



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE QUÍMICA (IQ)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LEONARDO MATOS FERREIRA

Teste molecular com dupla estratégia de detecção para o diagnóstico diferencial de SARS-CoV-2 e Influenza A por RT-LAMP no ponto de atendimento

GOIÂNIA
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) 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 9.610/98](#), 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 Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Leonardo Matos Ferreira

3. Título do trabalho

Teste molecular com dupla estratégia de detecção para o diagnóstico diferencial de SARS-CoV-2 e Influenza A por RT-LAMP no ponto de atendimento

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. 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.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Rodrigues Mendes Duarte, Professor do Magistério Superior**, em 04/07/2025, às 10:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Matos Ferreira, Usuário Externo**, em 04/07/2025, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



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 **5482370** e o código CRC **9ADC9C47**.

Referência: Processo nº 23070.026498/2025-79

SEI nº 5482370

LEONARDO MATOS FERREIRA

Teste molecular com dupla estratégia de detecção para o diagnóstico diferencial de SARS-CoV-2 e Influenza A por RT-LAMP no ponto de atendimento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, do Instituto de Química (IQ), da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte

GOIÂNIA
2025

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

Ferreira, Leonardo Matos

Teste molecular com dupla estratégia de detecção para o diagnóstico diferencial de SARS-CoV-2 e Influenza A por RT-LAMP no ponto de atendimento [manuscrito] / Leonardo Matos Ferreira. - 2025. 98 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2025.
Bibliografia. Anexos.

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

1. COVID-19. 2. Gripe. 3. Química analítica . 4. Diagnóstico molecular . 5. RT-LAMP. I. Duarte, Gabriela Rodrigues Mendes , orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata Nº 390 da sessão de Defesa de Dissertação de **Leonardo Matos Ferreira** que confere o título de **Mestre em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos quatro dias do mês de junho de dois mil e vinte e cinco, a partir das 14h:00m, no Anfiteatro do Bloco 02 - Instituto de Química, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação, intitulada "*Teste molecular com dupla estratégia de detecção para discriminação simultânea de SARS-CoV-2 e Influenza A por RT-LAMP no ponto de atendimento*". Os trabalhos foram instalados pela **Orientadora, Professora Doutora Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (IQ-UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (IQ-UFG)**, **Professor Doutor Leonardo Lopes da Luz (IPTSP-UFG)**. Durante a arguição, os membros da banca 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 o candidato aprovado pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Professora Doutora Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (IQ-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 quatro dias do mês de junho de dois mil e vinte e cinco.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Teste molecular com dupla estratégia de detecção para o diagnóstico diferencial de SARS-CoV-2 e Influenza A por RT-LAMP no ponto de atendimento



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Rodrigues Mendes Duarte, Professor do Magistério Superior**, em 04/07/2025, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Lopes Da Luz, Usuário Externo**, em 04/07/2025, às 11:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Professor do Magistério Superior**, em 07/07/2025, às 14:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



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 **5482363** e o código CRC **772E3F19**.

Referência: Processo nº 23070.026498/2025-79

SEI nº 5482363

Dedico esta dissertação à minha mãe, Valdenice, por possibilitar que eu seja a continuação de um sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao longo desta jornada, fui acompanhado por pessoas e instituições que formaram uma forte rede de apoio, pela qual sou imensamente grato. Essa colaboração foi fundamental para esta trajetória.

Agradeço à minha família pelo amor e torcida que foram a base para que eu conseguisse vivenciar esta etapa mesmo estando longe de muitos. Um agradecimento especial aos meus pais, Valdenice Reis Matos e Luiz Claudio de Souza Ferreira, pelo impulso e por sempre se preocuparem em me proporcionar uma caminhada com mais oportunidades e conforto.

Aos profissionais da educação que participaram de toda a minha formação, por sempre me conduzirem ao êxito com a noção do poder transformador da educação, dedicação e esforço. Vocês são referências fundamentais para mim.

Ao Laboratório de Biomicrofluídica, que desde o início me ofereceu o suporte necessário para lidar com o novo e o desafiador. Os momentos vividos e os conhecimentos adquiridos ao longo deste tempo foram extremamente valiosos e estão guardados com carinho. Agradeço especialmente ao Paulo, à Giovanna e à Charly. Esta etapa, sem vocês, seria muito mais difícil.

À minha orientadora, Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte. Sou grato pelos ensinamentos e pelas oportunidades de crescimento que surgiram durante o período de orientação. Agradeço também pelas ferramentas que me foram disponibilizadas para a execução deste trabalho e pelos momentos de lazer proporcionados ao longo da jornada.

À minha segunda família, formada ao longo da vida, composta pelos amores que estiveram ao meu lado neste período. Agradeço muito por me ouvir e me encorajar. Muito bom aprender sobre amizade e companheirismo com vocês.

Aos membros da banca examinadora de qualificação e defesa, Dra. Paola Cristina Resende Silva, Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro e Dr. Leonardo Lopes da Luz, pelas contribuições, observações e sugestões enriquecedoras.

À Universidade Federal de Goiás pela infraestrutura e assistência durante meu percurso acadêmico. À CAPES pela bolsa concedida. À FIOCRUZ pela parceria fundamental na execução deste trabalho.

Meus sinceros muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Características gerais do patógeno SARS-CoV-2	2
1.1.1 Taxonomia, estrutura genômica e sazonalidade	2
1.1.2 Contexto brasileiro e mecanismo evolutivo	4
1.2 Características gerais do patógeno Influenza A	5
1.2.1 Taxonomia, estrutura genômica e sazonalidade	5
1.2.2 Mecanismo evolutivo e contexto brasileiro	7
1.3 Diagnóstico molecular de doenças virais	8
1.3.1 Testes de amplificação de ácidos nucleicos	8
1.3.2 Testes de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos.....	11
1.4 Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP)	11
1.5 Detecção dos produtos de amplificação LAMP	14
1.5.1 Detecção colorimétrica.....	15
1.5.2 Detecção por ensaio de fluxo lateral	15
1.6 Diagnóstico molecular da COVID-19 e da gripe por RT-LAMP: revisão e proposta deste trabalho	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Equipamentos, materiais, reagentes e soluções	20
3.2 Procedimentos experimentais	20
3.2.1 Amostras biológicas	20
3.2.2 Reação RT-LAMP	22
3.2.3 Detecção da reação RT-LAMP.....	24
3.2.4 Otimização da reação RT-LAMP no formato <i>singleplex</i>	27
3.2.5 Otimização da detecção RT-LAMP por ensaio de fluxo lateral.....	27
3.2.6 Especificidade e limite de detecção dos ensaios RT-LAMP no formato <i>singleplex</i>	28

