also be accomplished by agarose gel electrophoresis. Here positive reactions generate ladder-like patterns, which correspond to the series of inverted repeats of the amplified target gene and cauliflower-like structures obtained from LAMP products reactions. This has been a popular method of detection for LAMP-based ZIKV assays [27,39,40,42,44,53,64]. However, visualization of LAMP amplicons by gel electrophoresis is time-consuming and carries an increased risk of cross-contamination between samples due to the massive generation of DNA amplicons during the LAMP assay [46,84].

Turbidity offers an alternate approach to tracking LAMP-based detection. Using a turbidimeter or an absorbance-based (650 nm) plate reader, the optical density of LAMP reactions can be monitored for a white precipitation that is caused by the generation of magnesium pyrophosphate,  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  (product generated during LAMP). Recently, turbidity-based LAMP was used to detect the presence of ZIKV in serum samples [39,41]. In the case of the absence of turbidimeter, a brief centrifugation of the LAMP reaction can be used to pellet the white precipitation for detection by eye under natural light [85].

Coupling the LAMP assay to real-time fluorescence has been used for detection of ZIKV in several applications, including from patient and mosquito samples [27,28,41,57,60]. Although it is a useful strategy, real-time fluorescence monitoring requires costly instrumentation that is incompatible with use in remote and low-resource areas where containment and surveillance are critically required. Moreover, some studies reported the use of ZIKV probes in the LAMP reaction, which limits the application in low-resource countries due to the high cost and the need for expensive equipment for data acquisition and analysis of results [27].

LAMP-based assays have also started to pair with portable companion hardware like the smartphone for reading ZIKV assay results [44,58,60]. Using this approach, Ganguli et al. (2017) developed a microfluidic platform using an RT-LAMP smartphone-enabled assay for simultaneous detection of ZIKV, CHIKV, and DENV from whole blood samples. They showed that this system was specific and sensitive for the detection of ZIKV, including the ability to quantitatively measure the target genetic material from samples [60]. A similar RT-LAMP assay paired a microfluidic chip with smartphone-based measurement to simultaneously detect ZIKV, DENV, and CHIKV in blood, urine, and saliva. They used a system involving RT-LAMP reaction coupled with another technology using quenching of unincorporated amplification signal reporters (QUASR), which offers bright signals, multiplexing capabilities, and reduces the detection of false-positives to analyze fluorescence, and the results can be analyzed by fluorescence intensity or by the naked eye [58].

In another study, Kaarj et al. (2018) developed an RT-LAMP assay using a microfluidic chip combined with a pH indicator and a smartphone to detect ZIKV. Using the pH change of productive LAMP reactions, ZIKV positive samples from urine and human plasma could be quantified with the pH-induced color change after only 15 min using the smartphone camera. Moreover, the assay

was specific and provided an impressive 1 copy/ $\mu\text{L}$  limit of detection [44]. Also, in the context of microfluidic devices, Sabalza et al. (2018) developed an RT-LAMP assay coupled with reverse dot blot analysis (RDB) to detect ZIKV in human saliva. The system was configured as a bench-top isothermal amplification device and was capable of analyzing 24 samples simultaneously and automatically from sample introduction to detection using the RDB technique [63].

AC susceptometry has also been used as a LAMP readout to detect synthetic ZIKV oligonucleotides [38]. The system contains streptavidin-magnetic nanoparticles (streptavidin-MNPs) premixed with LAMP reagents, including the analyte and biotinylated primers. LAMP results are then measured by a portable AC susceptometer, where the changes of the hydrodynamic volume are probed as Brownian relaxation frequency shifts, which can be used for the quantification of ZIKV. The authors evaluated the analytical sensitivity and showed that LAMP was able to recognize 1 attomolar (aM:  $10^{-18}$  moles per liter) synthetic ZIKV oligonucleotide in 20% serum within 27 min and also reported no cross-reactivity with other viruses, including four types of synthetic NS5 genes from relevant arboviruses, YFV, DENV, WNV, and JEV [38].

Several studies have focused on developing lateral flow assays (LFA) coupled with the LAMP method for end-point detection of ZIKV [37,40]. LFA is a favored technique because it is user-friendly, practical for in-field applications, lightweight, portable, and low-cost. One such study by Song et al. (2016), developed a disposable cassette based on RT-LAMP for rapid molecular detection of ZIKV. The instrument-free POC system uses a chemically heated cup to enable testing without the need for electrical power, which greatly reduces instrumentation complexity, processing time, and cost compared to the gold standard method (RT-qPCR). Using leuco crystal violet (LCV) dye, which is visible with the naked eye, they demonstrated that the RT-LAMP assay combined with a microfluidic cassette could detect as few as 5 plaque-forming units (PFU) of the ZIKV in as little as 40 min [37].

In another study, the authors combined the Bst 3.0 DNA polymerase-based RT-LAMP with an LFA to detect ZIKV [40]. This LFA LAMP platform contains an absorbent pad, a test line, a conjugate pad, and a buffer loading pad. Antidigoxigenin and biotin were also affixed at the control line and test line, respectively, and streptavidin-coated gold nanoparticles (AuNPs) were accrued in the conjugate pad. After 30 min of RT-LAMP assay at 72 °C, the resultant products of the assay were rapidly and simply analyzed using 1  $\mu\text{L}$  of the reaction by the LFA test in less than 5 min with a total assay time of 35 min. Taken together, the research we have summarized suggests that the RT-LAMP assay, in combination with any one of these modes of diagnostic reporting, provides a powerful strategy for the development of POC tools for the rapid diagnosis of ZIKV, and, moreover, this system holds great promise for the POC diagnosis of the many other pathogens.

#### 4. LAMP Specificity

For clinical validation of a diagnostic test, determination of its analytical and diagnostic specificity is required. Analytical specificity refers to the ability of an assay to unequivocally detect the target pathogen in a sample while remaining negative in the presence of relevant, non-target pathogens. Diagnostic specificity, in turn, refers to the probability that the test will be negative when the disease is absent (true negative rate).

The LAMP assay's use of four or six primers, which target six or eight distinct regions within a target, respectively conferring a high analytical specificity and selectivity to diagnostics using this approach [34,86]. In the case of LAMP assays for ZIKV detection, it is important that analytical specificity be assessed in the presence of other mosquito-borne arboviruses found in the region. In the case of the most recent ZIKV outbreak in Latin America, this would include the arboviruses DENV 1-4, CHIKV, and YFV [87–91].

High analytical specificity for LAMP-based ZIKV assays has been reported in both mosquito and human samples. In these studies, no detectable cross-reaction was seen against dengue virus (DENV 1-4), chikungunya virus (CHIKV), yellow fever virus (YFV), West Nile virus (WNV), Saint Louis encephalitis (SLEV), Western equine encephalitis virus (WEEV), Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), Rift



Valley fever virus (RVFV), Bussuquara virus (BSQV), Langat virus (LGTV), Powassan virus (POWV), Ilheus virus (ILHV), *Plasmodium falciparum*, influenza virus and other pathogens [37,39,41,42,59].

Recently, Guo et al. (2018) developed a real-time fluorescence RT-LAMP assay for ZIKV detection targeting the NS5 gene. In this study, the authors tested the assay's specificity against eight pathogens: *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Streptococcus mitis* ATCC49456, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Haemophilus influenzae* ATCC49766, and *Escherichia coli* ATCC25922. The results showed excellent specificity for the detection of ZIKV [57]. While exciting, this study evaluated analytical specificity only against bacterial species and not against arboviruses that cause similar symptoms to ZIKV. Moreover, the ZIKV strain used was the historical MR766 ZIKV strain, which is genetically very different from the contemporary epidemic ZIKV strains.

Several investigations have demonstrated that carry-over contamination and nonspecific amplifications are some of the major problems associated with the LAMP assay, producing false-positive results [40,68,92]. In one study, Kaarj et al. 2018 developed a wax-printed paper microfluidic chip utilizing RT-LAMP, whose results could be detected by smartphone imaging. They used a previously published primer set and observed that temperature was the most important factor for a specific and efficient RT-LAMP reaction to ensure reliable results and eliminate non-target amplification. Assay specificity was evaluated only against the Influenza A/H1N1 virus, which precludes generalization of this result to other arboviruses [44].

In another research, a total of 81 diagnostic specimens (serum and plasma) collected from patients in Nicaragua and Brazil was assayed by LAMP and the results compared with RT-qPCR [41]. They performed the experiments in quadruplicate and considered the positive sample based on one or more positive replicates with a defined melting point. From the total number of samples tested, 55 positive samples were determined by the LAMP assay. Of the 55 positive samples, 39 matched the results from the gold standard method for diagnostic of ZIKV, and 16 were false positives. In contrast, of the 26 LAMP assay-negative samples, 12 were false negatives. The analytical specificity of the LAMP assay was tested against RNAs from BSQV, SLEV, Langat virus, LGTV, ILHV, DENV-2, WNV, YFV, and CHIKV.

In this context, we developed a highly specific RT-LAMP assay for the detection of ZIKV in mosquito samples [53]. We evaluated the analytical specificity with seven arboviruses circulating in Brazil, including ZIKV (PE-243), DENV-1 (PE/97-42735), DENV 2 (PE/95-3808), DENV 3 (PE/02-95016), DENV 4 (PE/10-0081), YFV (17DD), and CHIKV (PE2016-480). The study shows that RT-LAMP is very specific for ZIKV detection [53]. Taken together, these results demonstrate the high specificity of the LAMP assay and prove a potential, inexpensive, and accurate molecular detection tool for the detection of ZIKV in arthropod vectors.

## 5. LAMP Sensitivity

Similar to specificity, analytical and diagnostic sensitivities are key parameters for the validation of a diagnostic test. The analytical sensitivity, also known as the limit of detection (LOD) is the lowest amount of the analyte that can reliably be detected in a sample. On the other hand, diagnostic sensitivity refers to the probability that the test will be positive when the disease is present (true positive rate).

To provide perspective on the analytical sensitivity of different LAMP assays for ZIKV, we assembled a table summarizing this measure for all studies using ZIKV-spiked or RNA-spiked samples (Table 1) [27,28,37–42,44,53,57–64]. The top-performing ZIKV RT-LAMP method could detect ZIKV RNA standard at as few as 0.02 PFU/test, using RNA prepared by in vitro transcription. For assays that used RNA extracted from ZIKV specimens, top-performing assays provided greater sensitivity than conventional PCR and demonstrated sensitivity similar to RT-qPCR [39]. Regarding reaction time, the RT-LAMP assay was able to detect viral RNA from ZIKV-spiked serum and urine samples (14.5 TCID<sub>50</sub>/mL) in as little as 15 min. However, this last study found that the limit of detection was less sensitive than the RT-qPCR assay for the diagnosis of ZIKV [28].

While some studies have found LAMP to have lower or similar sensitivity for the ZIKV when compared to RT-qPCR [28,39], others have found LAMP to out-perform RT-qPCR sensitivity. Calvert and coworkers demonstrated that the RT-LAMP assay was able to detect ZIKV RNA in serum and urine and showed sensitivity 10-fold higher than RT-qPCR [59]. Zhao and Feng developed a LAMP assay that detected  $0.5 \times 10^{-9}$  or  $1.12 \times 10^{-11}$  pmol/ $\mu$ l DNA for NS5 or E genes, respectively. This represented a 100-fold greater sensitivity compared with conventional PCR and RT-qPCR [43].

As mentioned, we have recently developed an RT-LAMP assay for the detection of ZIKV in mosquito samples [53]. To calculate the analytical sensitivity of our RT-LAMP assay, we used crude lysate of *Aedes aegypti* spiked with a 10-fold serial dilution of ZIKV ranging from  $10^5$  to  $10^{-7}$  PFU without RNA extraction from ZIKV spiked mosquito samples, with positive detection down to  $10^{-5}$  PFU. Additionally, our RT-LAMP assay was also able to detect ZIKV in mosquito samples that had been previously assayed as negative by RT-qPCR with Ct value ranging from 38.6 to 40.3. Taken together, our results suggest that our modification of the RT-LAMP assay could provide sensitivity 10,000 times greater than RT-qPCR for the detection of ZIKV in mosquito samples, thus corroborating previous studies demonstrating that the sensitivity of the LAMP method can be superior to RT-qPCR [42,43,59]. Importantly, there are a number of reasons that might have involved for this variation in sensitivity, including differences in enzymes and research suppliers, primers, detection systems, and type of biological samples.

## 6. LAMP Assay Evaluation Using Clinical Samples

The suitability of LAMP assays for ZIKV detection in clinical samples has been evaluated in several studies using approximately 800 selected samples from patients with suspected arboviruses infection in Brazil, Nicaragua, and the USA [28,41,42,59,61]. For comparison, clinical samples were also assayed using RT-qPCR. The comparative analysis of the ZIKV LAMP assays with RT-qPCR was based on several statistical parameters, such as sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, likelihood ratio positive, likelihood ratio negative, and overall accuracy [59].

In the first of these studies, Kurosaki et al. (2017) evaluated of the ZIKV RT-LAMP assay using 189 specimens (90 plasma/serum and 99 urine) from 120 suspected arbovirus infection cases and simultaneously tested the samples with RT-qPCR technique as a reference assay to detect ZIKV. The results obtained by RT-LAMP assay were concordant with those of the RT-qPCR. However, no statistical diagnostic parameters were calculated based on the results obtained in this work [28].

In another study, Calvert et al. (2017) evaluated of the ZIKV RT-LAMP assay with 178 clinical samples, including 94 serum and 84 urine specimens. The study found the assay to have a sensitivity of 54.5% (95% CI 45.2%–63.5%), specificity of 94.1% (95% CI 85.8%–97.7%), likelihood ratio positive of 9.3% (95% CI 3.8%–23.9%), likelihood ratio negative of 0.5 (95% CI 0.4%–0.6%) and accuracy of 69.7 (95% CI 62.6%–75.9%) for detection of ZIKV relative to RT-qPCR for diagnosis of ZIKV infection. The positive and negative predictive values were calculated based on pre-test probability resulting in approximately 30% for both predictive values [59].

Other previously published papers also evaluated the efficacy of the RT-LAMP for diagnosis of the ZIKV in clinical samples and compared these results with RT-qPCR [41,42,61]. Using 131 clinical samples from suspected patients collected during the acute phase of the disease, including 68 saliva and 63 urine specimens, an RT-LAMP assay was able to detect the ZIKV in 53.4% of the total number of samples. Interestingly, this study showed that ZIKV detection using saliva had a faster time to positivity compared to urine samples [61].

## 7. LAMP for Detection of ZIKV in Mosquito Samples

Surveillance of ZIKV in mosquitoes is an important measure for identifying potential entry points and monitoring virus activity [93]. LAMP has been evaluated for the detection of the ZIKV in mosquito samples by many groups, including ourselves [27,41,42,53]. Yaren et al. reported a diagnostic tool based on RT-LAMP for the detection of ZIKV in infected mosquito samples [27]. However, the need



for RNA extraction, complex reagents, such as ammonia, and the LED blue light for visualization of fluorescent signal limits its applications for POC diagnostics in low-resource countries. Other work by Lamb et al. (2018) developed a one-step protocol without RNA extraction that provided results that can be visualized in under 30 min with the naked eye under natural light. We, too, have concluded that the LAMP assay is specific, sensitive, and robust for the detection of ZIKV in experimentally infected *Aedes aegypti* [42].

Chotiwan and coworkers described a LAMP assay for rapid detection of Asian- and African-lineage Zika viruses without RNA extraction [41]. The authors demonstrated that ZIKV RNA can be detected by the LAMP test using infected C3/36 mosquito cell lines and infected mosquitoes. Results were visualized by turbidity after 1 h of incubation of the sample in a simple heat block.

More recently, we developed a novel RT-LAMP assay to detect ZIKV in mosquitoes samples from in Brazil [58]. In this study, we reported a one-step RT-LAMP assay, specific and very sensitive for the detection of ZIKV in experimentally and naturally infected mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*) without RNA extraction or reverse transcriptase reaction. Importantly, our assay can be performed in a heat block and the results distinguished between positive and negative samples by color change through the naked eye. In addition, the overall performances of the RT-LAMP assay relative to RT-qPCR for the detection of ZIKV in mosquito samples were performed using 60 mosquito samples collected at the epicenter of the Zika epidemic in Pernambuco state, Brazil [58]. The ZIKV RT-LAMP assay for detection of ZIKV in mosquito samples had a diagnostic sensitivity of 100% (95% CI 88.06% to 100.00%), diagnostic specificity of 91.18 % (95% CI 76.32% to 98.14%), ZIKV prevalence of 46.03% (95% CI 33.39% to 59.06%), positive predictive value of 90.62% (95% CI 76.64% to 96.61%), negative predictive value of 100%, and the overall accuracy of the RT-LAMP test was determined as 95.24% (95% CI 86.71% to 99.01%). Considering these advantages and satisfactory results, RT-LAMP using Bst 3.0 DNA polymerase is more suitable to be used for molecular diagnostics in field settings, mainly in low-resource scenarios.

## 8. Multiplexing

Mosquito-borne viruses such as ZIKV, DENV, and CHIKV have rapidly spread across the world, causing epidemics in several countries in South America and the Pacific region, causing significant global public health concern [14]. In these settings, multiplexed detection of the circulating arboviruses is highly desirable. In the last few years, several platforms based on LAMP have been developed for the simultaneous detection of ZIKV, DENV, and CHIKV [27,58,60]. Although these approaches were able to specifically differentiate the target viruses, they displayed lower sensitivity when compared to monoplex LAMP assays (Table 1).

## 9. Clinical Application and Public Health Perspectives

The current ZIKV epidemic has highlighted key limitations for the POC diagnosis of ZIKV and remains a significant unmet need in low-resource countries. With the fact that ZIKV, DENV, and CHIKV cause similar symptoms and co-circulate in many regions of the world, definitive clinical diagnosis is not possible. Although there are reliable laboratory diagnostic methods for ZIKV infection, there remains a need for lower-cost diagnostic platforms that can be performed in the field and overcomes the drawbacks of the gold-standard RT-qPCR assay. LAMP has proven to be a rapid, easy, accurate, and inexpensive platform for ZIKV diagnostics, especially in remote areas and developing countries which have been heavily affected by this devastating pathogen.

One-step LAMP platforms using enzymes with both reverse transcriptase and DNA polymerase activities, such as Bst DNA Polymerase 3.0 or OmniAmp polymerase are more attractive due to convenience to set up the reactions and less handling of samples, thereby reducing pipetting errors and the risk of contamination. Moreover, protocols that do not required sample pre-treatment or RNA extraction combined with straightforward visualization of results are ideal for POC applications, especially in low-resource settings.

The LAMP for ZIKV has the potential to provide diagnostic performance equal to, or even superior to, RT-qPCR. This type of POC tool can bring decentralization of health care through diagnosis and also have great potential for producing reliable and fast results to assist physicians in decision-making and therapeutic management of patients. The next priorities for the field are to operationalize this capability into robust and simple kits for mainstream use.

**Author Contributions:** L.P., K.P. and S.J.R.d.S. conceived the work. S.J.R.d.S. drafted the article. All authors contributed equally to this paper with the design of the paper, literature review and analysis, critical revision, editing, and approval of the final version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Canadian International Development Research Centre (IDRC—108410-001) and Foundation for Science and Technology of Pernambuco (FACEPE—APQ-0154-2.12/16). The funders had no role in study design, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Haddow, A.D.; Schuh, A.J.; Yasuda, C.Y.; Kasper, M.R.; Heang, V.; Huy, R.; Guzman, H.; Tesh, R.B.; Weaver, S.C. Genetic characterization of Zika virus strains: Geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1477. [[CrossRef](#)]
2. Faye, O.; Freire, C.C.; Iamarino, A.; de Oliveira, J.V.; Diallo, M.; Zannotto, P.M.; Sall, A.A. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2636. [[CrossRef](#)]
3. Petersen, L.R.; Jamieson, D.J.; Powers, A.M.; Honein, M.A. Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1552–1563. [[CrossRef](#)]
4. Chambers, T.J.; Hahn, C.S.; Galler, R.; Rice, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann. Rev. Microbiol.* **1990**, *44*, 649–688. [[CrossRef](#)]
5. Kuno, G.; Chang, G.J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* **2007**, *152*, 687–696. [[CrossRef](#)]
6. Lanciotti, R.S.; Kosoy, O.L.; Laven, J.J.; Velez, J.O.; Lambert, A.J.; Johnson, A.J.; Stanfield, S.M.; Duffy, M.R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1232–1239. [[CrossRef](#)]
7. Waggoner, J.J.; Pinsky, B.A. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 860–867. [[CrossRef](#)]
8. Dick, G.W.; Kitchen, S.F.; Haddow, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* **1952**, *46*, 509–520. [[CrossRef](#)]
9. Iosifidis, S.; Mallet, H.P.; Leparc Goffart, I.; Gauthier, V.; Cardoso, T.; Herida, M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med. Mal. Infect.* **2014**, *44*, 302–307. [[CrossRef](#)]
10. Musso, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1887. [[CrossRef](#)]
11. Gatherer, D.; Kohl, A. Zika virus: A previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 269–273. [[CrossRef](#)]
12. Oehler, E.; Watrin, L.; Larre, P.; Leparc-Goffart, I.; Lastere, S.; Valour, F.; Baudouin, L.; Mallet, H.; Musso, D.; Ghawche, F. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—Case report, French Polynesia, December 2013. Euro surveillance: Bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. *Eurosurveillance* **2014**, *19*, 20720. [[CrossRef](#)]
13. Campos, G.S.; Bandeira, A.C.; Sardi, S.I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1885–1886. [[CrossRef](#)]
14. Campos, T.L.; Duraes-Carvalho, R.; Rezende, A.M.; de Carvalho, O.V.; Kohl, A.; Wallau, G.L.; Pena, L.J. Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. *Int. J. Genom.* **2018**, *2018*, 6941735. [[CrossRef](#)]
15. Rasmussen, S.A.; Jamieson, D.J.; Honein, M.A.; Petersen, L.R. Zika Virus and Birth Defects—Reviewing the Evidence for Causality. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1981–1987. [[CrossRef](#)]

16. Meneses, J.D.A.; Ishigami, A.C.; de Mello, L.M.; de Albuquerque, L.L.; de Brito, C.A.A.; Cordeiro, M.T.; Pena, L.J. Lessons Learned at the Epicenter of Brazil's Congenital Zika Epidemic: Evidence From 87 Confirmed Cases. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2017**, *64*, 1302–1308. [[CrossRef](#)]
17. Diallo, D.; Sall, A.A.; Diagne, C.T.; Faye, O.; Ba, Y.; Hanley, K.A.; Buenemann, M.; Weaver, S.C.; Diallo, M. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109442. [[CrossRef](#)]
18. Guo, X.X.; Li, C.X.; Deng, Y.Q.; Xing, D.; Liu, Q.M.; Wu, Q.; Sun, A.J.; Dong, Y.D.; Cao, W.C.; Qin, C.F.; et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: A potential vector to transmit Zika virus. *Emerging Microbes Infect.* **2016**, *5*, e102. [[CrossRef](#)]
19. Guedes, D.R.; Paiva, M.H.; Donato, M.M.; Barbosa, P.P.; Krokovsky, L.; Rocha, S.W.D.S.; Saraiva, K.; Crespo, M.M.; Rezende, T.M.; Wallau, G.L.; et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, e69. [[CrossRef](#)]
20. Elizondo-Quiroga, D.; Medina-Sánchez, A.; Sánchez-González, J.M.; Eckert, K.A.; Villalobos-Sánchez, E.; Navarro-Zúñiga, A.R.; Sánchez-Tejeda, G.; Correa-Morales, F.; González-Acosta, C.; Arias, C.F.; et al. Author Correction: Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7887. [[CrossRef](#)]
21. Smartt, C.T.; Shin, D.; Kang, S.; Tabachnick, W.J. (Diptera: Culicidae) From Florida Transmitted Zika Virus. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 768. [[CrossRef](#)]
22. Musso, D.; Nhan, T.; Robin, E.; Roche, C.; Bierlaire, D.; Zisou, K.; Shan Yan, A.; Cao-Lormeau, V.M.; Brout, J. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. Euro surveillance: Bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. *Eurosurveillance* **2014**, *19*, 20761.
23. Cunha, M.S.; Esposito, D.L.; Rocco, I.M.; Maeda, A.Y.; Vasami, F.G.; Nogueira, J.S.; de Souza, R.P.; Suzuki, A.; Addas-Carvalho, M.; Barjas-Castro, M.E.L.; et al. First Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an Autochthonous Transmission in Brazil. *Genome Announc.* **2016**, *4*, e00032-16. [[CrossRef](#)]
24. Hills, S.L.; Russell, K.; Hennessey, M.; Williams, C.; Oster, A.M.; Fischer, M.; Mead, P. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission—Continental United States, 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 215–216. [[CrossRef](#)]
25. Faria, N.R.; Azevedo, R.D.S.D.; Kraemer, M.U.G.; Souza, R.; Cunha, M.S.; Hill, S.C.; Thézé, J.; Bonsall, M.B.; Bowden, T.A.; Rissanen, I.; et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **2016**, *352*, 345–349. [[CrossRef](#)]
26. Wikan, N.; Smith, D.R. Zika virus: History of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, e119–e126. [[CrossRef](#)]
27. Yaren, O.; Alto, B.W.; Gangodkar, P.V.; Ranade, S.R.; Patil, K.N.; Bradley, K.M.; Yang, Z.; Phadke, N.; Benner, S.A. Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 293. [[CrossRef](#)]
28. Kurosaki, Y.; Martins, D.B.G.; Kimura, M.; Catena, A.D.S.; Borba, M.A.C.S.; Mattos, S.D.S.; Abe, H.; Yoshikawa, R.; de Lima Filho, J.L.; Yasuda, J. Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13503. [[CrossRef](#)]
29. Faye, O.; Diallo, D.; Diallo, M.; Weidmann, M.; Sall, A.A. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virol. J.* **2013**, *10*, 311. [[CrossRef](#)]
30. Abd El Wahed, A.; Sanabani, S.S.; Faye, O.; Pessôa, R.; Patriota, J.V.; Giorgi, R.R.; Patel, P.; Böhlken-Fascher, S.; Landt, O.; Niedrig, M.; et al. Rapid Molecular Detection of Zika Virus in Acute-Phase Urine Samples Using the Recombinase Polymerase Amplification Assay. *PLoS Curr.* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)]
31. Nicolini, A.M.; McCracken, K.E.; Yoon, J.Y. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. *J. Biol. Eng.* **2017**, *11*, 7. [[CrossRef](#)]
32. Meagher, R.J.; Negrete, O.A.; Van Rompay, K.K. Engineering Paper-Based Sensors for Zika Virus. *Trends Mol. Med.* **2016**, *22*, 529–530. [[CrossRef](#)]
33. Felix, A.C.; Souza, N.C.S.; Figueiredo, W.M.; Costa, A.A.; Inenami, M.; da Silva, R.M.G.; Levi, J.E.; Pannuti, C.S.; Romano, C.M. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J. Med. Virol.* **2017**, *89*, 1477–1479. [[CrossRef](#)]
34. Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, E63. [[CrossRef](#)]

35. Nemoto, M.; Imagawa, H.; Tsujimura, K.; Yamanaka, T.; Kondo, T.; Matsumura, T. Detection of equine rotavirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Vet. Med. Sci.* **2010**, *72*, 823–826. [[CrossRef](#)]
36. Notomi, T.; Mori, Y.; Tomita, N.; Kanda, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.* **2015**, *53*, 1–5. [[CrossRef](#)]
37. Song, J.; Mauk, M.G.; Hackett, B.A.; Cherry, S.; Bau, H.H.; Liu, C. Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 7289–7294. [[CrossRef](#)]
38. Tian, B.; Qiu, Z.; Ma, J.; Zardán Gómez de la Torre, T.; Johansson, C.; Svedlindh, P.; Strömberg, M. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *86*, 420–425. [[CrossRef](#)]
39. Wang, X.; Yin, F.; Bi, Y.; Cheng, G.; Li, J.; Hou, L.; Li, Y.; Yang, B.; Liu, W.; Yang, L. Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol Methods* **2016**, *238*, 86–93. [[CrossRef](#)]
40. Lee, D.; Shin, Y.; Chung, S.; Hwang, K.S.; Yoon, D.S.; Lee, J.H. Simple and Highly Sensitive Molecular Diagnosis of Zika Virus by Lateral Flow Assays. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 12272–12278. [[CrossRef](#)]
41. Chotiwan, N.; Brewster, C.D.; Magalhaes, T.; Weger-Lucarelli, J.; Duggal, N.K.; Rückert, C.; Nguyen, C.; Garcia Luna, S.M.; Fauver, J.R.; Andre, B.; et al. Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaag0538. [[CrossRef](#)]
42. Lamb, L.E.; Bartolone, S.N.; Tree, M.O.; Conway, M.J.; Rossignol, J.; Smith, C.P.; Chancellor, M.B. Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitos by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3803. [[CrossRef](#)]
43. Zhao, J.; Feng, R. Sensitive and rapid detection of Zika virus by loop-mediated isothermal amplification. *Virus Genes* **2018**, *55*, 43–50. [[CrossRef](#)]
44. Kaarj, K.; Akarapipad, P.; Yoon, J.Y. Simpler, Faster, and Sensitive Zika Virus Assay Using Smartphone Detection of Loop-mediated Isothermal Amplification on Paper Microfluidic Chips. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 12438. [[CrossRef](#)]
45. Bui, T.T.; Moi, M.L.; Morita, K.; Hasebe, F. Development of a universal and lineage-specific primer sets for Zika virus (ZIKV) rapid detection in blood and urine samples by using one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *JPN J. Infect. Dis.* **2019**. [[CrossRef](#)]
46. Wong, Y.P.; Othman, S.; Lau, Y.L.; Radu, S.; Chee, H.Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124*, 626–643. [[CrossRef](#)]
47. Salinas, N.R.; Little, D.P. Electric LAMP: Virtual Loop-Mediated Isothermal AMPLification. *ISRN Bioinform.* **2012**, *2012*, 696758. [[CrossRef](#)]
48. Santiago-Felipe, S.; Tortajada-Genaro, L.A.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 300–306. [[CrossRef](#)]
49. Balasuriya, U.B.; Lee, P.Y.; Tiwari, A.; Skillman, A.; Nam, B.; Chambers, T.M.; Tsai, Y.L.; Ma, L.J.; Yang, P.C.; Chang, H.F.; 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* **2014**, *207*, 66–72. [[CrossRef](#)]
50. Lau, Y.L.; Lai, M.Y.; Teoh, B.T.; Abd-Jamil, J.; Johari, J.; Sam, S.S.; Tan, K.K.; AbuBakar, S. Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138694. [[CrossRef](#)]
51. Lopez-Jimena, B.; Bekaert, M.; Bakheit, M.; Frischmann, S.; Patel, P.; Simon-Lorieri, E.; Lambrechts, L.; Duong, V.; Dussart, P.; Harold, G.; et al. Development and validation of four one-step real-time RT-LAMP assays for specific detection of each dengue virus serotype. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006381. [[CrossRef](#)]
52. Lopez-Jimena, B.; Wehner, S.; Harold, G.; Bakheit, M.; Frischmann, S.; Bekaert, M.; Faye, O.; Sall, A.A.; Weidmann, M. Development of a single-tube one-step RT-LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006448. [[CrossRef](#)]
53. Silva, S.J.R.D.; Paiva, M.H.S.; Guedes, D.R.D.; Krokovsky, L.; Melo, F.L.; Silva, M.A.L.D.; Silva, A.D.; Ayres, C.F.J.; Pena, L.J. Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4494. [[CrossRef](#)]



54. Chen, H.W.; Weissenberger, G.; Atkins, E.; Chao, C.C.; Suputtamongkol, Y.; Ching, W.M. Highly Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Leptospira*. *Int. J. Bacteriol.* **2015**, *2015*, 147173. [[CrossRef](#)]
55. Chen, H.W.; Weissenberger, G.; Ching, W.M. Development of Lyophilized Loop-Mediated Isothermal Amplification Reagents for the Detection of *Leptospira*. *Mil. Med.* **2016**, *181* (Suppl. 5), 227–231. [[CrossRef](#)]
56. Nagamine, K.; Hase, T.; Notomi, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell Probes* **2002**, *16*, 223–229. [[CrossRef](#)]
57. Guo, X.G.; Zhou, Y.Z.; Li, Q.; Wang, W.; Wen, J.Z.; Zheng, L.; Wang, Q. Rapid and reliable diagnostic method to detect Zika virus by real-time fluorescence reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *AMB Express* **2018**, *8*, 60. [[CrossRef](#)]
58. Priye, A.; Bird, S.W.; Light, Y.K.; Ball, C.S.; Negrete, O.A.; Meagher, R.J. A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44778. [[CrossRef](#)]
59. Calvert, A.E.; Biggerstaff, B.J.; Tanner, N.A.; Lauterbach, M.; Lanciotti, R.S. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0185340. [[CrossRef](#)]
60. Ganguli, A.; Ornob, A.; Yu, H.; Damhorst, G.L.; Chen, W.; Sun, F.; Bhuiya, A.; Cunningham, B.T.; Bashir, R. Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care. *Biomed. Microdevices* **2017**, *19*, 73. [[CrossRef](#)]
61. Castro, T.; Sabalza, M.; Barber, C.; Abrams, W.; Da Costa, A.C.; De Pádua Milagres, F.A.; Braz-Silva, P.H.; Malamud, D.; Gallottini, M. Rapid diagnosis of Zika virus through saliva and urine by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J. Oral Microbiol.* **2018**, *10*, 1510712. [[CrossRef](#)]
62. Bartolone, S.N.; Tree, M.O.; Conway, M.J.; Chancellor, M.B.; Lamb, L.E. Reverse Transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay for Zika Virus and Housekeeping Genes in Urine, Serum, and Mosquito Samples. *J. Vis. Exp.* **2018**, *139*, e58436. [[CrossRef](#)]
63. Sabalza, M.; Yasmin, R.; Barber, C.A.; Castro, T.; Malamud, D.; Kim, B.J.; Zhu, H.; Montagna, R.A.; Abrams, W.R. Detection of Zika virus using reverse-transcription LAMP coupled with reverse dot blot analysis in saliva. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192398. [[CrossRef](#)]
64. Neves Estrela, P.F.; de Melo Mendes, G.; de Oliveira, K.G.; Bailã, A.M.; de Almeida Soares, C.M.; Assunção, N.A.; Mendes Duarte, G.R. Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. *J. Virol. Methods* **2019**, 113675. [[CrossRef](#)]
65. Chander, Y.; Koelbl, J.; Puckett, J.; Moser, M.J.; Klingele, A.J.; Liles, M.R.; Carrias, A.; Mead, D.A.; Schoenfeld, T.W. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 395. [[CrossRef](#)]
66. Poole, C.B.; Tanner, N.A.; Zhang, Y.; Evans, T.C.; Carlow, C.K. Diagnosis of brugian filariasis by loop-mediated isothermal amplification. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1948. [[CrossRef](#)]
67. Tanner, N.A.; Zhang, Y.; Evans, T.C. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques* **2012**, *53*, 81–89. [[CrossRef](#)]
68. Karthik, K.; Rathore, R.; Thomas, P.; Arun, T.R.; Viswas, K.N.; Dhama, K.; Agarwal, R.K. New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX* **2014**, *1*, 137–143. [[CrossRef](#)]
69. Tao, Z.Y.; Zhou, H.Y.; Xia, H.; Xu, S.; Zhu, H.W.; Culleton, R.L.; Han, E.T.; Lu, F.; Fang, Q.; Gu, Y.P.; et al. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. *Parasit Vectors* **2011**, *4*, 115. [[CrossRef](#)]
70. Hong, M.; Zha, L.; Fu, W.; Zou, M.; Li, W.; Xu, D. A modified visual loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis and differentiation of main pathogens from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28*, 523–531. [[CrossRef](#)]
71. Liang, C.; Cheng, S.; Chu, Y.; Wu, H.; Zou, B.; Huang, H.; Xi, T.; Zhou, G. A closed-tube detection of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) products using a wax-sealed fluorescent intercalator. *J. NanoSci. Nanotechnol.* **2013**, *13*, 3999–4005. [[CrossRef](#)]
72. Lucchi, N.W.; Ljolje, D.; Silva-Flannery, L.; Udhayakumar, V. Use of Malachite Green-Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Plasmodium* spp. *Parasites. PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151437. [[CrossRef](#)]

73. Nzelu, C.O.; Gomez, E.A.; Cáceres, A.G.; Sakurai, T.; Martini-Robles, L.; Uezato, H.; Mimori, T.; Katakura, K.; Hashiguchi, Y.; Kato, H. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for Leishmania infection. *Acta Trop.* **2014**, *132*, 1–6. [[CrossRef](#)]
74. Stranieri, A.; Lauzi, S.; Giordano, A.; Paltrinieri, S. Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for the detection of feline coronavirus. *J. Virol. Methods* **2017**, *243*, 105–108. [[CrossRef](#)]
75. Inoshima, Y.; Takasu, M.; Ishiguro, N. Establishment of an on-site diagnostic procedure for detection of orf virus from oral lesions of Japanese serows (*Capricornis crispus*) by loop-mediated isothermal amplification. *J. Vet. Med. Sci.* **2017**, *78*, 1841–1845. [[CrossRef](#)]
76. Lee, S.H.; Baek, Y.H.; Kim, Y.H.; Choi, Y.K.; Song, M.S.; Ahn, J.Y. One-Pot Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Detecting MERS-CoV. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 2166. [[CrossRef](#)]
77. Oscorbin, I.P.; Belousova, E.A.; Zakabunin, A.I.; Boyarskikh, U.A.; Filipenko, M.L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques* **2016**, *61*, 20–25. [[CrossRef](#)]
78. Wu, R.; Liu, X.; Guo, B.; Chen, F.; Wang, X. Development of double loop-mediated isothermal amplification to detect *Listeria monocytogenes* in food. *Curr. Microbiol.* **2014**, *69*, 839–845. [[CrossRef](#)]
79. Woźniakowski, G.; Samorek-Salamonowicz, E.; Kozdruń, W. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and PCR for the detection and differentiation of Marek's disease virus serotypes 1, 2, and 3. *Avian Dis.* **2013**, *57* (Suppl. 2), 539–543.
80. Wassermann, M.; Mackenstedt, U.; Romig, T. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the identification of species within the *Echinococcus granulosus* complex. *Vet. Parasitol.* **2014**, *200*, 97–103. [[CrossRef](#)]
81. Mwendwa, F.; Mbae, C.K.; Kinyua, J.; Mulinge, E.; Mburugu, G.N.; Njiru, Z.K. Stem loop-mediated isothermal amplification test: Comparative analysis with classical LAMP and PCR in detection of *Entamoeba histolytica* in Kenya. *BMC Res. Notes* **2017**, *10*, 142. [[CrossRef](#)]
82. Watts, M.R.; James, G.; Sultana, Y.; Ginn, A.N.; Outhred, A.C.; Kong, F.; Verweij, J.J.; Iredell, J.R.; Chen, S.C.; Lee, R. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *90*, 306–311. [[CrossRef](#)]
83. Fischbach, J.; Xander, N.C.; Frohme, M.; Glökler, J.F. Shining a light on LAMP assays—A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques* **2015**, *58*, 189–194. [[CrossRef](#)]
84. Niessen, L. Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 553–574. [[CrossRef](#)]
85. Zhou, D.; Guo, J.; Xu, L.; Gao, S.; Lin, Q.; Wu, Q.; Wu, L.; Que, Y. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4912. [[CrossRef](#)]
86. Mori, Y.; Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.* **2009**, *15*, 62–69. [[CrossRef](#)]
87. Pessôa, R.; Patriota, J.V.; Lourdes de Souza, M.; Felix, A.C.; Mamede, N.; Sanabani, S.S. Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. *Medicine* **2016**, *95*, e3201. [[CrossRef](#)]
88. Magalhaes, T.; Braga, C.; Cordeiro, M.T.; Oliveira, A.L.S.; Castanha, P.M.S.; Maciel, A.P.R.; Amancio, N.M.L.; Gouveia, P.N.; Peixoto-da-Silva, V.J.; Peixoto, T.F.L.; et al. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0006055. [[CrossRef](#)]
89. Cevallos, V.; Ponce, P.; Waggoner, J.J.; Pinsky, B.A.; Coloma, J.; Quiroga, C.; Morales, D.; Cárdenas, M.J. Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador. *Acta Trop.* **2018**, *177*, 74–80. [[CrossRef](#)]
90. Sánchez-Carbonel, J.; Tantaléan-Yépez, D.; Aguilar-Luis, M.A.; Silva-Caso, W.; Weilg, P.; Vásquez-Achaya, F.; Costa, L.; Martins-Luna, J.; Sandoval, I.; Del Valle-Mendoza, J. Identification of infection by Chikungunya, Zika, and Dengue in an area of the Peruvian coast. Molecular diagnosis and clinical characteristics. *BMC Res. Notes* **2018**, *11*, 175. [[CrossRef](#)]

91. Couto-Lima, D.; Madec, Y.; Bersot, M.I.; Campos, S.S.; Motta, M.A.; Santos, F.B.D.; Vazeille, M.; Vasconcelos, P.F.D.C.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Failloux, A.B. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4848. [[CrossRef](#)]
92. Hsieh, K.; Mage, P.L.; Csordas, A.T.; Eisenstein, M.; Soh, H.T. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3747–3749. [[CrossRef](#)]
93. Ayllón, T.; Campos, R.M.; Brasil, P.; Morone, F.C.; Câmara, D.C.P.; Meira, G.L.S.; Tannich, E.; Yamamoto, K.A.; Carvalho, M.S.; Pedro, R.S.; et al. Early Evidence for Zika Virus Circulation among *Aedes aegypti* Mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1411–1412. [[CrossRef](#)]




© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

COMMENT

Open Access



# Adaptive, diverse and de-centralized diagnostics are key to the future of outbreak response

Quinn Matthews<sup>1</sup>, Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>2</sup>, Masoud Norouzi<sup>1</sup>, Lindomar José Pena<sup>2</sup> and Keith Pardee<sup>1,3\*</sup> 

## Abstract

The global spread of SARS-CoV-2 has shaken our health care and economic systems, prompting re-evaluation of long-held views on how best to deliver care. This is especially the case for our global diagnostic strategy. While current laboratory-based centralized RT-qPCR will continue to serve as a gold standard diagnostic into the foreseeable future, the shortcomings of our dependence on this method have been laid bare. It is now clear that a robust diagnostics pandemic response strategy, like any disaster planning, must include adaptive, diverse and de-centralized solutions. Here we look at how the COVID-19 pandemic, and previous outbreaks, have set the stage for a new innovative phase in diagnostics and a re-thinking of pandemic preparedness.

