

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Testes Moleculares Baseados em Amplificação Isotérmica
Mediada por *Loop* para Detecção de Arbovírus em
Microdispositivos Descartáveis**

Geovana de Melo Mendes

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte

**Goiânia
2020**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das dissertações e teses disponibilizados são de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o autor e o orientador firmam o compromisso de que ele não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Geovana de Melo Mendes

Título do trabalho: Testes Moleculares Baseados em Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* para Detecção de Arbovirus em Microdispositivos Descartáveis

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Geovana de Melo Mendes
Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Gabriel R M Duarte
Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 16 / 03 / 20

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento, imagens coladas não serão aceitas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Testes Moleculares Baseados em Amplificação Isotérmica
Mediada por *Loop* para Detecção de Arbovírus em
Microdispositivos Descartáveis**

Geovana de Melo Mendes

Dissertação apresentada ao Instituto
de Química da Universidade Federal
de Goiás como exigência para
obtenção do título de Mestre em
Química

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte

Goiânia
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Mendes, Geovana de Melo

Testes Moleculares Baseados em Amplificação Isotérmica Mediada por Loop para Detecção de Arbovírus em Microdispositivos Descartáveis [manuscrito] / Geovana de Melo Mendes. - 2020. viii, 72 f.

Orientador: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2020.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. RT-LAMP. 2. dispositivos de PeT. 3. arbovírus. 4. diagnóstico molecular. 5. point-of-care. I. Duarte, Gabriela Rodrigues Mendes, orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 327 da sessão da Defesa de Dissertação de Mestrado de **Geovana de Melo Mendes**, que confere o título de **Mestra em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **18 (dezoito) dias do mês de fevereiro de 2020 (dois mil e vinte)**, a partir das **09h00min**, no **Anfiteatro do IQ II**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "**Testes Moleculares baseados em Amplificação Isotérmica Mediada por Loop para detecção de Arbovírus em Microdispositivos descartáveis**". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, **Profª. Drª. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Nilson Antônio Assunção (Unifesp) e Profª. Drª. Livia Flório Sgobbi (UFG). Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Profª. Drª. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (UFG), Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 18 (dezoito) dias do mês de fevereiro de 2020.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Rodrigues Mendes Duarte, Professor do Magistério Superior**, em 18/02/2020, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Livia Flório Sgobbi, Professor do Magistério Superior**, em 18/02/2020, às 11:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nilson Antonio de Assunção, Usuário Externo**, em 02/03/2020, às 12:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1170496** e o código CRC **A4213E4A**.

Referência: Processo nº 23070.047639/2019-49

SEI nº 1170496

Dedico esta dissertação aos meus pais Sônia e Geraldo, que me ensinaram
que a educação é o bem mais precioso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos derramadas sobre mim.

Aos meus pais, por todo amor, apoio, paciência e suporte durante essa caminhada. Serei eternamente grata por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

Ao meu sobrinho Joaquim, que encheu minha vida de luz durante essa jornada e me mostrou o amor mais puro do mundo.

À todos os meus familiares que sempre se orgulharam das minhas conquistas e me deram forças para que eu enfrentasse essa jornada.

À minha irmã de alma Ana Gabriela por estar ao meu lado em todos os momentos e nunca permitir que eu descreditasse de mim.

À minha amiga Sarah por ser a pessoa mais presente e companheira da minha vida e por dividir comigo todas as minhas dores e alegrias.

Aos meus amigos Larissa, Janaína, Natália, Tamires, Pâmella, Renata, Adriel e Matheus por serem tão queridos em minha vida e sempre oferecerem uma palavra de carinho e motivação.

Aos amigos Juliana, Carlos, Jenyffer, Namie e Flávia por compartilharem comigo todos os dias dessa jornada, por alegrar minhas manhãs e tardes e por compartilharem as frustrações e também celebrar cada vitória juntinhos.

Em especial agradeço aos amigos do laboratório: Kézia, Paulo, Giovanna (que é do nosso lab também) e Marcio. Vocês fizeram minha jornada mais leve, mais doce e muito prazerosa. Obrigada por todos os momentos de descontração e também por toda a ajuda com os experimentos. Carinhosamente agradeço o amigo Paulo por toda a colaboração com o trabalho da zika.

À minha orientadora querida professora Dr^a Gabriela Rodrigues Mendes Duarte pela oportunidade e confiança para realizar este trabalho, pelo acolhimento e por todos os conselhos que certamente levarei para a vida.

Ao professor Dr Alexandre Bailão por toda ajuda com biologia molecular e pela infraestrutura laboratorial. Agradeço também aos colegas do laboratório de Biologia Molecular pela ajuda e disposição.

À todos os professores do Instituto de Química que contribuíram para minha formação e engrandecimento pessoal.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURA	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
CAPÍTULO 1-INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1.1 Testes laboratoriais para infecções virais.....	2
1.1.1.1 Métodos Sorológicos: detecção de anticorpos/antígenos por ELISA.....	2
1.1.1.2 Isolamento do Vírus	3
1.1.2 Diagnósticos Moleculares	4
1.1.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	4
1.1.2.2 Métodos Isotérmicos de amplificação	5
1.1.2.2.1 Amplificação Isotérmica mediada por loop (LAMP)	6
1.1.3 SISTEMAS ANALÍTICOS MINIATURIZADOS.....	10
1.1.3.1 Microdispositivos de poliéster-toner (PeT)	11
1.1.4 INFECÇÕES POR ARBOVÍRUS.....	13
1.1.4.1. Dengue	14
1.1.4.2 Zika.....	15
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO 2-DETECÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE.....	26
2.1 INTRODUÇÃO.....	27
2.2 OBJETIVOS	29
2.2.1 Objetivo geral	29
2.2.2..... Objetivos específicos	29
2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	30
2.3.1 Materiais, reagentes e soluções.....	30
2.3.2. Amostras de pacientes infectados	30
2.3.3 Extração do ácido nucleico, síntese do cDNA e qPCR	31

2.3.4	Fabricação dos microdispositivos de PeT	31
2.3.5	Amplificação do RNA do vírus da dengue por RT- LAMP no microchip de PeT.....	32
2.3.6	Análise dos fragmentos amplificados por RT-LAMP em gel de agarose .	34
2.3.7	Detecção Visual.....	34
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
2.4.1	Comparação entre as enzimas <i>Bst</i> 2.0 e <i>Bst</i> 3.0	36
2.4.2	Limite de detecção por RT-LAMP em microdispositivos de PeT partindo de amostras de soro de pacientes infectados com DENV-4	37
2.4.3	Detecção Visual.....	39
2.5	CONCLUSÃO	44
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	CAPÍTULO 3-DETECÇÃO DE ZIKA VÍRUS	49
3.1	INTRODUÇÃO.....	50
3.2.	OBJETIVOS.....	52
3.2.1	Objetivo geral.....	52
3.2.2	Objetivos específicos	52
3.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	53
3.3.1	Materiais, reagentes e soluções.....	53
3.3.1	Amostras de pacientes infectados	53
3.3.2	Fabricação dos microdispositivos de PeT	54
3.3.4	Amplificação do Zika vírus por RT- LAMP no microchip de PeT	54
3.3.5	Análise dos fragmentos amplificados por RT-LAMP em gel de agarose .	56
3.3.6	Detecção Visual.....	56
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.4.1	Otimização das condições experimentais	57
3.4.2	Especificidade da Reação.....	59
3.4.3	RT-LAMP realizada diretamente em amostras de sangue total, soro, urina e saliva	61
3.4.4	Determinação do limite de detecção	63
3.5	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
	CURRICULUM VITAE	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Representação esquemática da etapa não cíclica da amplificação isotérmica medida por loop (LAMP). (Notomi, et al., 2000) 7
- Figura 1.2** Representação esquemática das etapas (etapa não cíclica e etapa cíclica) da LAMP. (Notomi, et al., 2000) 8
- Figura 1.3** Representação do genoma de um Flavivírus. (Pianka, et al., 2017) 14
- Figura 2.1** Representação das etapas de fabricação dos microdispositivos de poliéster-toner. 32
- Figura 2.2** Ilustração esquemática das etapas principais de amplificação e detecção RT-LAMP no microdispositivo PeT. (Mendes, et al., 2019) 34
- Figura 2.3** Monitoramento por eletroforese em gel do sucesso da amplificação utilizando soro de pacientes infectados com DENV-4 por RT-LAMP em microchips de PeT com as enzimas *Bst* 2.0 e *Bst* 3.0 a diferentes tempos de aquecimento da reação. Em ambos os painéis: M) Marcador de tamanho de DNA Invitrogen de 1 kb. Em 1) controle negativo (sem o alvo) 15 min; 2-3 amostras de soro dos pacientes infectados com DENV-4 com aquecimento de: 2) 15 min; 3) 20 min; 5) controle negativo (sem o alvo) 60 min; 6-8 amostras de soro dos pacientes infectados com DENV-4 com aquecimento de: 6) 30 min; 7) 45 min; 8) 60 min. 37
- Figura 2.4** Eletroforese em gel de agarose determinando o limite de detecção realizado off-chip para análise de DENV-4 por RT-LAMP. Poços: M) Marcador de tamanho de DNA Invitrogen de 1 kb; 1) Controle negativo (amostra de soro de paciente saudável); 2) 10000 cópias; 3) 5000 cópias; 4) 1000 cópias; 5) 500 cópias de RNA da amostra de soro de paciente infectado. 38

Figura 2.5	Detecção visual realizada no chip. 1) 20000 cópias 2) 10000 cópias; 3) 5000 cópias; 4) 1000 cópias; 5) 500 cópias de RNA da amostra de soro de pacientes infectados; 6) Controle negativo (amostra de soro de paciente saudável).	40
Figura 2.6	Análise digital das imagens da câmara reacional pelo software ImageJ para correlação quantitativa da intensidade de fluorescência verde (n = 6).	41
Figura 2.7	Análise digital das imagens das microcâmaras reacionais pelo software ImageJ para correlação semiquantitativa da intensidade de fluorescência da relação verde/azul (n = 6).	42
Figura 3.1	Representação esquemática das etapas de fabricação dos dispositivos microfluídicos de poliéster-toner.	54
Figura 3.2	Ilustração esquemática das etapas principais de amplificação e detecção RT-LAMP no microdispositivo PeT. Adaptado de (Mendes, et al., 2019)	56
Figura 3.3	Detecção A) visual e por B) eletroforese em gel dos produtos de amplificação obtidos por RT-LAMP nos microdispositivos de PeT. Em ambos os painéis: 1-3 controles negativos e 4-6 controles positivos com 0,16, 0,32, 0,48 U μ L ⁻¹ de Bst 3.0 DNA Polimerase, respectivamente.	57
Figura 3.4	Monitoramento do tempo de incubação da reação de RT-LAMP nos dispositivos descartáveis de PeT por A) detecção visual e por B) eletroforese em gel. Em ambos os painéis: 1: Controle negativo com 5 min; 2: Controle negativo com 10 min; 3: Controle negativo com 15 min; 4: Controle positivo com 5 min; 5: Controle positivo com 10 minutos; 6: Controle positivo com 15 minutos.	58
Figura 3.5	Ensaio de especificidade da reação de RT-LAMP nos microchips de poliéster toner por detecção A) visual e por B) eletroforese em amostras de soro de pacientes: saudável, infectado com chikungunya, dengue e zika respectivamente em ambos os painéis.	60
Figura 3.6	Detecção visual e por gel de eletroforese dos produtos amplificados por RT-LAMP nos microdispositivos de PeT partindo de amostras brutas (não processadas) de	62

pacientes infectados com o ZIKV e de RNA pré-purificado de ZIKV.

Figura 3.7 Avaliação do limite de detecção da RT-LAMP nos microchips de PeT, em A através da detecção visual e em B por eletroforese, M: Marcador de tamanho, 1: Controle negativo; 2: reação iniciada com 1 cópia de RNA; 3: reação iniciada com 10 cópias de RNA; 4: reação iniciada com 100 cópias de RNA em 5: reação iniciada com 1000 cópias de RNA. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Sequências de indicadores desenhados para o DENV-4 usados na RT-LAMP	32
Tabela 3.1	Sequências de indicadores desenhados para detecção do ZIKV por RT-LAMP.	55

LISTA DE ABREVIATURA

BSA – *Bovine serum albumine* (Albumina de soro bovina)

cDNA – DNA complementar

C_T – *Cycle threshold* (Limiar da fase exponencial)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP's – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

dSPE – *Dynamic solid phase extraction* (Extração dinâmica em fase sólida)

DTT – Ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

GBS – Síndrome de Guillain-Barré

GuHCl – Hidrocloro de guanidina

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Kb- kilobases

LAMP – *Loop-mediated isothermal amplification* (Amplificação isotérmica mediada por *loop*)

LOC – *lab on a chip* (laboratório em um chip)

MES – Ácido 2-(N-morpholino)etanosulfônico

M- Marcador de tamanho de DNA.

NASBA – Amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos

NS- Protéínas não estruturais

OMS-Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de bases

PCL- *Print, cut and lamination* (impressão, corte e laminação)

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PDMS – Poli(dimetilsiloxano)

Pe – Poliéster

PeT – Poliéster-toner

PMMA – Poli(metilmetacrilato)

POC-*point-of-care*

POCT – *Point-of-care Tests*

PP – Polipropileno

qPCR – PCR quantitativa

Razão A/V – Razão área/volume

RNA – Ácido ribonucleico

RPA – Amplificação de polimerase por recombinase

RT-LAMP – *Reverse transcription-loop mediated isothermal amplification*

(Amplificação isotérmica mediada por *loop* pós transcrição reversa)

TBE – Tris-borato-EDTA

UV – Ultravioleta

vRNA- RNA viral

μTAS – *Micro total analysis systems* (Microsistemas para análises totais)

RESUMO

Os vírus da dengue (DENV) e da zika (ZIKV) são arbovírus transmitidos aos seres humanos através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo que as infecções causadas por estes arbovírus apresentam sintomas semelhantes e muitas vezes reações cruzadas nos testes diagnósticos. A incidência desses vírus é majoritariamente em locais de recursos escassos, nos quais nem sempre há infraestrutura laboratorial sofisticada e profissionais especializados para realizar um diagnóstico preciso, confiável e diferencial. Nesse sentido, surge a necessidade de métodos diagnósticos que sejam simples de serem realizados, economicamente viáveis, de alta confiabilidade e que permitam que o diagnóstico seja feito no próprio local de necessidade (*point-of-care-tests*, POCT). Neste trabalho, foram desenvolvidos dois métodos para a detecção dos vírus da dengue e zika a partir de amostras reais de pacientes infectados através da reação de transcrição reversa seguida da amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (RT-LAMP) em um microdispositivo descartável de poliéster-toner (PeT). As reações foram controladas termicamente com um termobloco e em 10 min foi possível detectar o ZIKV e em 15 min o DENV. A detecção foi feita ao final do período de incubação ou por eletroforese em gel (detecção *off-chip*) ou por detecção visual no chip (detecção *on-chip*) através da adição de intercalador de DNA. Os resultados demonstraram que é possível detectar o vírus da dengue e da zika através de uma reação de RT-LAMP diretamente nas amostras dos pacientes infectados com os vírus, sem a necessidade de uma etapa de extração prévia de RNA. O sucesso da RT-LAMP foi confirmado em reações iniciadas com 200 cópias de RNA μL^{-1} para o DENV e com 0,2 cópias de RNA μL^{-1} para o ZIKV. A RT-LAMP realizada no microdispositivo de PeT demonstrou ser um método simples e de baixo custo que permitiu a detecção rápida dos vírus com alta confiabilidade e com grande potencial para aplicações nas situações de *point-of-care*.

Palavras chaves: RT-LAMP, dispositivos de PeT, arbovírus, diagnóstico molecular, *point-of-care*.

ABSTRACT

Arboviruses such as dengue virus (DENV) and zika virus (ZIKV) are transmitted to humans through the bite of *Aedes* mosquitoes. Infections with arboviruses presents similar symptoms and commonly cross reactions. The incidence of these viruses emerges in general in resource limited settings, where sophisticated laboratory infrastructure and trained professionals to make an accurate, reliable and differential diagnosis are not available. Hence, a diagnostic method that are simple, cost effective, reliable and point of care applicable is necessary. In this study we develop assays for the detection of arbovirus in real sample from infected patients by a reverse transcription reaction followed by a loop-mediated isothermal amplification of DNA (RT-LAMP) in a polyester toner (PeT) disposable microdevice. The reactions were thermally controlled with a thermoblock and in 10 min it was possible to detect the ZIKV and in 15 min it was possible to detect the DENV. At the end of the incubation time, detection was performed or by electrophoresis (off-chip detection) or a DNA fluorescent dye was added for on-chip detection (on-chip detection). Our results demonstrated that it is possible to detect DENV and ZIKV through an RT-LAMP assay directly on samples from infected patients, without a previous RNA extraction step. The success of RT-LAMP was confirmed in reactions initiated with 200 copies of RNA μL^{-1} for dengue and 0.2 copies of RNA μL^{-1} for Zika virus. RT-LAMP performed on the PeT microdevice is a simple and inexpensive method that allows for rapid detection of dengue virus with high reliability and great potential for point-of-care applications.

Keywords: RT-LAMP, PeT microdevice, arbovirus, molecular diagnosis, point-of-care.

CAPÍTULO 1-INTRODUÇÃO GERAL

1.1.1 Testes laboratoriais para infecções virais

Os testes laboratoriais utilizados para detectar as infecções virais podem ser realizados partindo de diferentes princípios, como por exemplo a identificação do vírus, ou a identificação dos componentes virais, através da medida da resposta imunológica do hospedeiro ao vírus, ou pela combinação destes testes. (Mardekian & Roberts, 2015) Para a realização destes testes, em geral uma amostra do paciente (sangue, urina ou saliva por exemplo) é coletada e processada. No caso de testes moleculares envolvendo vírus RNA, (ácido ribonucleico), o RNA viral (vRNA) deve ser extraído da amostra e geralmente purificado para transcrição reversa (RT) e subsequente amplificação do DNA complementar (cDNA). Em ensaios sorológicos, normalmente é necessária apenas a diluição da amostra do paciente. Os ensaios de detecção de anticorpos detectam a presença de anticorpos específicos (Imunoglobulina M-IgM, Imunoglobulina G-IgG) produzidos pelo organismo em resposta à infecção, enquanto os ensaios de detecção de antígenos detectam proteínas virais secretadas por células infectadas. (Pianka, et al., 2017)

1.1.1.1 Métodos Sorológicos: detecção de anticorpos/antígenos por ELISA

O preparo de amostras para ensaios sorológicos geralmente exige centrifugação das amostras dos pacientes e posterior diluição. Ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) são usados para detecção de anticorpos e antígenos. Existem várias modalidades diferentes de ensaios ELISA, mas o princípio de funcionamento é o mesmo: primeiro o alvo é imobilizado em uma placa, direta ou indiretamente, a um anticorpo de captura. Em seguida, o alvo é detectado com um conjugado de enzima de detecção de anticorpo primário (liga-se diretamente ao alvo) ou secundário (liga-se a um anticorpo que está ligado ao alvo). (Pianka, et al., 2017)

A maioria dos testes de detecção de anticorpos são usados para detectar imunoglobulinas G ou M específicas para vírus, que são anticorpos produzidos pelo organismo em resposta à infecção. O método ELISA é o método sorológico mais difundido para diagnósticos virais. No entanto, dependendo do estágio da infecção, pode não haver ainda um aumento significativo desses anticorpos.