3.2.7	Otimização da reação RT-LAMP no formato <i>duplex</i>	29
3.2.8	Especificidade e limite de detecção dos ensaios RT-LAMP no formato <i>duplex</i>	29
3.2.9	Codetecção e aplicação da metodologia em painel de amostras....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Tempo de análise do ensaio RT-LAMP e os formatos de otimização	32
4.2	Ensaio RT-LAMP no formato <i>singleplex</i>	33
4.2.1	Otimização da temperatura e tempo reacional.....	33
4.2.2	Otimização da detecção via ensaio de fluxo lateral.....	36
4.2.3	Especificidade dos ensaios RT-LAMP no formato <i>singleplex</i>	40
4.2.4	Limite de detecção dos ensaios RT-LAMP no formato <i>singleplex</i> ...	44
4.3	Ensaio RT-LAMP-LFA no formato <i>duplex</i>	46
4.3.1	Otimização de betaina e enzima Bst DNA polimerase	46
4.3.2	Especificidade e limite de detecção do ensaio RT-LAMP no formato <i>duplex</i>	49
4.4	Codetecção e aplicação da metodologia em painel de amostras	53
4.4.1	Codetecção	53
4.4.2	Painel de amostras.....	54
4.5	Avaliação prática: custo e viabilidade do ensaio em contextos descentralizados	59
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	61
5.1	Conclusão	61
5.2	Perspectivas	62
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura do vírus SARS-CoV-2. A. Proteínas estruturais no envelope viral. B. Organização genômica. Fonte: RAHIMI et. al, 2021.....3
- Figura 2** – Identificação dos vírus respiratórios no Brasil em 2024 segundo semana epidemiológica de início dos sintomas. Fonte: Grupo de Atenção à Linha de Frente (GAL) - Ministério da Saúde, 2024.....4
- Figura 3** – Distribuição global dos vírus Influenza de acordo com seus subtipos entre 31 de março e 14 de abril de 2025. Fonte: Adaptado do relatório Global Respiratory Virus Activity Weekly Update n° 524 – WHO, 2025.....6
- Figura 4** – Estrutura do vírus Influenza A: os oito segmentos de RNA e o capsídeo viral. Fonte: NELSON et al, 2007).....7
- Figura 5** – Representação da etapa acíclica da reação de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP). A. Esquema dos iniciadores internos (FIP e BIP) e externos (B3 e F3) assim como as seis regiões de anelamento do DNA alvo. B. Sequências da reação enzimática LAMP para formação da estrutura haste-laço. Fonte: TOMITA et al., 2008..... 13
- Figura 6** – Representação das sequências da etapa cíclica da reação de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP). Fonte: TOMITA et al., 2008. 14
- Figura 7** – Resumo gráfico do ensaio RT-LAMP com detecção dupla de SARS-CoV-2 e Influenza A. A. Resultado colorimétrico (etapa confirmatória). B. Resultado por ensaio de fluxo lateral (etapa de diferenciação). C. “Sanduíches moleculares” formados nas fitas de fluxo lateral. Fonte: Autoria própria.26
- Figura 8** – Fluxo de trabalho do teste RT-LAMP para detecção de SARS-CoV-2 e Influenza A desde a coleta da amostra a interpretação dos resultados. Fonte: Autoria própria com uso do *software* BioEdit.....32
- Figura 9** – Otimização do tempo e da temperatura da reação RT-LAMP no formato *singleplex* para detecção de SARS-CoV-2 a partir da avaliação de dois conjuntos de iniciadores: A. Conjunto 1 e B. Conjunto 2. Fonte: Autoria própria.33
- Figura 10** – Otimização do tempo e da temperatura da reação RT-LAMP no formato *singleplex* para detecção de Influenza A a partir de dois subtipos do vírus como alvo: A. Subtipo (H1N1)pdm09. B. Subtipo H3N2. Fonte: Autoria própria.35
- Figura 11** – Otimização da detecção da reação RT-LAMP por ensaio de fluxo lateral a partir da variação de volume reacional analisado. A. Ensaio *singleplex* para

detecção de Influenza A. B. Ensaio <i>singleplex</i> para detecção de SARS-CoV-2. Gráficos obtidos com o <i>software</i> Image J. CN: controle negativo. Fonte: Autoria própria.	38
Figura 12 – Otimização da concentração de uma sonda utilizada preliminarmente para detecção de produtos de amplificação de SARS-CoV-2 por ensaio de fluxo lateral. Fonte: Autoria própria.	39
Figura 13 – Especificidade da detecção de variantes de SARS-CoV-2 por RT-LAMP no formato <i>singleplex</i> com detecção colorimétrica, por ensaio de fluxo lateral e separação eletroforética em gel de agarose. M: marcador. Fonte: Autoria própria. .	40
Figura 14 – Região do genoma de SARS-CoV-2 (gene ORF1ab) utilizada para detecção do vírus por RT-LAMP. A. Regiões de anelamento dos iniciadores LAMP. B. Alinhamento de sequências de diferentes variantes do vírus. Fonte: Autoria própria.	41
Figura 15 – Especificidade da detecção de subtipos de Influenza A por RT-LAMP no formato <i>singleplex</i> com detecção colorimétrica, por ensaio de fluxo lateral e separação eletroforética em gel de agarose. M: marcador. Fonte: Autoria própria. ..	43
Figura 16 – Região do genoma de Influenza A (gene M) utilizada para detecção do vírus por RT-LAMP. A. Regiões de anelamento dos iniciadores LAMP. B. Alinhamento de sequências de diferentes subtipos do vírus. Fonte: Autoria própria.	44
Figura 17 – Limite de detecção dos ensaios RT-LAMP no formato <i>singleplex</i> com detecção dupla. A. Detecção de SARS-CoV-2. B. Detecção de Influenza A. Fonte: Autoria própria.	45
Figura 18 – Especificidade da reação RT-LAMP não otimizada no formato <i>duplex</i> . Fonte: Autoria própria.	47
Figura 19 – Otimização da concentração da enzima Bst DNA polimerase nos ensaios RT-LAMP no formato <i>duplex</i> . Fonte: Autoria própria.	49
Figura 20 – Especificidade do ensaio RT-LAMP no formato <i>duplex</i> para detecção de Influenza A e SARS-CoV-2. A. Detecção colorimétrica. B. Detecção via ensaio de fluxo lateral. C. Detecção via eletroforese em gel de agarose. M: marcador. Fonte: Autoria própria.	50
Figura 21 – Curvas de melting dos ensaios baseados em reações RT-LAMP em tempo real com o protocolo do teste desenvolvido. A. Alvo SARS-CoV-2. B. Alvo Influenza A. Fonte: Autoria própria.	51