**Keywords:** COVID-19, Pandemic response, De-centralized diagnostics

## Main

As World Health Organization Director General Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus said while highlighting the need for better coronavirus disease 2019 (COVID-19) testing, trying to contain an outbreak without adequate diagnostics is like attempting to “fight a fire blindfolded”. By identifying infected individuals and transmission hot-spots, diagnostic data enable scientists and governments to characterize an outbreak, allocate care and coordinate containment measures—without such data, mounting an effective pandemic response is nearly impossible. While the global response to the ongoing COVID-19 pandemic—which has infected millions and disrupted the global economy—has been admirable, the deployment of mass public health testing has been

our most significant failure, making it clear that our capacity to respond to outbreaks relies too heavily on a single, rigid, centralized laboratory-based diagnostic modality. Thus, we now need to support the development of diverse, affordable and scalable diagnostic tools that can be taken out of the laboratory and into the field. By simply expanding our diagnostic reach into a more distributed network of testing, regardless of the context, we can bring tremendous near-term benefit and health security to the world.

## Current modality

For decades, our national diagnostic strategies have been built around a laboratory-based testing model, where samples taken at the point-of-care (e.g. clinic, home, hospital) are delivered to a well-resourced centralized laboratory for processing and testing. Today, the molecular diagnostic workhorse in these settings is largely reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), a technique which harnesses the enzymatic machinery of reverse transcription and DNA

\* Correspondence: [keith.pardee@utoronto.ca](mailto:keith.pardee@utoronto.ca)

<sup>1</sup>Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

<sup>3</sup>Department of Mechanical and Industrial Engineering, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

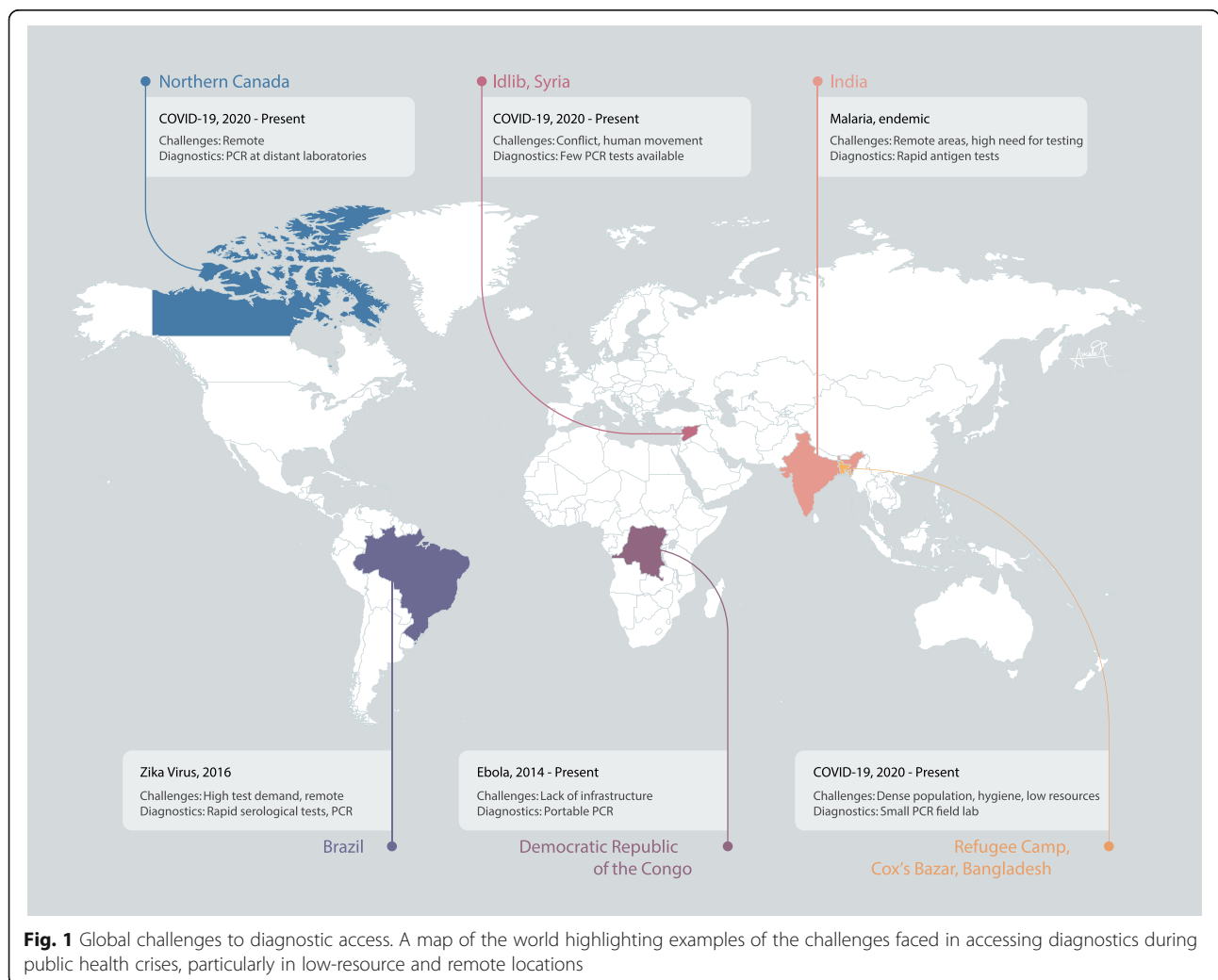


replication to amplify and detect specific target sequences (such as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [SARS-CoV-2] RNA) in a patient sample [1]. While a remarkable tool with tremendous specificity and robustness, RT-qPCR is not a one-size-fits-all diagnostic; its requirement for trained laboratory personnel, expensive refrigerated reagents, cumbersome equipment and stable power supply mean that it is best suited for high-resource laboratories typically centred in urban areas. The result is a hub-and-spoke diagnostic network with gaps in rural and/or low-resource settings, and, as we have seen with COVID-19, insufficient capacity to respond to a surge in demand during public health crises. This challenge is exacerbated further during an outbreak situation, where the spatial epidemiology of an outbreak is rapidly changing and RT-qPCR lacks the necessary adaptive portability to respond (examples summarized in Fig. 1).

Our research groups observed these RT-qPCR challenges first-hand during the 2015–2016 Zika virus

outbreak in Brazil, which infected over 200,000 people and left severe lasting pathologies in thousands of children [2]. As with COVID-19, centralized Zika virus diagnostics meant that just five reference laboratories were tasked with testing the thousands of samples taken across the country. With each RT-qPCR test batch taking 2–3 h, lengthy backlogs arose, resulting in patients experiencing significant wait times. For rural or remote populations without direct access to these centralized facilities, samples had to be stored and transported within a cold chain for testing, further separating patients from timely results. These same challenges are often faced by those living in settings with endemic diseases, such as malaria.

Reliance on lab-based equipment and technical expertise also makes RT-qPCR difficult to deploy to the front lines; a significant downside during a rapidly evolving outbreak situation. This was the case during the 2013 West Africa Ebola outbreak—which claimed 11,323 lives—where it took over 80 days after the first deaths



**Fig. 1** Global challenges to diagnostic access. A map of the world highlighting examples of the challenges faced in accessing diagnostics during public health crises, particularly in low-resource and remote locations

for reliable RT-qPCR testing to come on-line [3]. Because of infrastructure limitations, testing was initially carried out 6000 km away in a laboratory in Lyon, France. As the outbreak progressed, RT-qPCR field-testing laboratories closer to the front lines were established—however, challenges with testing capacity remained. The crisis left many wondering how many lives could have been saved if better de-centralized diagnostics were available earlier and, in many ways, was a catalyst for many of the field's first attempts at de-centralizing molecular diagnostics [4].

Now, in the midst of COVID-19, we are facing a diagnostic crisis on a global scale. Millions of tests per day are needed, which, even if PCR reagent manufacturing is brought to scale, the simple logistics of delivering such volume would be difficult without a significant investment in automation or, as we advocate, a shift toward de-centralized modalities. This is particularly challenging in remote areas and low-resource settings, where access to centralized infrastructure is lacking. For example, as of September 2020, testing of samples from Northern Canadian communities such as Yellowknife still required air transport to urban testing centres, in some cases, over a thousand kilometres away [5].

For the millions of refugees and displaced persons worldwide, access to diagnostic testing is even more tenuous. Often on the move or housed in refugee camps, these populations suffer from overcrowding (population densities can be double those of urban centres like Manhattan) and poor access to sanitation and clean water—a perfect storm for infectious disease spread. Because these camps are often under-resourced, their healthcare infrastructure is generally inadequate, making sufficient diagnostic testing capacity extremely difficult to implement. For example, refugee camps in Cox's Bazar, Bangladesh—which house over 800,000 displaced Rohingya people—are served by just one testing laboratory, conferring a capacity of only 1000 tests per day—a far cry from the required capacity needed for COVID-19 surveillance [6].

Even well-resourced urban settings that are supported by established diagnostic networks are not immune from the chaos of an outbreak. Early in the outbreak, stringent criteria for testing eligibility were put in place in cities like Toronto due to a lack of surge capacity, resulting in unconfirmed patients and asymptomatic transmission unwittingly fueling disease spread [7]. Such bottlenecks have been aggravated by the worldwide reliance on RT-qPCR, which has led to supply chain disruption and forced governments to canvas universities and private laboratories for reagents that were in short supply. Taken together, these collective diagnostic shortfalls make a strong case for re-thinking our absolute dependence on RT-qPCR and a move toward augmenting this capacity

with diverse and distributed tools that can adapt quickly to respond to urgent needs. As we discuss below, the development of these tools has begun and is hopefully just the first of a much larger and sustained push for diagnostic innovation.

### Going de-centralized

This new generation of diagnostic tools should be affordable to allow for broad distribution; user-friendly, to reduce the need for trained technicians; and portable, to expand the current diagnostic reach. These diagnostics will relieve pressure from centralized testing facilities and, importantly, help to stem the spread of infection by providing on-site results in near real-time, bringing testing capacity to hot spots (e.g. long-term care homes) and remote areas (e.g. refugee camps, rural communities) where sufficient diagnostic readiness is difficult to achieve. The availability of such affordable point-of care diagnostics will be key to prevent the second waves of disease and the reemergence of a given pathogen in disease-free areas.

Furthermore, implementing diverse testing methods will introduce new supply chains, mitigating risks associated with our global dependence on RT-qPCR reagents, consumables and instrumentation. These emerging diagnostics (summarized in Table 1) typically fall into three categories: antibody-based rapid antigen tests designed to detect SARS-CoV-2 antigens, protein-based serological assays designed to detect anti-SARS-CoV-2 antibodies or molecular diagnostics designed to detect viral RNA [1]. With each category serving different needs, all three have a place in a comprehensive diagnostic strategy.

Antibody-based antigen tests detect viral proteins in patient fluid in a manner similar to lateral flow pregnancy tests and have been deployed successfully for diagnosis of other infectious diseases like Malaria [1, 8]. Dependent only on an interaction between a SARS-CoV-2 antigen in a patient sample and an affixed antibody, these tests are rapid, portable, and inexpensive, providing results in 15–30 min and costing as little as \$5 United States Dollars (USD). Though these tests lack the sensitivity of molecular diagnostics like RT-qPCR and are best suited for detection of virus during peak infection, they are poised to drastically improve distributed screening. Fifty million antigen tests per month are set to be manufactured by Abbott Laboratories starting in October 2020, and from this, and other sources, 120 million tests have been secured for low- and middle-income countries where RT-qPCR testing may be unattainable. The introduction of new testing capacity at this scale represents an exciting addition to the COVID-19 diagnostic landscape and will be especially valuable for distributed testing in the community.

**Table 1** An overview of diagnostic platforms developed for the detection of SARS-CoV-2

Platform	Technology	Pros	Cons	Examples
<b>RT-qPCR</b>	DNA replication enzymes cycle through different temperatures to amplify specific SARS-CoV-2 sequences	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Well-established</li> <li>• Gold standard for sensitivity and specificity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requires centralized infrastructure</li> <li>• Complex operation</li> <li>• Slow (2–3 h)</li> </ul>	Thermo-Fisher TaqPath RT-qPCR COVID-19 kit
<b>Antigen assays</b>	Immobilized antigen-specific antibodies bind and detect SARS-CoV-2 antigens in patient fluid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Portable</li> <li>• Simple operation</li> <li>• Affordable</li> <li>• Ample sensitivity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poor detection during early-stage infection</li> </ul>	Abbott BinaxNOW COVID-19 Ag Card, SDBiosensor STANDARD Q COVID-19 Ag
<b>Serological assays</b>	Immobilized viral proteins bind and detect anti – SARS-CoV-2 antibodies in patient fluid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Portable</li> <li>• Simple operation</li> <li>• Can detect past infection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unable to detect early-stage infection</li> </ul>	Cellex qSARS-CoV-2 IgG/IgM Rapid Test, Biolidics 2019-nCoV IgG/IgM Detection Kit
<b>CRISPR</b>	CRISPR gene-editing enzyme cleaves SARS-CoV-2 sequences, generating colour output	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simple operation</li> <li>• Sensitive (20–200 aM)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• New technology not well established</li> <li>• Not portable</li> </ul>	SHERLOCK, DETECTR
<b>Toehold switch</b>	Engineered gene circuits produce a colour upon detection of SARS-CoV-2 RNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simple operation</li> <li>• Low-cost</li> <li>• Easy storage conditions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Still in development</li> </ul>	Not yet approved for SARS-CoV-2
<b>Isothermal amplification</b>	DNA replication enzymes active at a single temperature amplify SARS-CoV-2 sequences	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Portable</li> <li>• Simple operation</li> <li>• Sensitive, specific</li> <li>• Quick (as fast as 5 min)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• May require specialized instrumentation</li> <li>• Difficult to scale up</li> </ul>	Abbott ID-NOW

Serological assays also resemble lateral flow pregnancy tests, where patient fluid passes over immobilized viral antigen and a colourimetric readout is produced if patient antibodies are detected. Though these assays are of limited value for diagnosis of active infections (antibodies may take days for a patient to generate and may persist long after infection), their portability and scalability make them promising decentralized tools for tracking individual and population-level virus exposure [1]. Such tools may be of considerable use as vaccines become available and countries need to make strategic use of precious vaccine stocks.

Molecular strategies include isothermal nucleic acid amplification-based diagnostics, which are a simpler and more portable alternative to conventional RT-qPCR amplification, and can be deployed to peripheral testing sites with far less infrastructure than conventional facilities [1]; toehold switch-based diagnostics, which use affordable and portable paper-based engineered gene circuits capable of detecting viral RNA; and, perhaps most excitingly, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-based assays, which harness CRISPR associated proteins programmed to recognize specific sites within the SARS-CoV-2 genome, generating a colour-based response [1]. CRISPR, which has been touted as one of the most impactful scientific discoveries of the past century, is now poised to make major

contributions to diagnostics, with the specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking (SHERLOCK) and SARS-CoV-2 DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter (DETECTR) platforms receiving landmark Food and Drug Administration (FDA) emergency usage authorizations (EUAs) for COVID-19 and exhibiting limits of detection similar to those of many RT-qPCR tests [9]. Collectively, these emerging molecular methods have the potential to enable a more distributed diagnostic network by complementing RT-qPCR and, importantly, their independence from the PCR supply brings new testing capacity.

Another implemented diagnostic tool worth highlighting is the Xpert SARS-CoV-2 platform from Cepheid, which is a semi-portable RT-PCR system that can be moved to peripheral testing sites at the front lines of an outbreak. This platform—which has been successfully deployed during recent Ebola outbreaks—has also received FDA EUA for SARS-CoV-2 and operates with a cartridge-based design, similar to a single-serve coffee-maker. While exciting, the widespread use of Cepheid is limited by equipment cost (\$17,500 USD for a 4-module system) and low throughput, with a separate cartridge (\$19.80 USD) needed for each test [10].

With the introduction of these novel diagnostics, it is a point of interest to imagine how the future of infectious disease diagnosis and screening will change. For

formal clinical diagnostics, RT-qPCR—due to its high sensitivity, specificity and familiarity—will likely remain the gold standard but will be supplemented with different complementary options for large-scale screening and surveillance. For example, thanks to their portability and affordability, rapid antigen tests and CRISPR-based tests could be deployed in the field, such as in long-term care facilities or for routine screening in schools and other high-risk settings. This would allow central RT-qPCR testing capacity to be used exclusively to test symptomatic patients and to confirm positive results detected using rapid tests.

As these tests begin to enter the diagnostic market, only time can tell how they will fit into the changing diagnostic network. Supply chains need to be solidified, scale-up needs to be achieved, and tests need to be optimized and improved; all significant challenges during a global pandemic. Moreover, the continued development of new sensor technologies is critical and will pave the way to toward a more robust pandemic response with greater diagnostic sensitivity, specificity, speed and the ability to multiplex.

### A call to arms

While other areas of medicine have seen remarkable advancements over the last few decades, the diagnostic market has remained somewhat of an innovative doldrum. While the factors behind this are complex, the low profit margins of diagnostic reimbursement in healthcare systems have contributed in diminished investment in new diagnostic technologies. Now, having exposed the faults of our current approach, the COVID-19 pandemic gives us the opportunity to rethink and revitalize the diagnostic landscape. The human and economic cost of not doing so is all too clear.

Though a trying time, the lessons and new technologies that result from confronting COVID-19 will likely forever change how we think about diagnostics, and, more broadly, prepare for pandemics. Importantly, while developing and implementing COVID-19 diagnostics are certainly top-of-mind, our response to the pandemic is also an opportunity to re-think diagnostic infrastructure more broadly; by improving access to diagnosis of other diseases and infections, we can help extend the reach of health care out beyond the clinic, improve patient outcomes, and help push the world toward equitable access to healthcare for all.

### Authors' contributions

All authors contributed to writing the manuscript. The authors read and approved the final manuscript.

### Funding

This work was supported by funds from Canada's International Development Research Centre (grant 109547-001) through the COVID-19 May 2020 Rapid Research Funding Opportunity and the University of Toronto COVID-19

Action Initiative 2020 to K. P and Canada's International Development Research Centre (grant 109434-001) through the Canadian 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Rapid Research Funding Opportunity to L. P and K.P.

### Availability of data and materials

Not applicable

### Ethics approval and consent to participate

Not applicable

### Competing interests

No competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada. <sup>2</sup>Department of Virology, Aggeu Magalhaes Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil. <sup>3</sup>Department of Mechanical and Industrial Engineering, University of Toronto, Toronto, ON, Canada.

Received: 18 July 2020 Accepted: 8 October 2020

Published online: 28 October 2020

### References

1. Udugama B, Kadhiresan P, Kozłowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li YYC, et al. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS Nano*. 2020;14(4):3822–35. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>.
2. Lowe R, Barcellos C, Brasil P, Cruz O, Honório N, Kuper H, et al. The Zika virus epidemic in Brazil: from discovery to future implications. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(1):96. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010096>.
3. World Health Organization, Origins of the 2014 Ebola epidemic. Accessed July 2020: <http://www.who.int/entity/csr/disease/ebola/one-year-report/virus-origin/en/index.html>.
4. Tinafar A, Zhou Y, Hong F, Swingle KL, Tang AA, Green AA, et al. Cell-free biosensors: synthetic biology without Borders. In: Handbook of cell biosensors. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 1–39. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47405-2\\_130-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47405-2_130-1).
5. Government of Northwest Territories. Questions and Answers - GNWT's Response to COVID-19. 2020.
6. Banik R, Rahman M, Hossain MM, Sikder MT, Gozal D. COVID-19 pandemic and Rohingya refugees in Bangladesh: what are the major concerns? *Glob Public Health*. 2020;0(0):1–4. <https://doi.org/10.1080/17441692.2020.1812103>.
7. Testing at Ontario's COVID-19 assessment centres slows to a trickle. CBC News. Accessed September 2020: <https://www.cbc.ca/news/canada/toronto/covid-19-ontario-testing-assessment-centres-coronavirus-1.5527454>.
8. Guglielmi G. Fast coronavirus tests: what they can and can't do. Vol. 585, *Nature*. NLM (Medline); 2020. p. 496–8. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02661-2>.
9. SARS-CoV-2 Reference Panel Comparative Data | FDA [Internet]. Available from <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-reference-panel-comparative-data>.
10. GeneXpert® - FIND [Internet]. Available from <https://www.finddx.org/pricing/genexpert/>.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



OPEN

# Development and validation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in patient samples from Brazil

Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>1</sup>, Keith Pardee<sup>2</sup>, Udeni B. R. Balasuriya<sup>3</sup> & Lindomar Pena<sup>1</sup>✉

We have previously developed and validated a one-step assay based on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of the Zika virus (ZIKV) from mosquito samples. Patient diagnosis of ZIKV is currently carried out in centralized laboratories using the reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), which, while the gold standard molecular method, has several drawbacks for use in remote and low-resource settings, such as high cost and the need of specialized equipment. Point-of-care (POC) diagnostic platforms have the potential to overcome these limitations, especially in low-resource countries where ZIKV is endemic. With this in mind, here we optimized and validated our RT-LAMP assay for rapid detection of ZIKV from patient samples. We found that the assay detected ZIKV from diverse sample types (serum, urine, saliva, and semen) in as little as 20 min, without RNA extraction. The RT-LAMP assay was highly specific and up to 100 times more sensitive than RT-qPCR. We then validated the assay using 100 patient serum samples collected from suspected cases of arbovirus infection in the state of Pernambuco, which was at the epicenter of the last Zika epidemic. Analysis of the results, in comparison to RT-qPCR, found that the ZIKV RT-LAMP assay provided sensitivity of 100%, specificity of 93.75%, and an overall accuracy of 95.00%. Taken together, the RT-LAMP assay provides a straightforward and inexpensive alternative for the diagnosis of ZIKV from patients and has the potential to increase diagnostic capacity in ZIKV-affected areas, particularly in low and middle-income countries.

Zika virus (ZIKV) is an enveloped virus belongs to the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae*. Other notable viruses in this genus are West Nile virus (WNV), dengue virus (DENV 1–4), yellow fever virus (YFV), Japanese encephalitis virus (JEV), St. Louis encephalitis virus (SLEV), and Rocio virus (ROCV)<sup>1–3</sup>. The genome of ZIKV consists of a single-stranded positive-sense RNA molecule (+ ssRNA), with approximately 11 Kb in length and has a single open reading frame (ORF) which is flanked by 5' and 3' untranslated regions (UTRs), respectively<sup>4</sup>. ZIKV genome encodes three structural proteins [capsid (C), pre-membrane (prM) and envelope (E)] and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5)<sup>5</sup>.

ZIKV was first isolated in 1947 during a yellow fever study in the Zika forest, Uganda<sup>6</sup>. In the 60 years that followed its discovery, few cases of ZIKV infection were reported in humans and the virus has remained an obscure pathogen. In April 2007, the ZIKV caused an outbreak of disease in Yap State, Federated States of Micronesia, and

<sup>1</sup>Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Professor Moraes Rego, Recife, Pernambuco 50670-420, Brazil. <sup>2</sup>Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, ON M5S 3M2, Canada. <sup>3</sup>Louisiana Animal Disease Diagnostic Laboratory and Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA. ✉email: lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br



subsequently, spread rapidly across the Pacific causing outbreaks in French Polynesia, the Cook Islands, Easter Island, and New Caledonia<sup>7–13</sup>. The ZIKV was then introduced to Brazil, possibly in 2013, and in May 2015, the first case of ZIKV infection was reported in Brazil<sup>14–16</sup>. The virus then spread rapidly through the Americas and became a global health concern, causing the largest ZIKV epidemic recorded to date<sup>14</sup>. Besides Zika fever, the virus was responsible for a severe outbreak of microcephaly and other congenital abnormalities in neonates born to mothers infected during pregnancy, as well of many cases of neurological disorders such as Guillain–Barré syndrome (GBS) in infected patients<sup>1,15,17–20</sup>.

ZIKV is primarily transmitted to humans through the bites of infected female mosquitoes from the genus *Aedes*, mainly *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, although other species of mosquitoes may also be involved in the transmission chain<sup>21–27</sup>. In addition to vector-borne transmission, ZIKV can be transmitted through sexual intercourse and blood transfusions, as well as during pregnancy<sup>28–31</sup>. In most patients, infection by ZIKV is asymptomatic and, when present, the clinical manifestation is characterized by the presence of fever, rash, myalgia, arthralgia and headache, which overlaps significantly with the features of DENV and chikungunya (CHIKV) infections<sup>32</sup>. Since these clinical symptoms are shared with infections from other arboviruses, diagnosing ZIKV infection using clinical indications alone is difficult. Therefore, accurate diagnostic platforms are important to identify and differentiate the etiologic agent of illness<sup>1,33</sup>.

In the clinical laboratory, ZIKV infection can be diagnosed using serology and molecular methods. Serological assays available include plaque reduction neutralization tests (PRNT), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), and lateral flow assays to detect IgM or IgG antibodies<sup>7,34</sup>. However, cross reactivity with other flaviviruses, such as DENV, in serological assays limits their utility in regions where other flaviviruses circulate. Thus, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is considered the gold standard molecular method for ZIKV diagnosis and has been successfully used to detect ZIKV in serum, urine, saliva, semen and other body fluids<sup>7,35–40</sup>. Nevertheless, RT-qPCR is expensive, requires technical expertise, reliable access to electricity and utilizes sophisticated equipment for amplification and detection of viral genome. These drawbacks negatively impact the establishment of effective disease control programs caused by ZIKV, especially in low-resource settings. Moreover, the COVID-19 pandemic has worsened this situation in Brazil since most diagnostics resources have been directed for SARS-CoV-2 detection<sup>41</sup>.

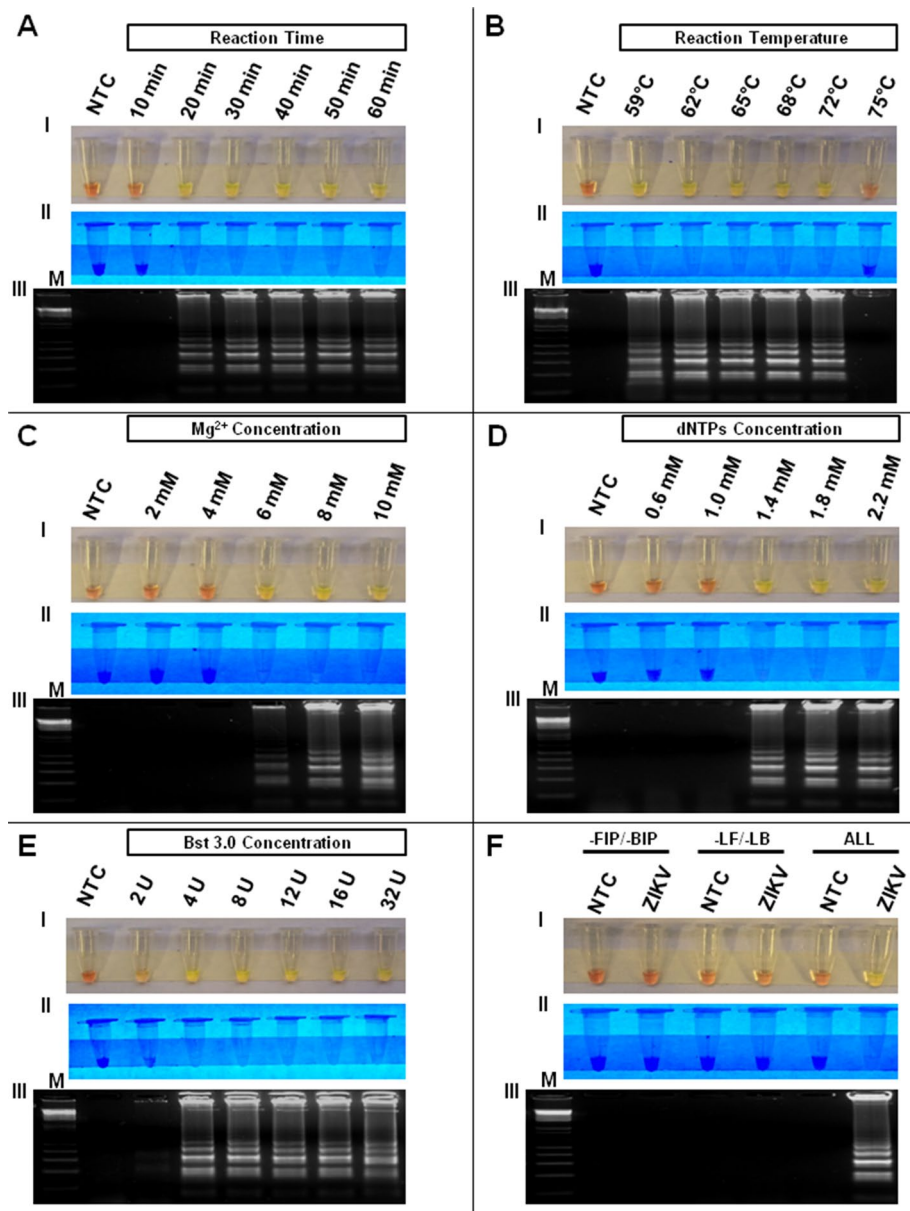
Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) is a rapid, simple and robust tool for the rapid amplification of nucleic acid at a single and fixed temperature<sup>42</sup>. The assay has many advantages compared to other molecular methods including low cost, convenience, high sensitivity and specificity, making it a powerful method for point-of-care (POC) diagnostic<sup>43</sup>. Importantly, the isothermal nature of RT-LAMP reactions means that they can be performed without expensive equipment and, moreover, the colorimetric output means results can be determined with the naked eye<sup>43</sup>. Due to these advantages and potential for POC applications, many LAMP platforms for ZIKV have been developed since ZIKV emergence in the Americas<sup>44</sup>. However, many of these assays still require sophisticated equipment, expensive supplies or laborious protocols for ZIKV amplification and detection, which limits its applicability in low-resource settings.

We previously developed a one-step RT-LAMP assay for detection of ZIKV in mosquito samples that addressed the above-mentioned limitations of ZIKV LAMP assays<sup>45</sup>. Our strategy is based on a close-tube, one-step protocol and does not require RNA extraction from the biological specimens. With these features in-place, our main goal here was we develop and validate a one-step RT-LAMP assay for ZIKV detection in different human specimens, including serum, urine, saliva, and semen. Detection of the virus was achieved in as little as 20 min without RNA extraction or any pretreatment of the patient samples. We then validated the performance of this assay for using patient samples collected in Pernambuco State, Brazil, which was the epicenter of the last ZIKV epidemic. The results validated our assay for POC applications for human diagnosis and does not require expensive equipment and can be performed by an operator with minimal technological expertise. This RT-LAMP technology represents a rapid, sensitive, and specific assay for ZIKV diagnosis and has the potential to improve diagnostic capabilities and surveillance actions in remote areas and countries with limited laboratory infrastructure.