Assim, uma quantidade maior de amostra pode ser necessária para confirmar os resultados, além da possibilidade de ocorrer reações cruzadas de anticorpos de outros vírus, representando uma possível fonte de falso-positivos. (Guzman, et al., 2010) Desta forma, este ensaio não proporciona um diagnóstico precoce da infecção, podendo apresentar resultados positivos apenas 7 dias após o início dos sintomas. Além disso, os testes baseados em ELISA, que requerem equipamentos robustos e profissionais treinados, foram projetados para analisar um grande número de amostras simultaneamente, sendo portanto mais adequados para um laboratório de testes centralizado do que as aplicações em *point-of-care* (POC). (Peeling, et al., 2010)

A detecção da glicoproteína não estrutural NS1 pode ser feita nos primeiros dias de infecção (fase aguda da infecção). Nesse estágio, a glicoproteína passa a ser expressa na superfície das células infectadas e também é secretada para a circulação sanguínea e a detecção pode ser feita no sangue do paciente infectado, no soro, plasma e outros tecidos. (Alcon, et al., 2002) (Libraty, et al., 2002) Entretanto, a detecção da glicoproteína NS1 só é eficiente se for feita em amostras de pacientes coletadas nos cinco primeiros dias de infecção. Além disso, outra desvantagem apresentada na detecção através da glicoproteína NS1 é que a mesma não permite a distinção entre os sorotipos. (WHO, 2016)

1.1.1.2 Isolamento do Vírus

O vírus pode ser isolado pela inoculação de amostras em mosquitos (vetores), cultura de células ou inoculação intracerebral de camundongos em aleitamento. As amostras (sangue, soro, plasma ou até mesmo tecidos) devem ser coletadas dos pacientes ainda na fase aguda da infecção viral. Existem evidências de que as taxas de isolamento do vírus no sangue total são consideravelmente mais altas do que as taxas de isolamento do soro ou plasma. Para diferenciação do sorotipo do vírus, são utilizados ensaios de imunofluorescência usando anticorpos monoclonais específicos para o sorotipo. (Peeling, et al., 2010)

O isolamento do vírus é considerado o teste mais eficiente para realizar diagnósticos. Entretanto, são necessários pelo menos sete dias para que seja

concluído, além de necessitar de instrumentação sofisticada e ser considerado um teste de alto custo. Por esses motivos, o isolamento do vírus é um ensaio incompatível de ser realizado em regiões de recursos limitados e para aplicação em diagnósticos precoces. (Igarashi, 1978) (Valdez, et al., 2012) (Tesh, 1979)

1.1.2 Diagnósticos Moleculares

Os testes para diagnósticos moleculares são notadamente valiosos para diagnósticos de doenças especialmente na fase aguda da infecção, devido aos altos níveis de vRNA circulante nesta fase, sendo então testes importantes para o diagnóstico precoce da doença. Os diagnósticos moleculares para infecções virais são aqueles que se baseiam na amplificação e detecção de ácidos nucleicos (DNA e RNA, ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico respectivamente) de patógenos em amostras biológicas dos pacientes infectados. Estes testes caracterizam-se pela alta sensibilidade e especificidade, além de serem capazes de distinguir os diferentes sorotipos de vírus, sendo portanto essenciais para controle epidemiológico. (Pianka, et al., 2017), (Faye, et al., 2008),

1.1.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*), foi descrita pela primeira vez em 1983 (Mullis, et al., 1986) e representa o método de amplificação de ácidos nucleicos (DNA ou cDNA) mais utilizado e consolidado atualmente. (Lorenz, 2012) A RT-PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase) é o ensaio molecular padrão usado para diagnóstico de doenças virais provenientes de vírus RNA. Uma enzima transcriptase reversa converte o RNA viral em um DNA complementar (cDNA), que servirá de modelo para que a PCR possa prosseguir. A reação de amplificação da região alvo do DNA se dá através de ciclos de aquecimento e resfriamento, alternando entre três temperaturas específicas: primeiramente uma etapa de desnaturação da fita de DNA, com um aumento da temperatura (~95 °C); seguida da etapa de hibridização dos iniciadores em suas regiões alvo, com a diminuição da temperatura (~60 °C) e por último ocorre a

etapa de extensão da fita de DNA, com um novo aumento da temperatura (~72 °C). (Duarte, 2010), (Pianka, et al., 2017).

Essas três etapas de aquecimento e resfriamento, são denominadas um ciclo de PCR e são repetidas inúmeras vezes (em média de 30 a 35 ciclos) usualmente em um equipamento denominado termociclador, que é um equipamento de custo relativamente elevado. Além disso, a PCR é muito susceptível a inibidores e desta forma exige uma etapa de extração e pré-purificação do ácido nucleico. Ainda, ao final da reação de amplificação é necessário uma última etapa de separação e detecção dos fragmentos de DNA amplificados. Todos esses passos descritos corroboram para que a PCR seja uma técnica laboriosa, que consome muito tempo, exige profissionais treinados e ainda seja considerada financeiramente inacessível nos laboratórios de regiões onde os recursos são limitados. (WHO, 2016), (Boon-Teong, et al., 2013), (Sahni, et al., 2013), (Li, et al., 2011), (Parida, et al., 2005). (Pianka, et al., 2017)

Outra modalidade da PCR, a chamada PCR em tempo real (*real time PCR*) ou PCR quantitativa (qPCR) foi descrita pela primeira vez em 1993 por Higuchi e seus colaboradores. (Higuchi, et al., 1993) Trata-se de um método onde o progresso da reação da PCR é monitorado em tempo real. De forma que os dados são coletados ao mesmo tempo em que a reação ocorre e não apenas no ponto final. Deste modo, as reações são caracterizadas pelo ciclo em que a amplificação de um DNA alvo é detectada em vez da quantidade de produto de amplificação de DNA que é acumulado no fim. Esse monitoramento da reação foi possível graças ao desenvolvimento de sondas através das quais é possível fazer a medida da amplificação do DNA alvo por meio de detectores de fluorescência incorporados aos termocicladores. (Heid, et al., 1996) Apesar de bem estabelecida e muito sensível, a qPCR tem custo substancialmente elevado, tanto de instrumentação quanto de reagentes.

1.1.2.2 Métodos Isotérmicos de amplificação

Recentemente, o uso de técnicas de amplificação isotérmica surgiu como ferramenta de diagnóstico molecular promissora para eliminar protocolos complexos e pouco acessíveis como a PCR. Sem a necessidade de ciclos

térmicos, os métodos isotérmicos têm sido desenvolvidos e utilizados para o diagnóstico de doenças infecciosas. Dentre as técnicas isotérmicas, destaca-se aqui a amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos (NASBA), (Wu, et al., 2001), (Jittmittraphap, et al., 2006) a amplificação da polimerase recombinase (RPA), (Wahed, A. A. E., et al., 2015), (Euler, et al., 2015) e a amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP). (Mineiro, et al., 2017), (Yaren, et al., 2017) Dentre as técnicas isotérmicas de amplificação de DNA a LAMP se tornou a mais popular devido a maior facilidade e simplicidade na sua execução (Pianka, et al., 2017), (Notomi, et al., 2000), e é a técnica utilizada neste trabalho para a detecção dos vírus da dengue e zika.

1.1.2.2.1 Amplificação Isotérmica mediada por loop (LAMP)

Dentre os métodos isotérmicos utilizados para diagnóstico de doenças infecciosas, a LAMP é uma técnica que ganha destaque devido ao seu potencial para superar as limitações da PCR. (Notomi, et al., 2000), (Tomita, et al., 2008), (Lanciotti, et al., 1992), (Seah, et al., 1995) Nos últimos anos tem-se observado um crescente aumento nas publicações envolvendo a amplificação isotérmica mediada por *loop*, e apenas no ano de 2018 quase 8000 publicações foram feitas sobre o tema.

A amplificação do ácido nucleico na LAMP ocorre através do deslocamento da fita de DNA, por meio da enzima *Bst* DNA polimerase e de três pares de iniciadores (FIP-*forward inner primer* e BIP- *backward inner primer*, F3 e B3 *outer primers*, LBP e LFP *loop primers*) que são desenhados para reconhecer seis regiões distintas de um gene alvo. A enzima utilizada na LAMP, a DNA polimerase, é uma enzima que apresenta atividade de deslocamento da fita de DNA. A *Bst* DNA Polymerase é a porção da proteína polimerase de DNA de *Bacillus stearothermophilus* que contém a atividade da polimerase 5' → 3' mas não tem atividade de exonuclease 5' → 3'. A reação LAMP ocorre em duas etapas, sendo uma primeira não cíclica cujo o objetivo é a formação de *loops* nas extremidades da fita de DNA, que servirão de ponto de partida para que ocorra a próxima etapa da reação de amplificação, a etapa cíclica.

A etapa não cíclica tem início quando o iniciador FIP hibridiza na região F2c da sequência alvo e assim direciona a enzima para sintetizar uma fita complementar. Em seguida, o iniciador F3 reconhece a sua região alvo F3c e ao

se hibridizar a ela direcional a enzima para iniciar a extensão da fita. Ao passo em que a fita complementar de DNA é sintetizada, ela é deslocada e nesta fita o iniciador BIP irá reconhecer sua região específica B2c e se hibridizará nela. Em seguida B3 irá reconhecer a sua região alvo B3c e provocará o deslocamento da fita sintetizada. Ao final, a fita sintetizada apresentará dois *loops*, um em cada extremidade, como resultado da proximidade das regiões complementares presentes nos iniciadores FIP e BIP, como observa-se na Figura 1.1. (Notomi, et al., 2000)

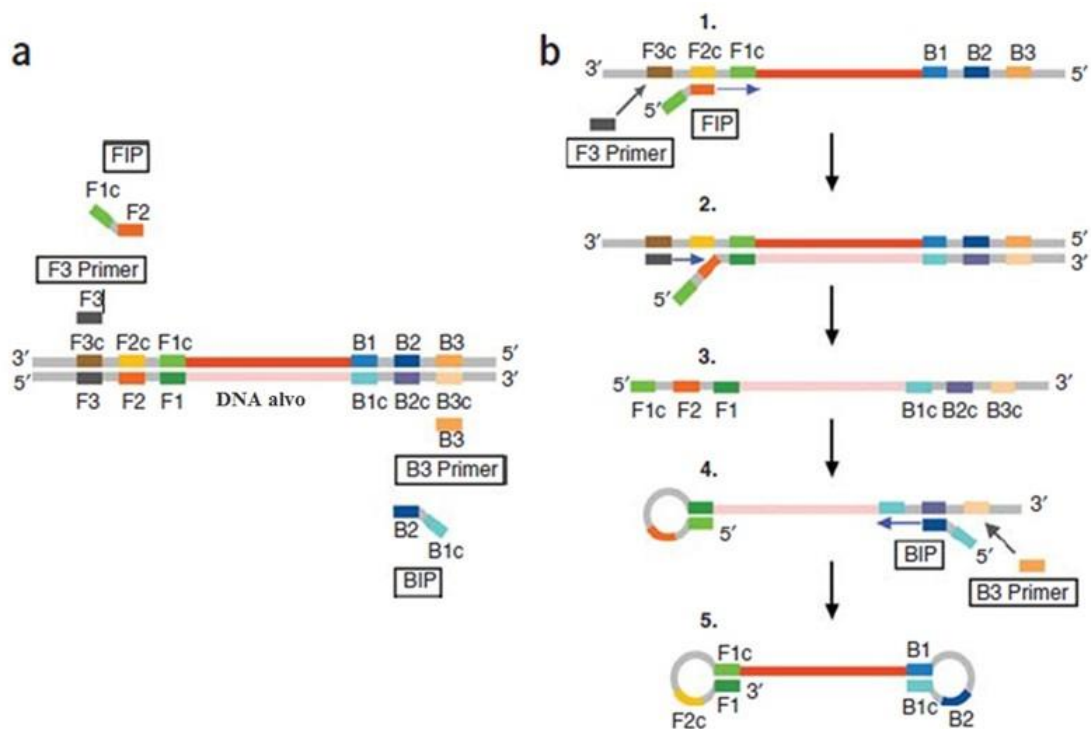


Figura 1.1: Representação esquemática da etapa não cíclica da amplificação isotérmica medida por loop (LAMP). Em a) Desenho das seis regiões distintas da sequência alvo, denominadas, F3c, F2c, F1c, B1, B2 e B3 e desenho dos pares internos, FIP e BIP, e externos, F3 e B3; em b) Início da etapa não-cíclica Adaptado de (Tomita, et al., 2008)

A última etapa da reação, onde atuarão apenas os iniciadores internos, inicia-se quando o iniciador FIP reconhece a região F2c presente na extremidade 3' e direciona a enzima para a síntese da fita complementar. Ao final da síntese, é formado um intermediário chamado haste-laço que promove a auto-ativação da síntese, como é mostrado na Figura 1.2. Após a hibridização e formação do *loop* pela região B1 e B1c, a síntese é iniciada. Ao formar o intermediário haste-

laço, a fita anteriormente sintetizada pelo iniciador FIP é liberada. A fita simples liberada é uma repetição invertida da estrutura de partida, e é nessa fita invertida que o iniciador BIP reconhece a região B2c, esse se hibridiza e sintetiza o DNA formando uma nova fita complementar que apresentará outros haste-laços que são cópias alternadas da sequência alvo, esses poderão formar múltiplas estruturas devido ao deslocamento das fitas complementares sintetizadas pelo iniciadores internos. Esses ciclos são repetidos até que os iniciadores internos sejam totalmente consumidos. (Notomi, et al., 2000)

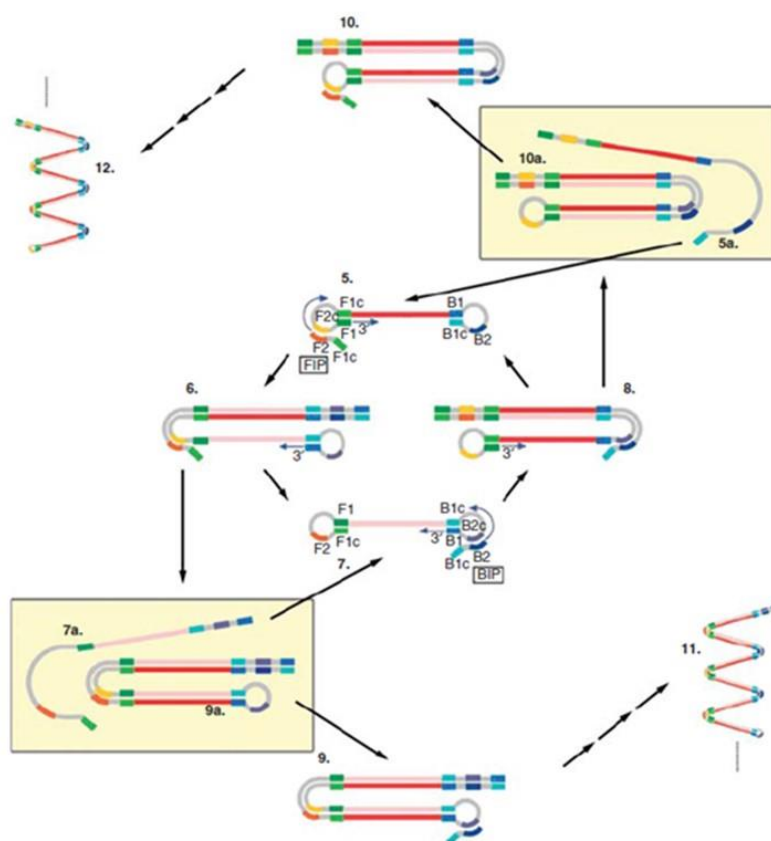


Figura 1.2: Representação esquemática das etapas cíclicas da LAMP. Adaptado de (Tomita, et al., 2008)

A LAMP promove uma repetição alternadamente invertida da sequência alvo, que se dá pelas etapas cíclica e não-cíclica, devido ao deslocamento da fita de DNA. Devido a isso, ao final da reação são produzidos fragmentos amplificados de DNA de tamanhos diferentes, apresentando no gel de agarose um padrão bem diferente da PCR, que apresenta um único tamanho de *amplicon* (fragmento de DNA amplificado). (Notomi, et al., 2000) Além disso, por não ser

fortemente afetada por inibidores presentes em amostras complexas, a LAMP pode ser realizada diretamente em uma variedade de amostras, como por exemplo soro, (Mora-Cárdenas & Marcello, 2017) sangue total, (Mansuy, et al., 2018) urina, (Calvert, et al., 2017) fluido oral (Singh, et al., 2013) e semem (Musso, et al., 2015). Por esses motivos, ela pode ser aplicada em situações e locais de recursos escassos, já que não requer equipamentos sofisticados e nem uma etapa de preparo da amostra. (Herrada, et al., 2018)

Outras vantagens, como alta sensibilidade e especificidade contribuem para o uso de LAMP no diagnóstico molecular. (Notomi, et al., 2000) Além disso, os produtos amplificados na LAMP podem ser detectados visualmente através da turbidez, (Wastling, et al., 2010), (Mori, et al., 2001) fluxo lateral, (Najian, et al., 2016), (Chowdrya, et al., 2014) e através da fluorescência gerada após a adição de um intercalador de DNA. (Le, et al., 2012), (Iwamoto, et al., 2003), (Tomita, et al., 2008)

1.1.3 SISTEMAS ANALÍTICOS MINIATURIZADOS

Há aproximadamente 25 anos surgiram os primeiros relatos na literatura científica acerca dos sistemas de microanálise total (μ TAS), também chamados de laboratórios em um chip (LOC- do inglês *lab on chip*), ou dispositivos microfluídicos. Nos últimos quinze anos, o desenvolvimento desses microdispositivos se intensificou de modo a produzir dispositivos sofisticados, com várias etapas de manipulação e processamento de amostras que são completamente integradas e geralmente automatizadas. (Culbertson, et al., 2014)

As principais vantagens de tais dispositivos, além da automação, é a redução da quantidade de amostras e reagentes utilizados. Outras vantagens são a grande razão área/volume, que colabora para reduzir o tempo de reação, e o alto controle da manipulação de fluidos; que são vantagens desses dispositivos. (Haeberle & Zengerle, 2007) Materiais como papel, (Martinez, et al., 2010) vidro, (Daridon, et al., 2001) polimetilmetacrilato (PMMA), (Liga, et al., 2016) polidimetilsiloxano (PDMS) (Liu, et al., 2018), poliéster (Pe) (Oliveira, et al., 2016), (Souza, et al., 2012) entre outros substratos podem ser utilizados para produção dos dispositivos.

Inicialmente os dispositivos microfluídicos foram bastante utilizados para separações analíticas e no desenvolvimento de elementos funcionais como válvulas e bombas, sendo umas das vantagens mais importantes a integração de múltiplos elementos para a produção de sistemas completos do tipo *sample-in/answer-out*. No entanto, mesmo que nem todos os dispositivos deste tipo sejam necessariamente *sample-in/answer-out*, já são encontrados na literatura diversos microchips que reduzem etapas e permitem o processamento de amostras de forma integrada e automatizada (Culbertson, et al., 2014), (Gan, et al., 2014)

Esses microdispositivos permitem inúmeras aplicações em diversas áreas da ciência, destacando-se aqui as aplicações voltadas para as áreas de análises biológicas e biomédicas, especialmente análise de ácidos nucleicos. (Gan, et al., 2014), (Roux, et al., 2014) Esse foco em aplicações biológicas está relacionado

a capacidade desses dispositivos em manusear com precisão pequenos volumes de materiais (na escala de picolitros), integrar todas as etapas de uma análise e ainda com a possibilidade de realizar a detecção diretamente no microchip. (Culbertson, et al., 2014)

Embora diversos materiais possam ser utilizados para a fabricação dos microdispositivos, este trabalho utilizou um material polimérico (poliéster), que além de ser de baixo custo proporciona a fabricação simples e rápida dos dispositivos.

1.1.3.1 Microdispositivos de poliéster-toner (PeT)

Como alternativa para produção simples e de baixo custo de dispositivos microfluídicos, em 2003 Do Lago e seus colaboradores propuseram uma metodologia para criar um microdispositivo a base de poliéster e toner (PeT). O grupo do Prof. Do Lago utilizou uma impressora a laser para depositar diretamente o toner em uma superfície de poliéster e, em seguida laminar os filmes de poliéster recobertos com toner em uma laminadora de documentos. (Do Lago, et al., 2003) O toner, um pó geralmente usado em impressoras a laser e fotocopiadoras para imprimir textos em papel ou em transparências (poliéster), é composto por uma base polimérica (acrilato e estireno) e óxido de ferro (Do Lago, et al., 2003) ou dióxido de silício e serve quando aquecido como adesivo para vedar o dispositivo. (Gabriel, et al., 2013). O método proposto por Do Lago e seus colaboradores é considerado um dos protocolos mais simples, rápido e de baixo custo para se produzir dispositivos microfluídicos. (Culbertson, et al., 2014) Existem relatos de sucesso na literatura de aplicações dos microchips de poliéster-toner para purificação de proteínas, (Yu, et al., 2008) extração de RNA, (Gimenez, et al., 2017), amplificação de DNA (Duarte, et al., 2011), (de Oliveira, et al., 2017), detecção de ânions inorgânicos presentes em amostras ambientais (Freitas, et al., 2016), preparo e misturação de amostras (Liu, et al., 2005), microrreatores enzimáticos (Liu, et al., 2006), ensaios de fluxo lateral (Souza, et al., 2012) e (Oliveira, et al., 2014) entre outras aplicações.