Figura 22 – Limite de detecção do ensaio RT-LAMP no formato <i>duplex</i> . A. Detecção dupla de SARS-CoV-2 e Influenza A. B. Análise das triplicatas próximo ao limite de detecção. Fonte: Autoria própria.	52
Figura 23 – Codetecções em ensaios <i>duplex</i> RT-LAMP. A. Reações avaliadas com as condições experimentais dos ensaios <i>singleplex</i> . B. Reações avaliadas com as condições experimentais dos ensaios <i>duplex</i> . Fonte: Autoria própria.	54
Figura 24 – Painel de amostras clínicas avaliado com o teste RT-LAMP com detecção dual. Fonte: Autoria própria.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das amostras de RNA viral utilizadas na otimização do teste RT-LAMP	21
Tabela 2 - Sequência dos iniciadores utilizados na reação RT-LAMP para detecção de SARS-CoV-2 e Influenza A.	23
Tabela 3 – Descrição das amostras utilizadas na avaliação do painel clínico e os respectivos resultados obtidos no teste RT-LAMP	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- B3** Iniciador externo reverso
- BIP** *Backward Inter Primer* (Iniciador interno reverso)
- Bst** *Bacillus stearothermophilus*
- cDNA** DNA complementar
- CNS** Conselho Nacional de Saúde
- COVID-19** *Coronavirus Disease 2019* (Doença do Coronavírus 2019)
- Ct** *Cycle threshold* (Limiar da fase exponencial)
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- DNA** *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- dNTP** Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- EDTA** Ácido etilenodiaminotetracético
- F3** Iniciador externo direto
- FIP** *Forward Inner Primer* (Inciador Interno Direto)
- LAMP** *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop)
- LB** Iniciador de Loop Reverso
- LF** Iniciador de Loop direto
- LFA** *Lateral Flow Assay* (Teste de Fluxo Lateral)
- M** Marcador de tamanho de DNA
- NAAT** *Nucleic Acid Amplification Test* (Teste de amplificação de ácido nucleico)
- INAAT** *Isothermal Nucleic Acid Amplification Test* (Teste de amplificação isotérmica de ácido nucleico)
- OMS** Organização Mundial da Saúde
- bp** Pares de bases
- PCR** *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
- PoCT** *Point-of-care test* (Teste no ponto de necessidade)
- qPCR** *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)
- qLAMP** *Quantitative Loop Mediated Isothermal Amplification* (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop Quantitativa)
- RNA** *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

RT-LAMP *Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification*
(Transcrição Reversa seguida de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop)

RT-LAMP-LFA *Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification with Lateral Flow Assay* (Transcrição Reversa seguida de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop com Ensaio de Fluxo Lateral)

RT-PCR *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase)

SARS-CoV-2 *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave)

SPE *Solid Phase Extraction* (Extração em Fase Sólida)

TBE Tris-borato-EDTA

UV Ultravioleta

VOC *Variant of Concern* (Variante de Preocupação)

VOI *Variant of Interest* (Variante de Interesse)

VUM *Variant Under Monitoring* (Variante Sob Monitoramento)

WHO *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

RESUMO

A COVID-19 e a gripe são infecções agudas com sintomas semelhantes como tosse, febre, dor de garganta e mialgia, o que pode gerar equívocos no diagnóstico clínico e no controle epidemiológico dessas doenças. Isso ressalta a importância de metodologias confiáveis e acessíveis para a testagem populacional com o intuito de identificá-las com acurácia e controlar a propagação dos vírus que as causam. Assim, este trabalho propõe a detecção molecular simultânea dos patógenos SARS-CoV-2 e vírus da Influenza A por RT-LAMP (Transcrição Reversa seguida de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop). O teste desenvolvido adota uma abordagem seletiva com duas etapas de detecção sequenciais: uma colorimétrica, que confirma a presença de ao menos um dos vírus no meio, e outra por ensaio de fluxo lateral, que os diferencia. Nos casos em que o resultado é negativo, a segunda etapa é dispensada, o que economiza recursos e racionaliza o processo diagnóstico. As reações foram otimizadas, inicialmente, no formato *singleplex* e ajustadas em seguida para o formato *duplex*, ocorrendo a 65 °C por 40 minutos. Quanto a especificidade do teste, não foram observadas reações cruzadas com outros vírus respiratórios e o ensaio apresentou um limite de detecção de 150 cópias de RNA viral/ μL nas duas etapas de detecção. Ao avaliar um painel com 60 amostras clínicas de diferentes variantes de SARS-CoV-2 e subtipos de Influenza A, o ensaio apresentou acurácia de 86,7% (na etapa colorimétrica), 85,0% (na etapa por fluxo lateral para SARS-CoV-2) e 88,3% (na etapa por fluxo lateral para Influenza A) em comparação ao método padrão-ouro RT-qPCR (Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa). O teste pode ser concluído em menos de uma hora, é visualmente interpretável e requer mínima infraestrutura laboratorial. A combinação da precisão molecular com a simplicidade operacional o torna promissor para aplicação no ponto de atendimento, auxiliando no controle da COVID-19 e da gripe, sobretudo, em locais com recursos limitados.

Palavras-chave: COVID-19; gripe; amplificação de ácidos nucleicos; bioanálise; química analítica; diagnóstico molecular.

ABSTRACT

COVID-19 and influenza are acute infections with overlapping symptoms such as cough, fever, sore throat, and myalgia, which can lead to misdiagnoses and hinder epidemiological control. This highlights the need for reliable and accessible testing methodologies to accurately identify these diseases and control the spread of their causative viruses. This study proposes a molecular detection strategy for the simultaneous discrimination of SARS-CoV-2 and Influenza A pathogens using RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification). The developed assay adopts a more selective approach with two sequential detection steps: a colorimetric stage, which confirms the presence of at least one of the viruses, and a lateral flow assay, which discriminates between them. In negative cases, the second step is omitted, saving resources and streamlining the diagnostic process. Reactions were initially optimized in a singleplex format and subsequently adjusted to duplex, performed at 65 °C for 40 minutes. Regarding the test specificity, no cross-reactivity with other respiratory viruses was observed, and the assay showed a detection limit of 150 copies of viral RNA/ μ L in both detection steps. When testing a panel of 60 clinical samples containing various SARS-CoV-2 variants and Influenza A subtypes, the assay showed an accuracy of 86.7% (colorimetric stage), 85.0% (lateral flow for SARS-CoV-2), and 88.3% (lateral flow for Influenza A) compared to the gold standard method RT-qPCR (Reverse Transcription followed by quantitative Polymerase Chain Reaction). The test can be completed in under one hour, is visually interpretable, and requires minimal laboratory infrastructure. The combination of molecular accuracy with operational simplicity makes it a promising tool for point-of-care applications, contributing to the control of COVID-19 and influenza, especially in resource-limited settings.