## Results

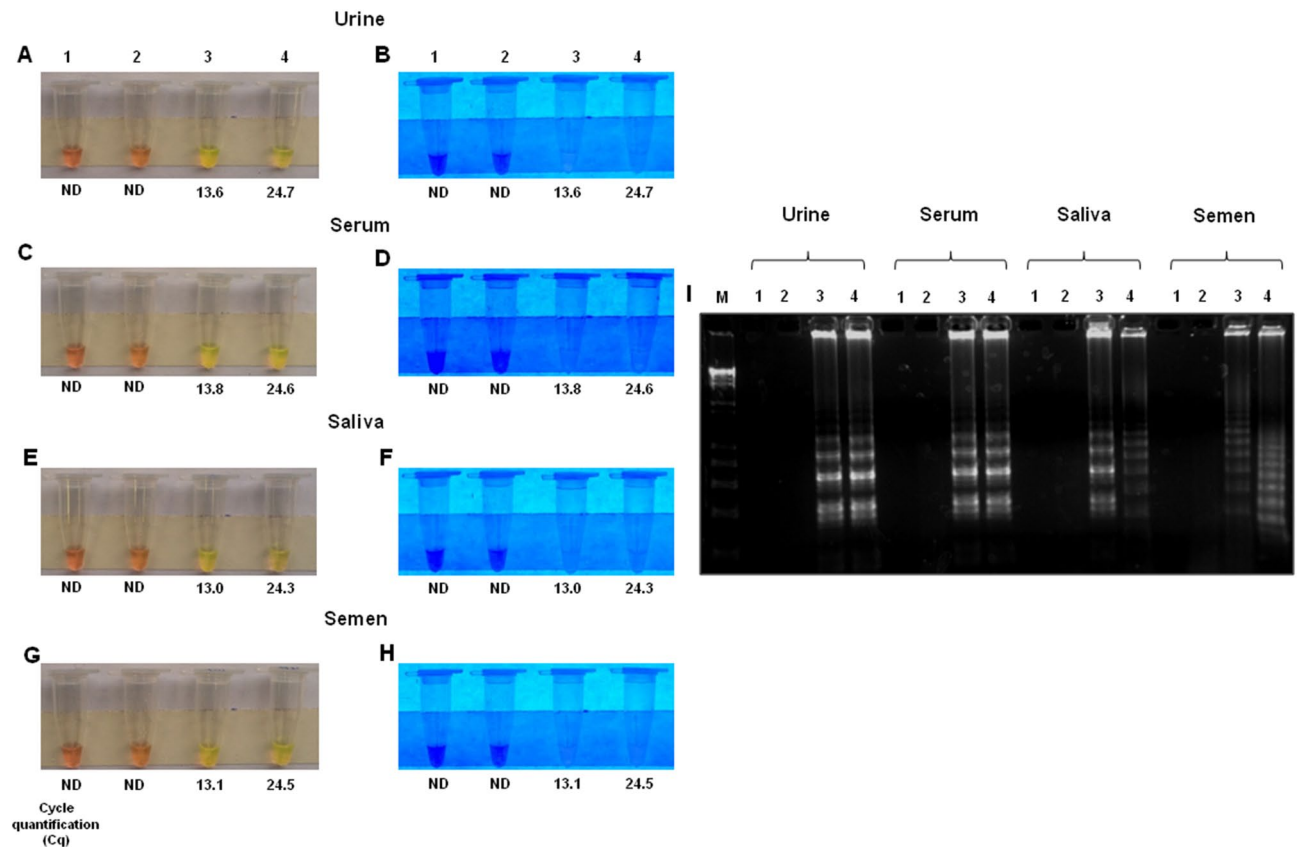
**Optimization of ZIKV RT-LAMP reaction conditions.** To optimize ZIKV RT-LAMP assay performance for human samples, we screened reaction conditions such as temperature, incubation time, Mg<sup>2+</sup> concentration, dNTPs concentration, enzyme concentration and primer sequences. We also evaluated whether all primers, including the external (F3 and B3), internal (FIP and BIP) and loop (LF and LB) primers were required for successful amplification of target RNA. Initially, we performed a time course series and found that ZIKV genome amplification (10<sup>5</sup> PFU) occurred with incubation time as short as 20 min (Fig. 1A), but 40 min of incubation provided more consistent results for low titer samples. Positive amplification was detected at incubation temperatures ranging from 59 to 72 °C (Fig. 1B). Based on these results, we carried out the other assays at the temperature of 72 °C for 40 min to maximize the chance of virus detection (sensitivity) and the specificity, respectively. Based on reagent titrations, the optimal concentrations for the Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, and Bst 3.0 DNA polymerase were determined to be 8 mM, 1.8 mM, and 4U of the enzyme, respectively (Fig. 1C–E). All six primers were required for amplification of the RNA target, since removal of either backward and forward inner (FIP/BIP) or loop primers (LF/LB) failed to produce a positive reaction (Fig. 1F). These optimized parameters were used for subsequent experiments described below.

**Detection of ZIKV in virus-spiked human samples.** To evaluate the ability of the RT-LAMP assay to detect ZIKV in clinically relevant specimens, we spiked urine, serum, saliva and semen obtained from healthy, consenting, adult volunteers with a high viral load (1 × 10<sup>6</sup> PFU/mL) followed by a 1:1000 dilution in water to



**Figure 1.** Optimization of reagent concentrations and conditions of the ZIKV RT-LAMP assay. All reagent concentrations as well as all RT-LAMP assay conditions were optimized and established. The reactions were performed under incubation time ranging from 10 to 60 min (A) and temperatures ranging from 59 to 75 °C (B). The reagents were optimized for optimal concentrations of  $Mg^{2+}$  (ranging from 2 to 10 mM) (C), dNTPs (ranging from 0.6 to 2.2 mM) (D) and Bst 3.0 DNA polymerase (ranging from 2 to 32 U) (E). In addition, all primers, including external primers (F3 and B3), internal (FIP and BIP) and loop (LF and LB) were required to perform the RT-LAMP assay (F). The RT-LAMP results were observed by visual color change of the products in the reaction tube and by gel electrophoresis. Amplification products were observed by naked eye natural light (A-FI) under UV irradiation (A-FII) and agarose gel electrophoresis (A-FIII). Legends: NTC (non-template control): water; M: molecular weight marker. Orange color: negative reaction for ZIKV; Greenish yellow color: positive reaction for ZIKV.

achieve a low viral load ( $1 \times 10^3$  PFU/mL). Samples were infected for 1 h at 37 °C and then directly assayed by RT-LAMP assay without RNA extraction using the same volume of human biofluids. ZIKV was detected in all spiked samples, regardless of the viral dose. In semen samples, the high and low viral load gave similar results as detected by naked eye and UV irradiation, but the low viral load spike gave better amplification than the high viral load as detected by agarose gel analysis. As expected, non-template control (NTC) samples (water) and negative control (human biological sample uninfected) tested negative (Fig. 2A–I). RT-LAMP results were compared to RT-qPCR, through which the cycle quantification (Cq) values<sup>46</sup> were (13.6; 13.8; 13.0; 13.1) and (24.7; 24.6; 24.3; 24.5), for high viral and low viral load in urine, serum, saliva and semen, respectively.



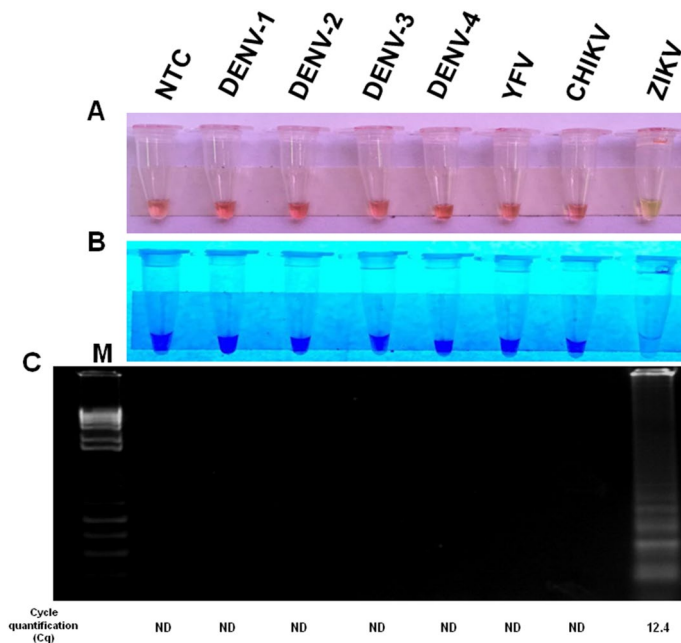
**Figure 2.** Detection of ZIKV in virus-spiked body fluid samples. Biological samples including urine, serum, saliva and semen were spiked with either a high ( $1 \times 10^6$  PFU/mL) or low viral load ( $1 \times 10^3$  PFU/mL) and processed for RT-LAMP without RNA extraction (A–I). The RT-LAMP results were observed by visual color change of the products in the reaction tube and by gel electrophoresis. Amplification products were observed by naked eye natural light (A, C, E and G), under UV irradiation (B, D, F and H) and agarose gel electrophoresis (I). Legends in (A–I) are: (1) NTC (non-template control): water; (2): uninfected biological sample (urine, serum, saliva and semen); (3): biological sample infected with  $10^6$  PFU/mL; (4): biological sample infected with  $10^3$  PFU/mL. M: molecular weight marker. Orange color: negative reaction for ZIKV; Greenish yellow color: positive reaction for ZIKV.

Viruses	Strain	GenBank access code
<i>Flaviviridae, flavivirus, Zika virus</i>	PE243	KX197192
<i>Flaviviridae, flavivirus, dengue virus serotype 1</i>	PE/97-42735	EU259529
<i>Flaviviridae, flavivirus, dengue virus serotype 2</i>	PE/95-3808	EU259569
<i>Flaviviridae, flavivirus, dengue virus serotype 3</i>	PE/02-95016	KC425219
<i>Flaviviridae, flavivirus, dengue virus serotype 4</i>	PE/10-0081	Unpublished
<i>Flaviviridae, flavivirus, yellow fever virus</i>	17DD	DQ100292
<i>Togaviridae, alphavirus, chikungunya virus</i>	PE2016-480	Unpublished

**Table 1.** Viruses used to evaluate the analytical specificity of the ZIKV RT-LAMP assay.

**Analytical specificity of ZIKV RT-LAMP assay.** In order to evaluate the specificity of the RT-LAMP primers to detect only ZIKV, we assayed human serum spiked with key endemic arboviruses circulating in Brazil, including DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081), YFV (17DD), and CHIKV (PE2016-480) (Table 1). RT-LAMP specifically detected ZIKV as determined by naked eye analysis, visual observation under UV light or agarose gel electrophoresis (Fig. 3). These results were confirmed by RT-qPCR, in which the Cq value for the ZIKV sample was 12.4 (Fig. 3). A common problem with highly sensitive RT-LAMP assays is cross-contamination. To prevent this, we added 1  $\mu$ L of 1:10 dilution of SYBR Green I dye diluted in RNase-free water to the center of the tube lid caps before the reaction and mixed afterwards<sup>47</sup>. This reduces the potential for the introduction of contamination and in work performed here, no contamination was seen observed using the one step, closed tubes RT-LAMP strategy (data not shown).





**Figure 3.** Analytical specificity of ZIKV RT-LAMP in human serum. Human serum sample uninfected was spiked with different arboviruses (DENV 1–4, YFV, CHIKV, ZIKV) circulating in Brazil and then assayed by ZIKV RT-LAMP without RNA extraction. The amplification products were observed by naked eye under natural light (A), under UV irradiation (B) and agarose gel electrophoresis (C). NTC (non-template control): water. M: molecular weight marker. Orange color: negative reaction for ZIKV; Greenish yellow color: positive reaction for ZIKV.

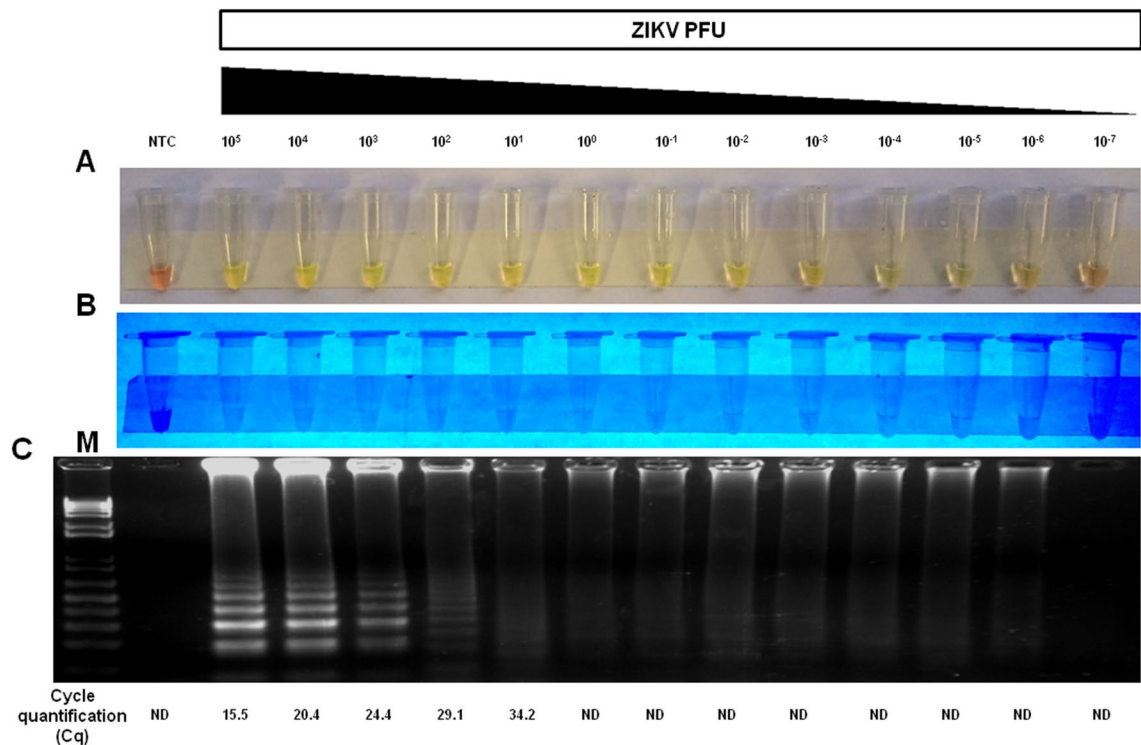
**Analytical sensitivity of ZIKV RT-LAMP assay.** To evaluate the analytical sensitivity (limit of detection—LOD) of the assay, RT-LAMP was performed in human serum spiked with varying concentrations ( $10^5$  PFU to  $10^{-7}$  PFU) of ZIKV. Spiked samples were directly assayed by RT-LAMP without RNA extraction. RT-LAMP was able to detect a broad range of virus concentration (from  $10^5$  to  $10^{-6}$  PFU). Then, viral RNA of same dilutions were extracted and assayed by the gold standard RT-qPCR test. The analytical sensitivity of RT-qPCR was only observed down to  $10^1$  PFU with a Cq value of 34.2 (Fig. 4). The experiments were independently repeated 10 times to allow probit regression analysis to accurately determine the limit of detection of RT-LAMP. The limit of detection of RT-LAMP at 95% probability was  $-1.07 \log_{10}$  PFU of ZIKV with confidence interval from  $-1.93$  to  $0.49$  (Table 2 and Fig. S5), which is 100-fold more sensitive than RT-qPCR for ZIKV. Similar analytical sensitivity results were also obtained in urine, saliva and semen (data not shown).

**Diagnostic performance and cost of the RT-LAMP assay for detection of ZIKV in patient samples.** We next validated the RT-LAMP assay using clinical samples obtained from patients with suspected arbovirus infection. A total of 100 serum samples double blinded (20 positive and 80 negative for ZIKV by RT-qPCR) (Table S1) were used in the experiment. The Cq value in these samples ranged from 21.0 to  $>40.0$  and samples with Cq values of  $\leq 38.0$  in triplicate wells were considered positive for ZIKV by RT-qPCR. The RT-LAMP assay detected ZIKV in 25 samples, including five samples which had been determined negative by gold standard method, whereas 75 were deemed negative by ZIKV RT-LAMP (Fig. 5).

The diagnostic performance of this assay for detection of ZIKV was inferred by statistical analysis of several parameters using RT-qPCR assay as reference test. The RT-LAMP assay had a clinical sensitivity of 100% (95% CI 83.16% to 100.00%) and clinical specificity of 93.75% (95% CI 86.01% to 97.94%). The overall ZIKV prevalence in the samples was 20.00% (95% CI 12.67% to 29.18%). The positive predictive value of this assay was 80.00% (95% CI 63.13% to 90.33%) and negative predictive value was 100%. The overall accuracy of the ZIKV RT-LAMP assay was 95.00% (95% CI 88.72% to 98.36%) (Table 3), highlighting the diagnostic positive features of the RT-LAMP assay for rapid detection of ZIKV in patient samples.

To confirm the identity of positive samples by RT-LAMP for ZIKV detection in human samples, we sequenced a positive sample of human serum by the Sanger method. Analyzes obtained from the sequenced amplicons and BLAST analysis demonstrated that ZIKV RT-LAMP amplicons match 100% with virus circulating in Brazil (Fig. 6), proving the specificity of the RT-LAMP for detection only ZIKV. Together, these results suggested that RT-LAMP protocol described here is highly specificity for detection of ZIKV.

We then compared the costs for consumables required RT-LAMP (Table S2) with RT-qPCR (Table S3) considering the prices (in US\$) for reagent acquisition in Brazil at the time of the study. The estimated reagent cost for our RT-LAMP assay was US\$ 0.32 as opposed to US\$ 10.33 for RT-qPCR, which makes the RT-LAMP 33 times cheaper than the gold-standard method.



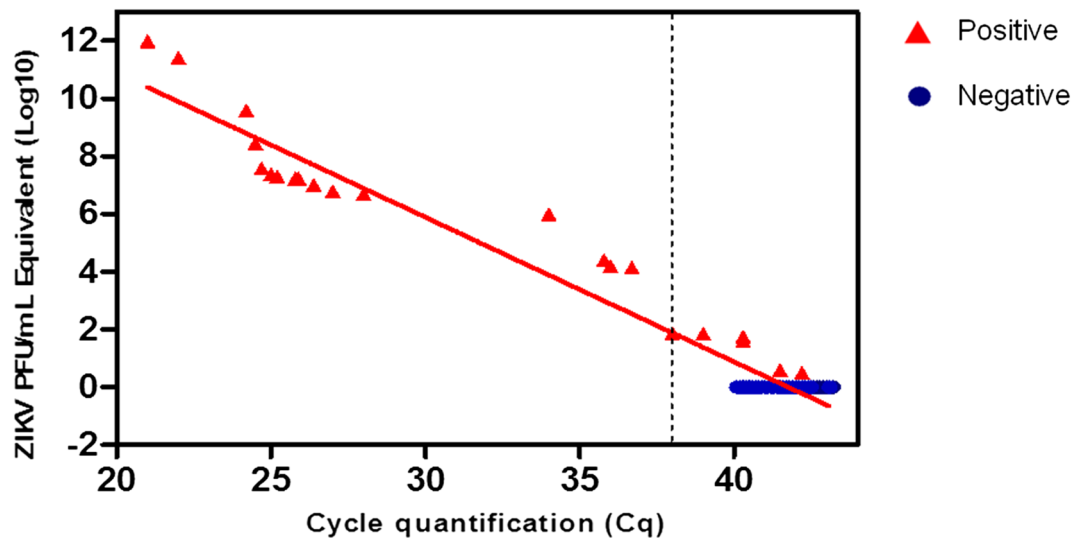
**Figure 4.** Analytical sensitivity of ZIKV RT-LAMP in human serum. The sensitivity of RT-LAMP was determined based on the last dilution at which the viral genome was detected by RT-LAMP assay. The sensitivity of RT-LAMP was determined by spiking different amounts ( $10^5$  to  $10^{-7}$  PFU) of ZIKV in human serum sample uninfected and then testing by RT-LAMP directly without RNA extraction. The amplification products were observed by naked eye under natural light (A), under UV irradiation (B), agarose gel electrophoresis from RT-LAMP (C) and agarose gel electrophoresis from RT-PCR. M: molecular weight marker. NTC (non-template control): water. ND (Not detected). To compare the results of RT-LAMP with RT-qPCR, viral RNA was extracted from the same dilutions and assayed. Orange color: negative reaction for ZIKV; Greenish yellow color: positive reaction for ZIKV.

ZIKV concentration (PFU)	Number of replicates	Number of positive results	Hit rate in %
$10^5$	10	10	100
$10^4$	10	10	100
$10^3$	10	10	100
$10^2$	10	10	100
$10^1$	10	10	100
$10^0$	10	10	100
$10^{-1}$	10	9	90
$10^{-2}$	10	9	90
$10^{-3}$	10	7	70
$10^{-4}$	10	4	40
$10^{-5}$	10	3	30
$10^{-6}$	10	1	10
$10^{-7}$	10	0	0

**Table 2.** Limit of detection (LOD) of the RT-LAMP assay for ZIKV detection.

## Discussion

Given the rapid spread of ZIKV in the Americas and its association with increased incidence of congenital defects in newborns and Guillain-Barré syndrome in infected patients, reliable and fast POC assays for accessible and inexpensive ZIKV diagnosis are urgently needed<sup>44</sup>. In areas with past or active ZIKV circulation such as Brazil, monitoring virus activity and disease incidence is critical to allow timely interventions and avoid massive outbreaks<sup>48</sup>. Moreover, early identification of virus infection directly in the field after patient sample collection is a critical step to containing the spread of ZIKV<sup>49</sup>. Despite its emergence in Brazil in 2015, the country still



**Figure 5.** Diagnostic of human samples by RT-LAMP. A total of 100 serum human samples from were tested for ZIKV by RT-LAMP assay. Of these, 20 were positive for ZIKV and 80 were negative as determined by RT-qPCR. Dashed line represents the RT-qPCR Cq threshold for ZIKV positivity (Cq $\leq$ 38). Red triangle indicates samples positive by RT-LAMP and blue circle are samples negative by RT-LAMP assay.

	RT-qPCR+	RT-qPCR-	Total
RT-LAMP+	20	5	25
RT-LAMP-	0	75	75
Total	20	80	
Sensitivity	<b>100%</b> (95% CI 83.16% to 100.00%)		
Specificity	<b>93.75%</b> (95% CI 86.01% to 97.94%)		
ZIKV prevalence	<b>20.00%</b> (95% CI 12.67% to 29.18%)		
Positive predictive value	<b>80.00%</b> (95% CI 63.13% to 90.33%)		
Negative predictive value	<b>100%</b>		
Accuracy	<b>95.00%</b> (95% CI 88.72% to 98.36%)		

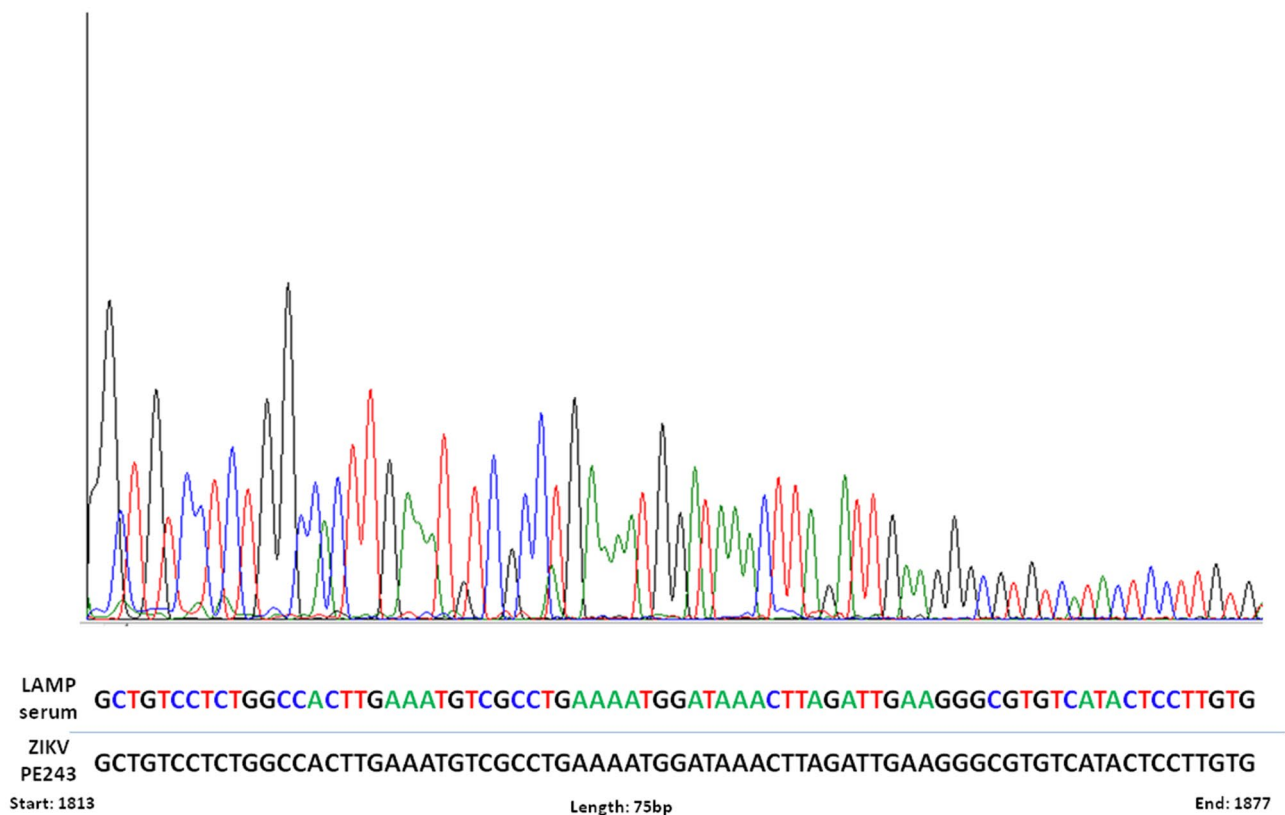
**Table 3.** Diagnostic performance of RT-LAMP assay for ZIKV detection in patient samples.

relies on expensive RT-qPCR testing for diagnosing ZIKV infection. The availability of testing for ZIKV has been even more challenging during the COVID-19 pandemic since most diagnostic supplies has been directed for SARS-CoV-2 detection.

The clinical diagnosis of ZIKV infection based on clinical symptoms alone is very difficult in countries where other arboviruses are endemic, and definitive confirmation is requires laboratory testing. Currently, RT-qPCR is considered the gold standard molecular method for lab-based diagnosis of ZIKV, but the technique has several limitations that preclude its wide use in remote or low-resource settings. Here, we developed a one-step closed tube RT-LAMP assay for ZIKV diagnosis that can be deployed in low-resource settings. The assay is rapid, specific, affordable, and allows straightforward detection of ZIKV in human samples, including serum, urine, saliva and semen even in the absence of RNA extraction or sample pre-treatment.

Serological assays are another alternative for laboratory ZIKV diagnosis, but lack specificity due to antibody cross-reactivity with other flaviviruses, especially DENV<sup>7,15,50,51</sup>. Here, our ZIKV RT-LAMP assay showed no cross-reactivity with other arboviruses including CHIKV, YFV and DENV 1–4 (Fig. 3). Additional confirmation of specificity was provided by Sanger sequencing of RT-LAMP amplicons, which confirmed 100% match with ZIKV circulating in Brazil (Fig. 6).

Since the emergence of ZIKV in the Western hemisphere, many LAMP assays have been developed for the diagnosis of ZIKV by research groups across the world, including one-step and two-step procedures<sup>44</sup>. The two-step LAMP protocol requires the addition of a reverse transcriptase (RT) enzyme together with the DNA polymerase for amplification and detection of the viral genome. In addition, the two-step protocol needed longer times, requires additional samples and reagents handling, which increases the probability pipetting errors and contamination<sup>44,45</sup>. In order to overcome these drawbacks of two-step protocol, we used the Bst 3.0 DNA polymerase 3.0 WarmStart due to the fact that it is an enzyme that allows the assay to be performed in a one-step protocol without RNA extraction or pre-treatment of the sample. This is possible because Bst 3.0 enzyme has reverse transcriptase and DNA polymerase activities at fixed temperature incubation. Moreover, this enzyme maintains



**Figure 6.** Electropherogram of ZIKV RT-LAMP detected in human serum. RT-LAMP amplicons from human serum was sequenced using Sanger method to confirm the identity of ZIKV. The region amplified was genome position 1813 to 1877. The obtained sequences were aligned against the ZIKV PE243 reference strain.

its performance even in the presence of amplification inhibitors and remains stable at room temperature compared to other prototypes of Bst enzyme (wild-type Bst DNA polymerase or Bst 2.0 DNA polymerase)<sup>44,52</sup>. Despite their resistance to the presence of inhibitors, we found that samples with high semen concentration seemed to have an effect on target amplification (Fig. 2I) which may be due to the presence of inhibitors in semen which are known to affect other DNA polymerases<sup>53</sup>.

Another potential limitation of molecular methods is to detect low viral loads in ZIKV-infected that samples usually have low titers after the acute phase of ZIKV infection. This makes it very difficult to confirm ZIKV infection in patient samples, even using the RT-qPCR<sup>54</sup>. Wang et al. developed a diagnostic test based on RT-LAMP for detection of ZIKV in human samples. The limit of detection of this assay was determined to be 0.02 PFU/mL using ZIKV-spiked samples including serum, urine, and saliva<sup>55</sup>. Tian et al. also reported a assay based on RT-LAMP combined with AC susceptometry in a portable reaction and LOD was determined to be 1 aM (aM:  $10^{-18}$  mol per liter) using human serum spiked with synthetically oligonucleotides of ZIKV<sup>52</sup>. These assays were able to detect low ZIKV concentrations, but the experiments and evaluation of the assay performance were conducted only with spiked samples, which not correlate with viral load presents in clinical samples obtained from infected patients.

Moreover, several studies based on the RT-LAMP assay have reported that the analytical sensitivity (limit of detection—LOD) is lower or similar when compared to RT-qPCR<sup>54,55</sup>. In contrast, we developed a RT-LAMP assay for detection of ZIKV in mosquito samples from Brazil, which was able to detect up to  $10^{-5}$  PFU. This represented a 10,000-fold greater sensitivity compared with RT-qPCR<sup>45</sup>. In human samples, our assay was 100-fold more sensitive than RT-qPCR. In the latter work, the virus was diluted in serum whereas in the former paper the virus was spiked in mosquito lysate and then serially diluted in water before the RT-LAMP. The reasons for the decreased sensitivity of the assay in human samples compared to mosquito samples are not clear, but molecules present in serum such as IgG, hemoglobin and lactoferrin are known to directly inhibit DNA polymerases<sup>56</sup>. Nevertheless, the results obtained here showed that the analytical sensitivity of the RT-LAMP assay is superior than conventional RT-PCR and RT-qPCR, corroborated with results found in other studies<sup>45,57–60</sup>. There are a number of reasons that explain the variation in analytical sensitivity of ZIKV LAMP assays in different studies, including differences in protocols (one and two-step protocol), primers, enzymes and research suppliers, LAMP modes of output, and type of samples<sup>44</sup>.

The performance of LAMP assays for ZIKV detection in patient samples has been evaluated in a few studies and compared to RT-qPCR<sup>54,57,61,62</sup>. In this study, we validated the ZIKV RT-LAMP assay using 100 serum specimens obtained from patients with suspected ZIKV infection cases in the state of Pernambuco, Brazil, which is at the epicenter of the last Zika epidemic. RT-LAMP assay designed in this study was shown to be 100% sensitive

and 93.75% specific, and overall accuracy of 95.00% as compared to RT-qPCR. These results indicate that our assay has the potential could be used as a diagnostic alternative for ZIKV detection in human samples.

Despite the advantages of RT-LAMP for POC diagnostics, the possibility of cross-contamination of products is considered a major challenge with this system<sup>54,57,63–65</sup>. The reason for this possible cross-contamination has not yet been fully elucidated, but the chance of contamination is greatest when the reaction tube caps are opened at the end of the incubation time to add dye for visualization of the result<sup>65</sup>. Moreover, several studies reported that SYBR, when added before incubation along with the other reagents, may inhibit LAMP reactions<sup>66,67</sup>. To overcome this, Antarctic Thermolabile UDG (Uracil DNA Glycosylase) or agar dye capsule have been used<sup>58,68,69</sup>. However, these strategies increase the cost of the reaction and make the technique more laborious. To address these concerns, we performed RT-LAMP reactions adding 1  $\mu$ L of SYBR Green I to the center of the tube caps before the incubation time based on closed tube. We did not experience with false-positive results during the development and validation process. Furthermore, in order to produce reliable results and reduce false-positive results, we optimized all parameters and conditions of the ZIKV RT-LAMP assay including  $Mg^{2+}$  concentration, dNTPs concentration, enzyme concentration, primers, time reaction, and temperature reaction.

Here we have standardized and validated a one-step RT-LAMP assay combined with strategy based on closed tube and demonstrated that it is sensitive, specific, and practical for ZIKV detection. The simplicity and high efficiency of RT-LAMP assay to rapidly amplify DNA under isothermal conditions suggests that RT-LAMP could be a potential alternative for detecting ZIKV. Moreover, our strategy is capable of drastically reduce the cross-contamination, when on than previous methods. The cost per reaction was less than \$1 USD, which is considerably cheaper than RT-qPCR (\$10 USD). Our POC assay is suitable and represents a great alternative for the diagnosis of ZIKV-infected patients and suspects cases in ZIKV endemic countries, especially in remote areas.

## Conclusion

The ZIKV RT-LAMP assay described here represents a potential alternative and inexpensive POC tool for the molecular diagnosis and routine screening of ZIKV-infection. The test is a simple, rapid, robust, and represents a fast molecular method for ZIKV detection in patient samples with performance equal to, or even superior to, RT-qPCR. It could also be useful in monitoring the efficacy of ZIKV control programs and to increase the diagnostic capacity of ZIKV-affected, especially for low and middle-income countries. Our POC assay have a great potential for producing rapid and reliable results to assist physicians in decision-making and can bring decentralization of health care through diagnosis in public health services.

## Methods

**Cells and viruses.** Vero cells (African Green Monkey Kidney) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Carlsbad, CA) supplemented with 100 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco) and 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. ZIKV strain PE243 (GenBank access code: KX197192.1) used in this work was isolated in C6/36 cell line and propagated in Vero cells following previously described protocols<sup>45</sup>. After propagation, the virus was stored at – 80 °C until use. The infection titer of the virus stock was determined by the standard plaque assay method and resulted in a titer of  $8.0 \times 10^7$  PFU/mL. Other arboviruses, including YFV (17DD), CHIKV (PE2016-480), DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016) and DENV-4 (PE/10-0081) were similarly propagated in Vero cells and titrated by plaque assay method with titers ranging from  $10^6$  to  $10^7$  PFU/mL. All viruses were isolated from humans in Pernambuco, Brazil with the exception of YFV (17DD), which is a vaccine strain.

**RT-LAMP assay.** RT-LAMP reactions were carried out in triplicate. First, the reaction condition was optimized to several parameters, including a range of temperatures (59–75 °C), incubation times (10–60 min),  $Mg^{2+}$  concentrations (2–10 mM), dNTPs (0.6–2.2 mM) and Bst 3.0 DNA polymerase (2–32 U). Then the RT-LAMP was conducted using the optimized conditions. Briefly, 25  $\mu$ L reactions were prepared containing 4 U of Bst DNA polymerase [version 3.0 WarmStart; New England Biolabs (NEB)], 1  $\times$  Isothermic Amplification Buffer, 1.8 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (ThermoFisher Scientific), 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.6  $\mu$ M for FIP (5'-GGCGACATTTCAAGTGGCCAGAGAGCTCTRGAGGCTGAGA-3'), 1.6  $\mu$ M for BIP (5'-AGGGCGTGT CATACTCCTTGTGAGTGTTCAGCCGGGATCT-3'), 0.2  $\mu$ M for F3 (5'-CAGTTCACACGGCCCTTG-3'), 0.2  $\mu$ M for B3 (5'-TGTACCTCCACTGTGACTGT-3'), 0.4  $\mu$ M for LF (5'-CCTTCCCCTTGCACCATCCA-3'), 0.4  $\mu$ M for LB (5'-TACCGCAGCGTTCACATTCA) primers and 5  $\mu$ L of test sample (samples without RNA extraction, extracted RNA, or non-template control (NTC)). These primers targeted in the envelope protein of the genome and have been previously described<sup>70</sup>. In order to optimize visualization of positive reactions and prevent crossover contamination, 1  $\mu$ L of SYBR Green I (ThermoFisher Scientific) diluted 1:10 dilution in RNase-free water (Promega) was added to the center of the tube caps before the reaction and mixing afterwards. After addition of sample, reactions were incubated at 72 °C for 40 min in a heat block, and then inactivated at 80 °C for 5 min. The reaction temperature of 72 °C was used for all experiments, except the screening for temperature. All experiments were independently replicated at least three times. To evaluate the performance of the RT-LAMP assay for POC applications, all set-up and execution of reactions were done in a conventional lab bench in an enclosed room using designated pipettes and filter tips. The capture and analysis of images occurred in different rooms to avoid contamination.

After the incubation time of the reactions, the RT-LAMP products were detected using three different methods. In the first method, the amplification products were observed by naked eye under natural light and images were captured using a conventional smartphone camera. The subsequent visual change of color orange to greenish was used to identify positive amplifications (positive sample), while a negative sample remained orange.



The second method was visual analysis of reaction tubes under UV light irradiation using a transilluminator (model UVB LTB 20 × 20 STV, Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brazil) coupled with a camera and connected to a computer. In this method, positive reactions were light fluorescent and negative samples were dark blue. In the third and final method, the RT-LAMP amplification products were electrophoresed along with 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific) on a 2% agarose gel in 1 × TAE buffer followed by ethidium bromide staining at 200 V for 40 min and were visualized under UV light.

**Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).** Samples with ZIKV are tested for positivity and analyzed in triplicate by RT-qPCR, according to protocols established by the Centers for Disease Control and Prevention—CDC USA with minor modifications<sup>7</sup>. Viral RNA from samples was extracted using the QIAamp Viral Mini Kit (QIAGEN, Germany) following the manufacturer's protocols. RT-qPCR was performed using the QuantiNova Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The reaction mixture (total volume, 10 µL) contained 5.0 µL of QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix 2 ×, 0.8 µM each primers Zika1087 (5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3'), Zika1163C (5'-CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3'), 0.4 µM FAM-labelled 1108 (5'-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACTCAA-3') probe for ZIKV, 0.1 µL of QuantiNova RT Mix, 0.05 µL of QuantiNova ROX Reference Dye and 3.5 µL of each RNA sample or RNase-free water for non-template control (NTC). Primers and probes were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies, Skokie, Illinois, USA). Each reaction was performed using the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with a thermal cycle program consisting of a single cycle of reverse transcription for 15 min at 45 °C, followed by 5 min at 95 °C for reverse transcriptase inactivation and DNA polymerase activation, and then 45 cycles of 5 s at 95 °C and 45 s at 60 °C. To estimate the amount of viral RNA in each sample, a standard curve, generated with ten-fold serial dilutions of the in vitro transcribed RNA was used to compare the C<sub>q</sub> values with the number of RNA copies.