Um fator limitante no procedimento proposto por Do Lago diz respeito à profundidade do canal, que dependerá da espessura da camada de toner (em torno de 6 μm) depositada pela impressora a laser. Apesar do protocolo

apresentar notadamente grande potencial para o desenvolvimento de dispositivos para aplicações em eletroforese por exemplo, o mesmo não é verdadeiro para a fabricação de dispositivos em que canais e/ou câmaras reacionais mais profundos são necessários como por exemplo para aplicações bioanalíticas, limitando assim o espectro de aplicações desta tecnologia. (Gabriel, et al., 2018)

Em 2011, Duarte e seus colaboradores propuseram uma estratégia para produzir dispositivos de PeT com canais mais profundos. Nessa metodologia, o procedimento descrito por Do Lago é modificado de maneira a produzir dispositivos com câmaras reacionais mais profundas aumentando a quantidade de filmes de poliéster-toner utilizada. Para fabricar os microdispositivos, ambas as faces dos filmes de poliéster são revestidas com camadas de toner nas quais, uma cortadora irá cortar seletivamente o desenho desejado. Em seguida, esses filmes de poliéster-toner intermediários são alinhados com uma base (camada inferior) e um topo (camada superior) de poliéster, sendo que no topo são recortados furos que servem para dar acesso aos reagentes. Após alinhados os filmes podem ser laminados e o dispositivo microfluídico estará pronto para uso. (Duarte, et al., 2011)

Através dessa proposta foi possível produzir canais e/ou câmaras com diferentes profundidades utilizando várias camadas de transparências. Associando a facilidade de produção dos dispositivos, os materiais de baixo custo de fabricação, a possibilidade de integrar diferentes domínios e a possibilidade de automação, os sistemas microfluídicos de análise feitos com poliéster-toner permitem o desenvolvimento de microdispositivos portáteis que podem ser levados aos locais onde se encontram as amostras, apresentando assim grande potencial para diagnósticos em situações de *point-of-care*. (Thompson, et al., 2015), (Duarte, et al., 2011)

1.1.4 INFECÇÕES POR ARBOVÍRUS

Este trabalho propõe a detecção rápida, precisa e individual de dois arbovírus (dengue e zika) visando o diagnóstico precoce dessas infecções. Arbovírus é o nome dado aos vírus cujo genoma geralmente contém um ácido ribonucleico (RNA) e que são transmitidos aos seres humanos através de artrópodes, principalmente mosquitos e carrapatos. Até recentemente, apenas alguns arbovírus haviam causado doenças humanas clinicamente significativas, incluindo alfavírus transmitidos por mosquitos, como chikungunya, e flavivírus, como dengue, zika e Nilo Ocidental. Historicamente, o arbovírus mais relevante é o vírus da febre amarela, que foi a primeira causa viral reconhecida de febre hemorrágica epidêmica mortal. (Fauci & Morens, 2016)

No cenário atual, diante da globalização e consequente aumento da urbanização, viagens internacionais e das mudanças climáticas aumentando o alcance dos mosquitos *Aedes*, a exposição humana a estes mosquitos está em ascensão. Deste modo, as infecções virais transmitidas por mosquitos *Aedes* vem se intensificando em regiões endêmicas e historicamente não expostas a esse vírus. Um exemplo foi a epidemia generalizada de ZIKV nas Américas nos anos de 2015 e 2016. (Campbell, et al., 2015) Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) é estimado que a exposição aos três vírus transmitidos por mosquitos *Aedes*- Zika (ZIKV), Dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV) - provavelmente aumentarão ainda mais no próximo século. (WHO, 2015)

Os Flavivírus, como o vírus da zika (ZIKV) e o vírus da dengue (DENV), são vírus que contêm no genoma uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA). O genoma codifica uma poliproteína que em seguida é processada em sete proteínas não estruturais (NS) e em três proteínas estruturais, como mostrado na Figura 1.3 abaixo.

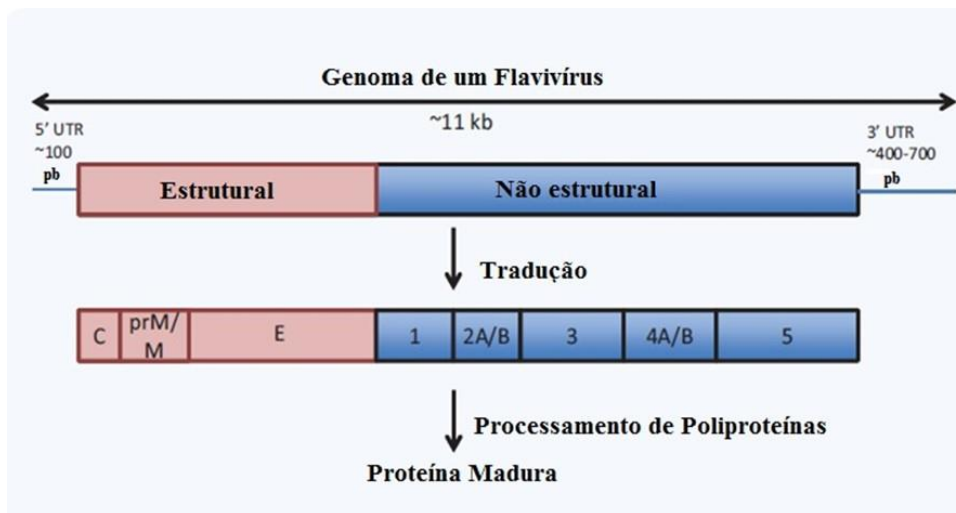


Figura 1.3: Representação do genoma de um Flavivírus. Adaptado de (Pianka, et al., 2017)

Essas infecções virais, como as de dengue, zika e chikungunya, apresentam sobreposição de sintomas clínicos e de distribuição geográfica. Um diagnóstico baseado somente nas informações clínicas se torna bastante comprometido diante dessas semelhanças, necessitando então de ferramentas laboratoriais eficientes para um diagnóstico diferencial, confiável e preciso. Nesse sentido surge a necessidade de métodos diagnósticos que sejam simples de serem realizados, economicamente viáveis, de alta confiabilidade e que permitam que o diagnóstico seja feito no próprio local de necessidade (*point-of-care-tests* POCT). (Pianka, et al., 2017)

1.1.4.1. Dengue

A dengue é uma doença febril, transmitida aos seres humanos através da picada dos mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* que estejam infectados com o vírus e é a principal doença transmitida por mosquitos. (WHO, 2016) Os vírus da dengue (DENV) são partículas virais esféricas cujo genoma consiste em uma fita simples de RNA de polaridade positiva e aproximadamente 11 kilobases, (Poloni, et al., 2016)

Até então, eram conhecidos apenas quatro sorotipos do vírus da dengue, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, no entanto em 2013 o sorotipo 5 (DENV-5) do vírus foi identificado por Dennis Normile. (Normile, 2013) Cada um desses sorotipos apresenta uma resposta imune diferente, entretanto são

geneticamente semelhantes compartilhando aproximadamente 65% de sua sequência genômica. (Darwish, et al., 2017) A infecção por um sorotipo do vírus da dengue fornecerá imunidade àquele sorotipo específico, mas não para os demais. Além disso, é bem comum que também ocorra reações cruzadas, podendo ter consequências graves, com casos extremos levando à morte. (WHO, 2016)

Nos últimos 40 anos, a incidência e a distribuição geográfica dos casos de dengue aumentaram significativamente em muitos países, particularmente naqueles com climas tropicais e subtropicais. (Racloz, et al., 2012) A dengue atingiu um alcance global nas últimas décadas. O DENV é especialmente prevalente na América Central e do Sul e no sul e sudeste da Ásia. Estima-se que haja 390 milhões de infecções por dengue por ano, das quais aproximadamente 96 milhões são sintomáticas. (Bhatt, et al., 2013) As infecções secundárias com um sorotipo diferente estão ligadas ao aumento do risco de febre hemorrágica com potencial risco de morte se os pacientes não receberem diagnóstico e cuidados adequados. (Pianka, et al., 2017)

1.1.4.2 Zika

O zika vírus (ZIKV) é um vírus cujo ácido nucleico é um RNA de sentido positivo com um genoma contendo 10,7 kilobases (kb). Pertencente à família *Flaviviridae*, o arbovírus foi isolado pela primeira vez em 1947 em um macaco-Rhesus na floresta Zika na Uganda e pode ser transmitido através dos mosquitos do gênero *Aedes*. A infecção em seres humanos foi reportada pela primeira vez na Nigéria, (NMacNamara, 1954) entretanto, até 2007, foram relatados apenas casos esporádicos de infecção em seres humanos associados ao ZIKV. (Araujo, et al., 2016)

Em 2015, o ZIKV foi detectado no Brasil pela primeira vez. Em seguida, novos casos foram reportados em outros países da América do Sul e na América Central. (Faria, et al., 2016). Esse surto ocorrido em 2015 revelou uma ligação entre o ZIKV e casos mais graves de problemas neurológicos (microcefalia) em recém-nascidos de mães infectadas com o vírus durante a gravidez, (Calvert, et al., 2017); (Song, et al., 2016) anormalidades fetais (como microcefalia), cegueira congênita e síndrome de Guillain-Barré (Mora-Cárdenas & Marcello,

2017). A transmissão do vírus pode também ocorrer por via sexual, possivelmente por transfusão de sangue e da mãe para o bebê por transmissão transplacentária ou durante o próprio processo de parto (M, et al., 2014), (Tian, et al., 2016), (Calvert, et al., 2017), (Song, et al., 2016), (Musso, 2015)

O ZIKV pode ser detectado no soro (Mora-Cárdenas & Marcello, 2017); (Calvert, et al., 2017), saliva (Musso, et al., 2015b); (Barzon, et al., 2018) plasma (Barzon, et al., 2018); (Mansuy, et al., 2018) urina (Mora-Cárdenas & Marcello, 2017); (Calvert, et al., 2017); (Barzon, et al., 2018); (Mansuy, et al., 2018) sangue (Mansuy, et al., 2018); (Matheus, et al., 2017) secreções vaginais (Murray, et al., 2017) e em outros tecidos por métodos diretos, como isolamento de vírus, detecção genômica e antigênica, ou por métodos indiretos, como os testes sorológicos. (Winkler & Peterson, 2017)

A maioria dos casos de infecção pelo ZIKV não apresentam sintomas (em 80% dos casos). Em casos sintomáticos, os sintomas não mostram especificidade para infecção pelo ZIKV, mas sinais como febre, dor nas articulações, mialgia e cefaleia que são comuns a outras infecções por arbovírus como as com dengue e chikungunya, por exemplo. (Musso, et al., 2015a), (Winkler & Peterson, 2017), (Yaren, 2017)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcon, S. et al., 2002. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 376–381.

Araujo, A. Q. C., Silva, M. T. T. & Araujo, A. P. Q. C., 2016. Zika virus-associated neurological disorders: a review. *Brain A Journal of Neurology* , Volume 139, p. 2122–2130 .

Barzon, L. et al., 2018. Virus and Antibody Dynamics in Travelers With Acute Zika Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 66(8), p. 1173–1180.

Bhatt, S. et al., 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* , Volume 496, p. 504–507.

Boon-Teong, T. et al., 2013. Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *BMC Infectious Diseases*, pp. 1-9.

Calvert, A. E. et al., 2017. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS ONE*, p. e0185340..

Campbell, L. P. et al., 2015. Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1665), pp. 1-9.

Chowdrya, V. K. et al., 2014. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick for rapid and simple detection of classical swine fever virus in the field. *Journal of Virological Methods* , p. 14– 18.

Culbertson, C. T. et al., 2014. Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Biological Applications. *Analytical Chemistry*, p. 95–118.

Daridon, A. et al., 2001. Multi-layer microfluidic glass chips for microanalytical applications. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 371(2), p. 261–269.

Darwish, N. T., Sekaran, S. D. & Khor, S. M., 2017. Point-of-care tests: A review of advances in the emerging diagnostic. *Sensors and Actuators B: Chemical*, p. 3316–3331.

de Oliveira, K. G. et al., 2017. Loop-mediated isothermal amplification in disposable polyester-toner microdevices. *Analytical Biochemistry*, pp. 70-77.

Do Lago, C. L., Silva, H. D. T. d., Neves, C. A. & Brito-Neto, J. G. A., 2003. A Dry Process for Production of Microfluidic Devices Based on the Lamination of Laser-Printed Polyester Films. *Analytical Chemistry*, pp. 3853-3858.

Duarte, G. R. M. et al., 2011. Dynamic Solid Phase DNA Extraction and PCR Amplification in Polyester-Toner Based Microchip. *Analytical Chemistry*, p. 5182–5189.

Duarte, G. R. M., 2010. Análises Genéticas em Sistemas Microfabricados. *Doutorado em Química, Instituto de Química de São Carlos USP*.

Euler, M. et al., 2015. Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Diagnostics of Dengue Infection. *Journal of Clinical Virology*, pp. 1-17.

Faria, N. R. et al., 2016. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *SCIENCE*, 352(6283), pp. 345-349.

Fauci, A. S. & Morens, D. M., 2016. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. *New England Journal of Medicine*, 374(7), pp. 601-604.

Faye, O. et al., 2008. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *Journal of Clinical Virology*, 43(1), pp. 96-101.

Freitas, C. B., Moreira, R. . C., Tavares, M. G. d. O. & Coltro, W. K. T., 2016. Monitoring of nitrite, nitrate, chloride and sulfate in environmental samples using electrophoresis microchips coupled with contactless conductivity detection. *Talanta*, Volume 147, pp. 335-341.

Gabriel, E. F. M., Lucca, B. G., Duarte, G. R. M. & Coltro, W. K. T., 2018. Recent advances in toner-based microfluidic devices for bioanalytical applications. *Analytical Methods* , p. 2943–3112.

Gabriel, E. F. M. et al., 2013. Characterization of microchip electrophoresis devices fabricated by direct-printing process with colored toner. *Electrophoresis* , 34(15), p. 2169–2176.

Gan, W. et al., 2014. A filter paper-based microdevice for low-cost, rapid, and automated DNA extraction and amplification from diverse sample types. *Lab Chip*, pp. 3719-3728.

Gimenez, T. D. et al., 2017. Dynamic Solid-Phase RNA Extraction from a Biological Sample in a Polyester-Toner Based Microchip. *Analytical Methods*, pp. 1-20.

Guzman, M. G. et al., 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, p. S7–S16.

Haeberle, S. & Zengerle, R., 2007. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab on a Chip*, 7(9), p. 1094–1110.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. . J. & Williams, P. M., 1996. Real Time Quantitative PCR. *GENOME METHODS*, pp. 986-994.

Herrada, C. A., Kabir, M. A., Altamirano, R. & Asghar, W., 2018. Advances in Diagnostic Methods for Zika Virus Infection. *Journal of Medical Devices*, pp. 040802-1.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R., 1993. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature*, p. 1026–1030.

Igarashi, A., 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses. *Journal of General Virology*, pp. 531-544.

Iwamoto, T., Sonobe, T. & Hayashi, K., 2003. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in Sputum Samples. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 41(6), p. 2616–2622.

Jittmittraphap, A. et al., 2006. RAPID DETECTION OF DENGUE VIRAL RNA IN MOSQUITOES BY NUCLEIC ACID-SEQUENCE BASED AMPLIFICATION

(NASBA). *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, pp. 1117-1124.

Lanciotti, R. S. et al., 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction.. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 545-551.

Le, T. H., Nguyen, N. . T. B., Truong, N. H. & De, N. V., 2012. Development of Mitochondrial Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of the Small Liver Fluke *Opisthorchis viverrini* (Opisthorchiidae; Trematoda; Platyhelminthes). *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), p. 1178–1184.

Libraty, D. H. et al., 2002. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue. *The Journal of Infectious Diseases*, pp. 1165-1168.

Liga, A., Morton, J. A. S. & Kersaudy-Kerhoas, M., 2016. Safe and cost-effective rapid-prototyping of multilayer PMMA microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics*, 16(4), pp. 1-12.

Li, S. et al., 2011. Simultaneous detection and differentiation of dengue virus serotypes 1-4, Japanese encephalitis virus, and West Nile virus by a combined reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Virology*, pp. 1-9.

Liu, A.-l.et al., 2005. Rapid method for design and fabrication of passive micromixers in microfluidic devices using a direct-printing process. *Lab on a chip*, 5(9), pp. 974-978 .

Liu, A.-L.et al., 2006. Off-line form of the Michaelis–Menten equation for studying the reaction kinetics in a polymer microchip integrated with enzyme microreactor. *Lab on a chip*, Volume 6, pp. 811-818 .

Liu, B. et al., 2018. Hermetic encapsulation of negative-pressure-driven PDMS microfluidic devices using paraffin wax and glass. *Microsystem Technologies*, 24(4), p. 2035–2043.

- Lorenz, T. C., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments* , 63(e3998), pp. 1-14.
- Mansuy, J.-M. et al., 2018. Detection of Zika, dengue and chikungunya viruses using single-reaction multiplex real-time RT-PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* , 92(4), pp. 284-287.
- Mansuy, J.-M. et al., 2018. Detection of Zika, dengue and chikungunya viruses using single-reaction multiplex real-time RT-PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, p. 284–287.
- Mardekian, S. K. & Roberts, A. . L., 2015. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *BioMed Research International*, pp. 1-8.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M. & Carrilho, E., 2010. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry* , 82(1), p. 3–10.
- Matheus, S. et al., 2017. Zika Virus Persistence and Higher Viral Loads in Cutaneous Capillaries Than in Venous Blood. *Emerging Infectious Diseases* , 23(11), p. 1910–1911.
- M, B. et al., 2014. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*, p. 20751.
- Mineiro, G. A. S. et al., 2017. Sequence-specific validation of LAMP amplicons in real-time optomagnetic detection of Dengue serotype 2 synthetic DNA. *Analyst*, pp. 3441-3450.
- Mora-Cárdenas, E. & Marcello, A., 2017. Switch-on the LAMP to spot Zika. *Annals of Translational Medicine*, pp. 1-4.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. & Notomi, T., 2001. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, p. 150–154.

Mullis, K. et al., 1986. Genetic Diagnosis- Development of New Methodologies: Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology*, Volume 51, pp. 263-273.

Murray, K. O. et al., 2017. Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood. *Emerging Infectious Diseases*, 23(1), p. 99–101.

Musso, D., 2015. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*, pp. 359-361.

Musso, D., Cao-Lormeau, V. M. & Gubler, D. . J., 2015a. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya?. *The Lancet* , 386(9990), pp. 243-244.

Musso, D., Robina, E. & Robin, E., 2015. Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology*, pp. 53-55.

Musso, D. et al., 2015b. Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology*, Volume 68, pp. 53-55.

Najian, A. N. et al., 2016. Development of multiplex loop mediated isothermal amplification (m-LAMP) label-based gold nanoparticles lateral flow dipstick biosensor for detection of pathogenic *Leptospira*. *Analytica Chimica Acta*, pp. 142-148.

NMacNamara, F., 1954. Zika virus : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(2), pp. 139-145.

Normile, D., 2013. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. *Science* , 342(6157), p. 415.

Notomi, T. et al., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, pp. i-vii.

Oliveira, K. A. et al., 2016. Dengue diagnosis on laser printed microzones using smartphone-based detection and multivariate image analysis. *Analytical Methods*, pp. 6506-6511.