Keywords: COVID-19; influenza; nucleic acid amplification; bioanalysis; analytical chemistry; molecular diagnostic;

1 INTRODUÇÃO

Febre, tosse, dor de garganta, fadiga e mialgia são sintomas comuns e inespecíficos observados em uma ampla variedade de infecções virais (Lee; Treanor, 2016). Nesse sentido, a disseminação de diversas doenças virais e seu potencial de cocirculação tornaram a diferenciação entre elas ainda mais complexa. Essa complexidade se torna especialmente preocupante quando as doenças envolvidas são responsáveis por epidemias sazonais com altas taxas de hospitalização e mortalidade, como é o caso da Doença de Coronavírus 2019 (COVID-19, do inglês *Coronavirus Disease 2019*) e da influenza (gripe) (WHO, 2023, 2024). Devido às semelhanças entre elas, o erro de diagnóstico clínico é frequente, o que representa desafios significativos para um diagnóstico preciso e uma vigilância epidemiológica eficaz.

O vírus SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) é o sétimo dentre os coronavírus identificados que causa infecção em seres humanos sendo o agente etiológico da COVID-19 (Wu et al., 2020). Esse nome faz referência à sua descoberta em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, na China. Devido à sua alta transmissibilidade, o vírus se disseminou globalmente resultando em mais de 777 milhões de casos e mais de 7 milhões de mortes registradas até abril de 2025 (WHO, 2025).

Em março de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como uma pandemia e, em maio de 2023, anunciou o fim da emergência de saúde global relacionada a essa doença. Esse progresso é atribuído sobretudo à vacinação em massa (Mathieu et al., 2021). Embora o estado de pandemia tenha se encerrado, a doença ainda representa um significativo risco à saúde pública, uma vez que o patógeno SARS-CoV-2 continua em circulação, especialmente devido ao surgimento frequente de novas variantes (Ribas Freitas; Giovanetti; Alcantara, 2021). A esse respeito, apenas entre 6 de janeiro e 2 de fevereiro de 2025, foram identificados mais de 147 mil casos no mundo (WHO, 2025).

A gripe, como é conhecida a doença causada pelo vírus Influenza, é outra infecção aguda que atinge o sistema respiratório humano. Ela é responsável por desencadear epidemias sazonais em diversos países, além de ocasionais pandemias históricas, como a da gripe “suína” em 2009 e a da gripe espanhola em 1918, que

resultaram em milhões de óbitos (D'ADAMO et al., 2023). A doença apresenta picos sazonais que afetam diferentes regiões do mundo em momentos distintos do ano. Além disso, crianças, idosos e indivíduos com comorbidades são particularmente vulneráveis às complicações associadas à gripe (WHO, 2023). É relevante ressaltar, ainda, que a vacinação para doença ocorre anualmente devido às constantes mutações do vírus influenza, que geram novas cepas e exigem atualizações na composição da vacina para garantir proteção eficaz (VLAICU et al., 2024).

A COVID-19 e a gripe possuem como características comuns o fato de acometer indivíduos de todas as faixas etárias, possuírem semelhantes formas de transmissão por gotículas respiratórias, além de compartilharem sintomas e sinais clínicos, com exceção dos casos assintomáticos. Isso ressalta a importância do desenvolvimento de metodologias simples para a testagem populacional com o objetivo de identificar e diferenciar com exatidão essas doenças tanto para o diagnóstico clínico correto dos pacientes quanto para controlar a propagação dos vírus que as causam. A detecção rápida e específica de patógenos que causam doenças semelhantes é crucial para o atendimento adequado dos pacientes infectados e para o monitoramento epidemiológico. Com a diferenciação dessas doenças, informações úteis são obtidas relacionadas ao tempo de infecção, medidas de isolamento e prevenção, logística em ambientes de saúde para evitar contaminação cruzada, produção de vacinas e orientação de políticas públicas adequadas (Chu et al., 2020; Jang et al., 2022; Sun et al., 2022).

1.1 Características gerais do patógeno SARS-CoV-2

1.1.1 Taxonomia, estrutura genômica e sazonalidade

O SARS-CoV-2 é um betacoronavírus pertencente ao subgênero *Sarbecovirus*, da família *Coronaviridae*. Esse vírus apresenta uma estrutura esférica, com diâmetro variando entre 120 e 140 nm, e seu material genético é composto por RNA de fita simples, de polaridade positiva, contendo cerca de 30.000 nucleotídeos (Hu et al., 2021). O RNA está envolto por uma cápsula lipoproteica e tal genoma contém todas as informações necessárias para a replicação viral e a síntese das proteínas essenciais para sua propagação na presença da maquinaria celular do hospedeiro (GORBALENYA et al., 2020).

O vírion do SARS-CoV-2 contém quatro proteínas estruturais principais: a proteína *spike* (S), a proteína de envelope (E), a proteína de membrana (M) e a proteína de nucleocapsídeo (N) (Figura 1A). O genoma viral, por sua vez, é composto por 14 *open reading frames* (ORFs), ou "fases de leitura abertas", que são sequências de nucleotídeos que podem ser transcritas e traduzidas para formar proteínas (Figura 1B). Dentre essas ORFs, as ORF1a e ORF1b desempenham papéis cruciais no ciclo de vida do SARS-CoV-2, uma vez que são regiões conservadas que codificam proteínas não estruturais essenciais para a replicação e transcrição (Rahimi; Mirzazadeh; Tavakolpour, 2021).