**Spiking human samples with ZIKV.** To evaluate the ability of the RT-LAMP assay for detection of ZIKV in human biological samples including serum, urine, saliva, and semen. Samples obtained from healthy donors were infected with (10<sup>6</sup> or 10<sup>3</sup> PFU/mL) of ZIKV, mimicking a physiological situation of high and low viral load, respectively. After incubation at 37 °C for 1 h, the samples were directly assayed by RT-LAMP without RNA extraction or pretreatment of the sample.

**Analytical specificity and analytical sensitivity of ZIKV RT-LAMP assay.** In order to test specificity of the RT-LAMP assay to detect only ZIKV, the primers were validated the cross-reactivity with others arboviruses circulating in Brazil. Serum samples uninfected were spiked separately with several arboviruses, including: DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016), DENV-4 (PE/10-0081), YFV (17DD), CHIKV (PE2016-480) and ZIKV (PE243) so the final concentration would be 10<sup>6</sup> PFU per reaction. After spiked, all samples were assayed by ZIKV RT-LAMP without RNA extraction.

To evaluate the analytical sensitivity (limit of detection) of the assay for detection of ZIKV, RT-LAMP was performed using a series of tenfold dilutions of strain PE243 in human biological samples uninfected. Virus concentration in serum samples ranged from 10<sup>5</sup> PFU to 10<sup>-7</sup> PFU. After dilution, samples were directly assayed by RT-LAMP. To compare the results of our RT-LAMP with RT-qPCR, viral RNA was extracted from 140 µL of same dilutions using the QIAamp Viral Mini Kit (QIAGEN, Germany) according to the manufacturer's instructions. The RNA was eluted in 60 µL of elution buffer and then tested by the reference test (RT-qPCR) currently used for the diagnosis of ZIKV in human samples<sup>7</sup>.

**Validation of RT-LAMP for detection of ZIKV in patient samples.** To evaluate the ability of the RT-LAMP assay for detection of ZIKV in clinical samples, 100 samples from patients with suspected arbovirus infection cases in the state of Pernambuco, Brazil were included. Peripheral blood was obtained from patients, who presented symptoms including fever, arthralgia, rash and neurological disorders. Serum samples were separated and stored at - 80 °C until use. The intrinsic diagnostic utility of the ZIKV RT-LAMP assay was determined using several statistical parameters compared to reference method to detect ZIKV reported by Lanciotti<sup>7</sup>.

**Sequencing of the ZIKV RT-LAMP amplicons.** The genetic characterization of the RT-LAMP amplicons from some positive samples from human serum obtained patient infected with ZIKV was executed by the Sanger sequencing method as previously described<sup>45</sup>. RT-LAMP amplicons were directly purified using Gel Band Purification Kit (GE) and illustra GFX PCR DNA according to the manufacturer's protocol and eluted in 30 µL of water. Purified RT-LAMP fragments were directly sequenced using the primer FIP and the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions and run on an ABI Prism 3100 Capillary Automatic DNA Analyzer. After sequencing by the Sanger method, the sequences were analyzed using the Bioedit software, v7.0.5 and submitted to NCBI BLAST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) to find the most closely ZIKV strain.

**Consumable reagents (price).** To analyze the costs between the reagents of both techniques, including our RT-LAMP assay and RT-qPCR for the diagnosis of ZIKV. The value per one reaction (sample test) was calculated based on Brazilian reagent prices at the time of the study, and are converted to US \$) (Tables S2 and S3).

**Statistical analysis.** Graphs were generated using the GraphPad Prism Software version 5.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Estimates of sensitivity, specificity, ZIKV prevalence, positive

predictive value, negative predictive value and overall accuracy of the ZIKV RT-LAMP assay were calculated based on the results from 100 samples using the web-based software MedCalc's Diagnostic Test Evaluation Calculator ([https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)). This analysis was based on the results from 100 human samples previously tested by RT-qPCR. A probit regression analysis was performed to calculate the limit of detection of the ZIKV RT-LAMP using MedCalc software (version 19.2.0, MedCalc Software, Ostend, Belgium).

**Ethical statement.** This study was approved by the Fiocruz Pernambuco Institutional Review Board (IRB) under protocol number CAAE 67404117.7.0000.5190 and was conducted following the ethical principles for medical research involving human subjects developed by World Medical Association Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from healthy volunteers, but was waived by the IRB for diagnostic samples suspected of ZIKV. Human serum samples were collected from patients who presented clinical symptoms compatible with Zika in the State of Pernambuco, Brazil.

Received: 5 August 2020; Accepted: 18 January 2021

Published online: 18 February 2021

## References

- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M. & Honein, M. A. Zika virus. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1552–1563. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113> (2016).
- Fajardo, Á., Cristina, J. & Moreno, P. Emergence and spreading potential of Zika virus. *Front. Microbiol.* **7**, 1667. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01667> (2016).
- Figueiredo, L. T. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* **2**, 1643–1649. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)01320-4](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)01320-4) (2000).
- Göertz, G. P., Abbo, S. R., Fros, J. J. & Pijlman, G. P. Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Res.* **254**, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.015> (2018).
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. & Rice, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 649–688. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.003245> (1990).
- Dick, G. W., Kitchen, S. F. & Haddock, A. J. Zika virus I Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–520 (1952).
- Lanciotti, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1232–1239. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287> (2008).
- Ioos, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med. Maladies Infect.* **44**, 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008> (2014).
- Musso, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1887. <https://doi.org/10.3201/eid2110.151125> (2015).
- Gatherer, D. & Kohl, A. Zika virus: A previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *J. Gen. Virol.* **97**, 269–273. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000381> (2016).
- Duffy, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715> (2009).
- Cao-Lormeau, V. M. *et al.* Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1085–1086. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140138> (2014).
- Faye, O., Diallo, D., Diallo, M., Weidmann, M. & Sall, A. A. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virol. J.* **10**, 311. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-311> (2013).
- Campos, T. L. *et al.* Revisiting key entry routes of human epidemic arboviruses into the mainland Americas through large-scale phylogenomics. *Int. J. Genom.* **2018**, 6941735. <https://doi.org/10.1155/2018/6941735> (2018).
- Campos, G. S., Bandeira, A. C. & Sardi, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1885–1886. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847> (2015).
- Faria, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **352**, 345–349. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5036> (2016).
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A. & Petersen, L. R. Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1981–1987. <https://doi.org/10.1056/NEJMs1604338> (2016).
- Brasil, P. *et al.* Guillain-Barre syndrome associated with Zika virus infection. *Lancet* **387**, 1482. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30058-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30058-7) (2016).
- Brito Ferreira, M. L. *et al.* Guillain-Barré syndrome, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis associated with Zika virus infection in Brazil: Detection of viral RNA and isolation of virus during late infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **97**, 1405–1409. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0106> (2017).
- Meneses, J. D. A. *et al.* Lessons learned at the epicenter of Brazil's congenital Zika epidemic: Evidence from 87 confirmed cases. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 1302–1308. <https://doi.org/10.1093/cid/cix166> (2017).
- Diallo, D. *et al.* Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS ONE* **9**, e109442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109442> (2014).
- Guo, X. X. *et al.* *Culex pipiens quinquefasciatus*: A potential vector to transmit Zika virus. *Emerg. Microbes Infect.* **5**, e102. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.102> (2016).
- Guedes, D. R. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg. Microbes Infect.* **6**, e69. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.59> (2017).
- Elizondo-Quiroga, D. *et al.* Author correction: Zika virus in salivary glands of five different species of wild-caught mosquitoes from Mexico. *Sci. Rep.* **8**, 7887. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25807-9> (2018).
- Smarrt, C. T., Shin, D., Kang, S. & Tabachnick, W. J. (Diptera: Culicidae) From Florida transmitted zika virus. *Front. Microbiol.* **9**, 768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00768> (2018).
- Giron, S. *et al.* Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. *Euro Surveill.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.45.1900655> (2019).
- Martinet, J. P., Ferté, H., Failloux, A. B., Schaffner, F. & Depaquit, J. Mosquitoes of North-Western Europe as potential vectors of arboviruses: A review. *Viruses* **11**, 1059. <https://doi.org/10.3390/v11111059> (2019).
- Musso, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* **19**, 14 (2014).

29. Cunha, M. S. *et al.* First complete genome sequence of Zika virus (flaviviridae, flavivirus) from an autochthonous transmission in Brazil. *Genome Announc.* <https://doi.org/10.1128/genomeA.00032-16> (2016).
30. Hills, S. L. *et al.* Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission: Continental United States, 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **65**, 215–216. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6508e2> (2016).
31. Gregory, C. J. *et al.* Modes of transmission of Zika virus. *J. Infect. Dis.* **216**, S875–S883. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix396> (2017).
32. Musso, D., Nilles, E. J. & Cao-Lormeau, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, O595–596. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707> (2014).
33. Wikan, N. & Smith, D. R. Zika virus: History of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect. Dis.* **16**, e119–e126. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30010-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30010-X) (2016).
34. Waggoner, J. J. & Pinsky, B. A. Zika virus: Diagnostics for an emerging pandemic threat. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 860–867. <https://doi.org/10.1128/JCM.00279-16> (2016).
35. Gourinat, A. C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C. & Dupont-Rouzeyrol, M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 84–86. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140894> (2015).
36. Musso, D. *et al.* Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 359–361. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141363> (2015).
37. Musso, D. *et al.* Detection of Zika virus in saliva. *J. Clin. Virol.* **68**, 53–55. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.04.021> (2015).
38. Bingham, A. M. *et al.* Comparison of test results for Zika virus RNA in urine, serum, and saliva specimens from persons with travel-associated Zika virus disease: Florida, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **65**, 475–478. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6518e2> (2016).
39. Paz-Bailey, G. *et al.* Persistence of Zika virus in body fluids: Preliminary report. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoal613108> (2017).
40. Medina, F. A. *et al.* Duration of infectious Zika virus in semen and serum. *J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy462> (2018).
41. Silva, S., Magalhaes, J. J. F. & Pena, L. Simultaneous circulation of DENV, CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 in Brazil: an inconvenient truth. *One Health* **12**, 100205. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100205> (2021).
42. Notomi, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, E63 (2000).
43. Nemoto, M. *et al.* Detection of equine rotavirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Vet. Med. Sci.* **72**, 823–826 (2010).
44. Silva, S. J. R. D., Pardee, K. & Pena, L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of Zika virus: A review. *Viruses* <https://doi.org/10.3390/v12010019> (2019).
45. Silva, S. J. R. D. *et al.* Development and validation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in mosquito samples from Brazil. *Sci. Rep.* **9**, 4494. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40960-5> (2019).
46. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797> (2009).
47. Zhou, D. *et al.* Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. *Sci. Rep.* **4**, 4912. <https://doi.org/10.1038/srep04912> (2014).
48. Musso, D., Ko, A. I. & Baud, D. Zika virus infection: After the pandemic. *N. Engl. J. Med.* **381**, 1444–1457. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1808246> (2019).
49. Nicolini, A. M., McCracken, K. E. & Yoon, J. Y. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. *J. Biol. Eng.* **11**, 7. <https://doi.org/10.1186/s13036-016-0046-z> (2017).
50. Campos, R. E. M. *et al.* Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. *J. Clin. Virol.* **77**, 69–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.02.009> (2016).
51. Zammarchi, L. *et al.* Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *J. Clin. Virol.* **63**, 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.12.005> (2015).
52. Tian, B. *et al.* Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptibility. *Biosens. Bioelectron.* **86**, 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.085> (2016).
53. Leruez-Ville, M., Kunstmann, J. M., De Almeida, M., Rouzioux, C. & Chaix, M. L. Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men. *Lancet* **356**, 42–43. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02435-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02435-1) (2000).
54. Kurosaki, Y. *et al.* Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Sci. Rep.* **7**, 13503. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13836-9> (2017).
55. Wang, X. *et al.* Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* **238**, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.10.010> (2016).
56. Al-Soud, W. A. & Radstrom, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 485–493. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.485-493.2001> (2001).
57. Calvert, A. E., Biggerstaff, B. J., Tanner, N. A., Lauterbach, M. & Lanciotti, R. S. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS ONE* **12**, e0185340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185340> (2017).
58. Lamb, L. E. *et al.* Rapid detection of Zika virus in urine samples and infected mosquitos by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Sci. Rep.* **8**, 3803. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22102-5> (2018).
59. Zhao, J. & Feng, R. Sensitive and rapid detection of Zika virus by loop-mediated isothermal amplification. *Virus Genes* <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1612-x> (2018).
60. Escalante-Maldonado, O. *et al.* Development and validation of loop-mediated isothermal amplification for the detection of the Zika virus. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud. Publica* **36**, 442–447. <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2019.363.3941> (2019).
61. Chotiwan, N. *et al.* Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. *Sci. Transl. Med.* <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag0538> (2017).
62. Castro, T. *et al.* Rapid diagnosis of Zika virus through saliva and urine by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J. Oral Microbiol.* **10**, 1510712. <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1510712> (2018).
63. Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. & Morita, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* **18**, 407–421. <https://doi.org/10.1002/rmv.593> (2008).
64. Njiru, Z. K. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, e147. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000147> (2008).
65. Lau, Y. L. *et al.* Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 3698–3702. <https://doi.org/10.1128/JCM.00462-10> (2010).
66. Salant, H., Abbasi, I. & Hamburger, J. The development of a loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for *Echinococcus granulosus* [corrected] coproduct detection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **87**, 883–887. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0184> (2012).
67. Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D. & Wolff, A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: Effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res.* **35**, e127. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm671> (2007).



68. Tang, Y., Chen, H. & Diao, Y. Advanced uracil DNA glycosylase-supplemented real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (UDG-rRT-LAMP) method for universal and specific detection of Tembusu virus. *Sci. Rep.* **6**, 27605. <https://doi.org/10.1038/srep27605> (2016).
69. Karthik, K. *et al.* New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX* **1**, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.08.009> (2014).
70. Song, J. *et al.* Instrument-free point-of-care molecular detection of Zika virus. *Anal. Chem.* **88**, 7289–7294. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01632> (2016).

## Acknowledgements

S.S is supported by a doctoral fellowship sponsored by the Foundation for Science and Technology of Pernambuco (FACEPE), reference number IBPG-1321-2.12/18. This work was supported by the Canadian International Development Research Centre (108410-001) and FACEPE (APQ-0154-2.12/16). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Author contributions

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

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83371-1>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to L.P.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

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



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

© The Author(s) 2021



OPEN

# Field validation of the performance of paper-based tests for the detection of the Zika and chikungunya viruses in serum samples

Margot Karlikow<sup>1,2,23</sup>, Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>3,23</sup>, Yuxiu Guo<sup>1,4,23</sup>, Seray Cicek<sup>1,4,23</sup>, Larissa Krokovsky<sup>5,23</sup>, Paige Homme<sup>1</sup>, Yilin Xiong<sup>1</sup>, Talia Xu<sup>1</sup>, Maria-Angelica Calderón-Peláez<sup>6</sup>, Sigrid Camacho-Ortega<sup>6</sup>, Duo Ma<sup>7</sup>, Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães<sup>3,8,9</sup>, Bárbara Nayane Rosário Fernandes Souza<sup>3</sup>, Diego Guerra de Albuquerque Cabral<sup>3,8</sup>, Katariina Jaenes<sup>1</sup>, Polina Sutyryna<sup>1</sup>, Tom Ferrante<sup>10</sup>, Andrea Denisse Benitez<sup>11</sup>, Victoria Nipaz<sup>11</sup>, Patricio Ponce<sup>11</sup>, Darius G. Rackus<sup>1,12,13</sup>, James J. Collins<sup>10,14,15,16,17,18</sup>, Marcelo Paiva<sup>5</sup>, Jaime E. Castellanos<sup>6</sup>, Varsovia Cevallos<sup>11</sup>, Alexander A. Green<sup>19,20,21</sup>, Constância Ayres<sup>5</sup>, Lindomar Pena<sup>3</sup> and Keith Pardee<sup>1,22</sup> ✉

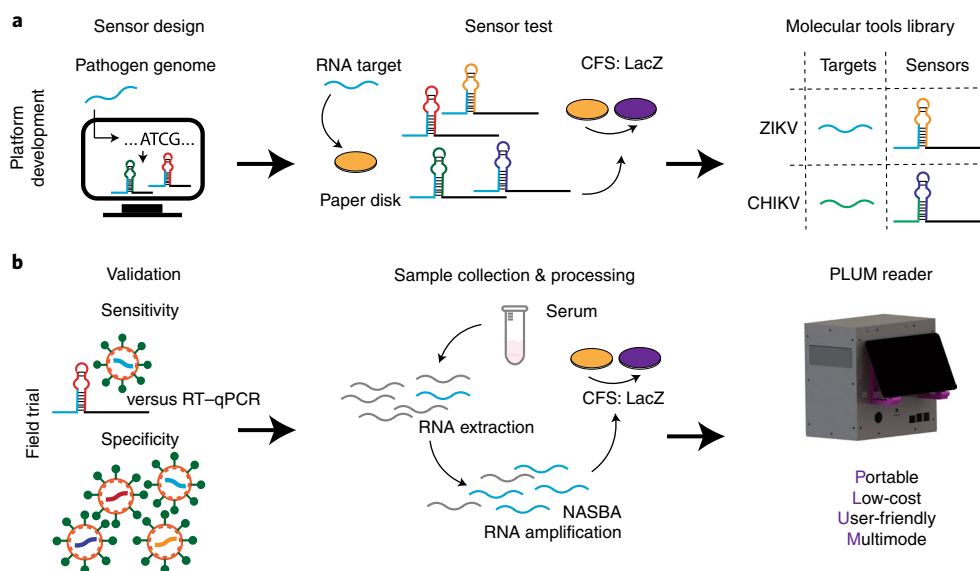
**In low-resource settings, resilience to infectious disease outbreaks can be hindered by limited access to diagnostic tests. Here we report the results of double-blinded studies of the performance of paper-based diagnostic tests for the Zika and chikungunya viruses in a field setting in Latin America. The tests involved a cell-free expression system relying on isothermal amplification and toehold-switch reactions, a purpose-built portable reader and onboard software for computer vision-enabled image analysis. In patients suspected of infection, the accuracies and sensitivities of the tests for the Zika and chikungunya viruses were, respectively, 98.5% (95% confidence interval, 96.2–99.6%, 268 serum samples) and 98.5% (95% confidence interval, 91.7–100%, 65 serum samples) and approximately 2 aM and 5 fM (both concentrations are within clinically relevant ranges). The analytical specificities and sensitivities of the tests for cultured samples of the viruses were equivalent to those of the real-time quantitative PCR. Cell-free synthetic biology tools and companion hardware can provide de-centralized, high-capacity and low-cost diagnostics for use in low-resource settings.**

The 2015–2016 outbreak of the Zika virus in Latin America transformed the virus into a global concern that infected an estimated 210,000 patients and caused congenital anomalies in thousands of newborns in Brazil alone<sup>1–6</sup>. This public health crisis highlighted the need for rapid and low-cost testing that can be deployed beyond the reach of centralized clinical diagnostic labs. Such centralized labs use real-time quantitative PCR (RT–qPCR) for the detection of pathogens, which, although tremendously sensitive and specific, requires specialized laboratory equipment that is cumbersome and costly. The result is a sparse network of diagnostic hubs that can be difficult to scale during an outbreak, often leading

to bottlenecks in testing<sup>7,8</sup>. This was the case in the hardest-hit country, Brazil, where RT–qPCR-based diagnostics for the Zika virus were provided by five centralized national reference laboratories, which led to limited access and delays in results<sup>9,10</sup>. The circumstance was worsened by overlapping clinical symptoms of the Zika virus with other endemic arboviruses<sup>5,11,12</sup>, cross-reactivity in antibody tests and a lack of portable antigen tests<sup>11,13</sup>.

Although most patients do recover from the Zika virus, the nature of mosquito-borne transmission makes this a disease of poverty, with most infections occurring in peri-urban settings, where standing water is common and public infrastructure is often

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada. <sup>2</sup>En Carta Diagnostics, Paris, France. <sup>3</sup>Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Recife, Brazil. <sup>4</sup>LSK Technologies Inc, Kitchener, Ontario, Canada. <sup>5</sup>Department of Entomology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Recife, Brazil. <sup>6</sup>Instituto de Virologia, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia. <sup>7</sup>Biodesign Center for Molecular Design and Biomimetics, The Biodesign Institute and the School of Molecular Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ, USA. <sup>8</sup>Pernambuco State Central Laboratory (LACEN/PE), Department of Virology, Recife, Brazil. <sup>9</sup>University of Pernambuco (UPE), Serra Talhada Campus, Serra Talhada, Brazil. <sup>10</sup>Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering, Harvard University, Boston, MA, USA. <sup>11</sup>Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública 'Dr. Leopoldo Izquieta Pérez', Quito, Ecuador. <sup>12</sup>Department of Chemistry and Biology, Ryerson University, Toronto, Ontario, Canada. <sup>13</sup>Institute for Biomedical Engineering Science and Technology (iBEST), a partnership between Ryerson University and St. Michael's Hospital Toronto, Toronto, Ontario, Canada. <sup>14</sup>Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA. <sup>15</sup>Institute for Medical Engineering and Science, MIT, Cambridge, MA, USA. <sup>16</sup>Synthetic Biology Center, MIT, Cambridge, MA, USA. <sup>17</sup>Harvard-MIT Program in Health Sciences and Technology, Cambridge, MA, USA. <sup>18</sup>Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA. <sup>19</sup>Department of Biomedical Engineering, Boston University, Boston, MA, USA. <sup>20</sup>Molecular Biology, Cell Biology & Biochemistry Program, Graduate School of Arts and Sciences, Boston University, Boston, MA, USA. <sup>21</sup>Biological Design Center, Boston University, Boston, MA, USA. <sup>22</sup>Department of Mechanical and Industrial Engineering, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada. <sup>23</sup>These authors contributed equally: Margot Karlikow, Severino Jefferson Ribeiro da Silva, Yuxiu Guo, Seray Cicek, Larissa Krokovsky. ✉e-mail: [keith.pardee@utoronto.ca](mailto:keith.pardee@utoronto.ca)



**Fig. 1 | Schematic of the paper-based diagnostic system.** **a**, System development. Virus-specific toehold-switch-based sensors were computationally designed based on the target virus genomic sequence. DNA encoding the toehold switch was then embedded into paper discs with a cell-free system (CFS) that transcribes the RNA-based sensor. In the presence of target viral RNA, the toehold switch enables cell-free translation of the LacZ (CFS: LacZ) reporter gene to create a colorimetric output (yellow → purple). The system is programmable and can be similarly applied to detect any pathogen sequence, enabling the formation of a molecular tools library. **b**, Field trial. Using cultured virus, the analytical sensitivity and specificity of the paper-based diagnostic were first validated using a two-step NASBA and toehold switch-based method. All of the data were collected and analysed using the in-house PLUM reader. RT-qPCR was performed in parallel for all experiments for comparison. Using the same method, validation was followed by a patient trial using RNA extracted from patient serum samples.

inadequate. Studies following the 2016 outbreak found that inadequate surveillance and diagnostic systems contributed to spread of the Zika virus, and that social and economic disparity in access to health services exacerbated the challenges faced by vulnerable populations<sup>14</sup>. Taken together, the shortfall in diagnostic capacity led to calls for molecular diagnostics that can be used at the point of care (POC) and motivated the development of several new Zika diagnostic technologies, many of which came from the field of synthetic biology<sup>15–17</sup>.

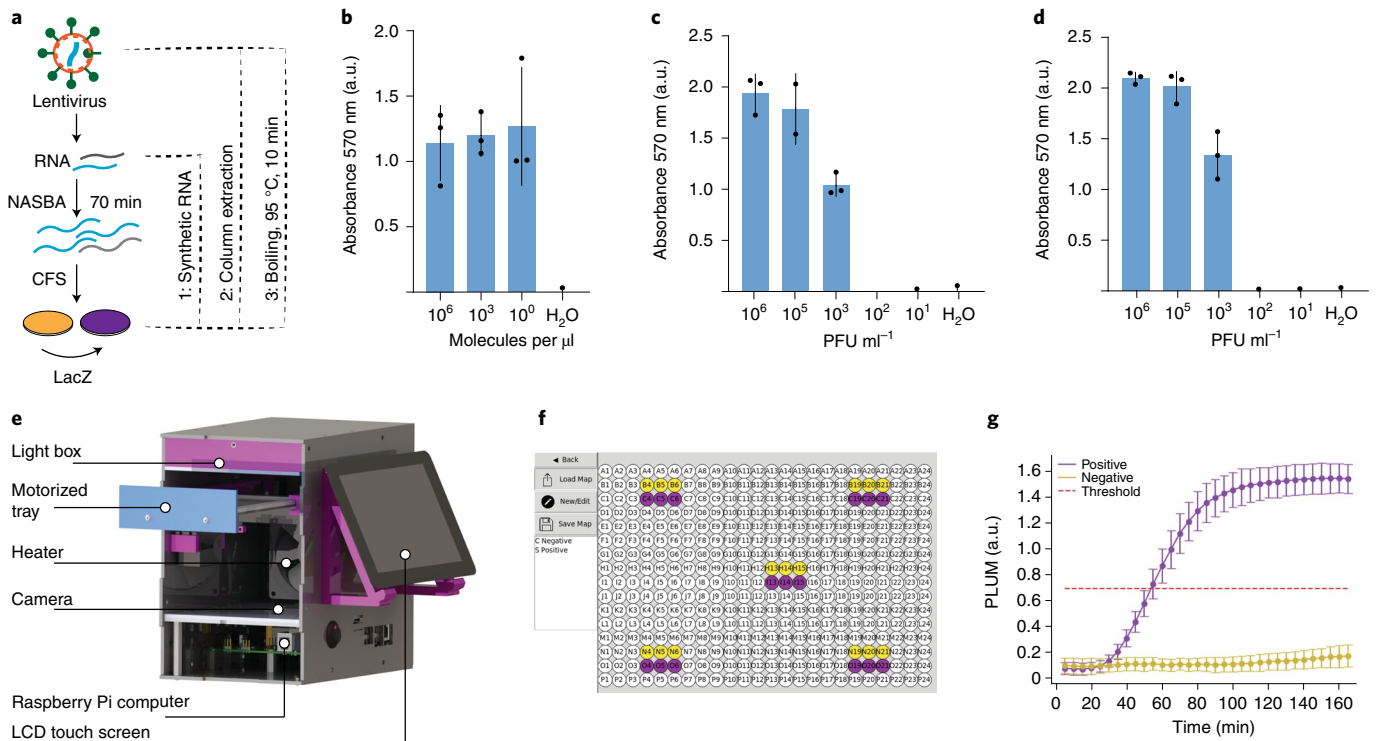
We were one of the groups that contributed to the effort for new and portable Zika virus diagnostics<sup>15</sup>. Using computationally designed toehold switch-based sensors (Supplementary Note 1) targeting the Zika RNA genome, we developed a paper-based test using cell-free protein expression reactions (PURExpress) that could be freeze-dried for distribution without refrigeration. Containing the recombinant enzymes of transcription and translation from *Escherichia coli*, these reactions first transcribe the RNA-based toehold switch from a DNA template and then, if the target Zika viral sequence is present, translate a reporter protein (for example,  $\beta$ -galactosidase (LacZ)) to create an optical signal through enzymatic cleavage of chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG, yellow → purple; Fig. 1a)<sup>18</sup>. To reach clinically relevant sensitivity, an isothermal RNA amplification reaction (nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)) was placed upstream in the workflow to provide detection down to the low-femtomolar range (3 fM)<sup>19,20</sup>. Notably, all of the molecular components for the test are independent of the PCR supply chain and, if needed, can be fabricated using the infrastructure of a simple microbiology lab<sup>15,18,21–24</sup>. These features make this in vitro and biosafe technology well suited for use where there is a need for de-centralized capacity, such as in low-resource settings or during public health crises.

Until recently, portable diagnostic technologies based on synthetic biology have remained largely untested under field conditions with patient samples. To address this need for validation, we

assembled a team of laboratories from five countries to perform a patient trial of our paper-based Zika diagnostic devices onsite in Latin America (Fig. 1b)<sup>15</sup>. Here we report field trials for a synthetic biology-based diagnostic using patient samples, and we benchmarked the test performance directly to a US Centers for Disease Control (CDC) RT-qPCR test for the virus<sup>25</sup>. After optimization of the molecular components, and as part of establishing a PCR-free molecular diagnostic at field sites away from the benches of home laboratories in Canada and the US, we developed a low-cost, computer vision-enabled, automated plate reader (which we named the PLUM reader, for portable, low-cost, user-friendly, multimode reader) to perform low-volume, high-capacity optical measurements in a 384-well format. Using RNA extracted from the serum of patient samples, we find that the combined PLUM reader and paper-based Zika sensor provide analytical sensitivity and specificity for the Zika virus equivalent to RT-qPCR, with a diagnostic accuracy of 98.5%. We further show that the combination of molecular, hardware and software tools can be used as an adaptive system for the point of need. In a second proof-of-concept effort, we demonstrate that by simply changing the molecular components that confer specificity to the assay (in particular, NASBA primers and toehold switch), we can detect the chikungunya virus (98.5% accuracy), which is another arbovirus with worldwide distribution that causes significant morbidity<sup>26–28</sup>.

## Results

**Preparation of the molecular tools.** We began by optimizing the original paper-based Zika virus diagnostic workflow for distribution to field sites (Extended Data Fig. 1)<sup>15</sup>. This started with evaluation of analytical sensitivity using in vitro-transcribed RNA inputs. As previous work has shown, the incorporation of an isothermal amplification step can be used to provide detection of target nucleic acids well within clinically relevant concentrations<sup>15,17,29</sup>. Using this two-step process, we demonstrated detection of target RNA from



**Fig. 2 | Optimization of the molecular tools for the Zika virus diagnostic test and development of the hardware and software components of the portable, low-cost PLUM reader.** **a**, Schematic showing the assay workflow for tests using synthetic RNA (1), extracted RNA from lentivirus containing the target Zika virus sequence (2) and direct use of lysed lentivirus containing the target Zika RNA sequence (3). **b–d**, Bar graphs of analytical sensitivity determination using synthetic RNA at  $1.24 \times 10^6$  molecules per  $\mu\text{l}$  (**b**) column-extracted RNA from engineered lentivirus carrying the target RNA sequence (**c**) and heat-lysed engineered lentivirus carrying the target sequence (**d**). All data represent technical replicates from a single representative experiment (three independent biological triplicates were performed). Absorbance at 570 nm was measured on a commercial plate reader. Analysis is the mean absorbance  $\pm$  s.d. of the cell-free experiments at 130 min, which were preceded by a 70 min NASBA reaction. **e**, Schematic of the PLUM reader labelled with hardware components, including Raspberry Pi computer, camera, light box, heater for incubation and an LCD touch screen for device operation. **f**, Image of the GUI showing the map setup screen for user-friendly PLUM operation and onboard data analysis. Here the map shows the plate locations of five triplicate LacZ-positive (purple) and LacZ-negative (yellow) reactions used to evaluate positional effects on data collection. **g**, Plot of PLUM reader data analysis for the spatially distributed triplicate LacZ-positive (purple) and LacZ-negative (yellow) reactions after layout in **f**. Analysis is the mean of the five selected locations; error bar represents  $\pm$  s.d. of all 15 wells (Supplementary Fig. 2). The red line represents a theoretical diagnostic threshold that was determined using sensitivity data from field trials.

concentrations as low as 1.24 molecules per  $\mu\text{l}$  (equivalent to  $\sim 2$  nM) (Fig. 2a,b and Supplementary Method 1). This is an increase in analytical sensitivity of three orders of magnitude over our previously published results, which was achieved by optimizing primer concentration (500 nM to 12.5  $\mu\text{M}$ )<sup>15</sup>, and, ultimately, we found that reducing the primer concentration (to 500 nM) provided the best sensitivity.

Before transferring the assay to the teams in Latin America, we wanted to confirm that the workflow would accommodate the detection of virus-encapsulated target sequences. For this, we chose to test the diagnostic with an engineered lentivirus containing a small segment of the Zika viral genome. Lentivirus was chosen over the Zika virus for safety and practical reasons. Although both viruses are categorized as Biosafety Level 2 (BSL-2), the lentivirus contains only a small portion of the Zika viral genome, reducing risk of disease, and has been engineered with safety features that mitigate many of the risks of working with Zika virus, including replication incompetence<sup>30</sup>. These factors, combined with the lentivirus being a widely used and easy-to-implement research tool, made the virus a useful proxy to evaluate assay performance from the context of encapsulated RNA.

We began by extracting RNA from the lentiviral particles using conventional column purification (Fig. 2a,c) and then tested the

ability of the diagnostic assay to detect the lentiviral RNA without the extraction step, using a simple boiling step to lyse the viral capsid for direct assay input (Fig. 2a,d). In both cases, the Zika assay was able to detect the lentivirus down to  $10^3$  plaque-forming units (PFU) per ml. With the diagnostic assay ready for field testing, the primer sequences, toehold switches and protocols were transferred to laboratories in Brazil, Ecuador and Colombia to establish testing capacity onsite in Latin America.

**A portable, high-capacity plate reader.** The transition of a paper-based diagnostic assay to field-deployable applications requires a field-ready companion device, and so, with no commercial options for low-cost and portable optical quantification, we developed a portable device that provides quantitative and high-throughput measurements of the paper-based Zika diagnostics onsite. Previous efforts developed companion electronic readers; however, the devices had limited sample capacity ( $n < 16$ ) and required a laptop and separate incubator for operation<sup>15,22</sup>. Moreover, these designs required a dedicated light-emitting diode (LED)/sensor pair (US\$6.50) for each sample, which alone would make the deployment of the high-capacity system needed for a patient trial impractical and costly for a 384-well format.



To meet this need, we designed the PLUM reader, an affordable, computer vision-enabled, camera-based plate reader, which is essentially a ‘lab in a box’ that serves as a low-cost, temperature-controlled plate reader (~US\$500; Fig. 2e). In PLUM, a low-cost camera and a credit-card-sized computer are used to collect and analyse the data from the entire multiwell plate in a single image capture. This strategy substantially reduces the complexity and cost of the device and moves much of the data collection burden to the software.

**Device configuration.** The PLUM reader was assembled (Fig. 2e) using a Raspberry Pi computer, off-the-shelf electronics and rapid prototyping techniques such as three-dimensional (3D) printing and a laser-cut acrylic housing. Much like a conventional plate reader, users interact with a user-friendly graphical user interface (GUI) (Fig. 2f and Supplementary Fig. 1) that coordinates all functions of the PLUM reader. An LCD touch screen is integrated into the device for a simple and compact system that can be easily brought, as we did for this project, to multiple sites of use. This toaster-size device (20 cm × 20 cm × 20 cm) weighs only 2 kg, which compares well to conventional devices that are considerably bulkier and can weigh as much as 35 kg (for example, BioTek Neo2). The device is capable, with the correct adaptor, of operating on global power supplies or can run for 8–9 h using a standard lithium-ion brick battery (100 Wh).

PLUM software controls the 3D-printed plate reader tray, powered by a servomotor, for automated operation and dependable control over tray position (Fig. 2e). Through the GUI, the user can setup the plate map (for example, control and samples wells) for onboard data analysis and plotting at the end of each experiment (Fig. 2f,g and Supplementary Fig. 1b–d). Once the plate is loaded, the position of the plate is identified through a validation algorithm that automatically finds reusable yellow acrylic markers that sit in the four corner wells of the plate for image alignment (Supplementary Fig. 1a). Upon recognition of these markers, a digital template of the multiwell plate is used to assign the red, green and blue (RGB) channel pixel values for each well into regions of interest, which are used to create absorbance-equivalent data for all 384 wells. Collateral benefits of this approach are that PLUM’s computer vision-enabled software can be easily configured to collect optical data from any plate format, and periodic calibration of device alignment is not necessary.

**Light path.** Another challenge to operationalizing the camera-based approach was the collection of high-quality, high-sensitivity data with such a simple hardware configuration. The light box, which is located at the top of the device, sits above the multiwell plate, with the camera looking up at the colour-based paper reactions in the plate much like an illuminated-stained glass window (Fig. 2e, Supplementary Note 2, and Methods for all design and component information). Our first attempts resulted in poor data quality due to high background signal from light passing through unused empty wells in the plate (data not shown). To resolve the issues of both low dynamic range and high variability over time, we applied commercially available opaque PCR foil to block incoming light from empty wells (estimated <US\$1 per sheet) (Extended Data Fig. 1). This simple and low-cost solution has the added benefit of ensuring that the unused wells remain clean for future experiments.