Oliveira, K. A. et al., 2014. Kinetic study of glucose oxidase on microfluidic toner-based analytical devices for clinical diagnostics with image-based detection. *Analytical Methods*, 6(14), pp. 4995-5000 .

Parida, M. et al., 2005. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Journal of Clinical Microbiology* , p. 2895–2903.

Peeling, R. W. et al., 2010. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 8, p. S30–S37.

Pianka, K., Rothman, A. & Tripathi, A., 2017. Status of diagnostics for three arbovirus infections in resource-limited settings. *TECHNOLOGY*, 5(3), pp. 115-128.

Poloni, T. R. et al., 2016. High Prevalence of Clinically Unsuspected Dengue. *Journal of Medical Virology*, p. 1711–1719.

Racloz, V., Ramsey, R., Tong, S. & Hu, W., 2012. Surveillance of Dengue Fever Virus: A Review of Epidemiological Models and Early Warning Systems. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, p. e1648.

Roux, D. L. et al., 2014. An integrated sample-in-answer-out microfluidic chip for rapid human identification by STR analysis. *Lab Chip*, pp. 4415-4425.

Sahni, B. A. K. et al., 2013. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for diagnosis of dengue. *Medical Journal Armed Forces India*, pp. 246-253.

Seah, C. L., Chow, V. T., Tan, H. C. & Can, Y. . C., 1995. Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. *Journal of Virological Methods* , pp. 193-200.

Singh, R., Bhatt, R. & Valecha, N., 2013. Rapid detection of Plasmodium vivax in saliva and blood using loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Journal of Infection* , pp. 245-247.

Song, J. et al., 2016. Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. *Analytical Chemistry*, pp. 1-18.

Souza, F. R. d., Alves, . G. L. & Coltro, W. K. T., 2012. Capillary-Driven Toner-Based Microfluidic Devices for Clinical Diagnostics with Colorimetric Detection. *Analytical Chemistry*, Volume 84, p. 9002–9007.

Tesh, R. B., 1979. A Method for the Isolation and Identification of Dengue Viruses, using Mosquito Cell Cultures. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 1053 - 1059.

Thompson, B. L. et al., 2015. Inexpensive, rapid prototyping of microfluidic devices using overhead transparencies and a laser print, cut and laminate fabrication method. *Nature Protocols*, 10(14), p. 875–886.

Tian, B. et al., 2016. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. *Biosensors and Bioelectronics* , p. 420–425 .

Tomita, N., Mori, . Y., Kanda, H. & Notomi, T., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*.

Valdez, S. J. J. et al., 2012. Evaluation of the SD Dengue Duo diagnosis system for detection of NS1 protein and IgM and IgG dengue antibodies. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, pp. 27-34.

Wahed, A. A. E., et al., 2015. Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Diagnostics of Dengue Infection. *Plos One*, pp. 1-17.

Wastling, S. L., Picozzi, K., Kakembo, A. S. L. & Welburn, S. . C., 2010. LAMP for Human African Trypanosomiasis: A Comparative Study of Detection Formats. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, pp. 1-6.

WHO, W. H. O., 2015. *Climate change and health*. s.l.:s.n.

WHO, W. H. O., 2016. *Dengue: Guidelines for Patient Care in the Region of the Americas*, Washington DC: Regional Office of the World Health Organization.

Winkler, C. W. & Peterson, K. E., 2017. Using immunocompromised mice to identify mechanisms of Zika virus transmission and pathogenesis. *Immunology*, Volume 153, p. 443–454.

Wu, S.-J.L. et al., 2001. Detection of Dengue Viral RNA Using a Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2794–2798.

Yaren, O. et al., 2017. Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. *BM Infectious Diseases*, 17(293), pp. 1-13.

Yu, H. et al., 2008 . A simple, disposable microfluidic device for rapid protein concentration and purification via direct-printing. *Lab Chip*, pp. 1496-1501.

CAPÍTULO 2-DETECÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE

2.1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico preciso, confiável, diferencial e na fase inicial (fase aguda) da infecção pelo vírus da dengue (DENV) é fundamental diante do risco de agravamentos da doença com potencial risco de morte. Os sintomas de cada paciente pode variar muito indo de uma febre leve até uma febre hemorrágica. Muitos pacientes que apresentam sintomas leves acabam não recebendo tratamento adequado e por muitas vezes não recebem o diagnóstico de infecção por DENV. Outro fator agravante é a infecção secundária com um sorotipo do DENV diferente da primeira infecção, aumentando ainda mais as complicações e os riscos de morte. (Patterson, et al., 2016)

A infecção é geralmente dividida em três fases: a fase febril, a fase crítica e a fase de recuperação. A primeira fase, a febril, dura em média de 2 a 7 dias; sendo que é neste estágio que o paciente irá apresentar os sintomas não específicos, como: febre, erupção cutânea, mialgia e artralgia. Nessa etapa, o tratamento da infecção é realizado da mesma maneira que é feito para outras infecções de arbovírus como zika e chikungunya. A maioria dos pacientes se recuperam na fase febril e apenas 5% passam para o próximo estágio da infecção, a fase crítica. A segunda fase da infecção, dura por volta de 1 a 2 dias e é caracterizado pelo retorno às temperaturas normais e evidência de hemorragia e vazamento de plasma, levando à perda de volume plasmático, que se manifesta clinicamente desde edema leve até sintomas mais graves com risco de morte. Um tratamento antecipado e/ou durante a fase crítica de maneira adequada (com uso de fluidos e gerenciamento de sintomas por exemplo) pode reduzir os riscos de complicações graves. Dados apontam que um tratamento adequado pode reduzir as taxas de mortalidade dos casos graves de 20% para 1%. (JavierCarod-Artal, et al., 2013), (WHO, 2016)

Nesse sentido, diagnosticar precocemente pacientes com infecções pelo DENV permite o gerenciamento da infecção viral ainda em sua fase inicial. Possibilitando que os profissionais possam tratar de maneira adequada o possível início da fase crítica, minimizando a necessidade de atendimento de emergência e atingindo resultados mais eficientes. Esta detecção precoce é

especialmente importante em locais onde os recursos são escassos. (Ranjit & Kissoon, 2011), (Elling, et al., 2013)

Portanto, este trabalho propõe o desenvolvimento de uma metodologia para o diagnóstico preciso e precoce da infecção causada pelo vírus da dengue, através da amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) de modo que a metodologia apresentada tenha potencial para aplicações no *point-of-care*, tanto para o diagnóstico clínico quanto para estudos e controle epidemiológicos.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é detectar o vírus da dengue em amostras de soro de pacientes infectados, por transcrição reversa seguida da amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (RT-LAMP) em um microdispositivo descartável e de baixo custo de poliéster-toner (PeT) para aplicação em situações de *point-of care*.

2.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições experimentais para detecção do vírus da dengue nos microdispositivos de poliéster-toner.
- Realizar a detecção do vírus da dengue (DENV-4) diretamente em amostras complexas, isto é, sem a necessidade da etapa prévia de pré-purificação do ácido nucleico.
- Separar os fragmentos amplificados pela RT-LAMP por eletroforese em gel de agarose.
- Realizar a detecção visual dos produtos amplificados diretamente nos microdispositivos utilizando um intercalador de DNA (SybrGreen I).
- Avaliar o limite de detecção da reação nos dispositivos microfluídicos.

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.3.1 Materiais, reagentes e soluções

A água padrão biologia molecular (livre de DNase, RNase e Protease), o etanol, hidrocloreto de Guanidina e o SYBR Green I foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO). PoweUp™ SYBR® foi obtida junto à Applied Biosystems, (Austin City, USA). A GoTaq® Green Master Mix, contendo a enzima Taq DNA polimerase, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's), o reagente ditioneitol (DTT), as enzimas SuperScript™ III *Reverse Transcriptase* e RNase Out foram obtidos juntos à Invitrogen/Life Technologies (Foster City, CA). O padrão de tamanhos de DNA *1000 bp DNA ladder* foi adquirido junto à Applied Biological Materials Inc. (Viking Way, Canadá). Albumina de soro bovina (BSA) foi obtida junto à Amersham/GE Healthcare. A proteinase K (20 mg mL⁻¹) foi obtida da Qiagen (Valência, CA). Os reagentes Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) e etilenodiaminotetracético (EDTA) foram obtidos junto à Vetec/Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Triton X-100 foi adquirido junto à Usb Corporation (Cleveland, OH). Os iniciadores foram obtidos da IDT (San Diego, CA). A enzima *Bst* DNA polimerase 2.0, *Bst* DNA polimerase 3.0 e sulfato de magnésio (MgSO₄) foram adquiridos junto à New England Biolabs (Ipswich, MA). Os filmes de poliéster (transparência) foram adquiridos da 3 M, modelo CG 5000 (Austin, TX) e Multilaser, modelo InkJet film (São Paulo, SP).

2.3.2. Amostras de pacientes infectados

As amostras foram obtidas de pacientes com infecções confirmadas pelo DENV-4 durante a epidemia no Brasil em 2013. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Materno Infantil, com protocolo nº 17/2012, e pelo Setor de Ensino e Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia, que autorizou o estudo nas unidades públicas de saúde. Os casos de infecção com DENV-4 foram confirmados previamente nas amostras por RT-PCR. Todas as experiências foram realizadas em conformidade com as diretrizes exigidas nacionalmente, seguindo as resoluções CNS 466/12 e CNS 441/11, e em conformidade com as diretrizes institucionais.

2.3.3 Extração do ácido nucleico, síntese do cDNA e qPCR

Para a quantificação da carga viral nas amostras reais, o RNA das amostras de soro dos pacientes infectados com o DENV foi extraído por extração dinâmica de RNA em fase sólida (dSPE). (Gimenez, et al., 2017) O RNA foi eluído em água livre de RNase e armazenado a -80 ° C. A transcrição reversa do RNA viral a DNA complementar (cDNA) foi feita usando um iniciador específico R (5'-TCCACCTGAGACTCCTTCCA-3') e com a enzima Transcriptase Reversa SuperScript® III. A reação de transcrição reversa foi realizada a 48 °C por 1 h. O cDNA assim obtido foi utilizado como molde para a PCR em tempo real (qPCR). PoweUp™ SYBR® Master Mix foi utilizado em todas as qPCRs. Cada reação foi feita com 40 nM de iniciador direto (R: 5'-TCCACCTGAGACTCCTTCCA-3') e 40 nM de iniciador reverso (F: 5'-TTGTCCTAATGATGCTAGTCG-3') num volume final de 20 µL. As misturas de PCR foram incubadas a 95 °C durante 10 min e 40 ciclos de 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 min utilizando o sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems Life. Foi feita uma diluição seriada dos fragmentos do gene gBlock® (5'-TTGTCCTAATGATGCACGTGGCCGCCTACGGAATGCGATGCGTAGGGGTGGGAACAGAGACTTTGTGGAAGGAGTCTCAGGTGGA-3') para gerar uma curva padrão (SC) para quantificação absoluta (20 a 2 x 10⁴ cópias de RNA viral) e obtenção do ponto CT do inglês Cycle threshold - Limiar da fase exponencial - denominado na literatura como o número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável. (Heid, et al., 1996) Os dados obtidos pela PCR em tempo real foram analisados usando o sistema StepOnePlus™ de Applied Biosystems.

2.3.4 Fabricação dos microdispositivos de PeT

Os microchips PeT foram fabricados usando um protocolo de impressão, corte e laminação (PCL) já anteriormente descrito. (Duarte, et al., 2011) As camadas inferior e superior do microdispositivo são apenas filmes de poliéster, sendo que no filme superior há furos pré-cortados que servem para dar acesso para a câmara reacional. As camadas intermediadas são folhas de poliéster recobertas com toner em ambos os lados usando uma impressora a laser (HP

laser Jet P4014n). O *design* da câmara foi desenhado usando o software CorelDraw 11.0, e a câmara foi criada cortando a microcâmara com uma cortadora a laser CO₂ de 50 watts (Red Sail Laser/M550). A microcâmara foi projetada para ter 7 mm de comprimento, 2 mm de largura e 350 µm de profundidade, com capacidade de volume interno de 5 µL. As camadas inferior, superior e intermediárias foram alinhadas e laminadas em conjunto utilizando uma laminadora (230c-A4) operando a 160 °C, como mostrado a seguir na Figura 2.1.

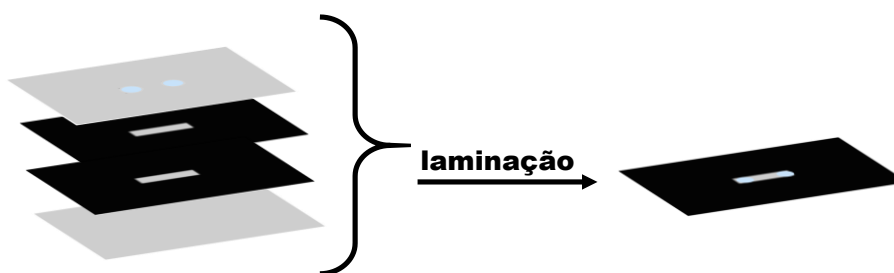


Figura 2.1: Representação das etapas de fabricação dos microdispositivos de poliéster-toner.

2.3.5 Amplificação do RNA do vírus da dengue por RT- LAMP no microchip de PeT

As sequências de iniciadores usados para RT-LAMP na detecção de DENV-4, que foi descrita por Hu e seus colaboradores (Hu, et al., 2015) são mostradas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Sequências de iniciadores desenhados para o DENV-4 usados na RT-LAMP

Iniciador	5' → 3'
F3	GCTCCTTTCGAGAGTGAAG
B3	AGTACAGCTTCCTCCTGG
FIP	CGTTATTGGCGGAGCTACAGGGAGGCTATTGAAGTCA GGC
BIP	GGAGGCGTTAAATTCCCAGGGGTCTCCTCTAACCGCTA GT

LFP	CAGCACGGTTTGCTCAAG
LBP	CTGTACGCGTGGCATATTG

A mistura reacional para RT-LAMP com 5 μL de volume final foi preparada em microtubo com as seguintes concentrações: 0,1 μM de cada iniciador externo (F3 e B3); 1,6 μM de cada iniciador interno (FIP e BIP); 0,8 μM de cada iniciador de *loop* (LFP e LBP); MgSO_4 6 mM; 1,4 mM de dNTP; 0,24 mg mL^{-1} de BSA; 0,96 U μL^{-1} de Bst 2.0 ou 0,64 U μL^{-1} de Bst DNA polimerase 3.0; 0,5 μL de tampão de amplificação isotérmica 10x (Tris-HCl 20 mM, KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, MgSO_4 2 mM, Triton X-100 a 0,1%) e quantidades variáveis de amostra de RNA ou soro de pacientes infectados. Em reações usando *Bst* 2.0, a adição de 0,024 mM DTT, 1,6 U μL^{-1} SuperScript Reverse Transcriptase™ III, 0,32 U μL^{-1} RNase OUT™ foi necessária. Antes da reação, as microcâmaras foram passivadas com BSA (5,0 mg mL^{-1}), como descrito anteriormente. (de Oliveira, et al., 2017)

Após a passivação, a câmara foi preenchida por força capilar com aproximadamente 5 μL da solução da mistura reacional. A evaporação da solução foi impedida cobrindo ambos os reservatórios com óleo mineral. A reação contendo o alvo e a reação negativa (ausência de RNA do vírus da dengue) foram colocados em um termobloco (Major Science, Saratoga, CA) a 72 °C por 15 min, seguido de aquecimento a 80 °C por 2 min para desativação da enzima. No final do tempo de incubação, ou a solução foi removida do microchip com o auxílio de uma micropipeta para realizar a eletroforese em gel ou foi adicionado 0,5 μL do intercalador fluorescente de DNA- SYBR Green I- (1:10) para detecção visual diretamente no microdispositivo, como mostrado na esquema da Figura 2.2.

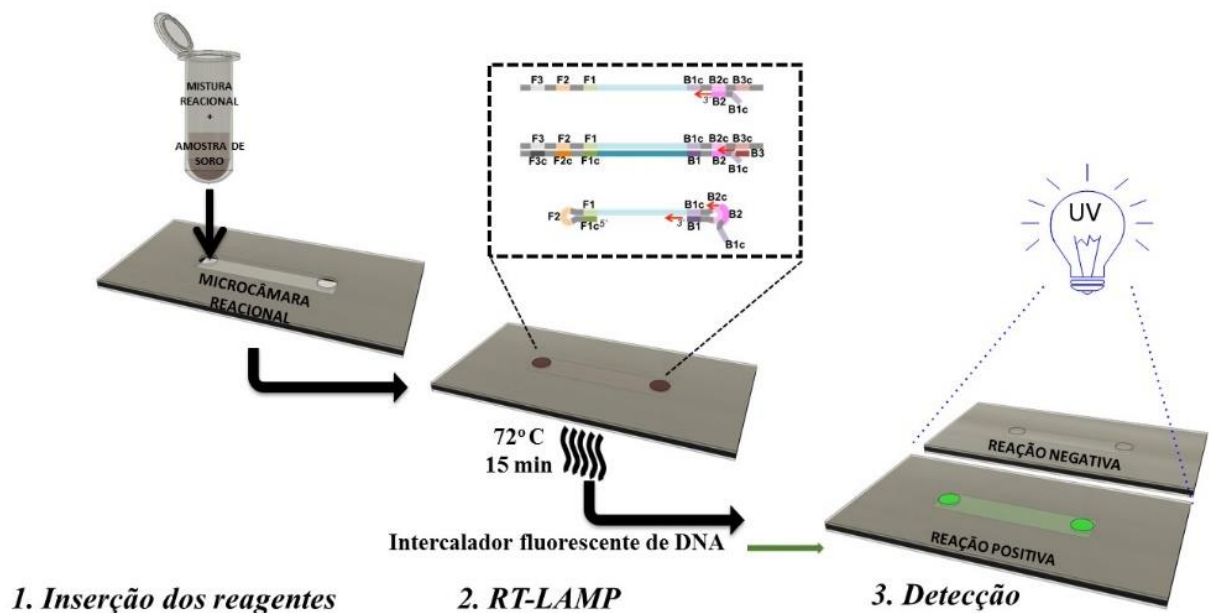


Figura 2.2. Ilustração esquemática das principais etapas de amplificação e detecção do DENV por RT-LAMP no microdispositivo PeT. Adaptado de (Mendes, et al., 2019)

2.3.6 Análise dos fragmentos amplificados por RT-LAMP em gel de agarose

Para a detecção *off-chip*, a eletroforese em gel utilizando gel de agarose a 2% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) a 0,5% separou o DNA amplificado. A corrida eletroforética foi realizada em 0,5% de tampão TBE com condições de potencial de 90 V, variando de 30 a 115 minutos. Após o tempo da corrida eletroforética, as bandas de DNA foram visualizadas através de um transiluminador UV acoplado a um sistema de fotodocumentação (GE Healthcare LifeSciences).