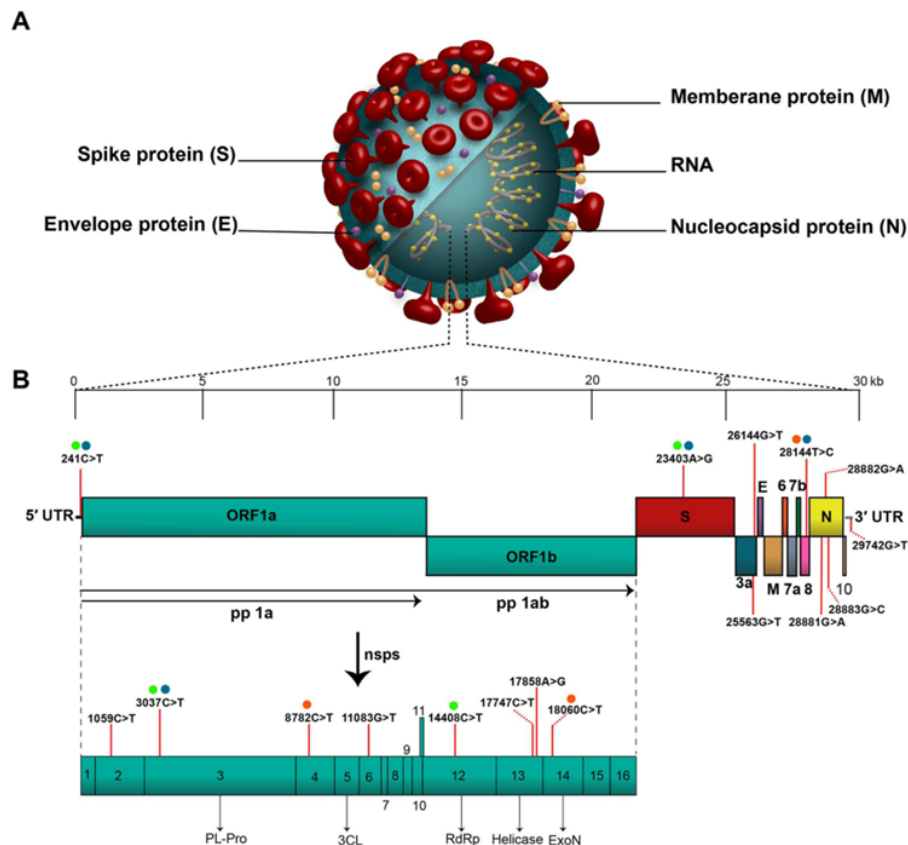


Figura 1 – Estrutura do vírus SARS-CoV-2. A. Proteínas estruturais no envelope viral. B. Organização genômica. Fonte: RAHIMI et. al, 2021.

Existem indícios de que o SARS-CoV-2 possa apresentar padrões sazonais semelhantes aos observados em outras doenças respiratórias, como a gripe (Guo et al., 2024; Kyaw et al., 2024). No entanto, até o momento a disseminação da COVID-19 não seguiu um ciclo sazonal fixo, com ondas de infecções ocorrendo em momentos diversos ao redor do mundo. De forma geral, nas regiões tropicais, a transmissão da

COVID-19 foi observada durante todo o ano, enquanto nas regiões temperadas, os picos de infecção costumam ocorrer nos meses mais frios (Briz-Redón; Serrano-Aroca, 2020). Contudo, fatores como o surgimento de novas variantes além de imunidade adquirida por meio de vacinação e infecções prévias tornaram mais difícil prever com precisão as tendências sazonais da COVID-19 (WHO, 2021).

1.1.2 Contexto brasileiro e mecanismo evolutivo

No contexto brasileiro, a COVID-19 impactou profundamente o país desde 2020, resultando em um elevado número de casos e mortes. O Brasil enfrentou desafios devido à sua grande extensão territorial, desigualdades sociais, um sistema de saúde sobrecarregado e resistência política a algumas medidas de controle (Werneck; Carvalho, 2020). Em 2024, até 28 de dezembro, foram registrados 862.680 casos e 5.959 óbitos por COVID-19, com os estados de Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e São Paulo apresentando as maiores taxas de incidência. O vírus SARS-CoV-2 foi identificado de maneira expressiva em 2024, representando 38% dos casos de vírus respiratórios entre as semanas epidemiológicas 50 a 52 (BRASIL. Ministério da saúde, 2024) (Figura 2).

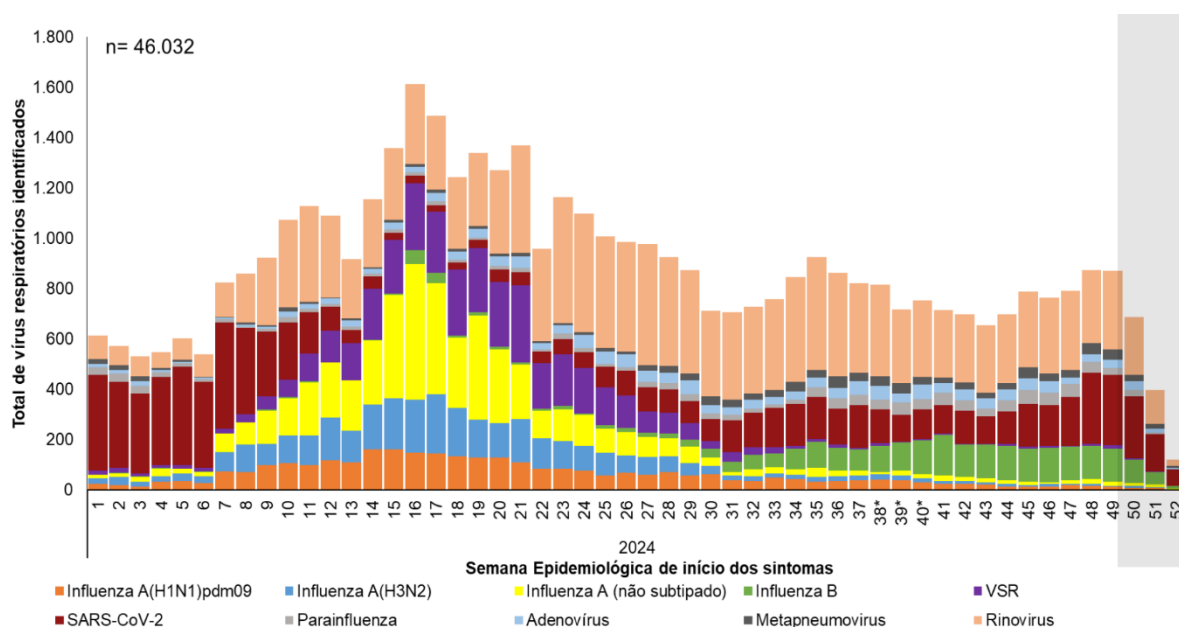


Figura 2 – Identificação dos vírus respiratórios no Brasil em 2024 segundo semana epidemiológica de início dos sintomas. Fonte: Grupo de Atenção à Linha de Frente (GAL) - Ministério da Saúde, 2024.