With the basic optical system in place, we next optimized the quality of the light source in the device. Off-the-shelf white LEDs carry warm and soft undertones with low or high blue channel biases and do not provide the broad spectrum of wavelengths needed for a colour-based analysis method<sup>31</sup>. Accordingly, we sourced specialized broad-spectrum white LEDs, which are used for niche applications to simulate daylight, to provide a near-ideal coverage of the visible spectrum. The 54 LEDs (US\$0.95 each) were arrayed using a custom-printed circuit board to create a simple and low-cost

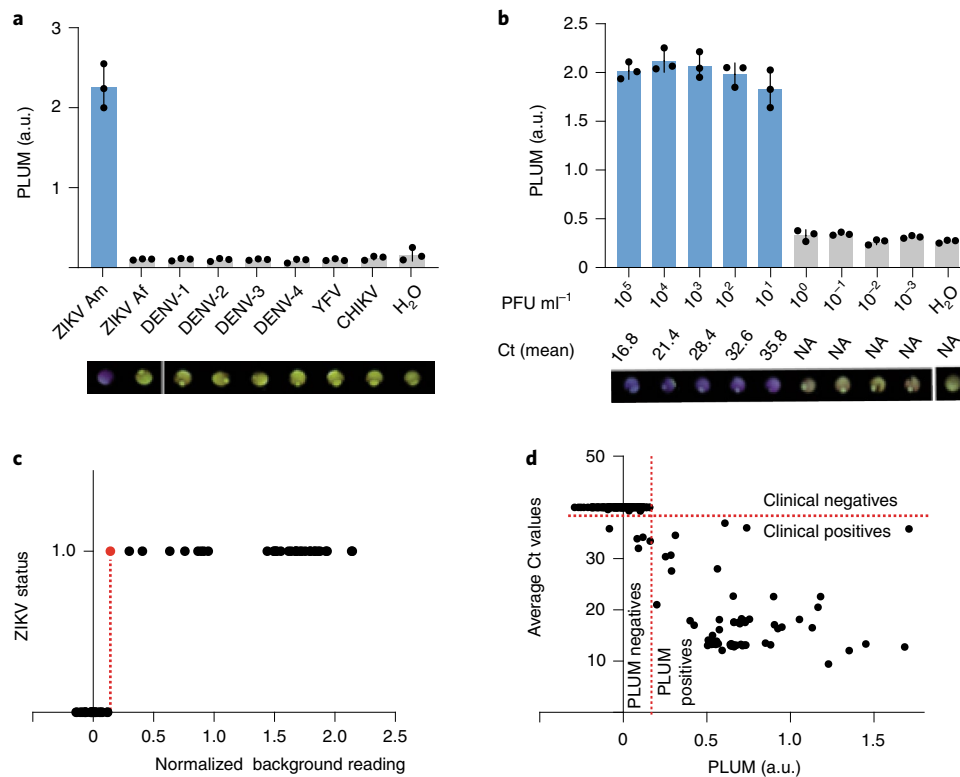
illumination source for the PLUM reader (Supplementary Note 2). To achieve an even illumination over the plate, a custom-built, 3D-printed light box housing the LED board was assembled by using a layer of tracing paper as a diffuser. To confirm that the design was free of positional measurement effects, triplicate cell-free expression reactions with and without LacZ reporter were run at five locations in a 384-well plate (Fig. 2f,g). The level of variation across the 15 parallel positive-reaction and 15 negative-reaction time-course measurements taken by the PLUM reader was modest (Fig. 2g) and compared well to measurements taken of a replicate plate using a commercial plate reader (Supplementary Fig. 2, bottom).

**Optical measurements.** Optical absorbance measurements are a routine and key functionality for plate readers and are central to measurement of the LacZ reporter output for the Zika virus diagnostic (570 nm). To measure absorbance, conventional plate readers directly monitor the intensity of the wavelength of interest and create an absorbance value by inverting the quantified decrease in transmitted light signal (Supplementary Fig. 3a)<sup>32</sup>. However, without the sophisticated components of conventional plate readers, such as monochromators and optical slits, we needed an alternative approach. Our solution was to use computer-vision-based software to compensate for the simplicity of the PLUM reader’s components (for example, camera-based measurement; Supplementary Fig. 3b).

Here, rather than measuring absorbance directly, we use all the light reaching the RGB channels of the camera to measure the spectral colour shift caused by optical changes in the sample (Supplementary Fig. 2, left column). Using the colour additive theory, the resulting algorithm calculates absorbance-equivalent values by taking a ratio of the increasing colour channel over the decreasing colour channel value<sup>33,34</sup>. During each experiment, an image of the plate is collected at each capture interval (for example, 5 minute periods), and the RGB channel values for all well regions of interest are stored in a data file (for example, CSV). To quantify the purple reporter signal of Zika-positive samples, onboard software calculates the ratio of blue channel values over green channel values, providing similar absorbance-equivalent outputs (Supplementary Fig. 2). Once done, using well-assignment data from the plate map, data can then be automatically analysed, graphed (Fig. 2g), uploaded via the Internet to the cloud storage (Amazon Web Services S3) and shared worldwide with collaborators.

**Field trial of the diagnostic test for the Zika virus.** After molecular and hardware training onsite in Latin America, we evaluated the performance of the Zika virus diagnostic system using cultured viruses (analytical specificity and sensitivity) and patient samples (diagnostic performance). As the site for the trial, we selected Recife in the Pernambuco State of Brazil, which was the epicentre of the 2016 Zika virus epidemic in Latin America. As a mosquito-borne abrovirus (for example, dengue and chikungunya), viral spread in the region was exacerbated by the many peri-urban settings, which, due to standing water, can serve as breeding grounds for mosquitoes such as *Aedes aegypti*. Selection of Recife provided an opportunity to trial the diagnostic in a location of endemic disease and near, ultimately, where we envision local and distributed health centres could use the technology.

For this phase of the project, a standardized diagnostic workflow was used in all experiments where, after RNA extraction, samples were tested using Zika virus-specific NASBA and paper-based cell-free reactions (Fig. 1b and Extended Data Fig. 1). The PLUM reader was used exclusively here and provided early and unbiased quantification of the colorimetric responses in real time. In parallel, as a gold-standard comparison, all samples were tested the same day using the RT-qPCR protocol for the Zika virus diagnosis, developed by the US CDC (cycle threshold (Ct) ≤ 38: positive and Ct > 38: negative)<sup>25</sup>.



**Fig. 3 | Performance of the diagnostic system for the Zika virus in Latin America.** **a**, Specificity was determined for ZIKV Am against a panel of off-target viruses (at  $10^6$  PFU ml<sup>-1</sup>) that included ZIKV Af, CHIKV, YFV and DENV-1-4. **b**, Analytical sensitivity experiment using cultured Zika virus as well as the mean Ct value obtained in the parallel RT-qPCR (Supplementary Fig. 4b). NA, not applicable. Visual outputs at final time point of 235 min are shown below the graphs in **a** and **b** (yellow, negative; purple, positive). The graphs in **a** and **b** represent the mean  $\pm$  s.d. of technical replicates from a single representative experiment (three independent biological triplicates were performed) at 130 min of the cell-free experiments (preceded by 70 min NASBA reaction). RT-qPCR experiments were run in parallel for results confirmation using the CDC gold-standard assay (Supplementary Fig. 4a,b). **c**, Logistic test for threshold value determination (a.u.) of Zika virus diagnostic at 130 min, established using normalized background reading from analytical sensitivity tests performed in PLUM device. On the y axis, negative samples were plotted at 0; positive samples were plotted at 1. **d**, Segregation of the patient samples using the threshold value set in **c** is placed in perspective of the Ct values obtained by RT-qPCR for all 268 samples.

We began the characterization of the diagnostic system by testing the analytical specificity for the American strain of the Zika virus against a panel of seven endemic arboviruses that could, in practice, be found in patients with similar symptoms to those associated with the Zika virus. This included the chikungunya virus (CHIKV) and yellow fever virus (YFV), along with the four serotypes of the dengue virus (DENV-1-4). We also evaluated strain specificity with addition of the African strain of Zika (ZIKV Af). As can be seen by eye, a positive signal (purple colour) was only detected in the presence of the American strain of the Zika virus (Fig. 3a, bottom). The colorimetric response of reactions was quantified using the PLUM reader, with these results directly matching those from the parallel RT-qPCR assay (Fig. 3a, graph, and Supplementary Fig. 4a).

We next evaluated the analytical sensitivity of the paper-based Zika virus test. Here, we performed serial dilutions of the Zika virus after RNA extraction. The results demonstrate that the sensitivity of the paper-based diagnostic system is equivalent to the gold-standard RT-qPCR assay, with detection of the virus down to  $10^1$  PFU ml<sup>-1</sup> (Fig. 3b and Supplementary Fig. 4b). The difference between the maximum sensitivity observed for synthetic RNA ( $10^0$  RNA molecules per  $\mu$ l; Fig. 2b) and cultured virus ( $10^1$  PFU ml<sup>-1</sup>; Fig. 3b) can be explained by the fact that the PFU metric accounts only for infective viral particles, whereas the diagnostic sensor can detect RNA from both infective and non-infective particles. Accordingly, it is not possible to directly correlate the results from synthetic RNA (Fig. 2b) to the lentiviral data (Fig. 2c,d) or viral stock (Fig. 3b).

With the analytical specificity and sensitivity of the paper-based test established, we next set out to evaluate the diagnostic performance of the system using patient samples from suspected cases of arboviral infection collected during the 2015–2016 Zika virus outbreak in Pernambuco State, Brazil. To enable automated diagnostic analysis for users, we generated a logistic regression threshold using the time-resolved absorbance-equivalent readings from the sensitivity experiments conducted in the PLUM reader (Fig. 3c). This threshold (0.1603 arbitrary units (a.u.) above background) was then applied to the analysis of data from double-blinded, paper-based testing of extracted RNA from patient serum samples. The resulting PLUM-based analysis allowed for the differentiation of positive from negative samples as early as 130 min (Supplementary Fig. 4c). A total of 268 patient samples were analysed using our diagnostic system in parallel with RT-qPCR (Fig. 3d and Table 1). In comparison with the RT-qPCR assay<sup>25</sup>, we detected four false-negative and zero false-positive samples, which translates to a calculated<sup>35</sup> diagnostic accuracy and specificity of 98.51% (95% confidence interval (CI), 96.22–99.59%) and 100%, respectively. Datasets from the field trial diagnostic (0.1603 a.u) and RT-qPCR (Ct  $\leq$  38) were plotted to show the similar accuracy of the respective thresholds in correctly segregating positive and negative patient samples (Fig. 3d).

**Field trial of the diagnostic test for the chikungunya virus.** Given the success of the Zika virus patient trial onsite in Brazil, we sought to demonstrate the versatility of the PLUM reader with

**Table 1 | Summary of the patient trial data**

		Positive by RT-qPCR	Negative by RT-qPCR	Total	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
ZIKV	Positive by PLUM	69	0	69	94.52 (86.56, 98.49)	100 (98.13, 100)	98.51 (96.22, 99.59)
	Negative by PLUM	4	195	199			
	Total	73	195				
CHIKV	Positive by PLUM	12	0	12	92.31 (63.97, 99.81)	100 (93.15, 100)	98.46 (91.72, 99.96)
	Negative by PLUM	1	52	53			
	Total	13	52				

For both ZIKV and CHIKV viruses, the diagnostic trial was performed using RNA extracted from patient serum. All data were collected and quantified using the PLUM reader. The patient trial data were collected over the course of 235 min. The segregation of positive and negative samples was performed at the 130 min time point for the ZIKV diagnostic using the set ZIKV threshold (Fig. 3c and Supplementary Fig. 4c) and at the 75 min time point for the CHIKV diagnostic using the set CHIKV threshold (Fig. 3d and Supplementary Fig. 6c). The 95% CIs are specified within brackets.

programmable gene-circuit-based diagnostics. For the next diagnostic demonstration, we chose the mosquito-borne chikungunya virus, which has symptoms overlapping with the Zika virus<sup>11,36,37</sup>. Like the Zika virus, the chikungunya virus originated in Africa and had recently arrived in Latin America, with a sustained and ongoing spread worldwide<sup>38</sup>. Symptoms include fever and soreness; and, although most patients recover within weeks, severe joint pain can last for months<sup>39</sup>. Chikungunya infections are similarly prevalent in peri-urban and low-income communities, and so, as for the Zika virus, there is a need for accessible and de-centralized testing<sup>40</sup>.

As with the Zika virus diagnostic<sup>15</sup>, we began with the computational design of 48 toehold switches targeting various regions of the chikungunya viral RNA genome. Each toehold switch candidate was linked to the LacZ reporter and tested for detection of the corresponding synthetic target RNA sequence (2  $\mu$ M; Supplementary Fig. 5). The top-performing sensor (number 10) was then optimized for analytical sensitivity using several combinations of NASBA primers specific to the region of the targeted chikungunya sequence. The combined NASBA and toehold switch-based test was able to detect the target synthetic RNA down to the clinically relevant range of  $3.25 \times 10^3$  molecules per  $\mu$ l (5 fM; Fig. 4a)<sup>38,41</sup>.

With the molecular components of the diagnostic validated, they were distributed to the field site in Recife, Brazil. Here, the paper-based test was evaluated for diagnostic capacity using cultured chikungunya virus (strains from Paraiba-PB and Pernambuco-PE states) and tested for analytical specificity against a panel of eight off-target endemic arboviruses (including the related Mayaro virus (MAYV)). As before, the chikungunya diagnostic test provided 100% analytical specificity for target strains (CHIKV PE, PB; Fig. 4b and Supplementary Fig. 6a). Similarly, when evaluated for analytical sensitivity using titrated chikungunya virus (strain PE), the paper-based assay provided detection down to  $10^1$  PFU ml<sup>-1</sup> (Fig. 4c). Although the RT-qPCR assay<sup>38</sup> was more sensitive than the paper-based test (Supplementary Fig. 6b), this did not seem to limit performance with patient samples. On the basis of the analytical sensitivity data of PLUM, a chikungunya-specific threshold value (0.08 a.u. above background) was established at 75 min (Fig. 4d). Diagnostic accuracy of the chikungunya test was compared to RT-qPCR (Fig. 4e) and calculated<sup>35</sup> to be 98.46% (95% CI, 91.72–99.96%) in a double-blinded, 65-patient study, with only one false negative, and with the diagnostic sensitivity and specificity of 92.31% and 100%, respectively (Table 1, green, and Supplementary Fig. 6c).

## Discussion

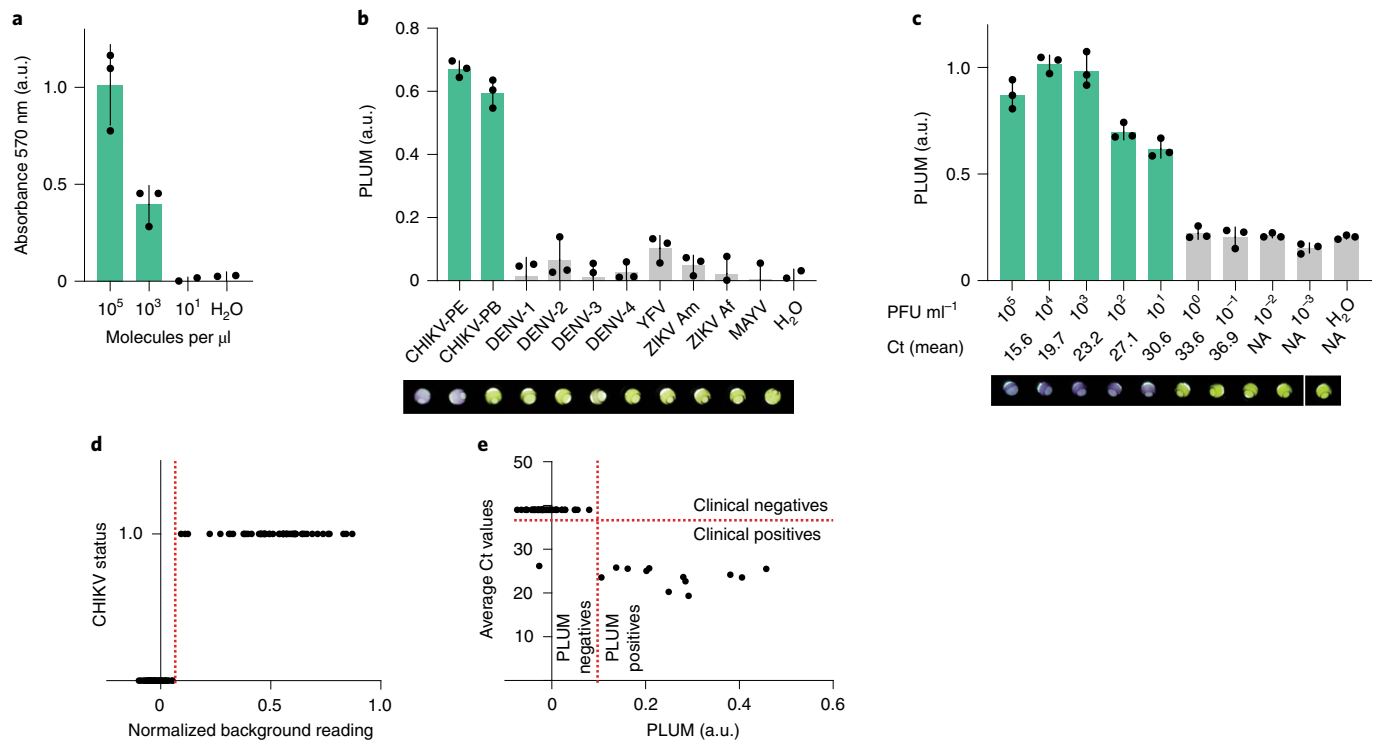
This report provides the results of validation studies, onsite in Latin America, of paper-based synthetic gene networks<sup>22,42</sup> as diagnostic systems for the Zika and chikungunya viruses (Figs. 3 and 4). This work also extends the concept of low-cost and portable companion hardware by describing the development of the PLUM reader.

PLUM uses computer vision and an algorithm based on colour analysis, rather than optical absorbance, to provide functionality similar to conventional plate readers but at a fraction of the cost because of its simple design (Fig. 2e). The combined hardware and software of the unit provides a self-contained, automated and easy-to-use system and includes onboard data collection and analysis, incubation and cloud-based data storage.

These combined purpose-built molecular and hardware technologies come together to help move a proof-of-concept, lab-based assay towards providing low-cost, clinical-grade diagnostics at the point of need. Using 268 patient samples, we found that the paper-based Zika diagnostic could provide analytical specificity and sensitivity equivalent to RT-qPCR, with a diagnostic accuracy of 98.5% (Table 1). Similar performance for the chikungunya sensors shows promise for a path towards a generalizable diagnostic approach. The PLUM reader adds considerably to the molecular diagnostic assay by providing the option for portable use and, via signal thresholding, the automated discrimination of positive and negative samples. This translates to results as early as 2.5 h of reaction time (70 min NASBA + minimum 75 min cell-free reactions), which compares well with traditional RT-qPCR (1.5 h). Importantly, the potential for detection at the point of need could functionally reduce the time required for patient diagnosis from a scale of days to hours.

The Zika outbreak is over, yet the need for Zika virus diagnostics remains, and, according to a United Nations Development Program report, it is now expected that the Zika virus will become endemic in Latin America<sup>14</sup>. This prediction is supported by confirmed Zika cases in 2020, which, in Brazil alone, totalled approximately 7,000 individuals<sup>43</sup>. Transmission continues at low rates throughout the Americas and is currently also a concern in South Asia<sup>44</sup>. Although the spread of the virus is not currently an urgent concern, an estimated 2.6 billion people live in regions of the world that could establish local Zika transmission<sup>45</sup>, based on the presence of competent mosquito vectors and appropriate climate. By 2050, it is expected that almost half of the world's population will live in regions of arbovirus transmission as a result of *Aedes aegypti* spread due to urbanization and climate change<sup>46</sup>. Thus, the ongoing need for Zika and chikungunya testing, and the risk of future surges of infection, make these viruses excellent exemplars for point-of-need diagnostics.

The PCR-free nature of our paper-based system also affords important benefits and has the potential to serve as a drop-in replacement for RT-qPCR in de-centralized applications. As we have seen with the coronavirus disease 2019 (COVID-19) crisis, the centralized nature of RT-qPCR can limit access to diagnostics and is prone to supply chain disruption during infection surges<sup>47</sup>. These same features, along with the challenges of cost and the logistics of shipping, also generally limit access to diagnostics in low-income and middle-income countries. Although not used here, our



**Fig. 4 | Performance of the diagnostic system for the chikungunya virus in Latin America.** **a**, Analytical sensitivity using synthetic trigger RNA on the best-performing molecular sensor. Values on the x axis are  $3.25 \times 10^4$  molecules per  $\mu\text{l}$ . **b**, Analytical specificity against eight off-target arboviruses (at  $10^6$  PFU  $\text{ml}^{-1}$ ) with the addition of MAYV. **c**, Analytical sensitivity of the test using serial dilution of extracted RNA from cultured CHIKV PE. Visual outputs (**b**, **c**) at final time point of 235 min are shown below the graphs (yellow, negative; purple, positive) as well as the mean Ct value obtained in the parallel RT-qPCR (**c** and Supplementary Fig. 6b). NA, not applicable. Analysis in **a–c** represents the mean absorbance  $\pm$  s.d. of technical replicates from a single representative experiment (three independent biological triplicates were performed) and represent the experimental time point at 75 min of the cell-free experiments (preceded by 70 min NASBA reaction). In some cases for **a** and **b**, data points of the replicates are below zero on the y axis. Statistical analysis of (**b**): unpaired *t*-test,  $***P=0.0007$ . RT-qPCR experiments were run in parallel of (**b**) and (**c**) for results validation (Supplementary Fig. 6a,b). **d**, Logistic test for threshold value determination (a.u.) of CHIKV diagnostic at 75 min, established using normalized background reading from analytical sensitivity tests performed in PLUM device. On the y axis, negative samples were plotted at 0; positive samples were plotted at 1. **e**, Segregation of the patient samples using the threshold value set in **d** are placed in perspective of the Ct values obtained by RT-qPCR for all 65 samples.

paper-based technology has previously been shown to be amenable to freeze-drying, for distribution without refrigeration and in-house *E. coli* cell-lysate-based reactions, for low-cost testing<sup>15,21,22</sup>. We see emerging diagnostics, such as the paper-based tests presented here, as having substantial near-term potential to augment existing RT-qPCR capacity, improving equity in the access to health care and aiding the responses to public health crises.

Still, important technical challenges remain to be solved ahead of practical implementation. In this report, we have provided validation results for clinical-grade molecular diagnostics using gene-circuit-based sensors and equipment that are low cost and portable. However, as with RT-qPCR, these assays still require liquid handling by skilled users to prepare samples (RNA extraction of 30 samples in about 60 min) and assays. Although we did not experience issues of cross-contamination, the need for manual intervention will increase this risk as efforts move into less technical settings. Continuation of good laboratory practices will be important as technologies make this transition.

Other real-world challenges also remain to be met. This includes ensuring that the paper-based diagnostic technology is affordable. Our estimated cost per test is US\$5.48 using the price of research-grade reagents (Supplementary Table 2); however, we anticipate that this cost will be further reduced at larger scales. This compares well to the price of RT-qPCR, which, at our site in Recife (Brazil), is US\$11 per reaction<sup>48</sup>. Notably, we also see the

implementation of local and distributed reagent manufacturing (for example, NASBA and lysate-based, cell-free protein expression reactions) as crucial to realizing many of the logistic and economic advantages of distributed diagnostic tools. Work on this is already underway by others in the community, and proof-of-concept efforts show a clear path to ultra-low-cost diagnostic reagents<sup>49–51</sup>. Recent proof-of-concept work demonstrated onsite in Chile indicated the cost of producing the cell-free protein expression reaction (5  $\mu\text{l}$ ) to be US\$0.069, which, here, would replace PURExpress and the related US\$2.54 cost (Supplementary Table 2)<sup>49</sup>. Notably, access to diagnostics is not solely a consideration of cost. Reducing the burden of diagnostic testing by creating technologies that can be made using local inputs and expertise, and that are not capital intensive, will go a long way to improving public health equity in future pandemics.

The development of low-burden techniques that can de-skill sample preparation and liquid handling steps for diagnostics is also key for the practical deployment of distributed diagnostics. With this in mind, here we have demonstrated two lab-based sample preparation methods. The first, sample boiling, introduces that possibility of essentially ‘no-cost’ viral lysis. Boiling has been established by others as an effective lysis method for diagnostics<sup>52</sup>, and, as we found for the engineered lentivirus (Fig. 2d), boiling was also an effective lysis method for the detection of cultured Zika virus (data not shown). The second method, column-based nucleic acid purification, was used for the extraction of patient RNA from samples.



At our research site in Recife (Brazil), the cost per column is US\$4.96, and so this should be considered in addition to the reagent cost described above (US\$5.48; Supplementary Table 2). However, most current diagnostics on the market do not include the extraction step in their kit nor in their price.

Another emerging feature for point-of-need diagnostics is the incorporation of a control sensor specific to patient RNA (such as RNase P). This control serves to guard against false-negative diagnostic results by ensuring that diagnostic samples contain RNA of sufficient quality and quantity. Although we followed gold-standard RT-qPCR methods<sup>25,38</sup> at the time of our patient trial in 2019, a sample RNA control was not part of the standard practice and so was not included. False-negative results were not a significant factor in this work (Table 1); however, going forward, we envision that the implementation of such tools at the point of need will improve the utility and robustness of distributed diagnostics.

As synthetic biology moves increasingly towards the practical application of biotechnologies, this report also holds potential lessons for those seeking to validate other diagnostic systems<sup>53</sup>. As an early demonstration of gene-circuit-based diagnostics in the field, this work serves to inform the emerging low-cost diagnostics research community of the challenges of taking technologies from the bench and into practice in the field. This transition and the transfer of technology, as we and others have found, hold many challenges<sup>54,55</sup>. One main challenge was how to bring high-capacity optical characterization into new environments for distributed testing. We solved this with the development of the PLUM reader, and we anticipate that this hardware solution will help future efforts to validate and implement technologies in low-resource settings. There were also notable logistical challenges in bringing the technology from our laboratory to field sites. Accordingly, we have included brief notes that outline details that we found helpful (Supplementary Method 2). Studies that focus on the validation of technologies at the point of need will be increasingly important as the challenges of moving a technology beyond the proof-of-concept stage and towards a practical tool that can impact the world are tackled. Given the low projected cost and low technical burden for operation, we envision these and other similar technologies as a new generation of tools that will improve global access to needed diagnostics<sup>17,56</sup>.

## Methods

**Toehold switch and NASBA primer design method.** Toehold switches were designed along with companion NASBA primers as described previously<sup>15</sup>. In brief, the target regions within the viral genome were analysed for suitable NASBA amplification sites based on primer sequence and thermodynamic characteristics and the secondary structure of resulting NASBA RNA amplicon. Toehold switches targeting the most promising RNA amplicons were designed and assessed based on multiple parameters, including the secondary structure of the toehold switch and the availability of the binding site in the amplified viral RNA. Combinations of toehold switches and NASBA primers predicted to provide the best performance were then selected for experimental screening.

**Toehold switch construction.** Toehold switches were designed and constructed using conventional molecular biology methods. Synthetic DNA templates (Integrated DNA Technologies (IDT)) were amplified by PCR using primers (Supplementary Table 1) and cloned into a pCOLA-Duet backbone in frame with the LacZ coding sequence using Gibson assembly, as described previously<sup>15</sup>.

**Synthetic RNA target.** DNA encoding the Zika virus target was obtained from the Collins lab in a pET15 backbone<sup>15</sup>. After PCR-based linearization of the template (New England Biolabs (NEB) Phusion, M0530L or NEB Q5 M0491L) using primers listed in Supplementary Table 1, *in vitro* T7 RNAP-based transcription of synthetic RNA was performed (NEB, E2040S). RNA samples treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific, K2981) were then purified (RNeasy Mini Kit, Qiagen, 74104) and used to perform toehold switch screening (2  $\mu$ M RNA) or sensitivity assays (10<sup>6</sup>–10<sup>9</sup> molecules per  $\mu$ l). DNA encoding the target chikungunya sequence was ordered through IDT as dsDNA with a T7 RNAP promoter. The primers used to amplify the target DNA are listed in Supplementary Table 1. After amplification, *in vitro* T7 RNAP-based transcription was performed as described above and then purified.

**RNA extraction virus.** RNA was extracted from lentivirus samples (20  $\mu$ l, 10<sup>7</sup> PFU ml<sup>-1</sup>) or patient serum samples (140  $\mu$ l) following the QIAamp Viral RNA Extraction Kit protocol (Qiagen, 52906) or by heating samples for 10 min at 95 °C. Processed RNA was then used as input to NASBA isothermal amplification reactions for use in toehold switch reactions.

**NASBA reactions.** Isothermal amplification of targets was performed using a commercial NASBA kit (Life Sciences Advanced Technologies NWK-1), following the manufacturer's instructions with slight modifications. In brief, reactions were performed in a 5  $\mu$ l volume format. Per reaction, 1.67  $\mu$ l reaction buffer, 0.83  $\mu$ l of nucleotide mix, 0.05  $\mu$ l of RNase inhibitors and 500 nM of each primer were mixed along with 1  $\mu$ l of sample (water containing target RNA or sample lysate). Reactions were assembled at room temperature, incubated at 65 °C for 2 min and then at 41 °C for 10 min, before adding the enzyme mix (1.25  $\mu$ l). This was followed by incubation at 41 °C for 1 h. Reactions were then added to the PURExpress reaction as previously described at a 1:7 dilution for detection of amplified target(s)<sup>15</sup>.

**Cell-free reactions.** Cell-free reactions (PURExpress, NEB, E6800L) were assembled following the manufacturer's instructions, as described previously<sup>15</sup>. Reactions were assembled to a final volume of 8  $\mu$ l. In brief, 40% solution A, 30% solution B, 0.5% v/v RNase inhibitors (NEB, M0314S) and 0.2  $\mu$ l of 25 mg ml<sup>-1</sup> of chlorophenol red-b-D-galactopyranoside (CPRG, Roche, 10884308001) were combined. Linearized DNA encoding the corresponding toehold switch was added to cell-free reactions at 33 nM. For reactions that included isothermally amplified RNA, NASBA products were added at a 1:7 dilution (1.14  $\mu$ l). The time point data presented (Figs. 2b–d, 3a,b and 4a–c) reflect the respective optimal time required for each cell-free diagnostic assay (ZIKV, 130 min; CHIKV, 75 min).

**Lentivirus engineering, cloning, culture, purification and titration.** *Plasmids.*

(1) pUltra-hot, third-generation lentiviral vector for bi-cistronic expression of mCherry and the gene of interest; pUltra-hot was a gift from Malcolm Moore (Addgene, plasmid 24130; <http://n2t.net/addgene:24130>; RRID:Addgene\_24130). (2) pMD2.G, a VSV-G envelope-expressing plasmid; pMD2.G was a gift from Didier Trono (Addgene, plasmid 12259; <http://n2t.net/addgene:12259>; RRID:Addgene\_12259). (3) pMDLg/pRRE, a third-generation lentiviral-packaging plasmid, contains Gag and Pol; pMDLg/pRRE was a gift from Didier Trono (Addgene, plasmid 12251; <http://n2t.net/addgene:12251>; RRID:Addgene\_12251). (4) pRSV-Rev, a third-generation lentiviral-packaging plasmid, contains Rev; pRSV-Rev was a gift from Didier Trono (Addgene, plasmid 12253; <http://n2t.net/addgene:12253>; RRID:Addgene\_12253).

*Cloning protocol.* Trigger sequence corresponding to the Zika-virus-specific toehold switches was placed downstream of the mCherry sequence between the P2A and T2A sequences<sup>57</sup>. The final sequence was mCherry-P2A-T3T8-T2A with the plasmid named pUltra-hot-mCherry-T3T8 (at 5093–5384 bp from ORI).

*Cell culture.* HEK293T cells were grown at 37 °C at 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator in DMEM or DMEM supplemented with 4,500 mg l<sup>-1</sup> of glucose, L-glutamine and sodium bicarbonate (D5796, Sigma-Aldrich), 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin–streptomycin, approximately, 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin and 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> (Gibco).

*HEK293T transfection with lentiviral constructs.* Once at 70% confluency in a 10 cm plate, cells were transfected with polyethylenimine (PEI, 408727, Sigma-Aldrich) by combining a ratio of DNA:PEI at 1:3, following manufacturer's instructions and incubated overnight at 37 °C<sup>58</sup>. The ratio of plasmid DNA ( $\mu$ g) used was pUltra-hot-T3T8: pMD2.G: pMDLg/pRRE: pRSV-Rev = 4.5: 1.5: 3: 3. Media were then replaced with 10 ml of fresh culture media and incubated at 37 °C. Once mCherry expression was detected, media were collected and centrifuged at 1,000g for 5 min to pellet the debris and the supernatant was syringe filtered using a 0.4  $\mu$ m filter (Millipore).

*Lentivirus concentration.* LentiX (TaKaRa, catalogue no. 631231, lot no. 1705016a) concentrating solution was added to the filtered supernatant in a 1:3 ml ratio (1 ml of LentiX to 3 ml of virus supernatant), and concentration was performed following manufacturer's instructions.

Virus titration: HEK293T cells were plated at 3  $\times$  10<sup>4</sup> cells per well. Serial dilution of lentivirus aliquot was performed in PBS, with 5–7 technical replicates for each, and 25  $\mu$ l of the diluted virus was transferred onto the wells containing the cells. The plate was placed at 37 °C for overnight incubation.

*Median tissue culture infectious dose.* Plates were analysed for cytopathic effect, and conversion from median tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) to PFU was done using the calculation suggested by the American Type Culture Collection (<https://www.atcc.org/support/technical-support/faqs/convert-tcid-50-to-plaque-forming-units-pfu#:~:text=For%20any%20titer%20expressed%20as,mean%20number%20of%20PFU%20Fml>).

**Virus strains, virus culture and purification.** All arboviruses used in this study were provided by the Laboratory of Virology and Experimental Therapy, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), in Recife, Brazil.

Zika virus, American strain PE243 (GenBank accession no. KX197192), was isolated from an infected patient in Pernambuco State, Brazil. Zika virus, African strain MR766 (GenBank accession no. AY632535), was isolated from infected mouse brain suspension. All four Dengue virus (DENV (1–4)) serotypes used were isolated from patient samples in Pernambuco State, Brazil: DENV-1, strain PE/97-42735 (GenBank accession no. EU259529), DENV-2, strain PE/95-3808 (GenBank accession no. EU259569), DENV-3, strain PE/02-95016 (GenBank accession no. KC425219) and DENV-4, strain PE/10-0081 (unpublished). Yellow fever virus, strain 17DD (GenBank accession no. DQ100292) is used as a vaccine strain. Chikungunya virus, strain PE2016-480 (unpublished), was isolated from a patient serum in Pernambuco State, Brazil, and chikungunya strain PB302 (unpublished) was isolated from serum of patient in Paraíba State, Brazil. Mayaro virus, strain BR/Sinop/H307/2015 (GenBank accession no. MH513597.1) was provided by the Federal University of Mato Grosso in Sinop, Brazil.

**Arbovirus cultures and titration.** All viruses used in this study were propagated in Vero cells using DMEM (Gibco) supplemented with 2% of inactivated FBS (Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco), 100 units per ml of streptomycin and 100 µg ml<sup>-1</sup> of penicillin (Gibco) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Mosquito-borne viruses, including ZIKV American lineage, ZIKV African lineage, DENV-1–4, YFV, MAYV, CHIKV PE and CHIKV PB, were titrated using plaque assay with titre ranging from 10<sup>6</sup> to 10<sup>7</sup> PFU ml<sup>-1</sup>. Virus stocks were stored at –80°C before downstream applications.

**Analytical sensitivity experiment.** Viral RNA from stock of all viruses (at 10<sup>6</sup> PFU ml<sup>-1</sup>) was extracted using the QIAamp Viral Mini Kit (Qiagen, 52906) and eluted in 60 µl of water. After serial dilution of the extracted RNA (from 10<sup>5</sup> to 10<sup>-3</sup> PFU ml<sup>-1</sup>), samples were assayed in parallel with the gold-standard RT-qPCR and the NASBA/cell-free reactions<sup>25,38</sup>. ZIKV American strain (PE243) and CHIKV strain (PE2016-480) were the strains used in those studies.

**Analytical specificity experiment.** Analytical specificity of Zika virus or chikungunya virus was determined against a panel of different mosquito-borne viruses endemic in Latin America. Extracted viral RNAs of DENV-1–4, YFV, ZIKV American, ZIKV African, MAYV, CHIKV PE and CHIKV PB at 10<sup>6</sup> PFU ml<sup>-1</sup> were used as inputs to NASBA/cell-free reactions and parallel RT-qPCR.

**RT-qPCR for ZIKV and CHIKV.** ZIKV and CHIKV RT-qPCR was performed according to protocols established by the CDC, with minor modifications<sup>25,38</sup>. Reactions were performed using the QuantiNova Probe RT-PCR kit (Qiagen) following the manufacturer's protocols for 10 µl of final volume with primers of both viruses in 800 nM final concentration and probes in 100 nM final concentration. Primers and probes for ZIKV and CHIKV can be found in Table 1. Reactions were carried out in a QuantiStudio 5 system (Applied Biosystems) with a thermal cycle programme consisting of a single cycle of reverse transcription for 15 min at 45°C, followed by 5 min at 95°C for reverse transcriptase inactivation and DNA polymerase activation, and then 45 cycles of 5 s at 95°C and 45 s at 60°C. All samples were tested in duplicates, with negative controls (all reagents except RNA) and positive controls (RNA extract from viral stock). For results analysis, the QuantStudio Design and Analysis Software version 1.5 was used with automatic threshold and baseline. Samples were considered positive with Ct ≤ 38.0.