2.3.7 Detecção Visual

Para a detecção direta no microchip, 0,5 µL de SYBR Green I (1:10) foi adicionado diretamente à microcâmara no final da reação. A câmara de reação foi exposta a uma iluminação de lâmpada UV (320 nm) e as imagens foram capturadas com um smartphone.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um trabalho anterior do nosso grupo demonstrou pela primeira vez que os dispositivos PeT podem ser usados para amplificação de DNA por LAMP. (de Oliveira, et al., 2017) De Oliveira e colaboradores demonstraram a amplificação do gene *malB* do DNA da *E. coli* com alta sensibilidade nos dispositivos descartáveis de PeT. Neste mesmo trabalho De Oliveira demonstrou a necessidade de passivar as superfícies internas da câmara reacional para evitar a adsorção de reagentes da LAMP na superfície da microcâmara. Os melhores resultados de Oliveira e colaboradores (de Oliveira, et al., 2017) foram obtidos através da passivação prévia com BSA na concentração de $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$. O mesmo estudo também observou a importância de controlar a razão A/V para melhorar a eficiência da reação de amplificação. Os resultados mostraram que a melhor relação A/V foi de $6 \text{ mm}^2 \mu\text{L}^{-1}$ (dimensões do canal: 7 mm de comprimento, 2 mm de largura e 0,35 mm de profundidade). A câmara reacional nestas dimensões tem uma capacidade de 5 μL . Em relação ao microdispositivo, as dimensões da câmara reacional, a razão A/V e a passivação anteriormente otimizados no trabalho de Oliveira e colaboradores (de Oliveira, et al., 2017) foram mantidas no presente trabalho. Aqui, o método anteriormente descrito para detecção de DNA através da LAMP foi adaptado pela primeira vez para um teste de RT-LAMP para detecção de RNA viral no microchip de PeT usando amostras reais de soro de pacientes infectados com DENV-4. O diagnóstico molecular alternativo para detecção de patógenos contendo RNA em amostras biológicas tem importância crucial para a saúde pública, pois existem numerosos patógenos cujos genomas consistem em uma fita simples de RNA, a exemplo dos vírus da dengue (Parida, et al., 2005), zika (Tian, et al., 2016), influenza (Chen, et al., 2008) e HIV (Curtis, et al., 2008). O ensaio utilizando amostras que contém RNA é mais complicado que o feito para amostras de DNA porque o RNA apresenta estabilidade inferior ao DNA. Apesar dos desafios da análise feita com o RNA, nossos resultados mostraram que o RNA foi compatível com substratos usados na fabricação de microchips, e que o RNA não foi degradado por RNases. Além disso, o diagnóstico molecular envolvendo amplificação de DNA a partir de uma amostra de RNA requer a etapa de transcrição reversa para converter o RNA em cDNA. Neste trabalho, realizamos a conversão de RNA a

cDNA e a amplificação do DNA em uma única etapa, através do uso de uma enzima *Bst* que possui atividade de transcrição reversa, a *Bst* 3.0.

2.4.1 Comparação entre as enzimas *Bst* 2.0 e *Bst* 3.0

Atualmente existem diferentes versões da *Bst DNA polimerase*, como a *Bst* 2.0 e a *Bst* 3.0, por exemplo. Inicialmente, os experimentos deste trabalho foram feitos usando a versão 2.0. A enzima *Bst* 2.0 apresenta uma velocidade de amplificação, rendimento, tolerância a sais e termoestabilidade melhorados em comparação com a *Bst DNA polimerase* tipo selvagem. A *Bst* 2.0 foi desenvolvida para reações de LAMP e pode ser usada para reações RT-LAMP, desde que uma enzima transcriptase reversa seja adicionada ao meio reacional. A detecção de alvos de RNA é realizada pela simples adição de uma enzima transcriptase reversa à reação da LAMP. Outra versão da *Bst* desenvolvida para RT-LAMP, *Bst* 3.0, apresenta melhorias na velocidade de amplificação, tolerância a inibidores, termoestabilidade e incorporação de dNTP. A *Bst* 3.0 também exibe uma atividade de transcriptase reversa significativamente maior que a versão anterior e pode ser usada diretamente para reações de RT-LAMP como uma enzima única.

Desta forma, como o vírus da dengue é um vírus de RNA, o uso da *Bst* 2.0 requer uma enzima transcriptase extra na mistura reacional. Quando a enzima foi alterada para a *Bst* 3.0, essa adição não foi mais necessária. Os experimentos mostraram que a concentração de *Bst* 3.0 necessária para produzir quantidades detectáveis de fragmentos de DNA em gel de agarose ou através da detecção visual pode ser reduzida de 0,96 U μL^{-1} para 0,64 U μL^{-1} , indicando que uma menor concentração desta enzima é suficiente, devido à sua forte atividade de deslocamento da fita. Além disso, observou-se que após 15 min de reação já é possível obter quantidades detectáveis de DNA no gel de agarose quando a enzima *Bst* 3.0 foi utilizada. Em contraste, o uso da *Bst* 2.0 exigiu 60 min de tempo de incubação para permitir a visualização de quantidades detectáveis de DNA em gel de agarose (Figura 2.3). Portanto, o uso da enzima *Bst* 3.0 reduz o custo da reação, uma vez que não requer o uso de uma enzima transcriptase extra, necessita de uma menor concentração de enzima e também fornece resultados em tempos mais curtos. Como a *Bst* 3.0 requer um tempo

menor para a reação de amplificação, é uma candidata ideal para métodos de diagnósticos rápidos.

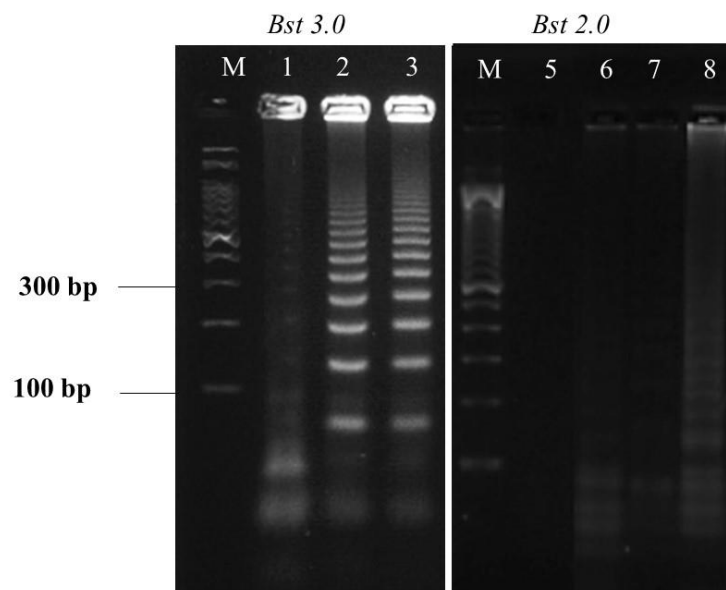


Figura 2.3: Monitoramento por eletroforese em gel do sucesso da amplificação utilizando soro de pacientes infectados com DENV-4 por RT-LAMP em microchips de PeT com as enzimas *Bst 2.0* e *Bst 3.0* a diferentes tempos de aquecimento da reação. Em ambos os painéis: M) Marcador de tamanho de DNA Invitrogen de 1 kb. Em 1) controle negativo (sem o alvo) 15 min; 2-3 amostras de soro dos pacientes infectados com DENV-4 com aquecimento de: 2) 15 min; 3) 20 min; 5) controle negativo (sem o alvo) 60 min; 6-8 amostras de soro dos pacientes infectados com DENV-4 com aquecimento de: 6) 30 min; 7) 45 min; 8) 60 min.

2.4.2 Limite de detecção por RT-LAMP em microdispositivos de PeT partindo de amostras de soro de pacientes infectados com DENV-4

Com o objetivo de avaliar o limite de detecção do vírus da dengue por RT-LAMP no microchip de PeT em amostras reais, a reação de amplificação foi realizada com amostras de soro de pacientes infectados com DENV-4, quantificado previamente por qPCR. A carga viral média das amostras foi de 7200 cópias de RNA μL^{-1} para amostra no terceiro dia após o início dos sintomas. As reações com as amostras de soro diluídos em série variaram de 500 a 2×10^4 de cópias iniciais de RNA por reação. Os resultados mostraram que a plataforma PeT permitiu a detecção dos produtos de amplificação no gel de agarose a partir de reações iniciadas com 200 cópias de RNA μL^{-1} na mistura

reacional, o que significa $0,8 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ ou $24,3 \text{ fM}$ de RNA na mistura reacional

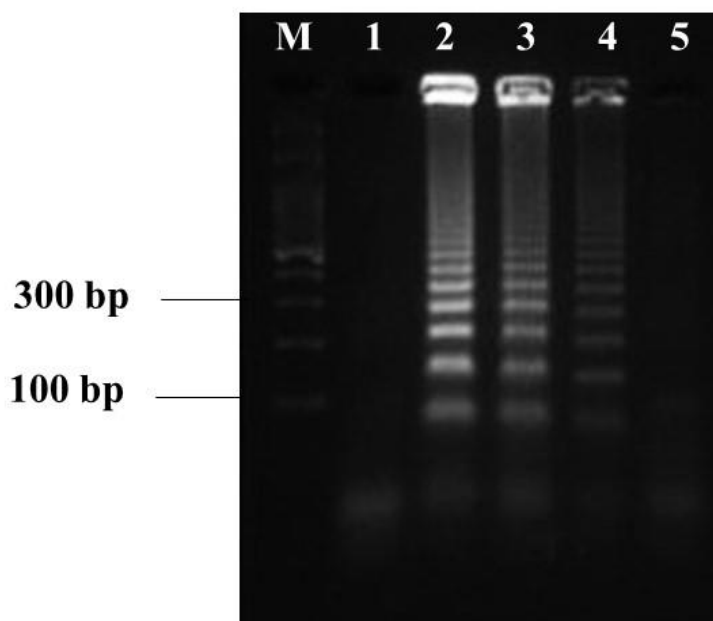


Figura 2.4 Eletroforese em gel de agarose determinando o limite de detecção realizado *off-chip* para análise de DENV-4 por RT-LAMP. Poços: M) Marcador de tamanho de DNA Invitrogen de 1 kb; 1) Controle negativo (amostra de soro de paciente saudável); 2) 10000 cópias; 3) 5000 cópias; 4) 1000 cópias; 5) 500 cópias de RNA por microchip ($5 \mu\text{L}$).

No estudo anterior sobre a amplificação por LAMP nos microchips de PeT, o limite de detecção encontrado foi de $1 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA da bactéria *E. coli* com 60 minutos de reação, a partir de amostra pré-purificada de DNA. (de Oliveira, et al., 2017) No presente estudo, a amplificação por RT-LAMP foi realizada diretamente de amostras de soro sem a etapa de pré-purificação do RNA em 15 min de incubação com um limite de detecção de $0,8 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ ou $24,3 \text{ fM}$. Outros estudos com RT-LAMP para a detecção do vírus da dengue encontraram valores menores de limite de detecção, mas a maioria deles foi realizada a partir da amostra de RNA pré-purificada e geralmente com tempos de reação mais longos. Nosso limite de detecção relativamente alto do RNA alvo na amostra de soro pode estar relacionado à presença de proteínas, ribonucleases (Rnases) e outros compostos presentes em amostras de soro de pacientes humanos, em comparação ao RNA/DNA sintético. (Hagan, et al., 2008) Kim e seus colaboradores (Kim, et al., 2018) detectaram o vírus DENV a partir de amostras pré-purificadas de RNA em 25 min de incubação em microtubos com limite de detecção de $3,5 \text{ cópias}/\mu\text{L}$. Em 2013, Lo e colaboradores (Lo, et al., 2013)

detectaram os amplicons (fragmentos de DNA amplificados) da RT-LAMP em dispositivos baseados em substratos de papel tendo como alvo o RNA dengue virus, o limite de detecção obtido foi de 300 ng mL^{-1} em reações com duração de 60 min. Lau et al. (Lau, et al., 2015) relataram um ensaio de RT-LAMP em microtubo detectando 10 cópias de RNA/ μL de DENV em reações de 45 min. Lu e seus colaboradores (Lu, et al., 2012) detectaram 12 cópias do RNA do vírus da dengue por reação com incubação de 90 min da reação RT-LAMP.

Embora o limite de detecção obtido aqui não seja tão baixo quanto o de outros métodos, nosso método apresenta vantagens claras. Podemos destacar i) baixo volume de amostra ($0,2 \mu\text{L}$ de amostra de soro por reação), ii) baixo consumo de reagentes ($<5 \mu\text{L}$), iii) curto tempo de reação (15 min), iv) ausência de extração de RNA, v) detecção visual diretamente no chip, vi) dispositivo de baixo custo (menos de \$ 1) e descartável, vii) adequado para aplicações em ponto de atendimento (*point-of-care*). Tais características tornam esta metodologia altamente atraente para o diagnóstico molecular da dengue, uma vez que esse limite de detecção ($200 \text{ cópias de RNA } \mu\text{L}^{-1}$) é suficiente para realizar um diagnóstico confiável da doença ainda no estágio inicial da doença, já no primeiro dia dos sintomas. (Duyen, et al., 2011)

2.4.3 Detecção Visual

Como uma alternativa à detecção por eletroforese em gel (*off-chip*), que leva um longo tempo (cerca de 60 min) para obter o resultado final, realizou-se a detecção visual diretamente no chip (*on-chip*) usando um intercalador de DNA. Na presença de DNA, a solução exibe fluorescência verde brilhante após a adição do intercalador (SYBER Green I). A detecção no chip reduziu o tempo de detecção de 60 min para 2 min e ainda sem a necessidade de equipamentos sofisticados, usando apenas uma fonte de luz UV e um celular smartphone para captura de imagem, permitindo uma análise quantitativa. A intensidade de fluorescência da solução diminuiu com a diminuição da concentração inicial de RNA, como mostrado na Figura 2.5. A detecção visual mostrada na Figura 2.5 foi realizada a partir de amostras de soro de pacientes infectados com DENV-4 com diluição serial variando de 2×10^4 a 500 cópias de RNA por reação. A detecção visual no chip permitiu a confirmação de reações positivas com até 200 cópias de RNA μL^{-1} ($0,8 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ de RNA na mistura reacional). Estes resultados

coincidem com a intensidade dos fragmentos de DNA amplificados mostrados por separação eletroforética no gel de agarose (Figura 2.4).

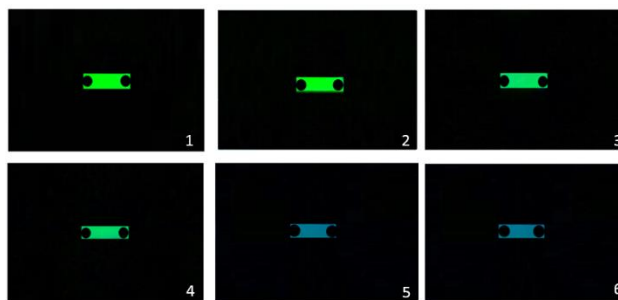


Figura 2.5: Detecção visual realizada no chip. 1) 20000 cópias 2) 10000 cópias; 3) 5000 cópias; 4) 1000 cópias; 5) 500 cópias de RNA da amostra de soro de pacientes infectados; 6) Controle negativo (amostra de soro de paciente saudável).

A análise da fluorescência é considerada útil para métodos de detecção rápidos e simples. O uso do intercalador fluorescente permite a quantificação do produto de amplificação em tempo real (Lucchi, et al., 2010), (Ahmad, et al., 2011), (Peng, et al., 2013), (Seok, et al., 2017) ou por análise de dados de imagem. (de Oliveira, et al., 2017), (Oliveira, et al., 2016) Aqui, a análise de imagem permitiu uma rápida análise quantitativa. As imagens foram avaliadas usando o programa ImageJ. Primeiro, a intensidade da cor verde da câmara reacional foi medida através de uma análise RGB (do inglês: *red*-vermelho, *green*-verde, *blue*-azul). A Figura 2.6 mostra um comportamento razoavelmente linear, com $R^2 = 0,9574$, da intensidade de fluorescência verde *versus* o número de cópias iniciais de RNA

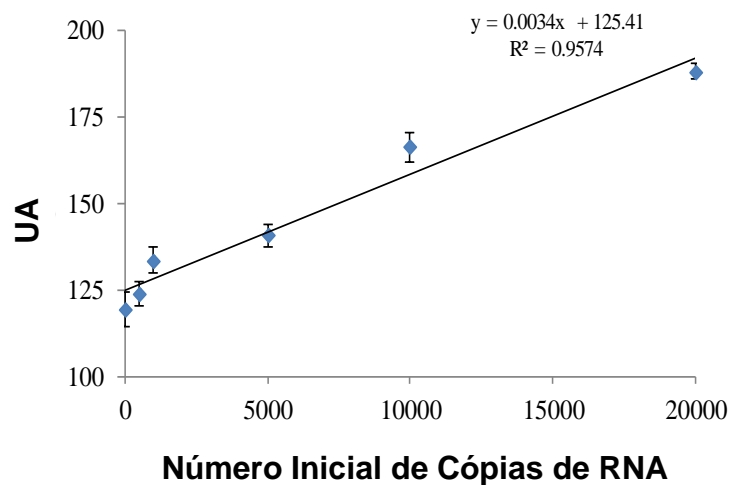


Figura 2.6. Análise digital das imagens da câmara reacional pelo software ImageJ para correlação quantitativa da intensidade de fluorescência verde (n = 6).

Para tentar melhorar a linearidade e sensibilidade dos dados, construímos uma curva utilizando a cor como variável, através do cálculo da razão de intensidade verde/azul, também obtidos através do sistema de cores RGB. A Figura 2.7 mostra o comportamento linear, com $R^2 = 0,9825$, do número de cópias iniciais de RNA *versus* relação verde/azul. Essa alteração causou uma melhoria na sensibilidade da reação. A detecção visual demonstrou ser uma excelente alternativa à eletroforese em gel para obter resultados rápidos, reduzindo o tempo de detecção de 60 min para 2 min.

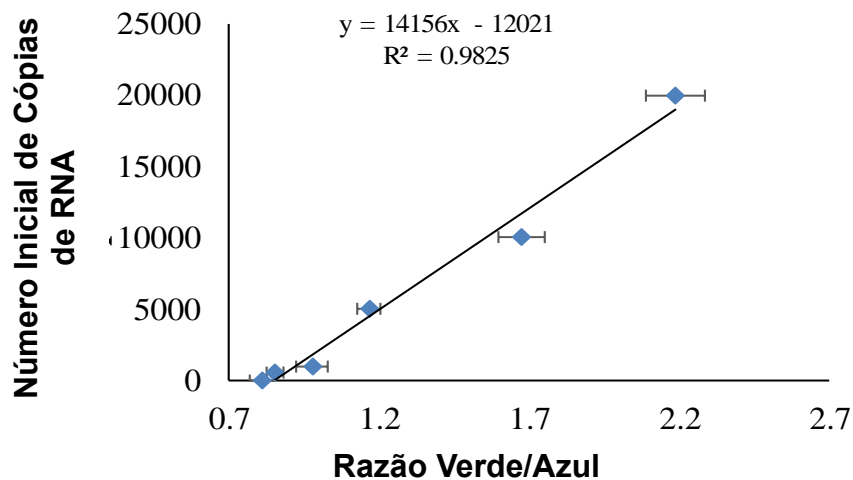


Figura 2.7: Análise digital das imagens das microcâmaras reacionais pelo software ImageJ para correlação semiquantitativa da intensidade de fluorescência da relação verde/azul (n = 6).

Métodos moleculares em plataformas portáteis são uma ferramenta importante no diagnóstico precoce da dengue, pois são rápidos, precisos e de baixo custo. O diagnóstico molecular usando a RT-LAMP nos dispositivos de PeT é capaz de detectar o vírus mesmo em amostras com carga viral relativamente baixa. Além disso, apresenta aplicabilidade relevante no diagnóstico diferencial da infecção por outros arbovírus, como zika e chikungunya, que atualmente é considerada a maior dificuldade clínica devido à similaridade dos sintomas clínicos. O diagnóstico precoce da dengue pode auxiliar no tratamento adequado da doença e na redução da taxa de mortalidade dos pacientes antes do início das complicações. Diagnóstico precoce significa detectar a doença no estágio inicial da progressão. Em geral, a duração média da viremia é de sete dias, no entanto, a carga viral máxima é observada entre o primeiro e o terceiro dia do início dos sintomas. Embora a interferência de diferentes fatores na progressão da infecção, relacionada ao vírus e/ou ao hospedeiro, possam afetar a carga viral, durante os primeiros três dias de infecção a carga viral permanece relativamente constante, tendo um valor médio de $1,0 \times 10^9$ cópias de RNA mL^{-1} , independentemente do sorotipo. (Ben-Shachar, et al., 2016) Considerando este valor médio de cópias de RNA encontradas no soro do hospedeiro infectado no primeiro dia de sintomas, apenas $0,001 \mu\text{L}$ de soro do paciente por reação/chip seriam necessários para uma reação positiva

segunda nossa metodologia. Assim, mesmo que o hospedeiro tenha uma carga viral inferior ao valor médio encontrado habitualmente no início da infecção (como foi o caso da amostra avaliada neste estudo - $7,2 \times 10^6$ cópias mL⁻¹), 0,2 µL de soro é mais que o suficiente para o diagnóstico, o que representa um volume muito pequeno de amostra. Portanto, a RT-LAMP é uma ferramenta importante que pode ser realizada em amostras coletadas imediatamente após o início dos sintomas, permitindo o diagnóstico nos estágios iniciais, quando os métodos sorológicos ainda são negativos.