Desde 2020, o vírus tem se espalhado pelo globo e sofrido algumas mutações

mutações à medida que se transmite entre as pessoas, resultando no surgimento de diversas variantes em diferentes países. Algumas das mudanças genômicas afetam significativamente o comportamento do vírus alterando a forma como o vírus é transmitido e a gravidade das infecções que causa. Para acompanhar e avaliar o impacto dessas variantes na saúde pública, a OMS as classifica em três categorias: Variantes sob Monitoramento (VUM, do inglês *Variant Under Monitoring*), Variantes de Interesse (VOI, do inglês *Variant of Interest*) e Variantes de Preocupação (VOC, do inglês *Variant of Concern*) (WHO, 2025b).

O sistema de rastreamento e as definições de trabalho para as variantes do SARS-CoV-2 foi atualizado em 2023. De acordo com a OMS, as variantes denominadas por letras gregas como Alpha, Gamma, Omicron e Delta são classificadas como VOCs devido à sua capacidade de causar alterações prejudiciais na gravidade clínica da COVID-19 e/ou provocar uma diminuição significativa da eficácia das vacinas disponíveis. Vale ressaltar, ainda, que os testes diagnósticos devem estar alinhados com a detecção das variantes do SARS-CoV-2 para garantir a precisão e a eficácia na detecção da infecção, levando em consideração um maior número de cepas em circulação (Goux et al., 2024).

1.2 Características gerais do patógeno Influenza A

1.2.1 Taxonomia, estrutura genômica e sazonalidade

Os vírus Influenza pertencem a família *Orthomyxoviridae* que inclui os gêneros *Thogotovirus* e *Isavirus* e os quatro tipos do gênero *Influenzavirus* (A, B, C e D). O tipo A é conhecido por provocar epidemias sazonais frequentes e já foi responsável por desencadear ocasionais pandemias históricas. O tipo B, linhagens *Yamagata* e *Victoria*, também causa epidemias sazonais de forma recorrente e o C é identificado com menor frequência e, em geral, provoca infecções de gravidade leve. Por outro lado, o vírus Influenza D afeta sobretudo suínos e bovinos e não são conhecidos pela infecção ou ao desenvolvimento de doenças em humanos. (WHO, 2023).

O tipo A do vírus Influenza é o que apresenta atualmente maior incidência global (Figura 3). Em relatório publicado em abril de 2025, a OMS relata que a positividade para influenza permaneceu elevada na América do Norte e Central (predominantemente o subtipo A(H1N1)pdm09), na América do Sul (predominantemente o tipo A), na África Ocidental (predominantemente o subtipo

A(H1N1)pdm09), na África Oriental (predominantemente o tipo A), na Europa (predominantemente o subtipo A(H3N2) e o tipo B), no Oeste e Sudeste Asiático (vírus sazonal de influenza de todos os subtipos), no Sul da Ásia (predominantemente o subtipo A(H3N2)) e no Leste Asiático (predominantemente o subtipo A(H1N1)pdm09).

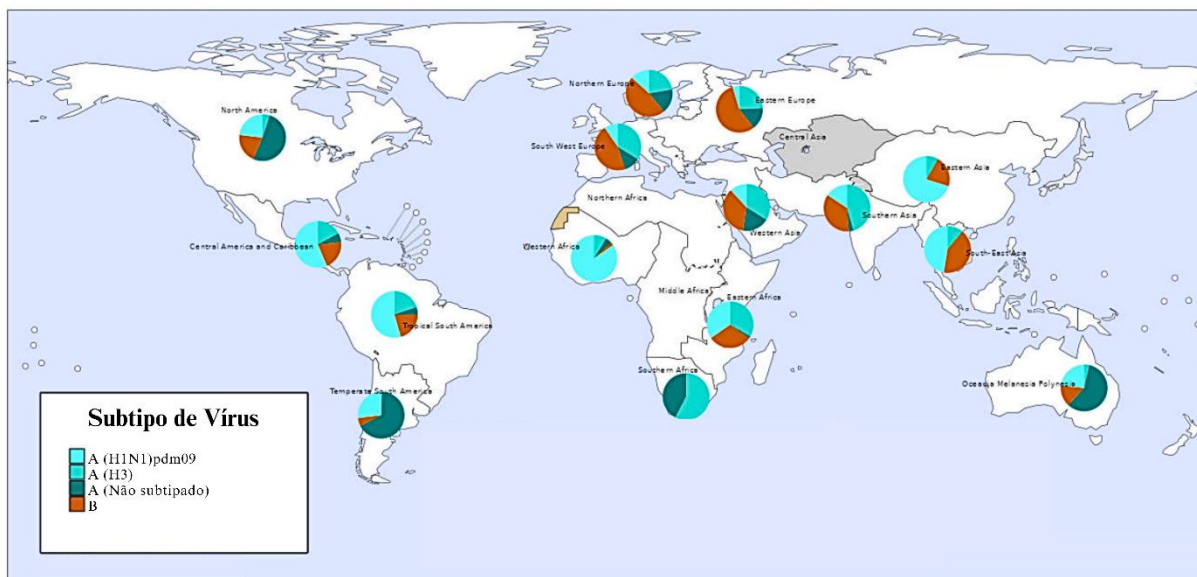


Figura 3 – Distribuição global dos vírus Influenza de acordo com seus subtipos entre 31 de março e 14 de abril de 2025. Fonte: Adaptado do relatório *Global Respiratory Virus Activity Weekly Update* n° 524 – WHO, 2025.

Na superfície dos vírus Influenza A, as diferentes combinações entre as proteínas Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA) geram 198 formas diferentes de combinações de subtipos (H1 – H18 e N1 – N11) (Forleo-Neto et al., 2003). Os subtipos H1N1 e H3N2 comumente infectam seres humanos de modo sazonal, mas existem outros subtipos que obtiveram a capacidade de se transmitir de forma eficiente entre humanos como, por exemplo, H5N1, H7N9, H9N2, H2N2 e H8N4 (Du et al., 2023). Convém pontuar que o subtipo do vírus pandêmico H1N1 de 2009 passou a ser denominado A(H1N1)pdm09 e a variante do H3N2, que surgiu em 2011 por rearranjo genético, é denominada A(H3N2)v (NELSON; HOLMES, 2007).