**PLUM hardware.** The PLUM reader consists of two chambers housed within a laser-cut acrylic box fastened together with metal screws and mounting brackets (Fig. 2; McMaster-Carr, 8505K14 and 98164A061; Digi-Key, 36-621-ND). The light box is designed with 54 LEDs (YJ-VTC-5730-G01-65, YUJI LED) for illumination. The motorized tray is designed to hold a standard multiwell plate and positions the plate at the correct focal length for the camera (US\$35, Raspberry Pi V2, 8-megapixel). This configuration allows for clear visualization of the plate from below for capture of the image data (Supplementary Fig. 3). On the side panels, the detection chamber houses a fan-based air incubator (Incubator Warehouse, IncuKit MINI) for heating, DS18B20 temperature sensor for recording (RobotShop, RB-Dfr-270), two tray rail guides, a Hitec HSR-1425CR continuous servomotor with 12T Metal Servo Gear (RobotShop, RB-Hit-78, RB-Sct-458) for controlling the tray and a microswitch (RobotShop, RB-Tam-71) for homing the tray. The servomotor gears engage with 3D-printed tray teeth to open and close the tray.

The electronic components of PLUM are controlled by a Raspberry Pi 3B. The camera (Raspberry Pi Camera Module V2) in the detection compartment and the LCD display unit (Raspberry Pi Touch Display 7 inch) mounted on the front panel of the PLUM are connected directly to the Raspberry Pi unit with flex cables (Flex Cable for Camera-24 inch/610 mm). The Raspberry Pi controls the detection unit components, with the exception of the incubator, via a 40-pin header ribbon cable connected to the custom-made motherboard PCB (printed circuit board) (Supplementary Information, vendor). The motherboard PCB facilitates connections of the servos, temperature probe, required resistors, microswitch, power to the LCD display and light box operation with mating connectors.

The device contains a power jack that can be mated with a 12V, 7A power supply or a portable battery (TalentCell Rechargeable, 100 Wh) to support 8–9 h of operation in the field.

All of the information required for the assembly of the PLUM reader is supplied as Supplementary Information. Data files for laser cutting, 3D printing and circuit diagrams and the Gerber files required for printed circuit board manufacturing can be accessed at [https://github.com/PardeeLab/zikaproject\\_hardware](https://github.com/PardeeLab/zikaproject_hardware).

**PLUM software.** A GUI operating on Rasbian was designed using Python 2.7 and open-source APIs (Supplementary Information). The Amazon Simple Storage Service provided by Amazon Web Services (<https://aws.amazon.com/>) was used to scale up the storage space of PLUM through a web service interface. GUI-related and workflow-related code can be found at [https://github.com/PardeeLab/zikaproject\\_plumcode.git](https://github.com/PardeeLab/zikaproject_plumcode.git).

**Statistics.** Statistical analyses for analytical sensitivity experiments were performed on GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) using an unpaired *t*-test.

**Diagnostic performance.** Final accuracy tests were established using an online mathematical tool provided by MedCalc ([https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php))<sup>48</sup>.

**Establishing threshold and data analysis.** All of the sample data collected in PLUM were normalized by subtracting the negative control values (extracted water) in each run. A logistic test was run on data collected for test sensitivity analysis with Zika virus patient samples. According to the time-based thresholds, each patient data point was classified as positive or negative (Supplementary Figs. 4 and 6).

**Patient sample collection.** This study was approved by the FIOCRUZ-PE institutional review board (IRB) under protocol 80247417.4.0000.5190 and research ethics board (REB) approval number at the University of Toronto (protocol 39531) and was conducted in accordance with relevant regulations and guidelines, including the ethical principles for medical research involving human subjects designed by the World Medical Association Declaration of Helsinki. Patient samples were obtained from suspected arbovirus infections, from patients who presented arthralgia, fever, exanthema and other related symptoms in an endemic area of several arboviruses in Latin America. Informed consent of all individuals included in this study was waived by the FIOCRUZ-PE IRB for diagnostic specimens.

**Reporting Summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

The main data supporting the results in this study are available within the paper and its Supplementary Information. All the experimental raw data are available for research purposes from the corresponding author on reasonable request.

## Code availability

Code for controlling the device and conducting experiments on the PLUM reader can be found at [https://github.com/PardeeLab/zikaproject\\_plumcode.git](https://github.com/PardeeLab/zikaproject_plumcode.git). Additional code is available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 25 March 2021; Accepted: 24 January 2022;

Published online: 7 March 2022

## References

- MacNamara, F. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **48**, 139–145 (1954).
- Dick, G. W., Kitchen, S. & Haddock, A. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–520 (1952).
- Duffy, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2536–2543 (2009).
- Musso, D., Nilles, E. J. & Cao-Lorreau, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, O595–O596 (2014).
- Lowe, R. et al. The Zika virus epidemic in Brazil: from discovery to future implications. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15**, 96 (2018).
- Another kind of Zika public health emergency. *Lancet* **389**, 573 (2017).
- Yager, P., Domingo, G. J. & Gerdes, J. Point-of-care diagnostics for global health. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **10**, 160524 (2008).
- Urdea, M. et al. Requirements for high impact diagnostics in the developing world. *Nature* <https://doi.org/10.1038/nature05448> (2006).
- Zika Epidemiological Report - Brazil* (Pan American Health Organization/World Health Organization, 2017); <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-phe-zika-situation-report-bra.pdf>

10. Faria, N. R. et al. Mobile real-time surveillance of Zika virus in Brazil. *Genome Med.* **8**, 97 (2016).
11. Waggoner, J. J. & Pinsky, B. A. Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 860–867 (2016).
12. Theel, E. S. & Jane Hata, D. Diagnostic testing for Zika virus: a postoutbreak update. *J. Clin. Microbiol.* **56**, e01972-17 (2018).
13. Chang, H. H. et al. Systematic analysis of protein identity between Zika virus and other arthropod-borne viruses. *Bull. World Health Organ.* **95**, 517–525 (2017).
14. *A Socio-economic Impact Assessment of the Zika Virus in Latin America and the Caribbean: with a focus on Brazil, Colombia and Suriname* (United Nations Development Programme in partnership with the International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies, 2017); <https://reliefweb.int/report/world/socio-economic-impact-assessment-zika-virus-latin-america-and-caribbean-focus-brazil>
15. Pardee, K. et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. *Cell* **165**, 1255–1266 (2016).
16. Da Silva, J. S., Pardee, K. & Pena, L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of Zika virus: A Review. *Viruses* **12**, 19 (2019).
17. Gootenberg, J. S. et al. Nucleic acid detection with CRISPR–Cas13a/C2c2. *Science* **356**, 438–442 (2017).
18. Shimizu, Y. et al. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/90802> (2001).
19. Romano, J. W., Williams, K. G., Shurtleff, R. N., Ginocchio, C. & Kaplan, M. NASBA technology: isothermal RNA amplification in qualitative and quantitative diagnostics. *Immunol. Invest.* **26**, 15–28 (1997).
20. Deiman, B., Van Aarle, P. & Sillekens, P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Appl. Biochem. Biotechnol. B* **20**, 163–179 (2002).
21. Takahashi, M. K. et al. A low-cost paper-based synthetic biology platform for analyzing gut microbiota and host biomarkers. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05864-4> (2018).
22. Pardee, K. et al. Paper-based synthetic gene networks. *Cell* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.004> (2014).
23. Kwon, Y. C. & Jewett, M. C. High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis. *Sci. Rep.* **5**, 1–8 (2015).
24. Lavickova, B. & Maerkl, S. J. A simple, robust, and low-cost method to produce the PURE cell-free system. *ACS Synth. Biol.* <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00427> (2019).
25. Lanciotti, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287> (2008).
26. Tauro, L. B. et al. A localized outbreak of chikungunya virus in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **114**, 1–4 (2019).
27. de Lima, S. T. S. et al. Fatal outcome of chikungunya virus infection in Brazil. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1038> (2020).
28. Souza, T. M. L. et al. Emergence of the East-Central-South-African genotype of chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39406-9> (2019).
29. Chen, J. S. et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science* **360**, 436–439 (2018).
30. Dull, T. et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* **72**, 8463–8471 (1998).
31. Keeping, S. Defining the color characteristics of white LEDs. *DigiKey Electronics* <https://www.digikey.ca/en/articles/defining-the-color-characteristics-of-white-leds> (2013).
32. Swinehart, D. F. The Beer–Lambert law. *J. Chem. Educ.* **39**, 333–335 (1962).
33. Maxwell, J. C. XVIII. Experiments on colour, as perceived by the eye, with remarks on colour-blindness. *Trans. R. Soc. Edinb.* **21**, 275–298 (1857).
34. MacEvoy, B. Additive & subtractive color mixing. *Handprint.com* <https://www.handprint.com/HP/WCL/color5.html#theoryadd> (2015).
35. MedCalc Software Ltd Diagnostic test evaluation calculator. [https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) (2020).
36. Schwartz, O. & Albert, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 491–500 (2010).
37. Weaver, S. C. & Lecuit, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1231–1239 (2015).
38. Lanciotti, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 764–767 (2007).
39. Chikungunya fact sheet. *World Health Organization* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>. (2020).
40. Bonifay, T. et al. Poverty and arbovirus outbreaks: when chikungunya virus hits more precarious populations than dengue virus in French Guiana. *Open Forum Infect. Dis.* **4**, ofx247 (2017).
41. Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet, C. & Guivel-Benhassine, F. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog.* **3**, 89 (2007).
42. Green, A. A., Silver, P. A., Collins, J. J. & Yin, P. Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. *Cell* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.002> (2014).
43. Ministério da Saúde Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika). *Sem. Epidemiol.* **51**, 1–39 (2020).
44. Huaxia. Indian gov't rushes team to Maharashtra to aid Zika virus monitoring. *Xinhuanet News* [http://www.xinhuanet.com/english/asiapacific/2021-08/02/c\\_1310103390.htm](http://www.xinhuanet.com/english/asiapacific/2021-08/02/c_1310103390.htm) (2021).
45. Bogoch, I. I. et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *Lancet* **387**, 335–336 (2016).
46. Kraemer, M. U. G. et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat. Microbiol.* **4**, 854–863 (2019).
47. da Silva, S. J. R., de Magalhães, J. J. F. & Pena, L. Simultaneous circulation of DENV, CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 in Brazil: an inconvenient truth. *One Heal.* **12**, 100205 (2021).
48. da Silva, S. J. R. et al. Development and validation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in mosquito samples from Brazil. *Sci. Rep.* **9**, 4494, 1–12 (2019).
49. Acre, A. et al. Decentralizing cell-free RNA sensing with the use of low-cost cell extracts. *Front. Bioeng. Biotechnol.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.727584> (2021).
50. Silverman, A. D., Kelley-Loughnane, N., Lucks, J. B. & Jewett, M. C. Deconstructing cell-free extract preparation for in vitro activation of transcriptional genetic circuitry. *ACS Synth. Biol.* **8**, 403–414 (2019).
51. Mcnerney, M. P. et al. Point-of-care biomarker quantification enabled by sample-specific calibration. *Sci. Adv.* **5**, eaax4473 (2019).
52. Heiniger, E. K. et al. Comparison of point-of-care-compatible lysis methods for bacteria and viruses. *J. Microbiol. Methods* **128**, 80–87 (2016).
53. Tan, X., Letendre, J. H., Collins, J. J. & Wong, W. W. Synthetic biology in the clinic: engineering vaccines, diagnostics, and therapeutics. *Cell* **184**, 881–898 (2021).
54. Kumar, A. A. et al. From the bench to the field in low-cost diagnostics: two case studies. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**, 5836–5853 (2015).
55. Ng, A. H. C. et al. A digital microfluidic system for serological immunoassays in remote settings. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaar6076 (2018).
56. Jung, J. K. et al. Cell-free biosensors for rapid detection of water contaminants. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1451–1459 (2020).
57. Bond, S. R. & Naus, C. C. RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects. *Nucleic Acids Res.* **40**, W209–13 (2012).
58. Jiang, W. et al. An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation. *Sci. Rep.* **5**, 13875 (2015).

## Acknowledgements

We thank all of the Pardee laboratory members as well as T. Narahari, J. Dahmer, A. Sklavounos, T. Kim, M. Satkauskas, I. Clotea, S. M. Ho, J. Lamanna, C. Dixon and A. R. Wheeler (all at the University of Toronto) for fruitful discussions about experimental design and analysis methodology and help with assembling the PLUM readers. We also thank F. Federici and A. Arce (Pontificia Universidad Católica de Chile) for discussion on the use of locally manufactured cell-free reagents. M.K. is supported by the Precision Medicine Initiative (PRIME) at the University of Toronto, internal fellowship number PRMF2019-002. S.J.R.d.S. is supported by a doctoral fellowship sponsored by the Foundation for Science and Technology of Pernambuco-Brazil (IBPG-1321-2.12/18). We express our sincere gratitude and appreciation to the Pernambuco State Central Laboratory (LACEN/PE) for providing the samples used in this study. We thank R. Vieira de Moraes Bronzoni from the Federal University of Mato Grosso, Brazil, and L. Helena Vega Gonzales Gil from FIOCRUZ for providing the MAYV and ZIKV MR766 strains used, respectively, as well as J. Camacho and C. Keating from NEB for all their efforts in getting reagents to us in Brazil. This work was supported by funds to K.P. from the CIHR Foundation Grant Program (201610FDN-375469), the Canada Research Chairs Program (Files 950-231075 and 950-233107), the University of Toronto's Major Research Project Management Fund and the University of Toronto's Connaught New Researcher Award and by funds to L.P., V.C., C.A., J.E.C., J.J.C., A.A.G., A.R.W. and K.P. through the CIHR/IDRC Team Grant: Canada-Latin America-Caribbean Zika Virus Program (FRN: 149783). This work was also supported by funds to A.A.G. from an NIH Director's New Innovator Award (1DP2GM126892), the Bill & Melinda Gates Foundation (OPP1160667), an Arizona Biomedical Research Commission New Investigator Award (ADHS16-162400) and an Alfred P. Sloan Fellowship (FG-2017-9108), as well as an NIH R21 award (1R21AI136571-01A1) to K.P. and A.A.G.

## Author contributions

M.K., S.J.R.d.S., L.K. performed most of the wet experiments. T.F. developed a camera-based plate reader prototype and provided ongoing mentorship. S.C., Y.G. and K.P. developed the PLUM reader that was deployed in Latin America. Y.X. and T.X. contributed to the software development of PLUM. M.K., S.J.R.d.S., L.K., Y.G., S.C., M.C. and B.N. contributed to the field trial. M.K., P.H. and S.C. designed and produced the



lentivirus. D.M. and A.A.G. designed the toehold switches. J.J.Ed.M. and D.G.d.A.C. contributed to patient sample collection. B.N., K.J., P.S., D.B., V.T., D.R. P.P. and M.P. supported the work. M.K., Y.G. and S.C. analysed the data and wrote the manuscript. K.P. wrote the manuscript and supervised the project, along with M.K., L.P., C.A., A.A.G., V.C. and J.J.C.

### Competing interests

K.P., A.A.G. and J.J.C. are co-inventors of paper-based toehold sensor-related technologies. Y.G., S.C. and K.P. are co-founders of LSK Technologies, Inc. and are co-inventors of the PLUM-related technologies. M.K., K.P. and A.A.G. are co-founders of En Carta Diagnostics Ltd. Provisional patent applications related to this work are 62/982,323 (to Y.G., S.C. and K.P., filed 27 February 2020), WO2014074648A3 (to A.A.G. and J.J.C., filed 6 November 2012), US15/963,831 (to K.P. and J.J.C., filed 6 December 2013), 62/403,778 (to K.P., A.A.G. and J.J.C., filed 4 October 2016) and 62/341,221 (to K.P., A.A.G. and J.J.C., filed 25 May 2016). The other authors declare no competing interests.

### Additional information

**Extended data** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00850-0>.

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00850-0>.

**Correspondence and requests for materials** should be addressed to Keith Pardee.

**Peer review information** *Nature Biomedical Engineering* thanks Brian Cunningham and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

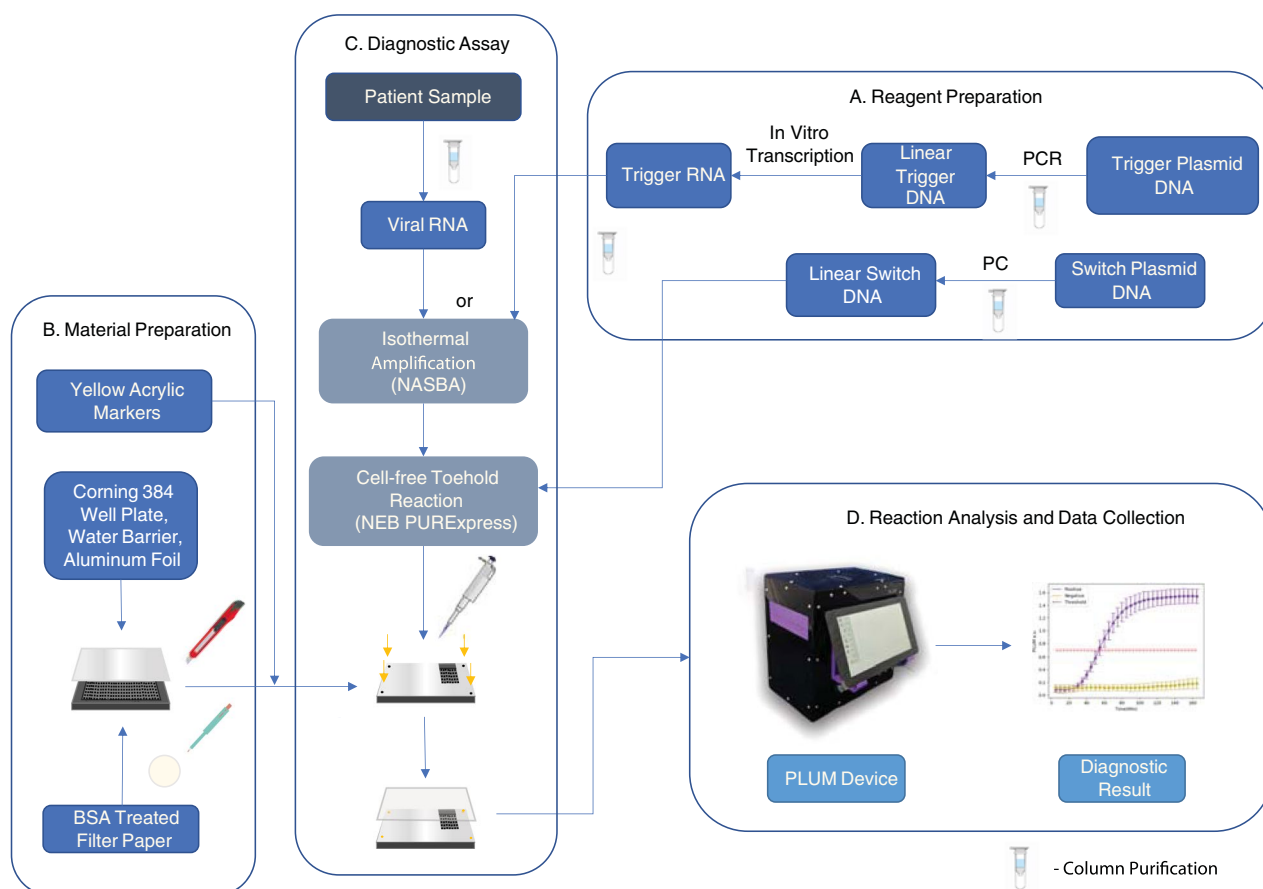
**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

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



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

© The Author(s) 2022



**Extended Data Fig. 1 | Graphical workflow.** **a**, Reagent preparation: Linear DNA for toehold switches is obtained by PCR from a plasmid vector. Similarly, positive control trigger DNA is obtained from plasmids via PCR and subsequently *in vitro* transcribed into RNA. Column purification steps are indicated. **b**, Material preparation: Yellow acrylic markers are laser-cut to fit into the four corners of a 384-well plate. Paper discs are punched out from BSA-treated filter paper using a 2 mm biopsy punch and deposited in the bottom of each reaction well. The wells surrounding the reaction are then filled with water and an aluminum foil seal is placed on the plate. Using an utility knife, only the reaction wells are cut out. **c**, Diagnostic assay: Viral RNA is extracted from patient samples and then amplified through NASBA isothermal amplification, alongside positive control trigger RNA. The amplification product from NASBA is then added to cell-free reactions with linear switch DNA. Clear PCR film is applied to the plate to seal the reactions. The plate is placed inside the pre-incubated PLUM device. **d**, Reaction analysis and data collection: The PLUM software recognizes the plate and continues to capture the reaction (5 min intervals) over the next three hours. At the end of the reaction, the software analyzes the images generated, determining whether a purple to yellow color change has occurred in each well. PLUM generates a graphical report, which indicates whether the sample is positive or negative using a pre-determined threshold value.

## Reporting Summary

Nature Portfolio wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form provides structure for consistency and transparency in reporting. For further information on Nature Portfolio policies, see our [Editorial Policies](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

### Statistics

For all statistical analyses, confirm that the following items are present in the figure legend, table legend, main text, or Methods section.

n/a Confirmed

- |                                     |                                     |  |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | The exact sample size ( $n$ ) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | A statement on whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | The statistical test(s) used AND whether they are one- or two-sided<br><i>Only common tests should be described solely by name; describe more complex techniques in the Methods section.</i>   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | A description of all covariates tested   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | A description of any assumptions or corrections, such as tests of normality and adjustment for multiple comparisons  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | A full description of the statistical parameters including central tendency (e.g. means) or other basic estimates (e.g. regression coefficient) AND variation (e.g. standard deviation) or associated estimates of uncertainty (e.g. confidence intervals) |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | For null hypothesis testing, the test statistic (e.g. $F$ , $t$ , $r$ ) with confidence intervals, effect sizes, degrees of freedom and $P$ value noted<br><i>Give <math>P</math> values as exact values whenever suitable.</i>                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | For Bayesian analysis, information on the choice of priors and Markov chain Monte Carlo settings   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | For hierarchical and complex designs, identification of the appropriate level for tests and full reporting of outcomes   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | Estimates of effect sizes (e.g. Cohen's $d$ , Pearson's $r$ ), indicating how they were calculated   |

*Our web collection on [statistics for biologists](#) contains articles on many of the points above.*

### Software and code

Policy information about [availability of computer code](#)

Data collection

Data analysis

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the research but not yet described in published literature, software must be made available to editors and reviewers. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). See the Nature Portfolio [guidelines for submitting code & software](#) for further information.

### Data

Policy information about [availability of data](#)

All manuscripts must include a [data availability statement](#). This statement should provide the following information, where applicable:

- Accession codes, unique identifiers, or web links for publicly available datasets
- A description of any restrictions on data availability
- For clinical datasets or third party data, please ensure that the statement adheres to our [policy](#)

The main data supporting the results in this study are available within the paper and its Supplementary Information. All the experimental raw data are available for research purposes from the corresponding author on reasonable request.

## Field-specific reporting

Please select the one below that is the best fit for your research. If you are not sure, read the appropriate sections before making your selection.

Life sciences  Behavioural & social sciences  Ecological, evolutionary & environmental sciences

For a reference copy of the document with all sections, see [nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf](https://www.nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf)

## Life sciences study design

All studies must disclose on these points even when the disclosure is negative.

Sample size	Aliquots of serum were taken from sera already collected from the patient for medical diagnosis. From these subpopulations, we assumed a 50% prevalence, as measured by qPCR. Targeting 95% sensitivity and specificity for both assays and a lower bound of 80% for the 95% confidence interval, we calculated a minimum sample size of 70 for each assay. A total of 268 samples were collected for Zika, and 65 samples were collected for chikungunya.
Data exclusions	No data were excluded.
Replication	All in vitro studies were independently performed in triplicates. The field trial on serum of patient samples was only performed once, and it compared during the same day the diagnostic system to gold-standard RT-qPCR.
Randomization	Positive and negative serum samples were randomly placed on ice.
Blinding	The experimenters were blinded while performing the field trial.

## Reporting for specific materials, systems and methods

We require information from authors about some types of materials, experimental systems and methods used in many studies. Here, indicate whether each material, system or method listed is relevant to your study. If you are not sure if a list item applies to your research, read the appropriate section before selecting a response.

### Materials & experimental systems

n/a	Involvement in the study
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Antibodies
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Eukaryotic cell lines
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Palaeontology and archaeology
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Animals and other organisms
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Human research participants
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Clinical data
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Dual use research of concern

### Methods

n/a	Involvement in the study
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ChIP-seq
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Flow cytometry
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> MRI-based neuroimaging

## Human research participants

Policy information about [studies involving human research participants](#)

Population characteristics	The participants independently chose to seek medical attention from enrolled clinics. Upon physician assessment, patients with a high clinical index of suspicion for either Zika or chikungunya viral infections were voluntarily enrolled in the study by a third party (non-medical staff) and with informed consent.
Recruitment	Patient samples were obtained from suspected arbovirus infections, who presented arthralgia, fever, exanthema and other related symptoms in an endemic area of several arboviruses in Latin America.
Ethics oversight	This study was approved by the Fiocruz-PE Institutional Review Board (IRB) under protocol 80247417.4.0000.5190 and REB approval number at the University of Toronto (Protocol# 39531), and was conducted in accordance with relevant regulations and guidelines, including the ethical principles for medical research involving human subjects designed by World Medical Association Declaration of Helsinki.

Note that full information on the approval of the study protocol must also be provided in the manuscript.

# Design to Implementation Study for Development and Patient Validation of Paper-Based Toehold Switch-Based Diagnostics

Katariina Jaenes<sup>\*1</sup>, Severino Jefferson Ribeiro da Silva<sup>\*1,2</sup>, Justin R. J. Vigar<sup>\*1</sup>, Kaiyue Wu<sup>3,4</sup>, Masoud Norouzi<sup>1</sup>, Pouriya Bayat<sup>1</sup>, Margot Karlikow<sup>1</sup>, Seray Cicek<sup>1</sup>, Yuxiu Guo<sup>1</sup>, Alexander A. Green<sup>3,4</sup>, Lindomar Pena<sup>2</sup>, Keith Pardee<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto <sup>2</sup>Laboratory of Virology and Experimental Therapy (LAVITE), Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) <sup>3</sup>Department of Biomedical Engineering, Boston University <sup>4</sup>Molecular Biology, Cell Biology & Biochemistry Program, Graduate School of Arts and Sciences, Boston University <sup>5</sup>Department of Mechanical and Industrial Engineering, University of Toronto

\*These authors contributed equally

## Corresponding Author

Keith Pardee  
keith.pardee@utoronto.ca

## Citation

Jaenes, K., Ribeiro da Silva, S.J., Vigar, J.R.J., Wu, K., Norouzi, M., Bayat, P., Karlikow, M., Cicek, S., Guo, Y., Green, A.A., Pena, L., Pardee, K. Design to Implementation Study for Development and Patient Validation of Paper-Based Toehold Switch-Based Diagnostics. *J. Vis. Exp.* (2022), e63223, doi:10.3791/63223 (2022).

## Date Published

April 19, 2022

## DOI

10.3791/63223

## URL

jove.com/t/63223

## Abstract

Access to low-burden molecular diagnostics that can be deployed into the community for decentralized testing is increasingly important and has meaningful wider implications for the well-being of societies and economic stability. Recent years have seen several new isothermal diagnostic modalities emerge to meet the need for rapid, low-cost molecular diagnostics. We have contributed to this effort through the development and patient validation of toehold switch-based diagnostics, including diagnostics for the mosquito-borne Zika and chikungunya viruses, which provided performance comparable to gold-standard reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) based assays. These diagnostics are inexpensive to develop and manufacture, and they have the potential to provide diagnostic capacity to low-resource environments. Here the protocol provides all the steps necessary for the development of a switch-based assay for Zika virus detection. The article takes readers through the stepwise diagnostic development process. First, genomic sequences of Zika virus serve as inputs for the computational design of candidate switches using open-source software. Next, the assembly of the sensors for empirical screening with synthetic RNA sequences and optimization of diagnostic sensitivity is shown. Once complete, validation is performed with patient samples in parallel with RT-qPCR, and a purpose-built optical reader, PLUM. This work provides a technical roadmap to researchers for the development of low-cost toehold switch-based sensors for applications in human health, agriculture, and environmental monitoring.



## Introduction

RT-qPCR has remained the gold standard technology for clinical diagnostics due to its excellent sensitivity and specificity. Although highly robust, the method depends on expensive, specialized equipment and reagents that require temperature-controlled distribution and storage. This presents significant barriers to the accessibility of quality diagnostics globally, particularly in times of disease outbreaks and in regions where access to well-equipped labs is limited<sup>1,2</sup>. This was observed during the 2015/2016 Zika virus outbreak in Brazil. With only five centralized laboratories available to provide RT-qPCR testing, significant bottlenecks resulted, limiting access to diagnostics. This was especially challenging for individuals in peri-urban settings, who were more severely impacted by the outbreak<sup>3,4</sup>. In an effort to improve access to diagnostics, the protocol shows a platform that has been developed with the potential to provide decentralized, low-cost, and high-capacity diagnostics in low-resource settings. As a part of this, a diagnostic discovery pipeline was established, coupling isothermal amplification and synthetic RNA switch-based sensors with paper-based cell-free expression systems<sup>5,6</sup>.

Cell-free protein synthesis (CFPS) systems, in particular *E. coli* based cell-free systems, are an attractive platform for a wide range of biosensing applications from environmental monitoring<sup>7,8</sup> to pathogen diagnostics<sup>5,6,9,10,11,12</sup>. Comprising the components necessary for transcription and translation, CFPS systems have significant advantages over whole-cell biosensors. Specifically, sensing is not limited by a cell wall and, in general, they are modular in design, biosafe, inexpensive, and can be freeze-dried for portable use. The ability to freeze-dry gene circuit-based reactions onto substrates such as paper or textiles, enables transport, long-

term storage at room temperature<sup>5</sup>, and even incorporation into wearable technology<sup>13</sup>.

Previous work has demonstrated that *E. coli* cell-free systems can be used to detect numerous analytes, for example, toxic metals such as mercury, antibiotics such as tetracycline<sup>7,14</sup>, endocrine-disrupting chemicals<sup>15,16</sup>, biomarkers such as hippuric acid<sup>17</sup>, pathogen-associated quorum sensing molecules<sup>9,18</sup> and illicit substances such as cocaine<sup>17</sup>, and gamma hydroxybutyrate (GHB)<sup>19</sup>. For the sequence-specific detection of nucleic acids, strategies have for the most part relied on the use of switch-based biosensors coupled to isothermal amplification techniques. Toehold switches are synthetic riboregulators (also referred to as simply 'switches' in the rest of the text) that contain a hairpin structure that blocks downstream translation by sequestering the ribosomal binding site (RBS) and the start codon. Upon interaction with their target trigger RNA, the hairpin structure is relieved and subsequent translation of a reporter open reading frame is enabled<sup>20</sup>.

Isothermal amplification can also be used as molecular diagnostics<sup>21</sup>; however, these methods are prone to nonspecific amplification, which can reduce the specificity and thereby the accuracy of the test to below that of RT-qPCR<sup>22</sup>. In the work reported here, isothermal amplification upstream of the switch-based sensors was used to provide combined signal amplification that enables clinically relevant detection of nucleic acids (femtomolar to attomolar). This pairing of the two methods also provides two sequence-specific checkpoints that, in combination, provide a high level of specificity. Using this approach, previous work has demonstrated the detection of viruses such as Zika<sup>6</sup>, Ebola<sup>5</sup>,

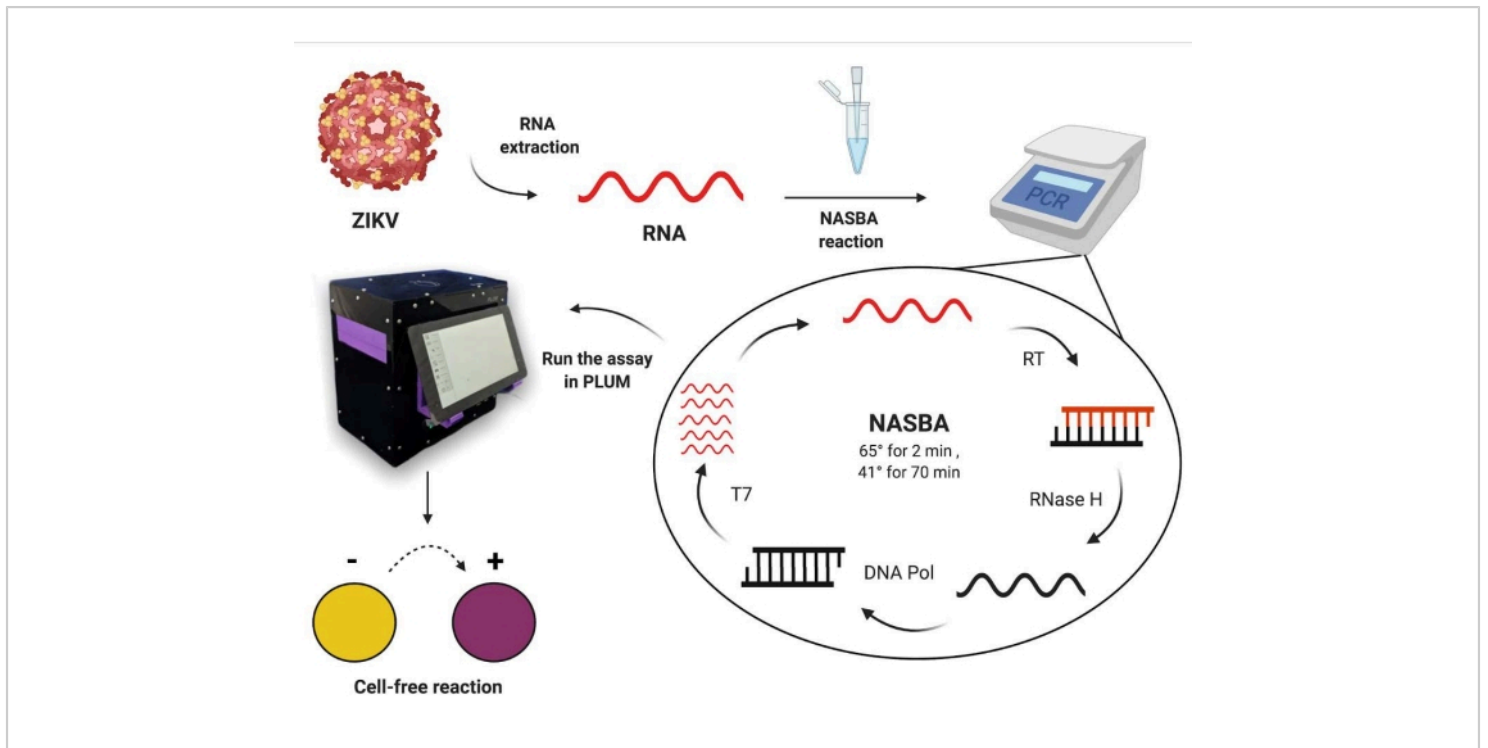
Norovirus<sup>10</sup>, as well as pathogenic bacteria such as *C. difficile*<sup>23</sup> and antibiotic resistant Typhoid<sup>12</sup>. Most recently, cell-free toehold switches have been demonstrated for SARS-CoV-2 detection in efforts to provide accessible diagnostics for the COVID-19 pandemic<sup>11,12,13</sup>.

The following protocol outlines the development and validation of cell-free, paper-based synthetic toehold switch assay for Zika virus detection, from *in silico* biosensor design, through the assembly and optimization steps, to field validation with patient samples. The protocol begins with the *in silico* design of RNA toehold switch-based sensors and isothermal amplification primers specific for the Zika viral RNA. Although numerous isothermal amplification methods exist, here the use of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) to increase the concentration of viral RNA target present in the reaction, enabling clinically significant sensitivity was demonstrated. Practically, isothermal amplification methods have the advantage of operating at a constant temperature, eliminating the need for specialized equipment, such as thermal cyclers, which are generally limited to centralized locations.

Next, the process of assembling the synthetic toehold switch sensors with reporter coding sequences through overlap extension PCR, and screening the synthetic toehold switch sensors for optimal performance in cell-free systems using

synthetic RNA is described. For this set of Zika virus sensors, we have selected the *lacZ* gene encoding the  $\beta$ -galactosidase enzyme, which is able to cleave a colorimetric substrate, chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG), to produce a yellow to purple color change that can be detected by eye or with a plate reader. Once top-performing synthetic switches are identified, the process for screening primers for nucleic acid sequence-based isothermal amplification of the corresponding target sequence using synthetic RNA to find sets that provide the best sensitivity is described.

Finally, the performance of the diagnostic platform is validated on-site in Latin America (**Figure 1**). To determine the clinical diagnostic accuracy, the paper-based cell-free assay is performed using Zika virus samples from patients; in parallel a gold standard RT-qPCR assay is performed for comparison. To monitor colorimetric cell-free assays, we enable on-site quantification of results in regions where thermal cyclers are not available. The hand-assembled plate reader called Portable, Low-Cost, User-friendly, Multimodal (PLUM; hereafter referred to as portable plate reader) is also introduced here<sup>24</sup>. Initially developed as a companion device for cell-free synthetic toehold switch diagnostics, the portable plate reader offers an accessible way to incubate and read results in a high-throughput manner, providing integrated, computer vision-based software analysis for users.



**Figure 1: Workflow for testing patient samples using paper-based cell-free toehold switch reactions.** The figure was created using BioRender.com. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

## Protocol

All the procedures involving human participants are to be conducted in accordance with ethical standards and relevant guidelines, including the ethical principles for medical research involving human subjects established by the World Medical Association Declaration of Helsinki. This study was approved by the human research ethics committee under license protocol number CAEE: 80247417.4.0000.5190. Informed consent of all patients included in this study was waived by the Fiocruz-PE Institutional Review Board (IRB) for diagnostic samples.