Uma desvantagem da LAMP, importante de se ressaltar aqui, é que a reação é facilmente sujeita à contaminação com os *amplicons*, gerando resultados falso-positivos. A fim de assegurar resultados corretos, devem ser usados procedimentos adequados de controle de contaminação. Neste trabalho foram utilizados diferentes equipamentos e ambientes laboratoriais para reações negativas e positivas. Desta forma, eliminamos e/ou reduzimos ao mínimo os resultados falso-positivos.

2.5 CONCLUSÃO

A reação RT-LAMP realizada nas plataformas de PeT demonstrou ser uma técnica economicamente viável, simples, rápida e precisa para a detecção do vírus da dengue. Os ensaios realizados no microdispositivo de PeT, permitiu detectar amplicons em reações que iniciaram com $0,8 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ de RNA ou 200 cópias μL^{-1} de RNA tanto para detecção *off-chip* (por eletroforese em gel) quanto para detecção diretamente no chip (detecção visual). A vantagem da detecção visual promovida pela LAMP é a obtenção de resultados rápidos, eliminando a necessidade da eletroforese. Além disso, este trabalho mostrou que o uso da enzima *Bst 3.0* reduziu o tempo de reação para 15 min e ainda permitiu o uso de apenas uma enzima para realizar a transcrição reversa e a amplificação em uma única etapa partindo de amostras de soro de pacientes infectados com o vírus.

Um teste rápido capaz de confirmar a infecção precoce da dengue pode evitar testes dispendiosos e caros como os métodos moleculares convencionais. O diagnóstico molecular convencional da dengue envolve a reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) seguida por uma semi-nested PCR, e por fim a eletroforese em gel. Este método requer uma amostra de RNA pré-purificada, e assim, uma etapa preliminar deve ser realizada para remover substâncias inibidoras (por exemplo, proteínas) geralmente presentes em amostras biológicas. Em contraste, a RT-LAMP não é significativamente afetada pela presença de inibidores e aqui mostramos que ela pode ser realizada diretamente em amostras complexas, eliminando a etapa de purificação do RNA. Portanto, enquanto uma metodologia convencional de diagnóstico molecular para dengue levaria pelo menos 300 minutos (incluindo a etapa de eletroforese), a metodologia desenvolvida neste trabalho mostrou que é possível realizar um diagnóstico molecular de dengue em 17 min (incluindo a detecção visual) usando apenas $0,2 \mu\text{L}$ em média de soro de pacientes infectados com o vírus da dengue. Além disso, um teste usando a metodologia desenvolvida para o dispositivo de PeT custa menos de \$1 (incluindo microchip e reagentes). Em relação a instrumentação necessária, um teste convencional de PCR requer

instrumentação que custa mais de US\$ 5.000 enquanto que a instrumentação utilizada para LAMP custa menos de US\$ 1.000.

Realizar a reação de RT-LAMP em um microchip descartável e de baixo custo é um primeiro passo na aplicação de diagnósticos moleculares em *point-of-care*. Devido ao funcionamento simples, possibilidade de ser realizada em uma única etapa e ainda dispensar a necessidade de instrumentação sofisticada, a RT-LAMP realizada nos microdispositivos de PeT tem se mostrado uma ferramenta valiosa para o diagnóstico molecular da dengue, apresentando um grande potencial para aplicações para diagnósticos e estudos epidemiológicos, especialmente em países em desenvolvimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, F. et al., 2011. A CCD-based fluorescence imaging system for real-time loop-mediated isothermal amplification-based rapid and sensitive detection of waterborne pathogens on microchips. *Biomedical Microdevices*, p. :929–937.

Ben-Shachar, R., Schmidler, S. & Koelle, K., 2016. Drivers of Inter-individual Variation in Dengue Viral Load Dynamics. *PLOS Computational Biology* , pp. 1-26.

Chen, H.-t. et al., 2008. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of H9 avian influenza virus. *Journal of Virological Methods*, p. 200–203.

Curtis, K. A., Rudolph, D. L. & Owen, S. M., 2008. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods* , p. 264–270.

de Oliveira, K. G. et al., 2017. Loop-mediated isothermal amplification in disposable polyester-toner microdevices. *Analytical Biochemistry*, pp. 70-77.

Duarte, G. R. M. et al., 2011. Dynamic Solid Phase DNA Extraction and PCR Amplification in Polyester-Toner Based Microchip. *Analytical Chemistry*, p. 5182–5189.

Duyen, H. T. L. et al., 2011. Kinetics of Plasma Viremia and Soluble Nonstructural Protein 1 Concentrations in Dengue: Differential Effects According to Serotype and Immune Status. *The Journal of Infectious Diseases*, 203(9), p. 1292–1300.

Elling, R., Henneke, P., Hatz, C. & Hufnagel, M., 2013. Dengue Fever in Children: Where Are We Now?. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(9), p. 1020–1022.

Gimenez, T. D. et al., 2017. Dynamic Solid-Phase RNA Extraction from a Biological Sample in a Polyester-Toner Based Microchip. *Analytical Methods*, pp. 1-20.

- Hagan, K. A., Bienvenue, J. . M., Moskaluk, C. A. & Landers, J. P., 2008. Microchip-Based Solid-Phase Purification of RNA from Biological Samples. *Analytical Chemistry* , p. 8453–8460.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. . J. & Williams, P. M., 1996. Real Time Quantitative PCR. *GENOME METHODS*, pp. 986-994.
- Hu, S.-f.et al., 2015. Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4. *BMC Microbiology*, 15 (265), pp. 1-15.
- JavierCarod-Artal, F., Wichmann, O., Farrar, J. & Gascón, J., 2013. Neurological complications of dengue virus infection. *The Lancet Neurology* , 12(9), pp. 906-919.
- Kim, J.-G.et al., 2018. Rapid discriminative detection of dengue viruses via loop mediated isothermal amplification. *Talanta*, p. 391–396.
- Lau, Y.-L.et al., 2015. Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS ONE* , pp. 1-9.
- Lo, S.-J.et al., 2013. Molecular-level dengue fever diagnostic devices made out of paper. *Lab on a Chip*, p. 2686–2692.
- Lucchi, N. W. et al., 2010. Real-Time Fluorescence Loop Mediated Isothermal Amplification for the Diagnosis of Malaria. *PLoS ONE*, p. e13733.
- Lu, X. et al., 2012. Rapid Identification of Chikungunya and Dengue Virus by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , p. 947–953.
- Mendes, G. M. et al., 2019. Molecular Diagnostics of Dengue by Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) in Disposable Polyester-Toner Microdevices. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, pp. 1-9.
- Oliveira, K. A. et al., 2016. Dengue diagnosis on laser printed microzones using smartphone-based detection and multivariate image analysis. *Analytical Methods*, pp. 6506-6511.

Parida, M. et al., 2005. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Journal of Clinical Microbiology* , p. 2895–2903.

Patterson, J., Sammon, . M. & Garg, . M., 2016. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *The Western Journal of Emergency Medicine*, 17(6), p. 671–679.

Peng, J. et al., 2013. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soil. *FEMS Microbiology Letters*, p. 127–134.

Ranjit, S. & Kisson, N., 2011. Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. *Pediatric Critical Care Medicine*, 12(1), pp. 90-100.

Seok, Y. et al., 2017. A Paper-Based Device for Performing Loop-Mediated Isothermal Amplification with Real-Time Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets. *Theranostics*, p. 2220–2230.

Tian, B. et al., 2016. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. *Biosensors and Bioelectronics* , p. 420–425 .

WHO, W. H. O., 2016. *Dengue and severe dengue fact sheet* .

CAPÍTULO 3-DETECÇÃO DE ZIKA VÍRUS

3.1 INTRODUÇÃO

A principal relevância do diagnóstico rápido, preciso e diferencial da infecção causada por zika vírus (ZIKV) é o monitoramento dos possíveis efeitos neuropáticos do vírus em seres humanos e a orientação dos pacientes acerca da transmissão sexual e vertical (mãe-feto), além dos riscos teratogênicos associados a infecção. Os sintomas, que em média duram uma semana, apresentam-se de forma leve e geralmente são erupções cutâneas associadas a pelo menos outros dois sintomas, como febre, dores musculares, dores de cabeça e conjuntivite. Na maioria das vezes não é necessária a hospitalização dos pacientes infectados por ZIKV. (WHO, 2016), (Loos, et al., 2014).

Ainda que a infecção pelo ZIKV apresente sintomas leves e na maioria das vezes facilmente tratáveis, uma das implicações clínicas mais significativas da infecção pelo ZIKV é o mecanismo de transmissão vertical e seus efeitos teratogênicos, denominado Síndrome da Zika Congênita. A manifestação primária dessa síndrome é a microcefalia, definida como uma condição rara que descreve um feto ou bebê com uma circunferência da cabeça menor que o esperado para a idade (dois a três desvios padrão abaixo da média ajustada por idade/sexo). (Chan, et al., 2016), (Moore, et al., 2017), (Miranda-Filho, et al., 2016)

Durante a epidemia de zika ocorrida no Brasil em 2015, a extraordinariamente alta incidência de microcefalia estava ligada à infecção pré-natal por ZIKV em 32% dos casos examinados de microcefalia. (Boeuf, et al., 2016) Segundo um estudo realizado neste mesmo ano com gestantes, foi descoberto que 42% dos bebês vivos nascidos de mães afetadas pelo ZIKV apresentaram anormalidades, incluindo a microcefalia. Já para o grupo de mulheres grávidas não infectadas pelo ZIKV apenas 5,3 % dos bebês nasceram com anormalidades. (Brasil, et al., 2016)

Portanto, um diagnóstico diferencial da infecção é o que irá permitir que os médicos aconselhem melhor as pacientes sobre qualquer risco na gravidez por transmissão vertical. Um teste diagnóstico que seja rápido, preciso e diferencial é fundamental para minimizar a disseminação da infecção pelo ZIKV e minimizar

as graves consequências à saúde e os efeitos teratogênicos da Síndrome do Zika Congênita. (Boeuf, et al., 2016)

Para além dos casos de microcefalia, o diagnóstico diferencial da infecção de zika é crucial para monitorar, quantificar e conscientizar o público sobre os efeitos neuropáticos da infecção por ZIKV. (WHO, 2016) A principal implicação clínica neuropática da infecção com o ZIKV é o possível desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré (GBS-do inglês *Guillain-Barré Syndrome*). A SGB é uma doença imune que é caracterizada por causar parestesia dos membros, fraqueza, dor e diminuição dos reflexos. (Winer, 2001) Os sintomas aparecem de duas a quatro semanas após a infecção pelo vírus, sendo que geralmente os pacientes apresentam fraqueza muscular simétrica nos membros inferiores. Em seguida, a fraqueza pode se espalhar para os braços, músculos truncais, nervos cranianos e músculos respiratórios. Os sintomas geralmente tendem a aumentar por várias semanas. O período de recuperação pode levar meses ou possivelmente anos. (Asbury & Cornblath, 1990), (NINDS, 2011)

Diagnosticar rápida e diferencialmente um paciente com infecção por ZIKV pode contribuir com os profissionais da área da saúde para diagnosticar a Síndrome de Guillain-Barré precocemente. Levando em consideração a rapidez do progresso da doença e as potenciais graves consequências, a confirmação da infecção e o tratamento precoce da Síndrome de Guillain-Barré podem mitigar agravamentos da doença e melhorar o prognóstico a longo prazo. (dos Santos, et al., 2016)

Portanto, neste trabalho é proposto o desenvolvimento de uma metodologia rápida e precisa para detectar o ZIKV em amostras complexas de pacientes infectados, através da transcrição reversa seguida da amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (RT-LAMP) em dispositivos microfluídicos de poliéster-toner, de maneira que a metodologia desenvolvida apresente potencial para aplicações no *point-of-care*, e controle epidemiológico.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é detectar ZIKV em amostras complexas de pacientes infectados, por amplificação isotérmica mediada por loop pós transcrição reversa (RT-LAMP) em um microdispositivo descartável e de baixo custo de poliéster-toner (PeT) para aplicações em situações de *point-of-care*.

3.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições experimentais para detecção do ZIKV nos microdispositivos de poliéster-toner.
- Realizar a detecção do ZIKV diretamente em amostras complexas, ou seja, sem a necessidade da etapa prévia de pré-purificação do ácido nucleico.
- Separar os fragmentos amplificados pela RT-LAMP por eletroforese em gel de agarose.
- Realizar a detecção visual dos produtos amplificados diretamente nos microdispositivos utilizando um corante intercalador de DNA (SybrGreen I).
- Avaliar o limite de detecção e a especificidade da reação nos microdispositivos.

3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Materiais, reagentes e soluções

A água padrão biologia molecular (livre de DNase, RNase e Protease), o etanol, hidrocloreto de Guanidina e SYBR Green I foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO). A GoTaq® Green Master Mix, contendo a enzima Taq DNA polymerase e desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) foram obtidos juntos à Invitrogen/Life Technologies (Foster City, CA). O padrão de tamanhos de DNA *1000 bp DNA ladder* foi adquirido junto à Applied Biological Materials Inc. (Viking Way, Canadá). A albumina de soro bovina (BSA) foi obtida junto à Amersham/GE Healthcare. A proteinase K (20 mg mL⁻¹) foi obtida da Qiagen (Valência, CA). Os reagentes Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) e etilenodiaminotetracético (EDTA) foram obtidos junto à Vetec/Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Triton X-100 foi adquirido junto à Usb Corporation (Cleveland, OH). Os iniciadores utilizados foram obtidos da IDT (San Diego, USA). A enzima *Bst* DNA polimerase 3.0 e sulfato de magnésio (MgSO₄) foram adquiridos junto à New England Biolabs (Ipswich, MA). Os filmes de poliéster (transparência) foram adquiridos da 3 M, modelo CG 5000 (Austin, TX, USA) e Multilaser, modelo InkJet film (São Paulo, SP, Brasil).

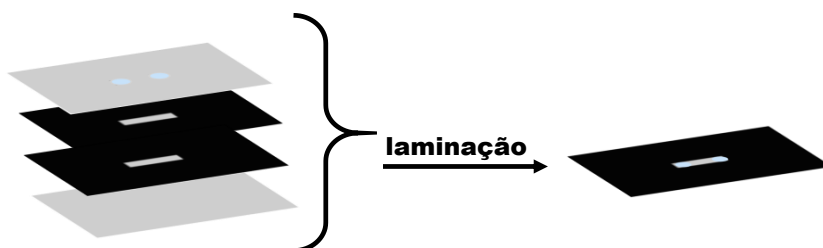
3.3.1 Amostras de pacientes infectados

As amostras foram obtidas de pacientes com infecções confirmadas pelo ZIKV durante a epidemia no Brasil em 2015. Os casos confirmados de infecção com o ZIKV foram aqueles onde houve o isolamento do vírus de um paciente ainda no estado febril da doença. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo UNIFESP-HSP, com número de protocolo nº 1.844.946. Todas as experiências foram realizadas em conformidade com as diretrizes exigidas nacionalmente, seguindo as resoluções CNS 466/12 e CNS 441/11, e em conformidade com as diretrizes institucionais.

3.3 .2 Fabricação dos microdispositivos de PeT

Os microchips PeT foram fabricados usando um protocolo de impressão, corte e laminação (PCL) anteriormente descrito. (Duarte, et al., 2011) As camadas inferior e superior do microdispositivo são filmes de poliéster, sendo que no filme superior há furos pré-cortados que servem para dar acesso para a câmara reacional. As camadas intermediadas são folhas de poliéster recobertas com toner em ambos os lados usando uma impressora a laser (Brother Laser Mono HL1212W). O *design* da câmara foi desenhado usando o software *Silhouette Studio*TM V4.2.471, e a câmara foi criada cortando a microcâmara com uma cortadora a lâminas (Silhouette Cameo® 3). A microcâmara foi projetada para ter 7 mm de comprimento, 2 mm de largura e 350 µm de profundidade, com capacidade de volume interno de 5 µL. As camadas inferior, superior e intermediarias foram alinhadas e laminadas em conjunto utilizando uma laminadora (230c-A4) operando a 160 °C, como mostrado a seguir na Figura 3.1.

Figura 3.1: Representação esquemática das etapas de fabricação dos dispositivos microfluídicos de poliéster-toner.



3.3.4 Amplificação do Zika vírus por RT- LAMP no microchip de PeT

As sequências de iniciadores usados neste trabalho para RT-LAMP, segundo descrito anteriormente por Tian e colaboradores (Tian, et al., 2016) são mostradas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Sequências de iniciadores desenhados para detecção do ZIKV por RT-LAMP

Inciador	5'→ 3'
F3	CGGATGGGATAGGCTCAAAC
B3	ATGGACCTCCCGTCCTTG
FIP	CCTGAGGGCATGTGCAAACCTAGAATGGCAGTCA GTGGAGAT
BIP	ACCCTCAACTGGATGGGACAACTGGAGCTTGTTG AAGTGGTG
LFP	CATCAATTGGCTTCACAACGC
BLP	GGGAAGAAGTTCCGTTTTGCTC

A mistura reacional para RT-LAMP nos microdispositivos foi primeiramente pipetada em um microtubo com as seguintes concentrações: 0,1 μM de cada iniciador externo (F3 e B3), 0,8 μM de cada iniciador interno (FIP e BIP), 0,4 μM de cada iniciador de *loop* (LF e LB) MgSO_4 4 mM, dNTP 0,48 mM. 0,32 U μL^{-1} de *Bst* DNA polimerase 3.0; 1,0 μL de tampão de amplificação isotérmica 10X (20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0,1% Triton X-100) e quantidades variáveis de amostras de pacientes infectados. A reação positiva e o controle negativo (amostra de paciente saudável ou infectado por outro arbovírus) foram incubados em um termobloco (Major Science, Saratoga, CA) a 72 ° C durante 5-15 minutos. Antes da reação, as microcâmaras foram passivadas com BSA (5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), como descrito anteriormente. (de Oliveira, et al., 2017)

Após a passivação, a câmara foi preenchida por força capilar com aproximadamente 5 μL da solução da mistura reacional. A evaporação da solução foi impedida cobrindo ambos os reservatórios com óleo mineral. A reação contendo o alvo e a reação negativa (amostra complexa de paciente saudável ou infectado por outro arbovírus) foram colocados em um termobloco (Major Science, Saratoga, CA) a 72 °C por tempos de 5 a 15 minutos. No final do tempo de incubação, ou a solução foi removida do microdispositivo com o auxílio de uma micropipeta para realizar a eletroforese em gel ou foi adicionado intercalador fluorescente de DNA- SYBR Green para detecção visual

diretamente no microdispositivo (detecção *on-chip*), como mostrado na esquema da Figura 3.2.