O genoma do vírus Influenza A consiste em oito segmentos de RNA de fita simples e polaridade negativa (Figura 4). Cada um deles codifica proteínas específicas essenciais para a replicação viral e a patogênese da gripe. O direcionamento de estudo dos oito genes que compõem o genoma de Influenza A está relacionado à sua aplicabilidade prática. Por exemplo, o gene HA (hemaglutinina), com cerca de 1.701

bases nucleotídicas, pode ser melhor empregado na distinção molecular dos subtipos H1N1 e H3N2. Em contrapartida, o gene M (matrix), com aproximadamente 1.027 bases nucleotídicas, exibe menor variabilidade e pode ser mais útil na diferenciação molecular entre os tipos Influenza A e Influenza B (Dadonaite et al., 2019).

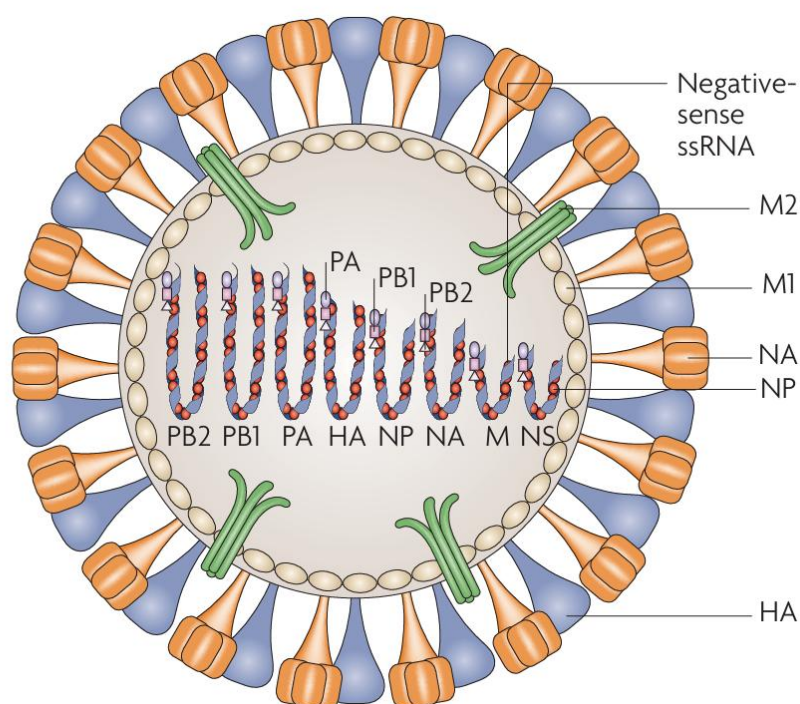


Figura 4 – Estrutura do vírus Influenza A: os oito segmentos de RNA e o capsídeo viral. Fonte: NELSON et al, 2007).

No que diz respeito a sazonalidade, os vírus Influenza apresentam um pico epidêmico variável conforme as condições climáticas regionais. Nas áreas de clima temperado do Hemisfério Sul, a maior incidência ocorre entre os meses de maio e setembro, enquanto no Hemisfério Norte, o período de maior disseminação abrange de dezembro a março. Nas zonas tropicais e subtropicais, por outro lado, a circulação do vírus se mantém ao longo de todo o ano, com uma incidência mais acentuada durante a estação chuvosa (Nelson; Holmes, 2007).

1.2.2 Mecanismo evolutivo e contexto brasileiro

Os mecanismos evolutivos conhecidos como *drift* antigênico e *shift* antigênico desempenham um papel crucial na capacidade do vírus Influenza de escapar da resposta imunológica do hospedeiro. O primeiro é caracterizado por mutações

específicas que ocorrem durante a replicação viral, enquanto o segundo resulta do rearranjo genético entre segmentos virais de diferentes origens, quando duas nanopartículas virais infectam simultaneamente a mesma célula. Essas alterações genéticas permitem que o vírus ultrapasse a imunidade adquirida previamente pelos humanos, favorecendo a circulação de novas variantes e cepas (Webster et al., 1992).

Nesse sentido, é importante observar que ainda não existe uma vacina de longa duração contra o vírus Influenza, visto que os indivíduos precisam receber doses anuais. Isso se deve ao fato de que os anticorpos gerados por infecções anteriores, seja por contágio natural ou vacinação, podem não ser capazes de reconhecer os antígenos das novas variantes virais, oferecendo, assim, uma proteção incompleta (Carrat & Flahault, 2007). Como resultado, os indivíduos continuam vulneráveis a infecções repetidas por Influenza durante a vida.

A OMS realiza anualmente uma análise dos principais tipos de vírus da gripe em circulação, com o objetivo de desenvolver uma vacina eficaz. No contexto brasileiro, o Ministério da Saúde, em parceria com empresas, considera as variações sazonais e epidemiológicas do vírus Influenza de acordo com as diferentes regiões do país, levando em conta as dimensões continentais do Brasil. Na última semana epidemiológica de 2024, foram registrados 120 casos por síndrome aguda respiratória sendo 13% causada por algum tipo do vírus Influenza (BRASIL. Ministério da saúde, 2024).

1.3 Diagnóstico molecular de doenças virais

1.3.1 Testes de amplificação de ácidos nucleicos

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs, do inglês *Nucleic Acid Amplification Tests*) distinguem-se dos testes sorológicos por sua capacidade de detectar ácidos nucleicos através da amplificação de fragmentos específicos do material genético alvo (Kang et al., 2022). O aumento exponencial na quantidade de tais fragmentos é utilizado sobretudo para a detecção precisa de patógenos, entre outras aplicações. A capacidade de detectar diretamente o material genético de um organismo ou microrganismo confere a esses testes alta especificidade e sensibilidade (Lee et al., 2019). Os NAATs, dessa forma, são ferramentas confiáveis no diagnóstico molecular de diversas doenças.

O processo comum de realização desses testes segue a seguinte sequência: extração e purificação de ácidos nucleicos da amostra biológica, reação de amplificação de DNA e detecção dos produtos de amplificação. Esses testes possibilitam que amostras de pacientes recém infectados positivem rapidamente após a infecção do paciente, pois não dependem da resposta imunológica do organismo, ao contrário dos testes baseados em sorologia (Kubina; Dziedzic, 2020).