**NOTE:** The PLUM device will be hereafter referred to as a 'portable plate reader'.

### 1. Computational design of nucleic acid sequence-based amplification primers

1. Scan the Zika genome to identify a set of candidate regions for amplification that are approximately 200 nucleotides (nt) to 300 nt in length by putting the genomic sequence into NCBI/Nucleotide BLAST<sup>25,26</sup>. Compare the genome against reference RNA sequences (refseq\_rna) and search for sites that remain highly conserved and do not have homology with the human genome (other BLAST parameters remain unchanged). Select at least two sites to design the synthetic toehold switch.
2. Use the selection criteria of Deiman et al.<sup>27</sup> to generate pairs of forward and reverse nucleic

acid sequence-based amplification primers for each candidate amplification region. In brief, follow these criterias for designing primers: (1) GC content between 40%-60%; (2) 20 to 24 nt in length with DNA melting temperature above 41 °C; (3) no runs of four or more identical nucleotides; (4) the final 3' nucleotide is an A base; (5) low primer secondary structure and dimer formation probability. Screen 8-10 primer pairs for each target region (recommended).

3. Append the prefix sequence containing the T7 promoter sequence

AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGG (T7 promoter sequence underlined) to the 5' end of the forward primers to allow for transcription of the amplicons using T7 RNA polymerase (RNAP). Order the primers as DNA oligos from a DNA synthesis company.

## 2. Computational design of toehold switches

1. Install NUPACK<sup>28</sup> version 3.2 (nucleic acid design suite) based on the instructions on the website<sup>29</sup>. Use a UNIX operating system and MATLAB (numeric computing platform) as the programming language (recommended).
2. Identify the target sequences (e.g., viral genome) specific to the pathogen of interest for the toehold switch designs as in step 1.1. Choose the Zika target sequences from the nucleic acid sequence-based amplicons generated in step 1.2.

**NOTE:** In practice, either the nucleic acid sequence-based amplification primers or the synthetic toehold switches can be designed and tested first, depending on the needs of the users. If particular target regions of interest have already been established (e.g., from existing publications or diagnostic protocols), toehold

switch design and screening may occur first, followed by design and screening for nucleic acid sequence-based amplification primers. If there are no established target regions, first screen nucleic acid sequence-based amplification primers against the full genome to narrow down the targets of choice while selecting for primer amplification efficiency. If multiple sequences for the pathogen are available, it is best to design nucleic acid sequence-based amplification primers that focus on highly conserved regions (rather than screening the entire genome).

3. Download and install the required MATLAB software on the computer.
4. Set up the environment variables to allow the nucleic acid design suite functions to be called in the software. To do this, open the software, and then open (or create) a startup.m file in the default work folder. Next, copy the following lines of code into the startup.m file and finally, add the folder containing the nucleic acid design suite binaries to the PATH:
 

```
NUPACKINSTALL = '/Users/[user_name]/.../nupack3.2.2';
setenv('NUPACKINSTALL',NUPACKINSTALL);
setenv('PATH',[getenv('PATH'),sprintf(':%s/build/bin',NUPACKINSTALL)]);
```
5. Open the numeric computing platform software and navigate to the design software folder. Run the design algorithms accessible at <https://github.com/AlexGreenLab/TSGEN>.
6. Input the target sequences into the design\_input\_file.csv located in the input subfolder. The inputs include Name, Outer sequence, Inner sequence, Temperature, Output name, and Output sequence as defined in **Table 1**. If no

priming sites are determined yet for the target, keep inner and outer sequences the same. Only the first 29 nt of the reporter will be considered during the design process. When finished, save and close the updated spreadsheet.

**NOTE:** The output sequence is the sequence of the reporter protein planned to be used for the assay (e.g., *lacZ*). Specifying the inner and outer sequences ensures that the algorithm will not generate synthetic toehold switches that overlap with either of the primers. It also ensures that the assay recognizes three unique sites in the Zika genome to improve its specificity.

7. Select the parameters to use for the design function: `toehold_switch_design_run(num_designs,input_file,options)`. Fill the parameter values as:

1. `num_designs` - the number of top designs for each target output by the software. The default is 6 and can be changed as needed (a minimum of six designs for each target is recommended).
2. `input_file` - this parameter specifies the name of the file that provides the input sequence information. The default value is 'design\_input\_file.csv' and can be changed as needed.
3. Choose from the following options - (1) SeriesA and SeriesB: the version(s) of toehold switch that the code will generate. Set SeriesB to 1 and SeriesA to 0 to generate series B toehold switch, which is the format used in the Zika virus diagnostic<sup>6</sup>; (2) Parallel: set to 1 to harness multiple cores to compute the designs; otherwise, set to 0; (3) Antisense: set to 1 to generate toehold switches that hybridize the antisense sequence (i.e., the reverse complement) of the target input; otherwise, set to 0.

8. Run the design function using the selected parameters: `toehold_switch_design_run(num_designs,input_file,options)`. The algorithm will then start to generate the toehold switch designs for the targets of interest.
9. Upon design completion, locate the top toehold switch design sequences and the corresponding target sequences in the `final_designs` folder in the form of .csv format spreadsheets. The toehold switch DNA sequences generated by the algorithm will contain the T7 promoter sequence at the 5' end and the conserved 21 nt linker sequence AACCTGGCGGCAGCGCAAAG at the 3' end.
10. Screen the resulting top toehold switch design sequences against other common viruses by putting them on NCBI-BLAST and checking for sequence homology. Accept sequences with 40% homology or less.
11. Order the toehold switch hairpin sequences as DNA oligos and later assemble them with the reporter gene into fully functional switches. Order the necessary PCR primers for subsequent sensor assembly depending on the reporter protein of choice.

Parameter	Definition
Name	The desired names of the output toehold switch sequences.
Outer sequence	Full NASBA transcript produced from amplification.
Inner sequence	The outer sequence excluding the primer binding sites. It matches the outer sequence but excludes the portions of the transcripts that bind to the forward and reverse primers.
Temperature	The temperature used by the algorithms to compute the RNA structures.
Output name	The name of the output gene (e.g. <i>lacZ</i> , <i>gfp</i> ).
Output sequence	The sequence of the output gene.

**Table 1: The definition of each parameter used in the toehold switchdesign software.**

### 3. Construction of toehold switches by PCR

**NOTE:** These steps describe the construction of LacZ toehold switches by overlap extension PCR. Here, the DNA oligo is used as a forward primer and the T7 terminator is used as a reverse primer. We use the pCOLADuet-LacZ plasmid as a template for the *lacZ* gene (addgene: 75006). Any other DNA templates that contain the corresponding sequence can be used as templates, provided that the T7 terminator is included in the final construct.

1. Once synthetic DNA oligos have been received from the commercial provider, prepare solutions of the synthetic DNA and reverse amplification primer at a concentration of 10  $\mu$ M in nuclease-free water. Assemble reactions in PCR tubes on ice according to **Table 2**.

**NOTE:** PCR volumes can be scaled as needed. Use a minimal amount (0.1-1 ng) of pCOLADuet-LacZ DNA template to avoid the need for an additional plasmid

removal step or background LacZ signal. For higher DNA template amounts, follow the PCR with a DpnI restriction enzyme digest to remove the residual plasmid template.

2. Place the reactions in a thermal cycler, following the cycling conditions listed in **Table 3**. Analyze the PCR products on an agarose gel (**Figure 2**; see **Supplementary Protocol** and<sup>30</sup>).
3. Purify the PCR products using a spin column-based PCR purification kit and elute the DNA in 15-30  $\mu$ L of nuclease-free water, according to the manufacturer's instructions. Quantify the DNA using a spectrophotometer.

Component	Volume	Concentration
5X Q5 Reaction Buffer	10 $\mu$ L	1x
10 mM dNTPs	1 $\mu$ L	200 $\mu$ M
10 mM Forward Primer (Synthetic Switch DNA FW)	2.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
10 mM Reverse Primer (T7 terminator RV)	2.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
Template DNA (pCOLADuet-LacZ)	variable	<1 ng
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0.5 $\mu$ L	0.02 U/ $\mu$ L
Nuclease-free water	to 50 $\mu$ L	-

**Table 2: The PCR components used to construct toehold switches.**

Step	Temperature	Time
Initial Denaturation	98 °C	30 s
35 Cycles	Denaturation	98 °C
	Annealing	60 °C
	Extension	72 °C
Final extension	72 °C	5 min
Hold	4 °C	-

**Table 3: Cycling conditions used during construction of toehold switches by PCR.**

#### 4. Preparation of synthetic RNA target (Trigger)

- Using a molecular biology design software, modify the synthetic trigger RNA templates (selected in step 1.1) to include an upstream T7 promoter sequence, ensuring that the full template remains short (<200 bp). Design forward and reverse primers to amplify the

trigger sequence primer (for oligo sequences please see **Supplementary Protocol**).

- Order the sequences as DNA oligos. Once received, reconstitute the synthetic trigger DNA and amplification primers to 10  $\mu$ M in nuclease-free water. Assemble the corresponding PCRs in thin-wall tubes on ice according to **Table 2** and use 0.5  $\mu$ L of the trigger DNA ultramer (final concentration of 0.1  $\mu$ M) as the template DNA.



- Place the reactions in a thermal cycler and use the cycling conditions listed in **Table 3**. Use an extension time of 15 s. Assess the quality and purify trigger PCR products as described in step 3.3 and **Supplementary Protocol**.

**NOTE:** To expedite the process, column-purified trigger PCR products can also be directly used for initial toehold switch screening.

### 5. *In vitro* transcription of selected trigger sequences

- Assemble reaction components on ice according to **Table 4**.
- Incubate *in vitro* transcription (IVT) reactions at 37 °C for 4 h, followed by DNaseI treatment to remove the template

DNA. For the DNase I step, add 70 µL of nuclease-free water, 10 µL of 10x DNase I Buffer, and 2 µL of DNase I (RNase-free), and incubate at 37 °C for 15 min. If not proceeding to step 5.4 immediately, inactivate DNase I with the addition of 50 mM EDTA and heat inactivation at 65 °C for 10 min.

- Optional Step: Perform denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (e.g., urea-PAGE) analysis on the IVT products to assess RNA quality as described in the **Supplementary Protocol**.
- Purify the trigger IVT products using a column-based RNA cleanup kit according to the manufacturer's instructions, and then quantify the RNA concentration and purity using spectrophotometry. See **Supplementary Protocol** for instructions on how to determine the molarity and copy number/µL of the RNA.

Component	Volume	Concentration
10X Reaction Buffer	1.5 µL	0.75x
25 mM NTP mix	6 µL	7.5 mM
Template trigger DNA	X µL	1 µg
T7 RNA Polymerase Mix	1.5 µL	-
Nuclease-free water	X µL	To 20 µL

**Table 4:** *In vitro* transcription (IVT) of selected trigger sequences.

### 6. Initial screening of the switches

**NOTE:** This section describes the steps associated with setting up cell-free, paper-based toehold switch reactions, and how to screen for high-performing toehold switches. The

BSA blocked filter paper used in step 6.10 should be prepared in advance as described in the **Supplementary Protocol**.

- Prepare a CPRG stock solution by dissolving 25 mg of the powder in 1 mL of nuclease-free water. Keep the solution on ice at all times and store at -20 °C for long-term use.



2. Determine the number of reactions to set up. For each toehold switch assessed, include a no template control (no switch and no target RNA—otherwise known as cell-free alone control) to account for any background signal that may arise from the master mix. Include a switch only control to assess for the background switch leakiness or OFF rate in the absence of target RNA.
3. Assemble a cell-free reaction master mix of solution A, solution B, RNase Inhibitor, and CPRG on ice according to the standard protocol listed in **Table 5**.  
**NOTE:** The steps described here are for a master mix that will be sufficient for a triplicate set of 1.8  $\mu\text{L}$  reactions with added 10% volume to account for pipetting error. The master mix volume should be adjusted as needed depending on the number of toehold switches screened.
4. For each triplicate cell-free reaction, dispense the master mix into a PCR tube, keeping all the tubes on ice. For the tube set aside as the cell-free alone control, add nuclease-free water to a final volume of 5.84  $\mu\text{L}$ , mix by pipetting up and down, and centrifuge briefly. For the remainder of the tubes, add PCR purified toehold switch DNA to a final concentration of 33 nM.
5. For tubes set aside as switch alone controls, add nuclease-free water to a final volume of 5.84  $\mu\text{L}$ . For tubes set aside to test the toehold switch and target RNA combination, add *in vitro* transcribed target RNA to a final concentration of 1  $\mu\text{M}$ . Then, add nuclease-free water to a final volume of 5.84  $\mu\text{L}$ . Mix all reactions thoroughly by pipetting up and down, and centrifuge briefly.
6. Add 30  $\mu\text{L}$  of nuclease-free water to the wells surrounding the reaction wells on a 384-well black, clear bottomed plate. This minimizes evaporation over the course of the experiment and improves reproducibility.

**NOTE:** If using the portable plate reader device, place a PCR foil over the plate, and use a precision knife to cut out the wells intended for your reaction, as well as each of the four corner wells. The PCR foil prevents the portable plate reader camera overexposure from empty wells.

7. Using a 2 mm biopsy punch and tweezers, cut BSA-blocked filter paper disks and place them in the reaction wells either by ejecting the punch or using tweezers (see **Supplementary Protocol** for preparing BSA-blocked filter paper). Dispense triplicate 1.8  $\mu\text{L}$  volumes from each reaction tube onto the filter paper discs in the 384-well plate, keeping all the samples, as well as the 384-well plate, on ice at all times.

**NOTE:** If using the portable plate reader device, add 1.8  $\mu\text{L}$  of CPRG (0.6 mg/mL) to each of the four corners of the 384-well plate. The yellow color from the CPRG provides pattern recognition to the portable plate reader for alignment of the digital multiwell plate template in image analysis. Cover the wells of the plate with PCR film to prevent evaporation.

8. Place the plate in a plate reader, read OD<sub>570</sub> at 37 °C every min for 130 min.

Component	Volume	Final Concentration Per Reaction
Solution A	3.2 $\mu\text{L}$	40%
Solution B	2.4 $\mu\text{L}$	30%
RNase Inhibitor	0.04 $\mu\text{L}$	0.5% v/v
CPRG (25 mg/mL)	0.2 $\mu\text{L}$	0.6 mg/mL
Toehold Switch	X $\mu\text{L}$	33 nM
Target RNA	X $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{M}$
Nuclease-free water	to 5.84 $\mu\text{L}$	-
Total volume:		5.84 $\mu\text{L}$

**Table 5: PURExpress cell-free transcription-translation reaction components.**

## 7. Identifying high-performing toehold switches

**NOTE:** This section describes how to analyze data from step 6 in order to select the best performing toehold switches to move forward with.

1. Begin data analysis by first normalizing to the background OD<sub>570</sub> absorbance. To do this, subtract the OD<sub>570</sub> measurements of reactions that do not have any switch or target RNA (i.e., cell-free alone wells) from the other OD<sub>570</sub> measurements.
2. Smooth the normalized data using a three-point moving average and adjust the minimum value of each well to zero. See **Figure 3** for an example of normalized time-course data collected for the toehold switches 27B, 33B, and 47B.
3. Using this processed data, calculate the fold change (or ON/OFF ratio) by determining the difference in the rate of color change (i.e., change in OD<sub>570</sub> over time) between

the toehold switch and target and switch alone wells (see **Supplementary Protocol** for calculating the ratio; **Figure 4**).

4. Select switches with the highest ON/OFF fold change for further characterization. Omit the poorly performing toehold switches that display the lowest fold change.

## 8. Nucleic acid sequence-based amplification primer screening and sensitivity

**NOTE:** In the following steps, first a screen for functional isothermal amplification primers is done, and then their sensitivity is assessed by determining the number of target RNA copies per  $\mu\text{L}$  of synthetic RNA that a given toehold switch can reliably detect when coupled with isothermal amplification. Following isothermal amplification, perform cell-free reactions to identify successful nucleic acid sequence-based amplification primer sets. However, it may be more cost-effective to run polyacrylamide or agarose gels on nucleic acid sequence-based amplification reactions to first narrow the pool of candidate primer sets. In that case, nucleic

acid sequence-based amplification primer sets that generate a band on the gel at the appropriate amplicon size can be shortlisted for subsequent cell-free screening.

1. Make a 25  $\mu\text{M}$  stock solution of all forward and reverse primer sets in nuclease-free water (see **Supplementary Protocol**). Determine the number of nucleic acid sequence-based amplification reactions and subsequent cell-free reactions that need to be set up. This will depend on the number of toehold switches and respective primer sets.

**NOTE:** When screening the primers, it is important to always include a no template control for each primer set to account for any background artifacts that may arise due to primer-associated nonspecific amplification.

2. Set up one 5  $\mu\text{L}$  reaction as follows (scale this as needed). Thaw all the reagents on ice. Assemble a reaction master mix of the reaction buffer, nucleotide mix, and RNase inhibitor according to **Table 6**. Mix thoroughly by pipetting up and down until the white precipitate is solubilized, and then dispense aliquots into PCR tubes.

1. If the master mix is for screening nucleic acid sequence-based amplification primers, exclude the primers from the master mix at first (dispense 2.55  $\mu\text{L}$  of master mix). Otherwise, if performing primer sensitivity analysis, the primers can be included in the master mix (in which case dispense 2.75  $\mu\text{L}$  aliquots). Add the enzyme mix after the denaturation and equilibration stages.

3. If screening nucleic acid sequence-based amplification primers, add the forward and reverse primers to the appropriate tubes. On a thermal cycler, set up the incubation protocol as described in **Table 7**.

4. Add 1  $\mu\text{L}$  of either nuclease-free water or 1  $\mu\text{L}$  of target trigger RNA at 2 pM or approximately  $10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ , making sure to label the tubes accordingly. Mix by gentle pipetting and briefly spin down the tubes.

**NOTE:** For primer set screening, use a concentration of target trigger RNA that is high enough not to impinge on the lower limit of detection of the isothermal amplification method, yet not high enough to provide activation of the toehold switch if no amplification were to occur.

5. Move the tubes to the thermal cycler and start the incubation. After 12 min, remove the tubes and add 1.25  $\mu\text{L}$  of the enzyme mix to each tube. Mix by pipetting up and down and briefly centrifuge the tubes.

**NOTE:** At this point, the tubes may be kept at room temperature; however, the enzyme mix should be kept on ice until added to the tubes.

6. Return the tubes to the thermal cycler, skipping the 41  $^{\circ}\text{C}$  hold step to start the 1 h reaction incubation.

**NOTE:** Following incubation, the reactions can be placed on ice for same-day processing or frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for later processing.

7. Follow steps 6.2-6.7 and **Table 8** to assemble paper-based cell-free toehold switch reactions to assess primer performance. Analyze data as described in steps 7.1-7.2 and **Figure 3**.

**NOTE:** In addition to the controls previously mentioned, it is important to also include the negative control to account for any background signal that might arise from the reaction. Additionally, it is important to also include a control with the switch and 2 pM (final concentration) of target RNA, as a no-NASBA amplification control.

8. Identify candidate primer pairs to move forward with sensitivity analysis. Primer pairs are selected based on

whether toehold switch activation occurs following the addition of the incubated reaction. If needed, repeat the primer screen with more primer combinations.

9. Keeping RNA samples on ice at all times, make the following serial dilution set of target RNAs in nuclease-free water:  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ , and  $10^0$  RNA copies/ $\mu\text{L}$ . Repeat nucleic acid sequence-based amplification and cell-free reactions with the selected primer sets (steps 8.2-8.7), testing the serial dilution series in order to identify the primer sets that provide the best sensitivity. See **Figure 5** for an example of results for determining the primer set sensitivity.

**NOTE:** Ideally, the selected toehold switch and the primer pair should detect as few as 1-100 target RNA copies per  $\mu\text{L}$  of the RNA (stock solution concentration).

10. Repeat the nucleic acid sequence-based amplification sensitivity experiment in biological triplicate. This step serves to confirm the reproducibility of the results before moving to experiments with patient samples.
11. *Optional:* To have a reliable source of the switch DNA for long-term use and for transport, clone the selected switch sequence(s) into a plasmid using any conventional cloning method. Similarly, the target trigger RNA sequence may also be cloned into a plasmid of choice for storage.

Component	Volume per reaction	Final Concentration
NASBA Reaction Buffer	1.67 $\mu\text{L}$	1x
NASBA Nucleotide Mix	0.833 $\mu\text{L}$	1x
25 $\mu\text{M}$ Forward Primer	0.1 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$
25 $\mu\text{M}$ Reverse Primer	0.1 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{L}$ )	0.05 $\mu\text{L}$	0.4 U/ $\mu\text{L}$
Target RNA	1 $\mu\text{L}$	
NASBA Enzyme Mix	1.25 $\mu\text{L}$	1x
Total volume	5 $\mu\text{L}$	

**Table 6: Nucleic acid sequence-based amplification reaction components.**

Step	Temperature	Time
Denaturation	65 °C	2 min
Equilibration	41 °C	10 min
Hold	41 °C	∞
Incubation	41 °C	1 h
Hold	4 °C	-

**Table 7: Reaction conditions for the nucleic acid sequence-based amplification.**

Component	Volume	Final Concentration Per Reaction
Solution A	3.2 µL	40%
Solution B	2.4 µL	30%
RNase Inhibitor	0.04 µL	0.5% v/v
CPRG (25 mg/mL)	0.2 µL	0.6 mg/mL
Toehold Switch	X µL	33 nM
Target RNA (if applicable)	X µL	1 µM
NASBA (if applicable)	0.85 µL	1:7
Nuclease-free water	to 5.84 µL	-
Total volume:		5.84 µL

**Table 8: Paper-based cell-free reaction components.**

## 9. Patient samples collection and viral RNA extraction

**NOTE:** This section describes the protocol to collect patient samples and to extract the RNA using an RNA purification kit. The protocol below is used to obtain serum from peripheral blood. The samples used in this study were collected from patients presenting fever, exanthema, arthralgia, or other

related symptoms of arbovirus infection in Pernambuco state, Brazil.

1. Collect peripheral blood samples from suspected arbovirus-infected patients. Perform venipuncture (whole blood tube) using a standard aseptic technique. Label the sample tubes with an anonymous code and the date of sample collection.

2. Centrifuge blood to separate the serum at 2,300 x *g* for 10 min. Using a pipette, prepare aliquots of serum (200  $\mu$ L) that will be used for RNA extraction in 1.5 mL tubes.  
**NOTE:** If it is not possible to perform the RNA extraction shortly after sample collection, serum samples should be stored at -80 °C prior to downstream applications.
3. Pipette 560  $\mu$ L of prepared Buffer AVL (viral lysis buffer) containing the carrier RNA into a 1.5 mL tube. Add 140  $\mu$ L of serum to the Buffer AVL/carrier RNA mixture in the tube. Mix by pulse-vortexing for 15 s.
4. Incubate for 10 min at room temperature, and then briefly centrifuge the sample to collect the contents at the bottom of the tube. Add 560  $\mu$ L of ethanol (96%-100 %) to the sample and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, centrifuge the sample to collect the contents at the bottom of the tube.
5. Carefully add 630  $\mu$ L of the solution from step 9.4 to the spin-column without wetting the rim. Following this step, close the cap, and centrifuge at 6,000 x *g* for 1 min. Place the spin-column into a clean 2 mL collection tube and discard the used collection tube containing the filtrate.
6. Carefully open the spin-column and repeat step 9.5. Carefully open the spin-column and add 500  $\mu$ L of Buffer AW1 (wash buffer 1). Close the cap, and centrifuge at 6,000 x *g* for 1 min. Place the spin-column into a clean 2 mL collection tube and discard the used collection tube containing the filtrate.
7. Carefully open the spin-column and add 500  $\mu$ L of Buffer AW2 (wash buffer 2). Close the cap and centrifuge at 20,000 x *g* for 3 min. Place the spin-column into a clean 2 mL collection tube, and discard the used collection tube containing the filtrate.
8. To avoid contamination by residual buffer AW2, which could cause problems in downstream enzymatic reactions, place the spin-column into a clean 2 mL collection tube and discard the used collection tube with the filtrate. Centrifuge at 20,000 x *g* for 1 min.
9. Place the spin-column in a clean 1.5 mL tube and discard the used collection tube with the filtrate. Carefully open the spin-column and add 60  $\mu$ L of Buffer AVE (elution buffer) equilibrated to room temperature. Following this step, close the cap, and incubate at room temperature for 1 min.
10. Centrifuge at 6,000 x *g* for 1 min. The eluted RNA can then be used as an input for the nucleic acid sequence-based amplification and RT-qPCRs in parallel.
11. Follow steps 8.3 to 8.11 to perform the nucleic acid sequence-based amplification and paper-based cell-free reactions using 1  $\mu$ L of extracted patient RNA, ensuring to include negative and positive control reactions. Following the reactions, prepare the 384-well reaction plate and run the assay in the portable plate reader device at 37 °C (see details in the **Supplementary Protocol**).  
**NOTE:** Two RNA concentrations of  $10^4$  and  $10^2$  PFU/mL, extracted from cultured Zika virus are used as positive controls for all experiments during the clinical validation. In addition to the controls previously mentioned, it is important to also include the trigger (10 ng/ $\mu$ L) as a positive control.
12. At the end of every experiment, the raw data (.csv file) from the portable plate reader can be uploaded to a secure database online. Additionally, the portable plate reader generates a report indicating whether samples are positive or negative for Zika virus (**Figure 6**); see

the representative results section for examples of all the graphs obtained during the incubation (**Figure 7**).

**NOTE:** Users can also transfer files from the portable plate reader to their own computer *via* the USB.

## 10. Portable plate reader device

1. The portable plate reader device (**Figure 8**) can be used as an alternative to a conventional plate reader<sup>24</sup>. For the protocol and representative results, see **Supplementary Protocol**.

## 11. RT-qPCR for Zika virus detection

**NOTE:** This section outlines the steps to perform the RT-qPCR for Zika virus detection from patient samples (see **Supplementary Protocol**).

1. To avoid contamination, assemble the RT-qPCR components in an area isolated from the amplification process (e.g., clean-hood). Place the RT-qPCR buffer, enzymes, and primer/probes on ice or a cold-block. Following this, add the reactions to a 96-well plate on ice according to **Table 9**.

**NOTE:** Negative (extraction control and non-template control [NTC]) and positive control ( $10^4$  PFU/mL) are recommended for all experiments.

2. After adding the reagents to a 1.5 mL microcentrifuge tube, mix the reaction by pipetting up and down (do not vortex), and dispense 6.5  $\mu$ L into each well. Add 3.5  $\mu$ L of each RNA template in triplicate.
3. Place a PCR film over the top of the plate. Centrifuge the 96-well plate at 600 x *g* for 2 min.

4. Place the plate in a RT-qPCR machine using the following cycling conditions outlined in **Table 10**. To analyze the results, use the RT-qPCR machine design and analysis software and consider the automatic threshold and baseline (see details in the **Supplementary Protocol**).

Component	Volume	Concentration
2X QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix	5 $\mu$ L	1x
100 $\mu$ M Forward Primer	0.8 $\mu$ L	0.8 $\mu$ M
100 $\mu$ M Reverse Primer	0.8 $\mu$ L	0.8 $\mu$ M
25 $\mu$ M Probe	0.04 $\mu$ L	0.1 $\mu$ M
QuantiNova ROX Reference Dye	0.05 $\mu$ L	1x
QuantiNova Probe RT Mix	0.1 $\mu$ L	1x
Template RNA	3.5 $\mu$ L	-
Nuclease-free water	to 10 $\mu$ L	-

**Table 9: RT-qPCR components to amplify Zika virus RNA based on centers for disease control and prevention-CDC USA to detect Zika virus from patient samples<sup>31</sup>.**

Step	Temperature	Time
Reverse transcription	45 °C	15 min
PCR initial activation step	95 °C	5 min
45 Cycles	Denaturation	95 °C
	Combined annealing/extension	60 °C

**Table 10: Cycling conditions for RT-qPCR.**

## Representative Results

Following the computational design pipeline, the construction of three toehold switches was performed by PCR. The PCR products were analyzed using agarose gel electrophoresis (**Figure 2**). The presence of a clear band around 3,000 bp, roughly the size of the *lacZ* gene coupled to a toehold switch, typically indicates a successful reaction. Alternatively, a lane without a band, multiple bands, or a band of the incorrect

size, indicates a failed PCR. In the case of a failed PCR, the reaction conditions and/or primer sequences should be optimized.

The assembled toehold switches were screened to assess each sensor against its respective *in vitro* transcribed trigger RNA (**Figure 3**). While all three sensors displayed an increased OD<sub>570</sub> absorbance, sensor 27B (**Figure 3A**) had the most rapid on-rate. Switches 33B and, to a lesser extent,



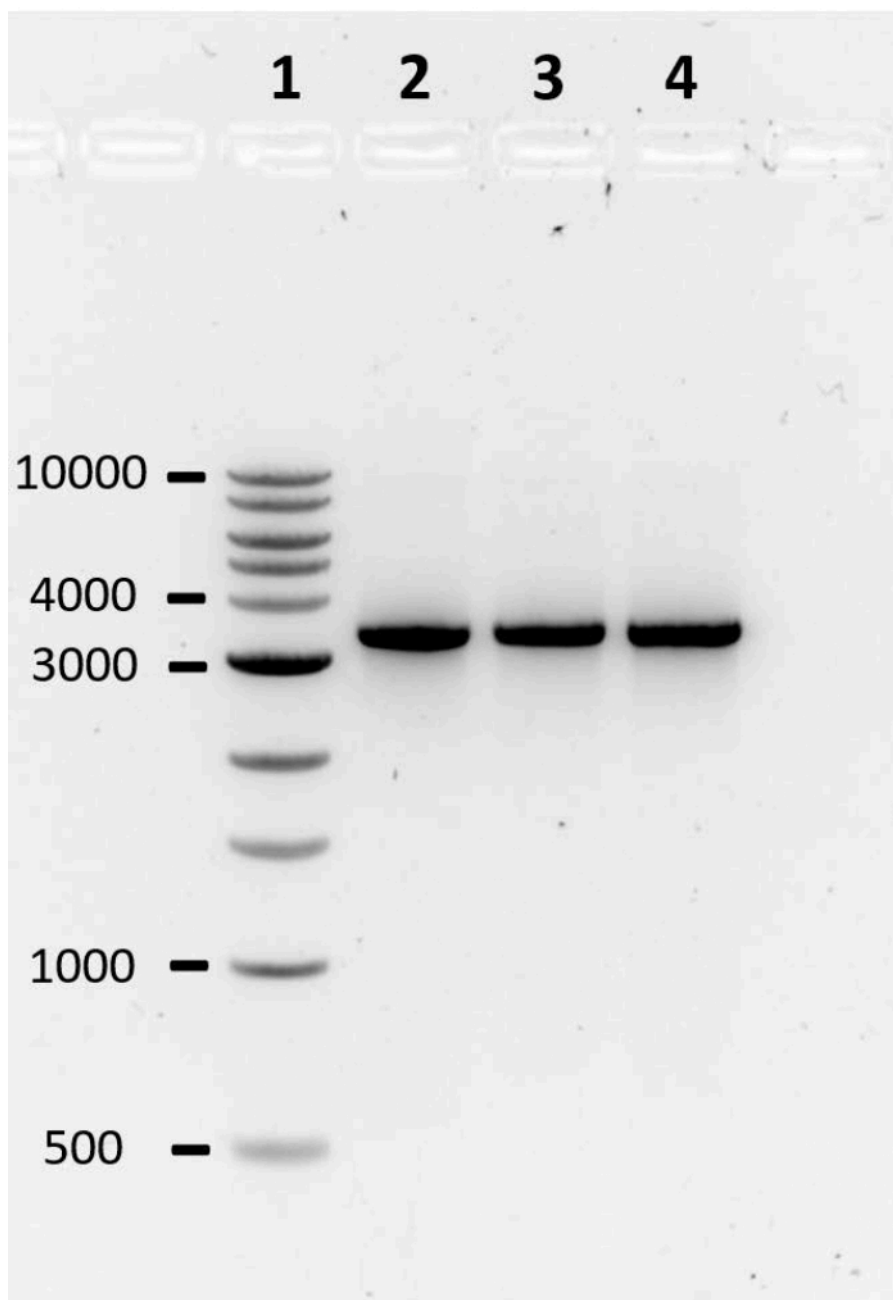
47B showed an increased OD<sub>570</sub> absorbance in the absence of target trigger RNA, indicating that these switches possess some background activity or leakiness (**Figure 3B,C**)—a trait not wanted in a candidate sensor as it can reduce specificity. To more clearly identify the sensor with the highest ON/OFF signal ratio, the fold change of OD<sub>570</sub> absorbance was calculated (see supplemental information section 5) and plotted (**Figure 4**). From this analysis, it is clear that switch 27B is the sensor that has the best performance with an ON/OFF signal ratio of around 60.

The sensitivity of the top-performing toehold switch (27B) was then evaluated by determining the lowest RNA concentration required to activate the toehold switch 27B when coupled with a nucleic acid sequence-based amplification reaction. The graph illustrates that the top-performing Zika sensors can detect RNA at concentrations as low as 1.24 molecules per  $\mu\text{L}$  (equivalent to  $\sim 2$  aM; **Figure 5**).

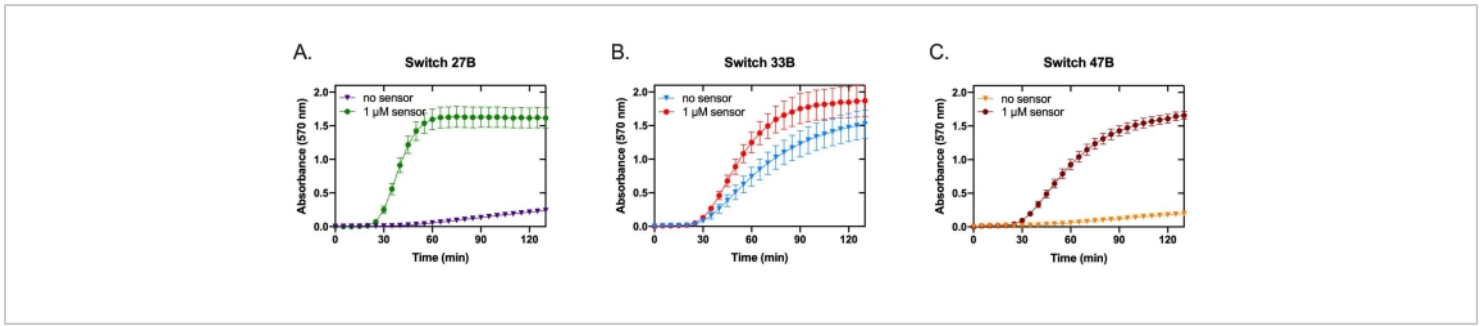
After switch 27B was identified and validated, the sensor materials were distributed to the team members in Recife in the Pernambuco state of Brazil. In Brazil, the clinical diagnostic accuracy of the Zika virus diagnostic platform was assessed using Zika virus patient samples, in parallel with a

gold standard RT-qPCR method for comparison. To validate the paper-based Zika diagnostic platform, the portable plate reader was used, which is capable of incubating and reading the colorimetric output of paper-based sensors. The color change from yellow to purple is used to identify a positive sample, while a negative sample remains yellow (**Figure 6**). An additional option for visualizing the results generated by the portable plate reader (**Figure 8**) is to plot the colorimetric response for each paper-based reaction over time. Samples were tested in triplicate and those that exceeded the threshold (red line set to 1) were considered positive, while samples below the threshold were considered negative (**Figure 6** and **Figure 7**).

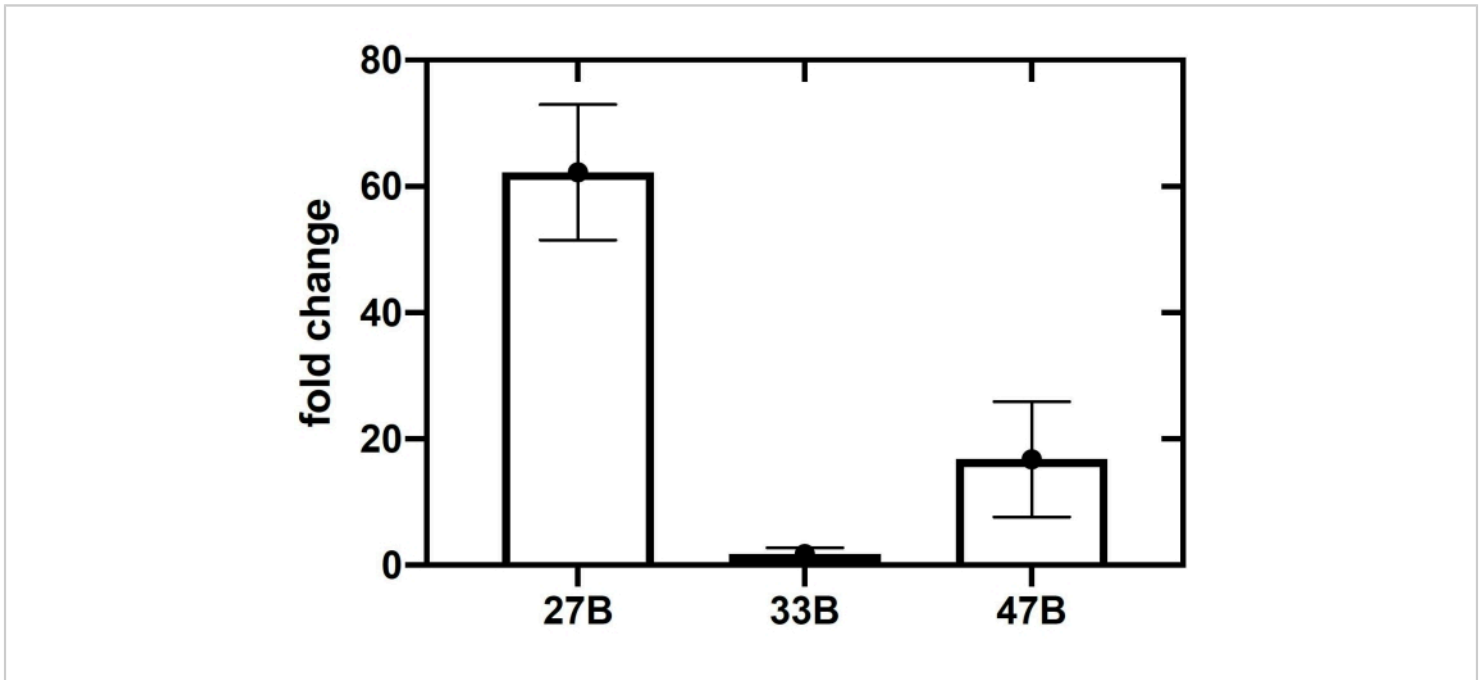
Finally, to evaluate and compare the clinical performance of the Zika toehold switch sensor with the current gold standard method for diagnosing Zika virus infection, all patient samples were tested in parallel with RT-qPCR. The amplification plot of two representative patient samples was tested in triplicate for the detection of Zika virus by RT-qPCR (**Figure 9**). The samples are considered positive when the cycle threshold (Ct) value is  $\leq 38$ ; the red line indicates a positive sample and the blue line indicates a negative sample for Zika virus.