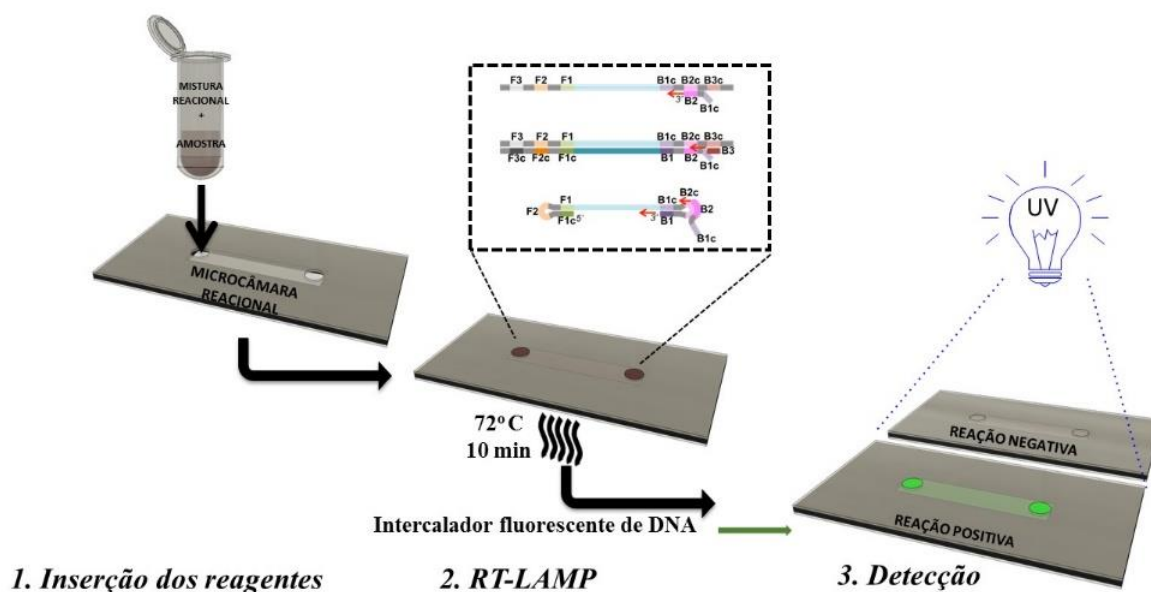


Figura 3.2. Ilustração esquemática das etapas principais de amplificação e detecção RT-LAMP no microdispositivo PeT. Adaptado de (Mendes, et al., 2019)

3.3.5 Análise dos fragmentos amplificados por RT-LAMP em gel de agarose

Para a detecção off-chip, a eletroforese em gel utilizando gel de agarose a 2% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) a 0,5% separou o DNA amplificado. A corrida eletroforética foi realizada em 0,5% de tampão TBE com condições de potencial de 90 V, variando de 30 a 115 minutos. Após o tempo da corrida eletroforética, as bandas de DNA foram visualizadas através de um transiluminador UV acoplado a um sistema de fotodocumentação (GE Healthcare LifeSciences).

3.3.6 Detecção Visual

Para a detecção direta no chip, 0,5 μ L de SYBR Green I (1:10) foi adicionado diretamente à microcâmara no final da reação. A câmara de reação foi exposta a uma iluminação de lâmpada UV (320 nm) e as imagens foram capturadas com o auxílio de um smartphone.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Otimização das condições experimentais

A fim de melhorar a eficiência da reação de amplificação isotérmica mediada por *loop* pós transcrição reversa (RT-LAMP) nos microdispositivos de poliéster-toner, alguns parâmetros foram otimizados, como o tempo de reação da RT-LAMP e a concentração da enzima utilizada (Bst DNA polimerase).

A primeira otimização realizada foi referente a concentração da enzima Bst DNA polimerase 3.0 adicionada na mistura reacional. Como mostrado no capítulo anterior, a enzima Bst 3.0 apresenta desempenho superior e atividade de transcrição reversa, e foi a enzima utilizada neste trabalho. Foi avaliada a eficiência da reação com concentrações de $0,16 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$, $0,32 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$ e $0,48 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$. Os resultados obtidos mostraram que com $0,16 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$ de Bst DNA polimerase 3.0 não é possível detectar nem visualmente nem por eletroforese em gel produtos amplificados. Porém, tanto com $0,32 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$ quanto com $0,48 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$ de enzima foi possível detectar visualmente e por eletroforese em gel de agarose os fragmentos amplificados (Figura 3.3), sendo que com $0,48 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$ de enzima observou-se uma maior intensidade nos fragmentos amplificados no gel de agarose bem como visualmente uma maior intensidade de fluorescência. Entretanto, considerando que a enzima Bst DNA polimerase 3.0 é o reagente mais oneroso utilizado neste ensaio (aproximadamente R\$ 0,40 por reação), optou-se por realizar todas as reações deste trabalho com a concentração de $0,32 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$ de Bst DNA polimerase 3.0 devido a uma melhor relação custo benefício.

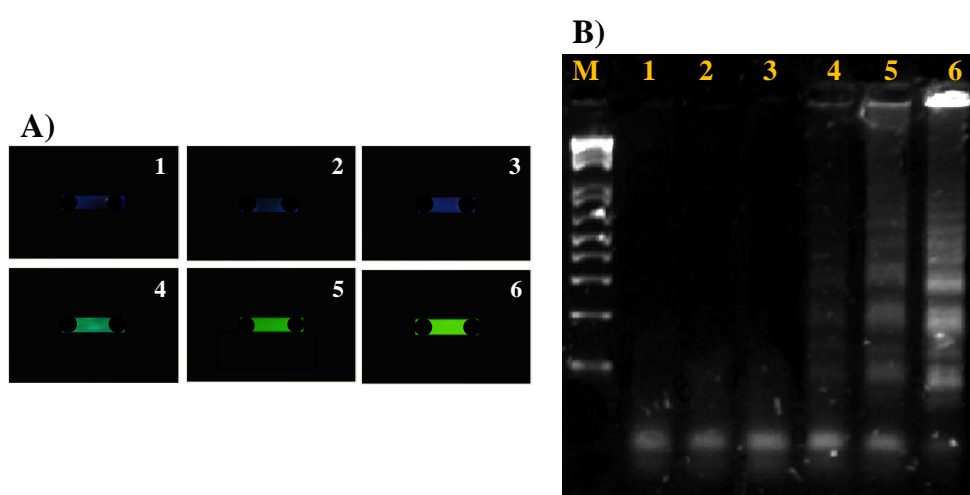


Figura 3.3 Detecção A) visual e por B) eletroforese em gel dos produtos de amplificação obtidos por RT-LAMP nos microdispositivos de PeT. Em ambos os painéis: 1-3 controles negativos e 4-6 controles positivos com 0,16, 0,32, 0,48 U μ L⁻¹ de Bst 3.0 DNA Polimerase, respectivamente.

Para reduzir o tempo necessário para a detecção do ZIKV, mantendo a alta sensibilidade, o tempo de incubação da reação foi testado em 5, 10 e 15 minutos de aquecimento. Os resultados da otimização do tempo de aquecimento mostraram que 10 min de aquecimento foi o menor tempo que produziu quantidades detectáveis de fragmentos amplificados no gel de agarose e pela detecção visual, como mostrado na Figura 3.4. Nenhuma das replicatas das reações do controle negativo (onde foi usado soro de pacientes saudáveis ou infectados com outros arbovírus) produziu falso-positivo em 10 min. Resultados falsos positivos foram observados com tempos de incubação superiores a 15 min.

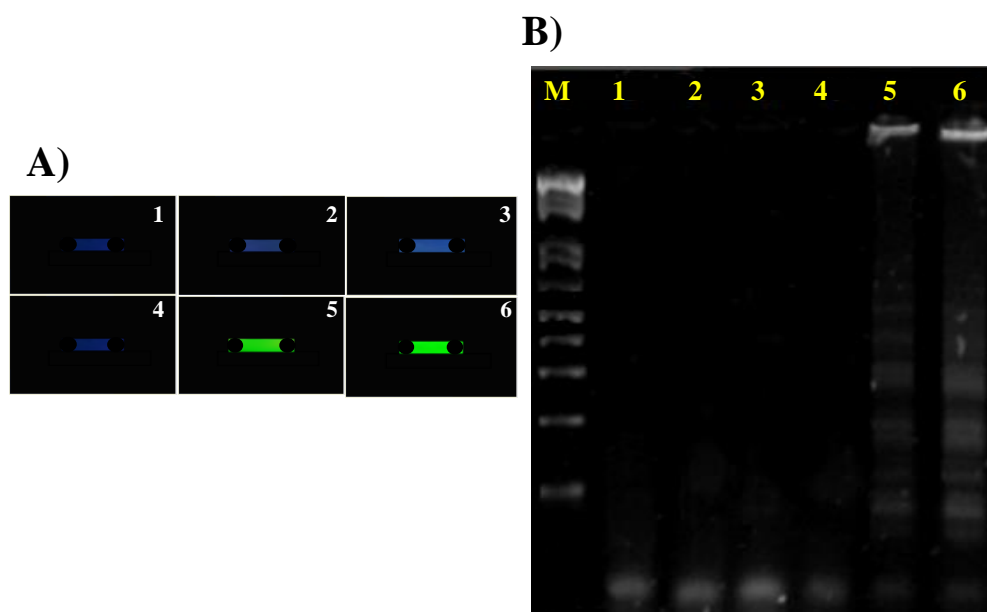


Figura 3.4 Monitoramento do tempo de incubação da reação de RT-LAMP nos dispositivos descartáveis de PeT por A) detecção visual e por B) eletroforese em gel. Em ambos os painéis: 1: Controle negativo com 5 min; 2: Controle negativo com 10 min; 3: Controle negativo com 15 min; 4: Controle positivo com 5 min; 5: Controle positivo com 10 minutos; 6: Controle positivo com 15 minutos.

Os resultados obtidos tanto pela detecção visual quanto pela eletroforese em gel de agarose são condizentes e mostram que com apenas dez minutos de incubação é possível detectar o ZIKV nos microdispositivos descartáveis de poliéster-toner (PeT). São descritos na literatura inúmeros ensaios de RT-LAMP para diagnóstico de ZIKV com tempo de incubação superiores a 10 min. Calvert

e seus colaboradores conseguiram detectar ZIKV com 25 minutos de incubação partindo de amostras de soro e de urina. (Calvert, et al., 2017). Em seu trabalho, Lamb e colaboradores realizaram a detecção do ZIKV através de RT-LAMP em amostras de urina e em mosquitos infectados com ZIKV com 30 minutos de reação (Lamb, et al., 2018). Em 2016, Song et al. desenvolveram um ensaio de RT-LAMP para aplicações em situações de *point-of care* com tempo de detecção de 40 minutos. (Song, et al., 2016). Tian e seus colaboradores detectaram ZIKV em amostras de soro contaminadas com o vírus com um tempo total de análise de 27 minutos. (Tian, et al., 2016) Vale destacar aqui que em um trabalho anterior do nosso grupo foi possível detectar o ZIKV em microtubos comerciais de polipropileno com 10 min de incubação (Estrela, et al., 2019). O presente trabalho, proporcionou a detecção do ZIKV nos microdispositivos de poliéster-toner mantendo o mesmo tempo de incubação, demonstrando que as plataformas microfluídicas representam uma atraente ferramenta para aplicações para realização de um diagnóstico confiável.

O baixo tempo obtido, aliado a facilidade instrumental, baixo custo e elevada confiabilidade, evidencia a potencialidade do teste para diversas aplicabilidade em saúde pública onde este teste se faz necessário, desde o monitoramento pré-natal de mulheres que vivem em áreas de risco da possível transmissão do vírus, a testes de rotina de doação de sangue em hemocentros deslocalizados e diagnóstico em ambientes de recursos limitados (Calvert, et al., 2017) Diante disto, o ensaio de RT-LAMP realizado nos microdispositivos de PeT desenvolvido neste trabalho apresenta grande potencial para a realização de diagnósticos precoces e aplicação em situações de *point-of-care*.

3.4.2 Especificidade da Reação

A especificidade dos iniciadores da RT-LAMP utilizados neste trabalho para detectar o ZIKV foi avaliada utilizando amostras de soro de paciente saudável e amostras de soro de pacientes infectados com os vírus DENV e CHIKV. Foi observado, com 10 minutos de reação, a emissão de fluorescência e de produtos de amplificação em gel de agarose apenas quando o soro de pacientes infectados com ZIKV foi usado como alvo. Enquanto que para as reações onde foram usadas amostras de soro infectadas com o vírus da dengue e chikungunya ou controles negativos de soro de pacientes saudáveis não foi

possível visualizar a emissão de fluorescência, nem observar fragmentos amplificados no gel de agarose (Figura 3.5), demonstrando a alta especificidade da RT-LAMP .

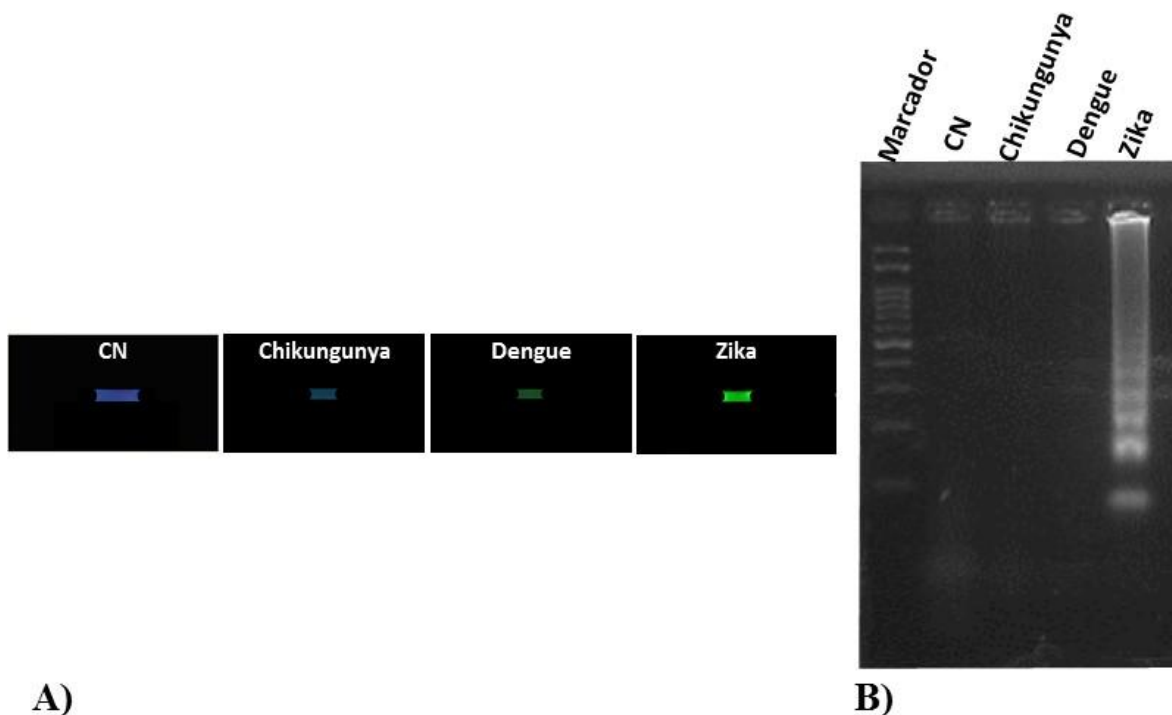


Figura 3.5 Ensaio de especificidade da reação de RT-LAMP nos microchips de poliéster toner por detecção A) visual e por B) eletroforese em amostras de soro de pacientes: saudável, infectado com chikungunya, dengue e zika respectivamente em ambos os painéis.

Tendo em vista que a infecção por qualquer um destes arbovírus usados aqui apresenta sintomas clínicos extremamente semelhantes, o diagnóstico baseado apenas nos sintomas do paciente se torna pouco confiável e inviável. Já existem kits comerciais para testes que fazem o diagnóstico da infecção viral por detecção de anticorpo IgM via ELISA. Entretanto é possível que ocorram reações cruzadas com anticorpos produzidos pela infecção por outro vírus semelhante (outros arbovírus como dengue e chikungunya, por exemplo), o que aumenta a possibilidade de ocorrência de resultados falsos positivos (Speer & Pierson, 2016). Portanto, uma metodologia baseada no diagnóstico molecular como o teste desenvolvido aqui, apresenta aplicabilidade relevante no diagnóstico diferencial da infecção por outros arbovírus, como dengue e chikungunya, que atualmente é considerado o maior desafio clínico pela semelhança dos sintomas apresentados.

3.4.3 RT-LAMP realizada diretamente em amostras de sangue total, soro, urina e saliva

Após a infecção pelo ZIKV, o RNA viral pode ser detectado por métodos moleculares no sangue do paciente infectado por aproximadamente 7 dias enquanto que no soro o RNA viral pode ser detectado mesmo 10 dias após os primeiros sintomas. Já em amostras de saliva, urina e fluidos genitais por exemplo, o vírus pode ser detectado com 30 dias ou mais após a infecção. (Ribeiro, et al., 2016), (Calvert, et al., 2017) Em seu estudo, Nicastrì e seus colaboradores relataram que foi possível confirmar a presença do ZIKV em amostras de urina e saliva em um paciente mesmo após 91 dias de infecção. (Nicastrì, et al., 2016) Inúmeros estudos indicam ainda que o ZIKV é mais frequentemente detectável na saliva e em concentrações mais altas do que no próprio sangue. (Rozé, et al., 2016), (Kutsuna, et al., 2014), (Korhonen, et al., 2016)

Aqui, um paciente infectado com ZIKV forneceu amostras de sangue, urina e saliva 16 dias após o início dos sintomas. O sucesso da detecção do ZIKV nas amostras de sangue total, soro, urina e saliva mesmo 16 dias após o início dos primeiros sintomas no paciente, quando a carga viral já é consideravelmente inferior ao da fase aguda, demonstra a elevada sensibilidade da metodologia proposta neste trabalho e a potencialidade desta técnica para aplicações tanto em situações de controle epidemiológico quanto para testes rápidos em locais de recursos limitados. Os ensaios foram realizados utilizando tanto amostras não processadas quanto amostras de RNA pré-purificado. Os resultados obtidos tanto pela eletroforese em gel de agarose quanto pela detecção visual mostram o sucesso da reação de RT-LAMP nos dispositivos descartáveis de poliéster-toner com apenas 10 minutos de incubação (Figura 3.6)

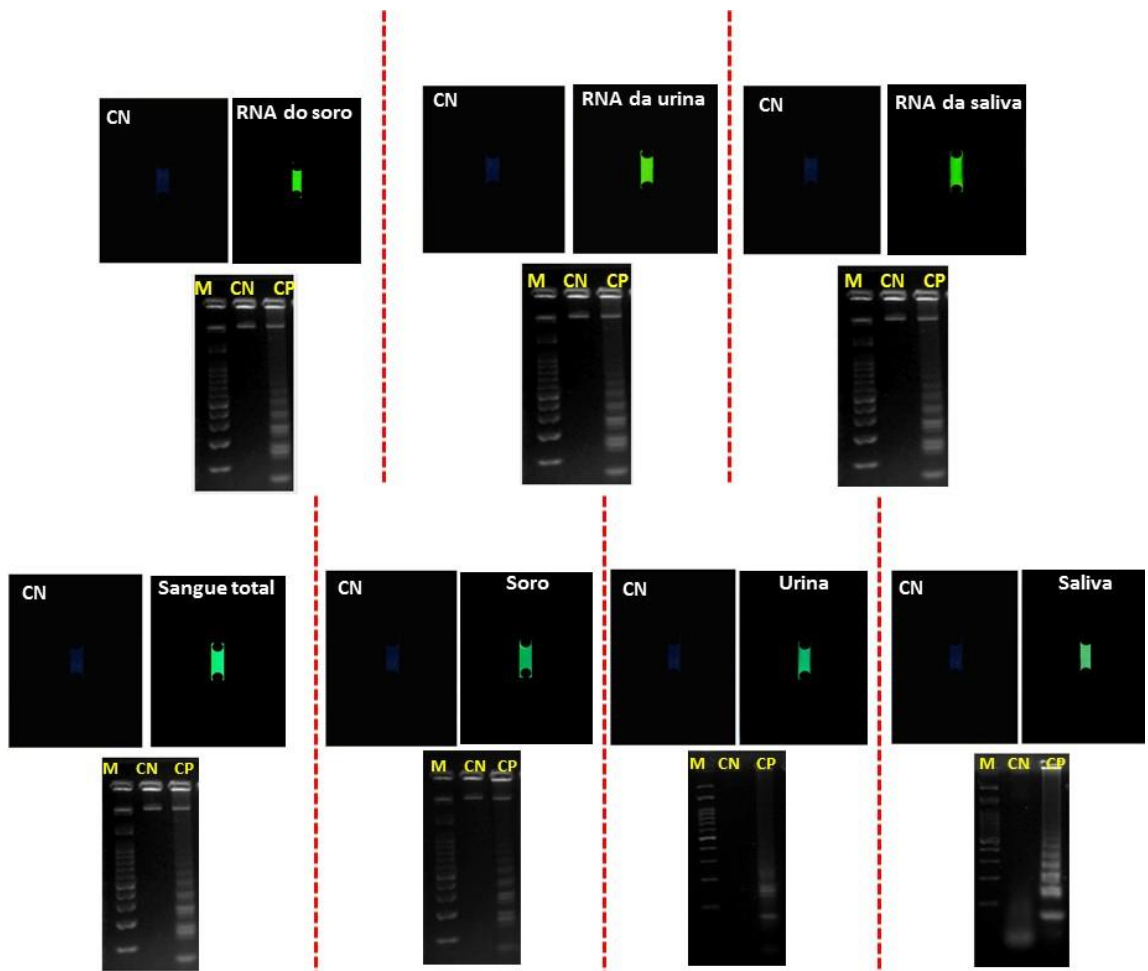


Figura 3.6 Detecção visual e por gel de eletroforese dos produtos amplificados por RT-LAMP nos microdispositivos de PeT partindo de amostras brutas (não processadas) de pacientes infectados com o ZIKV e de RNA pré-purificado de ZIKV.

Após 10 minutos de incubação foi possível detectar fragmentos amplificados em gel de agarose tanto para as amostras não processadas quanto para as amostras de RNA pré-purificado de sangue, saliva, e urina. Foi possível também realizar a detecção visual dos produtos de amplificação tanto quando iniciou-se as reações com amostras complexas quanto quando iniciou-se a reação com RNA pré-purificado. Esses resultados apresentam grande relevância pois mostram que a RT-LAMP é uma ferramenta pouco sensível a presença de inibidores, sendo possível realizar a detecção diretamente nas amostras complexas, sem a necessidade de uma etapa prévia de extração do ácido nucleico, que é uma etapa experimental laboriosa, relativamente demorada, que necessita de infraestrutura laboratorial sofisticada e profissionais treinados.

Outra vantagem em realizar a detecção diretamente em amostras como de urina e saliva se refere ao fato destas amostras apresentarem potencial para

aplicações em locais remotos sem instalações médicas e em ambientes comunitários para fins de vigilância e epidemiologia. Além disso, por serem facilmente coletadas, sem a necessidade de métodos invasivos, podem ser aplicadas por exemplo para coleta de amostras de crianças pequenas e recém-nascidos com mais facilidade. (T.Wong, 2006), (Hart, et al., 2011) e (Qiu, et al., 2009)

3.4.4 Determinação do limite de detecção

Para avaliar o limite de detecção da reação de RT-LAMP nos microdispositivos partindo das amostras reais, utilizou-se as amostras de soro diluídas em série variando de 1 a 1000 cópias iniciais de RNA por reação. Após dez minutos de incubação foi possível detectar fragmentos de DNA amplificados no gel de agarose e também visualmente em reações iniciadas com apenas 1 cópia de RNA por reação (5 μ L). (Figura 3.3).

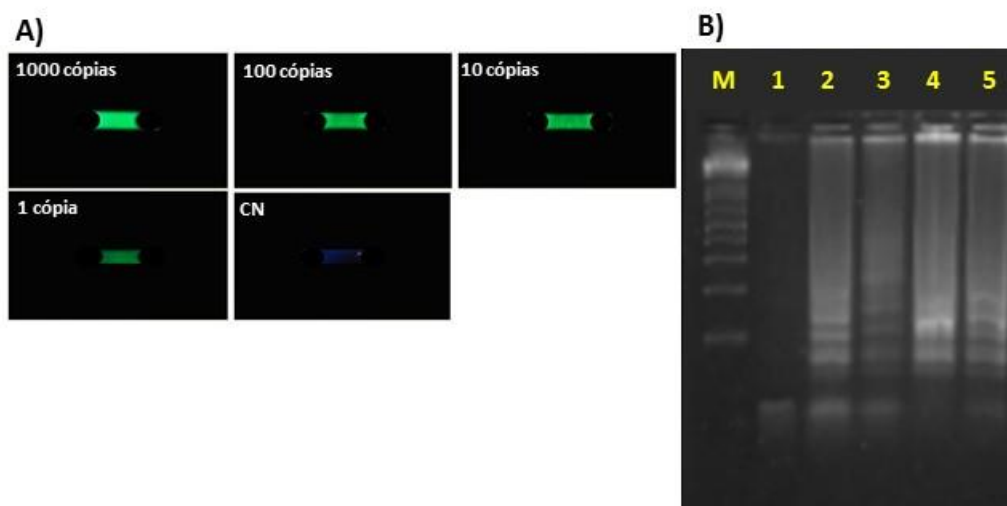


Figura 3.7 Avaliação do limite de detecção da RT-LAMP nos microchips de PeT, em A através da detecção visual e em B por eletroforese, M: Marcador de tamanho, 1: Controle negativo; 2: reação iniciada com 1 cópia de RNA; 3: reação iniciada com 10 cópias de RNA; 4: reação iniciada com 100 cópias de RNA em 5: reação iniciada com 1000 cópias de RNA.

O limite de detecção para o ZIKV obtido neste trabalho é inferior ao de muitos trabalhos descritos na literatura. Calvert et al. realizaram detecção visual indireta do ZIKV usando o indicador ácido-base vermelho de fenol e encontraram um limite de detecção de 2,7–3,9 cópias de RNA μ L⁻¹ em amostras de soro de pacientes infectados com o ZIKV. (Calvert, et al., 2017) Enquanto isso, Wang e

seus colaboradores utilizaram calceína para detectar diretamente 4 cópias de RNA μL^{-1} visualmente em 50 minutos de análise. (Wang, et al., 2016)

Embora diferentes fatores possam afetar a progressão da infecção, o que pode resultar em cargas virais variáveis para cada paciente, a carga viral média descrita na literatura no primeiro dia do início dos sintomas é $1,0 \times 10^4$ – $6,0 \times 10^7$ cópias de RNA mL^{-1} (Matheus, et al., 2017), (Besnard, et al., 2014). O limite de detecção encontrado neste estudo ($200 \text{ cópias mL}^{-1}$), prova que a RT-LAMP realizada nos microchips de poliéster-toner é capaz de detectar a presença do vírus, mesmo em pacientes com baixa carga viral, permitindo assim o diagnóstico da doença desde o primeiro dia após o início dos sintomas.

3.5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível detectar fragmentos de DNA amplificados em reações que iniciaram com apenas 1 cópia de RNA por reação (200 cópias de RNA mL⁻¹) tanto para detecção *off-chip* (por eletroforese em gel de agarose) quanto para detecção *on-chip* (detecção visual). O limite de detecção obtido neste estudo apresenta um valor bastante inferior ao da carga viral média de um paciente na fase aguda da infecção ($1,0 \times 10^4$ – $6,0 \times 10^7$ cópias de RNA mL⁻¹) (Matheus, et al., 2017), (Besnard, et al., 2014) e portanto a metodologia aqui proposta demonstrou ser mais que o suficiente para o diagnóstico da infecção por ZIKV no estágio inicial da infecção, quando a detecção de anticorpos ainda é negativa. Embora os kits comerciais de testes de anticorpos via ELISA para o ZIKV já tenham sido desenvolvidos, os níveis destes anticorpos são tipicamente detectáveis apenas quatro dias após o início dos sintomas e ainda há a possibilidade da ocorrência de resultados falsos positivos devido a probabilidade de reações cruzadas com outros arbovírus. (Pianka, et al., 2017).

Outra vantagem da RT-LAMP é a possibilidade de realizar a reação de amplificação diretamente nas amostras complexas como sangue total, urina e saliva (sem a necessidade realizar uma etapa prévia de extração do ácido nucleico) o que simplifica e diminui o tempo e custo por teste.

O ensaio de RT-LAMP realizado nos microdispositivos descartáveis de poliéster-toner proposto neste trabalho demonstrou-se de simples execução sem a necessidade de equipamentos sofisticados, rápido (12 min, levando em conta a detecção visual) e específico (não apresentando reações cruzadas com outros arbovírus semelhantes) para a detecção do ZIKV. Aliando as vantagens da RT-LAMP aos benefícios das plataformas microfluídicas, como a possibilidade de integração das etapas, baixo custo e a portabilidade, a metodologia deste trabalho demonstra ser uma ferramenta valiosa para o diagnóstico da infecção por ZIKV, com grande aplicabilidade especialmente em países em desenvolvimento onde os recursos são limitados (*point-of-care*) e onde surgem os maiores surtos de infecção por este arbovírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asbury, A. K. & Cornblath, D. R., 1990. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology*, Volume 27, pp. s21-s24.

Besnard, M. et al., 2014. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*, 19(13), pp. 1-4.

Boeuf, P. et al., 2016. The global threat of Zika virus to pregnancy: epidemiology, clinical perspectives, mechanisms, and impact. *BMC Medicine*, 14(112), pp. 1-9.

Brasil, P. et al., 2016. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*, Volume 375, pp. 2321-2334.

Calvert, A. E. et al., 2017. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS ONE*, p. e0185340..

Chan, J. F. et al., 2016. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *Journal of Infection*, 72(5), pp. 507-524.

de Oliveira, K. G. et al., 2017. Loop-mediated isothermal amplification in disposable polyester-toner microdevices. *Analytical Biochemistry*, pp. 70-77.

dos Santos, T., Rodriguez, A. & Almiron, M., 2016. Zika Virus and the Guillain-Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. *New England Journal of Medicine*, Volume 375, pp. 1598-1601.

Duarte, G. R. M. et al., 2011. Dynamic Solid Phase DNA Extraction and PCR Amplification in Polyester-Toner Based Microchip. *Analytical Chemistry*, p. 5182–5189.

Estrela, P. F. N. et al., 2019. Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. *Journal of Virological Methods*, Volume 271, p. 113675.

Hart, R. et al., 2011. Point-of-care oral-based diagnostics. *Oral diseases*, 17(8), pp. 745-752.

- loos, S. et al., 2014. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(7), pp. 302-307.
- Korhonen, E. M. et al., 2016. Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. *Eurosurveillance*, 21(2), p. 30107.
- Kutsuna, S. et al., 2014. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Eurosurveillance*, 19(4), p. 20683.
- Lamb, L. E. et al., 2018. Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitos by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Scientific Reports*, 8(3803), pp. 1-9.
- Matheus, S. et al., 2017. Zika Virus Persistence and Higher Viral Loads in Cutaneous Capillaries Than in Venous Blood. *Emerging Infectious Diseases*, 23(11), p. 1910–1911.
- Mendes, G. M. et al., 2019. Molecular Diagnostics of Dengue by Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) in Disposable Polyester-Toner Microdevices. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, pp. 1-9.
- Miranda-Filho, D. d. B. et al., 2016. Initial Description of the Presumed Congenital. *American Journal of Public Health*, 106(4), pp. 598-600.
- Moore, C. A. et al., 2017. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatrics*, 171(3), pp. 288-295.
- Nicastri, E. et al., 2016. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Eurosurveillance*, 21(32), p. 30314.
- NINDS, N. I. o. N. D. a. S., 2011. *Guillain-Barré syndrome*. s.l., s.n.
- Pianka, K., Rothman, A. & Tripathi, A., 2017. Status of diagnostics for three arbovirus infections in resource-limited settings. *TECHNOLOGY*, 5(3), pp. 115-128.

- Qiu, X. et al., 2009. Finger-actuated, self-contained immunoassay cassettes. *Biomedical Microdevices*, 11(1175), pp. 1572-8781.
- Ribeiro, L. S. et al., 2016. Zika crisis in Brazil: challenges in research and development. *Current Opinion in Virology*, Volume 18, p. 76–81.
- Rozé, B. et al., 2016. Zika virus detection in urine from patients with Guillain-Barré syndrome on Martinique, January 2016. *Eurosurveillance*, 21(9), p. 30154.
- Song, J. et al., 2016. Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. *Analytical Chemistry*, pp. 1-18.
- Speer, S. D. & Pierson, T. C., 2016. Diagnostics for Zika virus on the horizon. *SCIENCE*, 353(6301), pp. 750-751.
- T.Wong, D., 2006. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *The Journal of the American Dental Association*, 137(3), pp. 313-321.
- Tian, B. et al., 2016. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. *Biosensors and Bioelectronics* , p. 420–425 .
- Wang, X. et al., 2016. Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, Volume 238, pp. 86-93.
- WHO, W. H. O., 2016. *Dengue and sever dengue fact sheet*. s.l.:s.n.
- WHO, W. H. O., 2016. *SITUATION REPORT ZIKA VIRUS MICROCEPHALY GUILLAIN-BARRÉ SYNDROME*. s.l., s.n.
- Winer, J. B., 2001. Guillain Barré syndrome. *Molecular Pathology* , 54(6), p. 381–385.

CURRICULUM VITAE

Atualção Profissional

Vínculo Institucional

- 2018 Graduação em andamento em Licenciatura em Formação Pedagógica.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, IFG, Goiania, Brasil
- 2014 - 2017 Graduação em Química.
Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, Brasil
Título: DETECÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE POR RT-LAMP EM DISPOSITIVOS DESCARTÁVEIS DE POLIÉSTER-TONER
Orientador: Gabriela Rodrigues Mendes Duarte
- 2010 - 2013 Ensino Profissional de nível técnico em Técnico Integrado de Nível Médio em Química.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, IFG, Goiania, Brasil
-

Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- MENDES, GEOVANA; OLIVEIRA, KÉZIA; BORBA, JULIANE; OLIVEIRA, THAIS; FIACCADORI, FABIOLA; NOGUEIRA, MAURÍCIO; BAILÃO, ALEXANDRE; SOARES, CÉLIA MARIA; CARRILHO, EMANUEL; DUARTE, GABRIELA
1. Molecular Diagnostics of Dengue by Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) in Disposable Polyester-Toner Microdevices. JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY. **JCR**, v.30, p.1789 - 1998, 2019.
 2. ESTRELA, PAULO FELIPE NEVES; MENDES, GEOVANA DE MELO; DE OLIVEIRA, KÉZIA GOMES; BAILÃO, ALEXANDRE MELO; SOARES, CÉLIA MARIA DE ALMEIDA; ASSUNÇÃO, NILSON ANTÔNIO; DUARTE, GABRIELA MENDES RODRIGUES
Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS. **JCR**, v.271, p.113675 - , 2019.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- MENDES, G. M.; OLIVEIRA, K. G.; DUARTE, GABRIELA RODRIGUES MENDES
- Molecular Diagnostics of Dengue by Reverse Transcription-Loop mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) in Disposable Polyester-Toner Microdevices In: III Workshop da Pós Graduação em Química, 2019, Goiânia. III Workshop da Pós Graduação em Química. , 2019. *Referências adicionais: Brasil/Inglês.*
1. MENDES, G. M.; OLIVEIRA, KÉZIA; BAILÃO, ALEXANDRE; FIACCADORI, FABÍOLA; DUARTE¹, G. R. M. DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE POR RT-LAMP EM DISPOSITIVOS DESCARTÁVEIS DE POLIÉSTER-TONER (PeT) In: 14^o CONPEEX - Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão, 2017, Goiânia. DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE POR RT-LAMP EM DISPOSITIVOS DESCARTÁVEIS DE POLIÉSTER-TONER (PeT). , 2017. p.89 - *Referências adicionais: Brasil/Português.*
2. MENDES, G. M.; GIMENEZ, T. D.; BAILAO, A. M.; BORBA, JULIANE; FIACCADORI, F. S.; CARRILHO, EMANUEL; DUARTE, GABRIELA RODRIGUES MENDES
- Detecção Rápida do Vírus da Dengue por Amplificação Isotérmica Mediada por Loop após Transcrição Reversa em Dispositivos Descartáveis de Poliéster-Toner In: I Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. Centro-Oeste, 2017, Pirenópolis. I Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química Centro-Oeste. , 2017.
3. MENDES, GEOVANA DE MELO; OLIVEIRA, K. G.; GIMENEZ, T. D.; BAILÃO, ALEXANDRE; FIACCADORI, FABÍOLA; DUARTE¹, G. R. M. DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE POR RT-LAMP EM DISPOSITIVOS DESCARTÁVEIS DE POLIÉSTER-TONER (PeT) In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão- CONPEEX, 2016, Goiânia. DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE POR RT-LAMP EM DISPOSITIVOS DESCARTÁVEIS DE POLIÉSTER-TONER (PeT).. , 2016. p.284 - *Referências adicionais: Brasil/Português.*
4. MENDES, G. M.; GIMENEZ, T. D.; BAILAO, A. M.; FIACCADORI, F. S.; BORBA, JULIANE; CARRILHO, EMANUEL; DUARTE, GABRIELA RODRIGUES MENDES
5. Detecção Rápida do vírus da dengue por amplificação isotérmica mediada por loop após transcrição reversa em dispositivos descartáveis de poliéster-toner In: 18o Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis. 18o Encontro Nacional de Química Analítica. , 2016. v.1.
6. MENDES, G. M.; GIMENEZ, T. D.; BAILAO, A. M.; FIACCADORI, F. S.; BORBA, JULIANE; CARRILHO, EMANUEL; DUARTE, GABRIELA RODRIGUES MENDES
6. Rapid Detection of Dengue Virus by Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification in Polyester Toner Based Microchip In: LACE, 2016, Santiago. 22nd Latin-America Symposium. , 2016. p.76 - 76

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

- ESTRELA, PAULO FELIPE NEVES; DUARTE¹, G. R. M.; MENDES, G. M.; OLIVEIRA, K. G. DETECÇÃO DE ZIKA VÍRUS EM 10 MINUTOS POR AMPLIFICAÇÃO
1. ISOTÉRMICA DE DNA EM MICROCHIP DE POLIÉSTER-TONER In: 19o ENQA, 2018, Caldas Novas. ENQA. 2018.
Referências adicionais: Brasil/Português.
 2. OLIVEIRA, KÉZIA; MENDES, G. M.; ASSUNÇÃO, NILSON ANTÔNIO; BAILAO, A. M.; DUARTE¹, G. R. M. DETECÇÃO DO ZIKA VÍRUS POR RT-LAMP EM TEMPO REAL In: 19o ENQA, 2018, Caldas Novas. ENQA. 2018.
Referências adicionais: Brasil/Português.
 3. MENDES, G. M.; OLIVEIRA, K. G.; BORBA, JULIANE; CARRILHO, EMANUEL; FIACCADORI, F. S.; BAILAO, A. M.; DUARTE, GABRIELA RODRIGUES MENDES IAGNÓSTICO MOLECULAR DA DENGUE POR AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP PÓS TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-LAMP) EM MICRODISPOSITIVOS DESCARTÁVEIS DE POLIÉSTER-TONER In: 19o ENQA, 2018, Caldas Novas. ENQA. 2018.
Referências adicionais: Brasil/Português.
 4. DUARTE¹, G. R. M.; OLIVEIRA, K. G.; MENDES, G. M.; GIMENEZ, T. D.; BAILAO, A. M.; FIACCADORI, F. S.; BORBA, JULIANE; CARRILHO, EMANUEL ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA IN DISPOSABLE PeT MICRODEVICE In: 34th International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis, 2018, Rio de Janeiro. 34th International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis. , 2018.
Referências adicionais: Brasil/Português.
 5. MENDES, G. M.; OLIVEIRA, K. G.; BAILAO, A. M.; FIACCADORI, F. S.; DUARTE, GABRIELA RODRIGUES MENDES Detecção do Vírus Dengue por RT-LAMP em Dispositivos Descartáveis de Poliéster- Toner (PeT) In: Reunião Anual da SBQ, 2016, Goiânia. Reunião Anual da SBQ. , 2016.
Referências adicionais: Brasil/Português.

Prêmios e reconhecimentos

- | | |
|------|---|
| 2019 | Artigo na Capa do Periódico Journal of the Brazilian Chemical Society, Vol. 30, No. 9, 1841-1849, 2019, Journal of the Brazilian Chemical Society (JBACS) |
| 2019 | Menção Honrosa ao Trabalho apresentado, III Workshop da Pós Graduação em Química |
| 2018 | Prêmio de melhor poster, premiação SBQ regional centro-oeste no 19º Encontro Nacional de Química Analítica, Secretaria Region |

2016

Melhor painel (Química Analítica), 39ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química