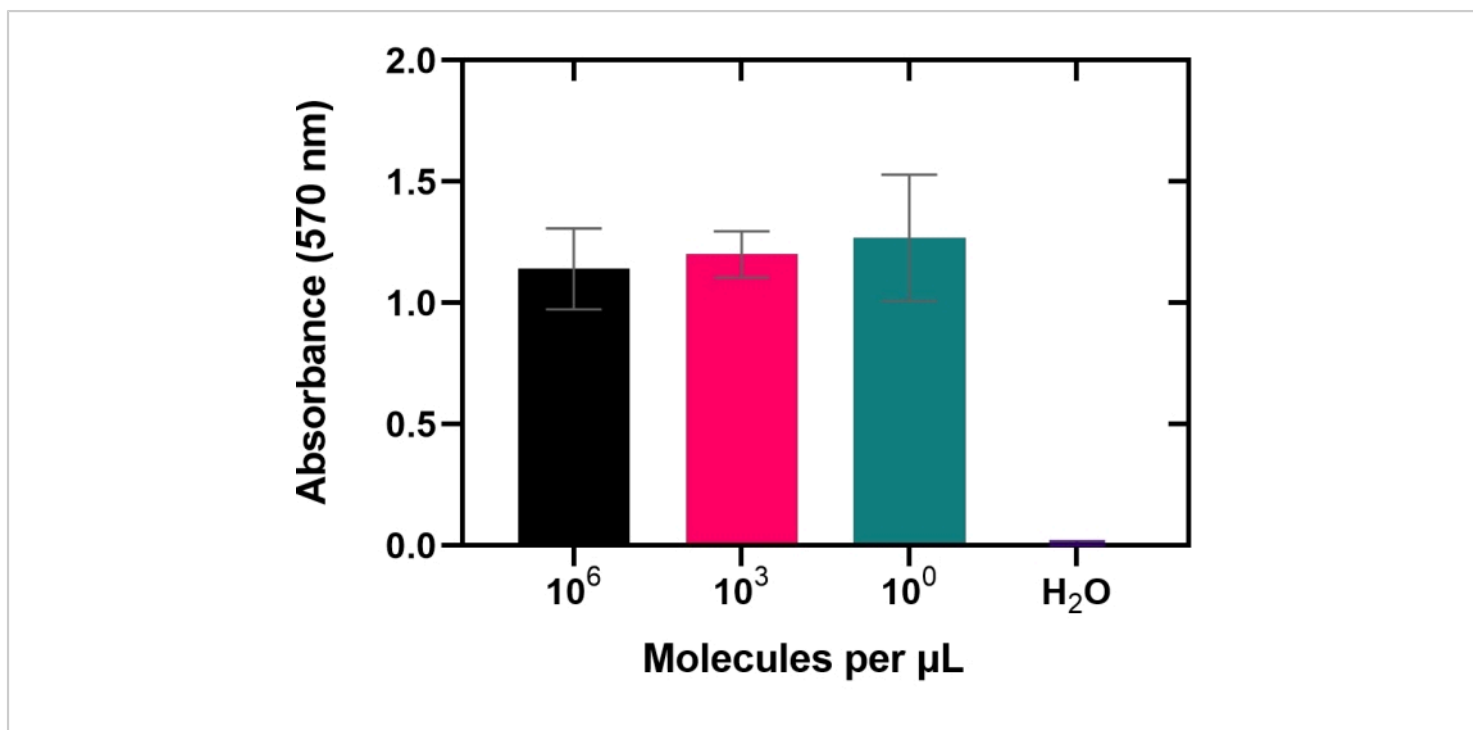
**Figure 2: Agarose gel electrophoresis to assess the quality of PCR products.** PCR products are analyzed on a 1% agarose gel in 1x TAE, run at 80 V for 90 min. A single clear band typically indicates a successful reaction. Lane 1: 1 kb DNA ladder; Lanes 2-4: 27B switch DNA, 33B trigger DNA, and 47B trigger DNA, respectively. The numbers on the left-hand side represent band size in bp. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 3: Prototyping three toehold switches for paper-based Zika sensors.** The performance of three paper-based RNA toehold switch sensors was measured at 37 °C for over 130 min. Each graph contains two traces, one represents the switch only control, while the other represents the switch and trigger. The three graphs represent data acquired using toehold switch sensors 27B (A), 33B (B), and 47B (C). Error bars represent the standard error of the mean (SEM) from three replicates. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

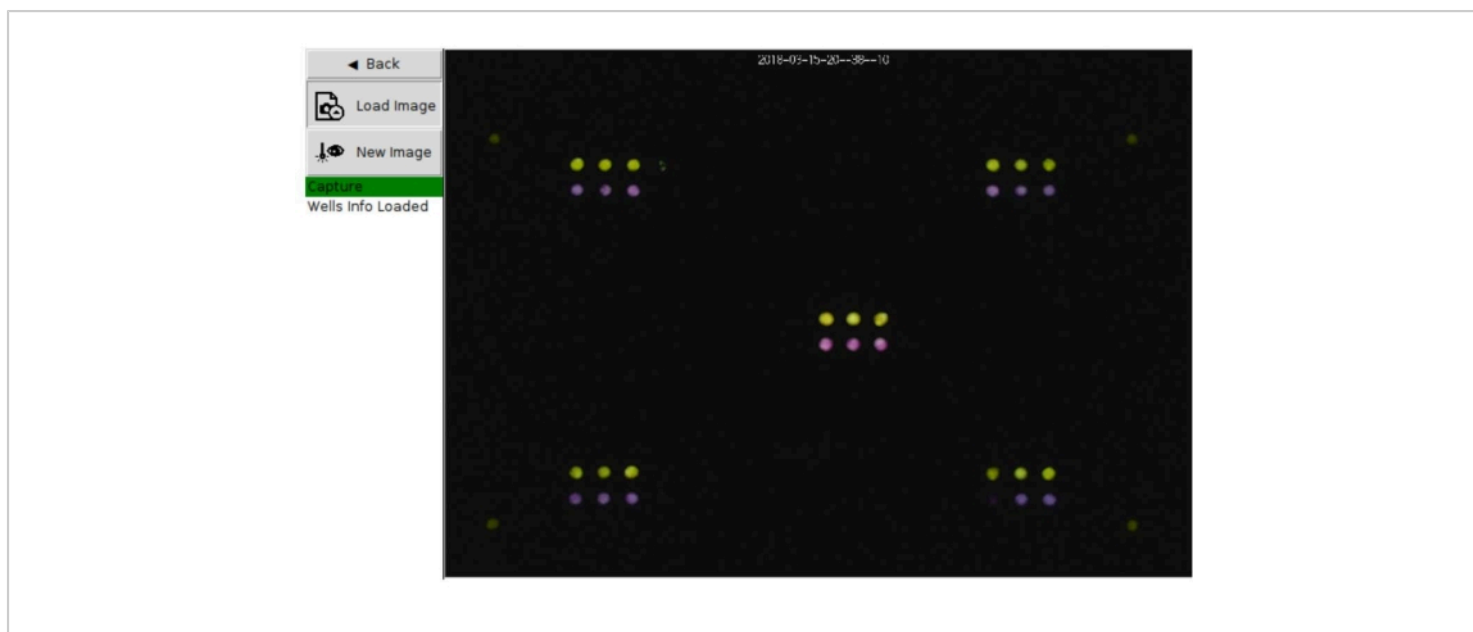


**Figure 4: Top-performing sensors are identified by calculating the fold change in absorbance at 570 nm.** Fold change (or maximum ON/OFF ratio) is calculated by measuring the ratio of absorbance (OD<sub>570</sub>) at 130 min between the switch only control, and the switch plus trigger CFPS assay. Error bars represent SEM from three replicates. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



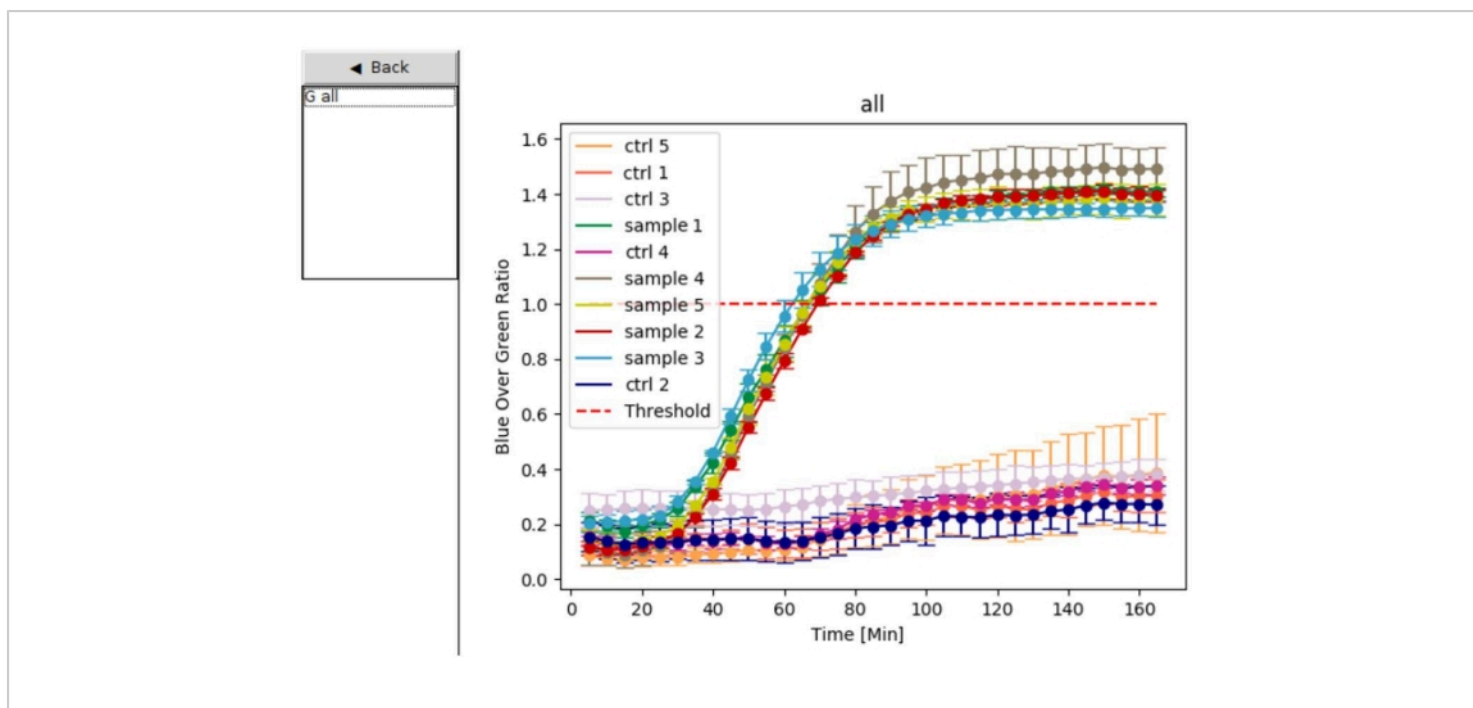
**Figure 5: Sensitivity assessment of top-performing switch.** *In vitro* transcribed Zika RNA is titrated into nucleic acid sequence-based amplification reactions. After a 1 h incubation, the reactions were added to cell-free PURExpress reactions on paper discs at a ratio of 1:7. The fold change after 130 min at 37 °C is plotted. This figure has been modified from<sup>24</sup>.

[Please click here to view a larger version of this figure.](#)

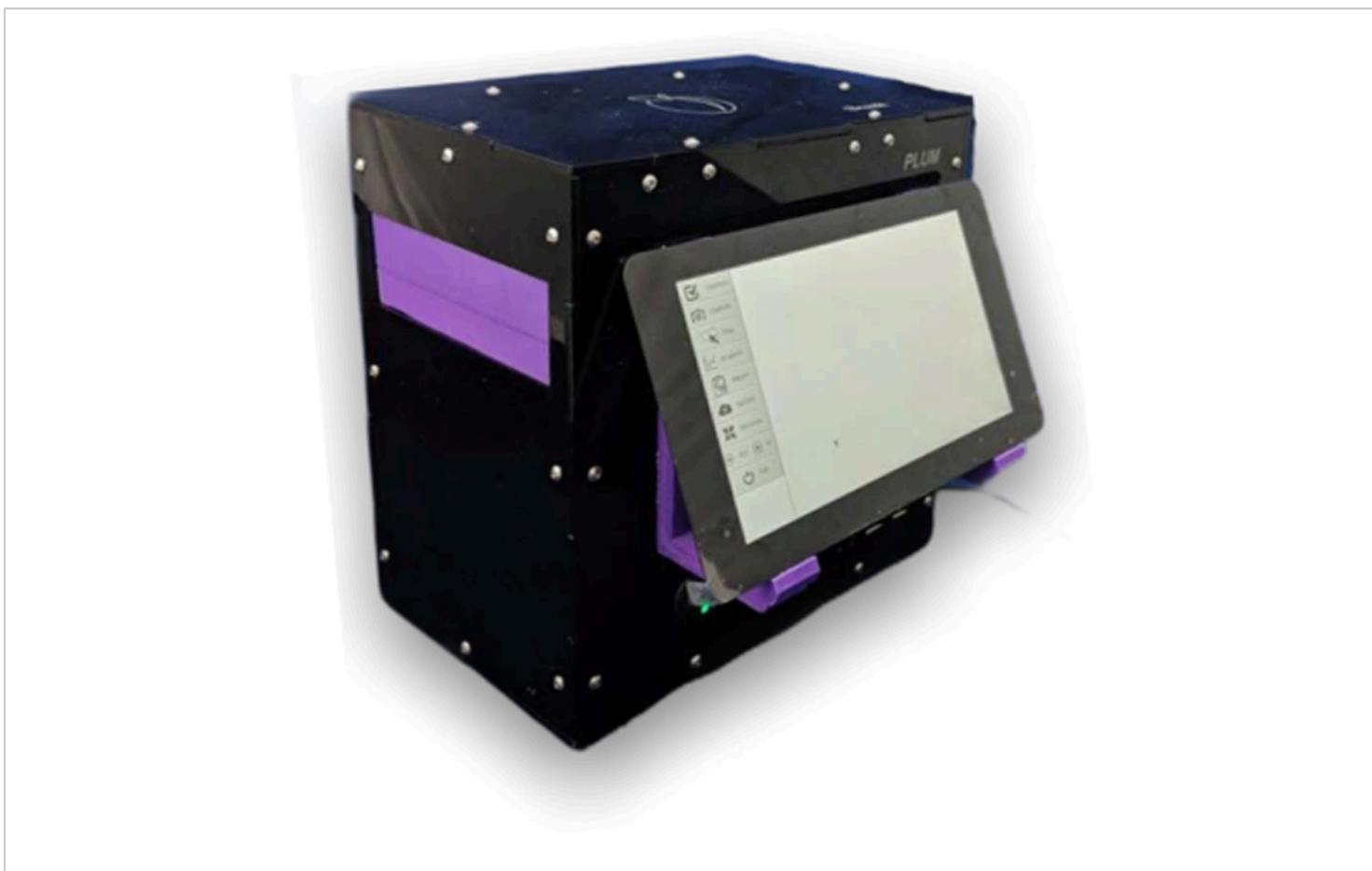


**Figure 6: Portable plate reader capture page loaded with captured image data.** This figure shows a sample picture of the final image captured by the portable plate reader during a data collection run. The original date/time stamp is visible at the top of the image. Yellow color indicates control or negative reactions, and the purple color indicates a positive reaction.

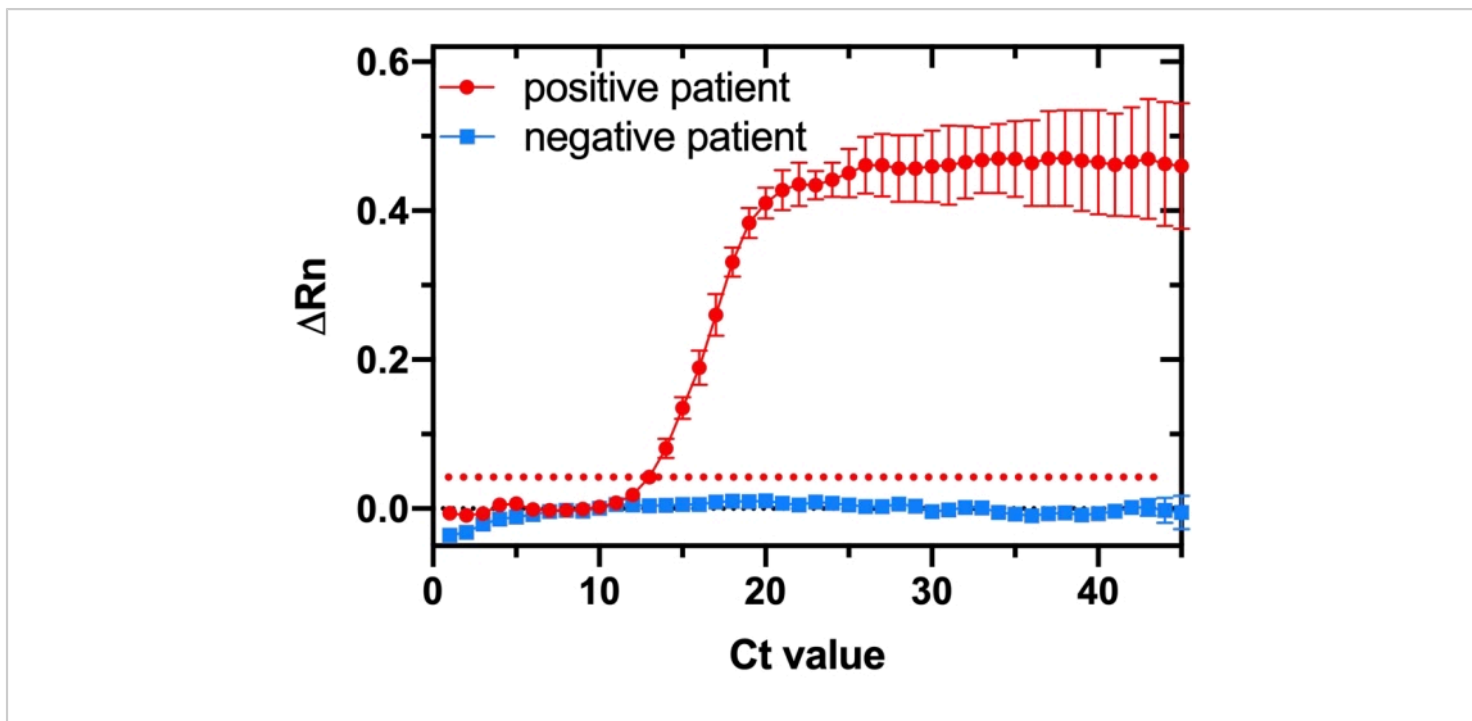
[Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 7: Data analysis mode.** On the left, users select the data sets they would like to plot; the graphs are then displayed on the right with unique colors for each sample or control set. The dashed red line serves as a threshold for determining positive and negative samples. Samples tested in triplicate that exceed the threshold are considered positive, while samples below the threshold are deemed negative. Error bars represent standard deviation (SD) from three replicates. Ctrl 1 to Ctrl 5 indicates controls. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 8. An image of the portable plate reader companion reader.** The portable plate reader acts as a lab-in-a-box and serves as a temperature-controlled plate reader to incubate and monitor colorimetric reactions. This portable device can provide quantitative and high-throughput measurements of the paper-based Zika sensors on-site. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 9: RT-qPCR plot of the amplification of two patient samples tested in triplicate for the detection of the Zika virus.** Samples are considered positive when the cycle threshold (Ct) value is  $\leq 38$ . The dotted red line serves as a threshold for determining positive and negative samples. The red trace indicates a positive sample, and the blue trace indicates a negative sample.  $\Delta R_n$  value represents the normalized magnitude of the fluorescence signal detected by the RT-qPCR instrument for all the samples tested. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

**Supplementary Protocol File.** [Please click here to download this File.](#)

## Discussion

The combined paper-based system described here can bring clinically relevant molecular diagnostics, with functionally comparable performance to RT-qPCR, to the point-of-need<sup>6</sup>. Importantly, for remote settings, the availability of diagnostic on-sites can decrease the time to results from days to hours. Highlighting the programmability of this approach, the pipeline that has been described can be directed, using computational design, to the detection of virtually any pathogen target. We have paired this with the purpose-built hardware of the portable plate reader, which is compact and compatible with

battery operation (8-9 h) and provides onboard data analysis to enable distributed applications. In other work, we have validated the combined hardware and Zika virus diagnostic platform with 268 patient samples, in parallel with RT-qPCR, and found a diagnostic accuracy of 98.5%<sup>24</sup>. Taken together, our goal is to enable the technology transfer of this platform to researchers so that it can be repurposed and improved by the community to address unmet needs through improved access to diagnostics. The process of creating the paper-based diagnostics begins with the computational design of toehold switches and nucleic acid sequence-based amplification primers using software available from the Green lab.



The *in silico* toehold switch design process has been integrated and automated into a pipeline that can be divided into three stages. The first stage generates a pool of toehold switch designs that hybridize to the target sequence in one nucleotide increment. The second stage examines the secondary structure and toehold switch availability and eliminates sensors with in-frame premature stop codons. A scoring function that considers multiple factors (e.g., defect level of the toehold switch, toehold switch availability, and target site accessibility) is then implemented to select top toehold switch designs based on overall scores. In the final stage, a list of sequences is generated for the top toehold switch designs and their corresponding target triggers. The top sensor sequences should be screened for specificity against the human transcriptome and closely related viral genomes using NCBI/Primer-BLAST<sup>25</sup>. It is also best practice to screen the sensor target sites for sequence conservation in the Zika viral genome to ensure that the sensors will provide broad and robust detection. Several versions of toehold switch design software have been developed and the design algorithm allows users to generate two versions, either series A<sup>6</sup> or series B toehold switches<sup>6</sup>. In this article, the focus has been on the series B toehold switch design.

Following commercial DNA synthesis, the toehold switches can be rapidly assembled, and then tested by performing an initial screen against a synthetic target trigger sequence that corresponds to short regions (200-300 nt) of the target genome. For screening the performance of toehold switch-based sensors, it is ideal to add the target sequence in the form of RNA. In this article, the steps required to add *in vitro* transcribed trigger RNA sequences have been outlined. However, if available, full-length genome templates such as quantified viral RNA extracts or commercial synthetic RNA genomes or standards can be used. Using full-length RNA

genomes for initial toehold switch screening is beneficial as it can inform whether additional factors, such as RNA secondary structure, will affect sensor performance. To optimize the ON/OFF ratio of candidate switches, the toehold switch DNA can be titrated into the cell-free reaction. This step can also serve to identify high-performing toehold switches (fold amplification, or high ON/OFF LacZ signal ratio) and omit leaky toehold switches (high signal in the absence of the target RNA) from downstream characterization steps.

To improve the limit of detection of the top-performing toehold switch candidates, nucleic acid sequence-based amplification is used to increase clinically-relevant concentrations of target Zika viral RNA to a level that can be detected by toehold switches<sup>6</sup>. Different combinations of forward and reverse primer sets are screened to determine high-performing nucleic acid sequence-based amplification primer and toehold switch combinations to enable detection at clinically relevant concentrations. Once an ideal primer set and toehold switch combination has been identified, the assay is taken forward to clinical validation. It is important to note that the toehold switch and nucleic acid sequence-based amplification screening stages can be labor and resource-intensive and therefore test development is best suited to well-resourced research sites. Although we have not applied process automation, it is likely that this could accelerate the iterative design, build, and test cycle<sup>32</sup>. Fortunately, the turnaround time from sensor design and testing to deployment can be remarkably short (less than a week), making this strategy ideal for time-critical situations, such as epidemic outbreaks<sup>6</sup>.

Even after a biosensor with clinically relevant sensitivity has been developed, there are technical challenges that need to be addressed. Since this protocol involves manual

operation and is a multi-step procedure, there is a risk of cross contamination between samples. We do our best to abate this risk through careful laboratory practice. In a recent clinical trial of 268 patient samples, we did not encounter any contamination issues; however, it is an important consideration<sup>24</sup>. With this in mind, the protocol remains a laboratory assay and requires a skilled user with command of proper molecular biology techniques. An additional consideration for deployments is the RNA isolation from patient samples. Here we describe RNA isolation using column-based nucleic acid extraction kits. However, in other work, we have demonstrated an effective and simple boiling lysis method (95 °C for 2 min) for low-burden patient sample processing<sup>6</sup>. This strategy nearly eliminates the costs associated with RNA extraction and avoids the use of column-based nucleic acid extraction kits, which can pose a logistics challenge in low-resource settings or supply chain issues during crises, such as the COVID-19 pandemic<sup>33</sup>.

As we have seen during the COVID-19 pandemic, the instruments used to perform RT-qPCR can themselves serve as a bottleneck and limit patient access to testing. This factor, which is also largely financial, leads to a centralized testing model, which can limit diagnostic access. For example, during the 2015/2016 Zika outbreak, only five national reference labs were available in Brazil, which caused delays in patient testing. Without considering the potential benefit of economies of scale, the current cost of goods for the portable plate reader is ~\$500 USD, which even if increased five-fold to account for labor and commercial margin, still provides an affordable instrument. This compares well to RT-qPCR instruments that range in cost from \$15,000-\$90,000 USD<sup>34</sup>. Furthermore, the estimated cost per test for the cell-free assay in Latin America is around \$5.48 USD, while the cost per test of RT-qPCR in Brazil was ~\$10-11 USD at the

time of the Zika outbreak<sup>36</sup>. Beyond the cost of equipment, the portable plate reader has a small footprint (20 cm<sup>3</sup>), automatic analysis, data upload to the cloud *via* internet, and can be run on battery power. These features dramatically expand the potential settings where testing can be deployed and concomitantly expands the patient population that can be served.

To date the most common commercial *E. coli* CFPS platforms are the S30 and PURE systems<sup>37</sup>; however, a key consideration in improving access to diagnostics in low- and middle-income countries is the limited domestic availability of these reagents. An important step toward resolving this challenge is the development of local CFPS production. The Federici lab has recently made significant progress toward developing a non-commercial platform to implement toehold switch-based sensors in lysate-based cell-free systems, reaching a 2.7 fM LOD with Zika virus RNA<sup>14</sup>. Not only does this achievement allow the reagents to be made in the country of use, avoiding import tariffs and delays, but labor costs also scale to local rates and thus the overall cost can be significantly lowered. In the work outlined by the Federici group, the cost of producing the CFPS expression reaction (5 µL) in Chile was 6.9 cents (USD)<sup>35,38</sup>, providing a dual incentive (improved logistics and cost) for implementing lysate-based systems<sup>35,38</sup>.

The placement of RT-qPCR-comparable testing into distributed diagnostic networks could bring significant advantages over current practices that are dependent on the transportation of samples to centralized RT-qPCR facilities. In peri-urban settings, where Zika cases were concentrated, the physical distance between a patient and the diagnostic facility slows diagnosis and increases the risk that results will not reach the patient at a clinically relevant time. It is our hope

that the work presented here can contribute to enabling the research community, through the transfer of knowledge, to create decentralized biotechnologies and portable hardware for human health, agriculture and environmental monitoring.

## Disclosures

K.P. and A.A.G. are co-inventors of paper-based toehold sensor related technologies. Y.G., S.C., and K.P. are co-founders of LSK Technologies, Inc. and are co-inventors of the PLUM-related technologies. M.K., K.P. and A.A.G. are co-founders of En Carta Diagnostics Ltd. Other authors have no conflicts of interest. Patents: PLUM device: Y.G., S.C., and K.P. patent application was filed by University of Toronto and assigned to LSK Technologies Inc. U. S. Provisional Patent Application No. 62/982,323 filed February 27, 2020; Toehold switch patent: A.A.G., P.Y., and J.J. C. "Riboregulator compositions and methods of use", Patent. WO2014074648A3 filed November 6, 2012; Paper-based diagnostic patent: K.P. and J.J.C. "Paper-based synthetic gene networks" U.S. patent pending No. US15/963,831 filed December 6, 2013; Zika patent 1: K.P., A.A.G., M.K.T., D.B., G.L., T.F., and J.J.C., "Portable, Low-Cost Virus Detection and Strain Identification Platform," U. S. Provisional Patent Application No. 62/403,778 filed October 4, 2016; Zika patent 2: K.P., A. A.G., M.K.T., D.B., G.L., T.F., and J.J.C., "Portable, Low-Cost Virus Detection and Strain Identification Platform," U. S. Provisional Patent Application No. 62/341,221 filed May 25, 2016.

## Acknowledgments

The authors thank all members of the Green, Pardee and Pena labs as well as all co-authors of previous manuscripts pertaining to the work disclosed in this manuscript. S.J.R.d.S. was supported by a PhD fellowship sponsored by the

Foundation for Science and Technology of Pernambuco (FACEPE), Brazil, reference number IBPG-1321-2.12/18, and currently is supported by a Postdoctoral Fellowship sponsored by the University of Toronto, Canada. P.B. is supported by the William Knapp Buckley Award from the Faculty of Pharmacy, University of Toronto. M.K. was supported by the Precision Medicine Initiative (PRIME) at the University of Toronto internal fellowship number PRMF2019-002. This work was supported by funds to K.P. from the Canada Research Chairs Program (Files 950-231075 and 950-233107), the University of Toronto's Major Research Project Management Fund, the CIHR Foundation Grant Program (201610FDN-375469), and to L.P., A.A.G., and K.P. through the CIHR/IDRC Team Grant: Canada-Latin/America-Caribbean Zika Virus Program (FRN: 149783), as well as by funds to K.P. from the Canada's International Development Research Centre (grant 109434-001) through the Canadian 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Rapid Research Funding Opportunity. This work was also supported by funds to A.A.G. from an Arizona Biomedical Research Commission New Investigator Award (ADHS16-162400), the Gates Foundation (OPP1160667), an NIH Director's New Innovator Award (1DP2GM126892), an NIH R21 award (1R21AI136571-01A1) to K.P./A.A.G, and an Alfred P. Sloan Fellowship (FG-2017-9108). **Figure 1** was created with Biorender.com under academic license.

## References

1. Urdea, M. et al. Requirements for high impact diagnostics in the developing world. *Nature*. **444 Suppl 1**, 73-79 (2006).
2. Yager, P., Domingo, G. J., Gerdes, J. Point-of-care diagnostics for global health. *Annual Review of Biomedical Engineering*. **10**, 107-144 (2008).

3. Faria, N. R. et al. Mobile real-time surveillance of Zika virus in Brazil. *Genome Medicine*. **8** (1), 97 (2016).
4. Faria, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*. **352** (6283), 345-349 (2016).
5. Pardee, K. et al. Paper-based synthetic gene networks. *Cell*. **159** (4), 940-954 (2014).
6. Pardee, K. et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*. **165** (5), 1255-1266 (2016).
7. Duyen, T. T. M. et al. Paper-based colorimetric biosensor for antibiotics inhibiting bacterial protein synthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **123** (1), 96-100 (2017).
8. Jung, J. K. et al. Cell-free biosensors for rapid detection of water contaminants. *Nature Biotechnology*. **38** (12), 1451-1459 (2020).
9. Yang, Y. H. et al. Cell-free Escherichia coli-based system to screen for quorum-sensing molecules interacting with quorum receptor proteins of streptomyces coelicolor. *Applied and Environmental Microbiology*. **75** (19), 6367 (2009).
10. Ma, D., Shen, L., Wu, K., Diehnelt, C. W., Green, A. A. Low-cost detection of norovirus using paper-based cell-free systems and synbody-based viral enrichment. *Synthetic Biology*. **3** (1), ysy018 (2018).
11. Park, S., Lee, J. W. Detection of coronaviruses using RNA toehold switch sensors. *International Journal of Molecular Sciences*. **22** (4), 1-13 (2021).
12. Amalfitano, E. et al. A glucose meter interface for point-of-care gene circuit-based diagnostics. *Nature Communications*. **12** (1), 1-10 (2021).
13. Nguyen, P. Q. et al. Wearable materials with embedded synthetic biology sensors for biomolecule detection. *Nature Biotechnology*. **39** (11), 1366-1374 (2021).
14. Pellinen, T., Huovinen, T., Karp, M. A cell-free biosensor for the detection of transcriptional inducers using firefly luciferase as a reporter. *Analytical Biochemistry*. **330** (1), 52-57 (2004).
15. Salehi, A. S. M. et al. Cell-free protein synthesis approach to biosensing hTR $\beta$ -specific endocrine disruptors. *Analytical Chemistry*. **89** (6), 3395-3401 (2017).
16. Salehi, A. S. M. et al. Biosensing estrogenic endocrine disruptors in human blood and urine: A RAPID cell-free protein synthesis approach. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **345**, 19-25 (2018).
17. Voyvodic, P. L. et al. Plug-and-play metabolic transducers expand the chemical detection space of cell-free biosensors. *Nature Communications*. **10** (1), 1-8 (2019).
18. Yang, W. C., Patel, K. G., Wong, H. E., Swartz, J. R. Simplifying and streamlining Escherichia coli-based cell-free protein synthesis. *Biotechnology Progress*. **28** (2), 413-420 (2012).
19. Gräwe, A. et al. A paper-based, cell-free biosensor system for the detection of heavy metals and date rape drugs. *PLOS One*. **14** (3), e0210940 (2019).
20. Green, A. A., Silver, P. A., Collins, J. J., Yin, P. Toehold Switches: De-Novo-Designed Regulators of Gene Expression. *Cell*. **159** (4), 925-939 (2014).
21. Craw, P., Balachandran, W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip*. **12** (14), 2469-2486 (2012).

22. Zyrina, N. V., Antipova, V.N. Nonspecific Synthesis in the Reactions of Isothermal Nucleic Acid Amplification. *Biochemistry (Moscow)*. **86** (7), 887-897 (2021).
23. Takahashi, M. K. et al. A low-cost paper-based synthetic biology platform for analyzing gut microbiota and host biomarkers. *Nature Communications*. **9** (1), 1-12 (2018).
24. Karlikow, M. et al. Field validation of the performance of paper-based tests for the detection of the Zika and chikungunya viruses in serum samples. *Nature Biomedical Engineering*. **6** (3), 246-256 (2022).
25. Agarwala, R. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*. **44** (D1), D7-D19 (2016).
26. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. at <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.
27. Deiman, B., Van Aarle, P., Sillekens, P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Molecular Biotechnology*. **20** (2), 163-179 (2002).
28. Zadeh, J. N., Wolfe, B. R., Pierce, N. A. Nucleic acid sequence design via efficient ensemble defect optimization. *Journal of Computational Chemistry*. **32** (3), 439-452 (2011).
29. NUPACK: Nucleic Acid Package. at <<http://www.nupack.org/>>
30. JoVE Science Education Database. *Basic Methods in Cellular and Molecular Biology*. DNA Gel Electrophoresis. *Journal of Visualized Experiments: JoVE.*, Cambridge, MA (2021).
31. Lanciotti, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*. **14** (8), 1232 (2008).
32. Walsh, D. I. et al. Standardizing automated DNA assembly: Best practices, metrics, and protocols using robots. *SLAS Technology*. **24** (3), 282 (2019).
33. Silva, S. J. R. da, Magalhães, J. J. F. de, Pena, L. Simultaneous circulation of DENV, CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 in Brazil: An inconvenient truth. *One Health*. **12**, 100205 (2021).
34. Kimura, S., Fujinaga, K., Sekiya, T. PCR machine. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*. **41** (5), 514-517 (1996).
35. Arce, A. et al. Decentralizing cell-free RNA sensing with the use of low-cost cell extracts. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **9**, 727584 (2021).
36. Silva, S. J. R., Pardee, K., Balasuriya, U. B. R., Pena, L. Development and validation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in patient samples from Brazil. *Scientific Reports*. **11** (1), 1-13 (2021).
37. Shimizu, Y. et al. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nature Biotechnology*. **19** (8), 751-755 (2001).
38. Lavickova, B., Maerkl, S. J. A simple, robust, and low-cost method to produce the PURE cell-free system. *ACS Synthetic Biology*. **8** (2), 455-462 (2019).