Entre os NAATs, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) é amplamente reconhecida como a técnica padrão-ouro para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas, análises forenses e estudos genéticos em geral (BEN-AMI et al., 2020; KANG, 2019). Sua consolidação nos laboratórios deve-se à ampla aplicabilidade e à eficiência demonstrada ao longo dos anos. Desenvolvida por Kary Mullis na década de 1980, a PCR baseia-se em um processo no qual, ao final de cada ciclo reacional, a quantidade de fragmentos de DNA é duplicada, utilizando como base o DNA alvo inicial.

Em uma PCR convencional é utilizado um par de iniciadores, uma enzima DNA polimerase — comumente a Taq polimerase — desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e uma solução tampão que proporciona o ambiente químico adequado para a reação. Os iniciadores são oligonucleotídeos projetados para reconhecer e interagir de forma específica com o DNA alvo, promovendo o anelamento. Para que a reação ocorra, ela é submetida a ciclos de aquecimento em equipamentos chamados termocicladores, que realizam as etapas de desnaturação, anelamento e extensão da fita de DNA. O tempo total de análise de uma PCR convencional comumente está entre 1 hora e meia e 3 horas e, ao final do processo, obtêm-se milhares a milhões de cópias idênticas dos fragmentos de DNA, utilizando o DNA alvo como molde (Erich, 1989; Rahman et al., 2013).

Com os avanços na ciência e na tecnologia, novas modalidades de PCR foram desenvolvidas, aprimorando uma técnica que já demonstrava grande sucesso. Dentre essas inovações, destaca-se a Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR, do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), que permite a realização da transcrição reversa antes da amplificação por PCR, sendo especialmente útil quando o alvo é o ácido ribonucleico (RNA). Além disso, merece destaque a PCR quantitativa (qPCR, do inglês *quantitative Polymerase Chain Reaction*), que possibilita o monitoramento em tempo real do progresso da

amplificação, por meio da detecção de fluorescência (Erlich; Gelfand; Sninsky, 1991; Kubista et al., 2006).

Os testes de diagnóstico para doenças virais baseados em PCR oferecem as vantagens de uma detecção molecular com alta especificidade e sensibilidade. Abbasi et al. (2023) desenvolveram um teste com transcrição reversa seguida de PCR quantitativa multiplex (RT-qPCR) para detecção viral utilizando iniciadores e sondas recém-desenhadas que visam regiões virais conservadas com base em análises genômicas. O ensaio demonstrou desempenho clínico equivalente a um método comercial, com sensibilidade de 94,4% para SARS-CoV-2, 93,7% para Influenza A e 100% para Influenza B, além de 100% de especificidade para todos os alvos.

Ma et al. (2024) desenvolveram um teste RT-qPCR multiplex baseado em fluorescência para a detecção simultânea dos vírus SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B, utilizando um dispositivo de fabricação própria, capaz de fornecer resultados em até 30 minutos e detectar até 200 cópias/mL. Mosadegh et al. (2024) avaliaram a eficiência do ensaio imunoenzimático (ELISA), bem como de ensaios de RT-PCR em tempo real do tipo *singleplex* e multiplex para a detecção dos vírus SARS-CoV-2, Influenza A e B. A coinfeção pelos três vírus foi identificada em 9,5% dos pacientes (8 de 84), e a sensibilidade e especificidade do ensaio multiplex em comparação com o *singleplex* foram de 100% e 55%, respectivamente.

O uso da PCR, no entanto, é limitado por fatores como a necessidade de preparo das amostras, equipamentos caros, como o termociclador, tempo total de análise elevado, além da exigência de profissionais capacitados para sua execução. Esses aspectos tornam a PCR incompatível com a modalidade de testes no ponto de atendimento (PoCTs, do inglês *Point-of-care Tests*) (FAKRUDDIN et al., 2013). Convém pontuar ainda que a alta demanda por reagentes de PCR durante emergências, como na pandemia de COVID-19, causou limitações na aplicabilidade, comprometendo a capacidade de testes à medida que o número de casos aumentava. Pelos motivos descritos, outras técnicas de amplificação de DNA ganharam destaque sobretudo pelo fato de operarem de modo isotérmico dando início, assim, aos testes de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos (INAATs, do inglês *Isothermal Nucleic Acid Amplification Tests*) (GILL; GHAEMI, 2008; ZHAO et al., 2015).

1.3.2 Testes de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos

Algumas técnicas de amplificação de DNA ganharam destaque no âmbito dos diagnósticos moleculares de doenças virais por terem como característica principal não demandar ciclos de aquecimento, isto é, operam de modo isotérmico. São exemplos a amplificação de círculo rolante (RCA, do inglês *Rolling Circle Amplification*), amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP, do inglês *Loop-mediated Isothermal Amplification*), amplificação da recombinase polimerase (RPA, do inglês *Recombinase Polymerase Amplification*) e amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos (NASBA, do inglês *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*). Essas técnicas possibilitam a execução de testes de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos e proporcionam uma detecção molecular mais simples e rápida quando comparadas com a PCR, a técnica padrão-ouro (Oliveira; Veigas; Baptista, 2021).

A técnica LAMP, dentre as mencionadas, destacou-se por sua ampla aplicabilidade e simplicidade de execução metodológica. Ela foi desenvolvida pelo pesquisador Notomi Tomoko e colaboradores em 2000. Desde então, muitos testes para o diagnóstico de doenças infecciosas foram criados com base nessa abordagem. No contexto de pandemias e endemias, realizar testes em locais com recursos escassos e limitados, utilizando técnicas simples e rápidas como a LAMP, torna-se crucial para conter a propagação de patógenos (Mori; Notomi, 2009; Notomi et al., 2000, 2015) .

Além da elevada especificidade e sensibilidade, a reação de amplificação via LAMP possui como vantagem o fato de não ser fortemente afetada por interferentes presentes em amostras complexas de cunho biológico (Mori; Kanda; Notomi, 2013). Desse modo, as etapas de preparo de amostras são simplificadas ou podem até ser dispensadas e pode-se utilizar, por exemplo, amostras de urina, sêmen, soro, sangue total e saliva de maneira direta nas reações (Calvert et al., 2017; Dos Santos et al., 2021; Estrela et al., 2019; Mora-Cárdenas; Marcello, 2017).

1.4 Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP)

O mecanismo de amplificação de DNA a partir da técnica LAMP baseia-se na utilização de dois a três pares de iniciadores projetados para reconhecer e anelar em seis a oito regiões do genoma alvo de maneira complementar. Os iniciadores externos

F3 (direto) e B3 (reverso) assim como os iniciadores internos FIP (direto) e BIP (reverso) são indispensáveis para a síntese dos produtos de amplificação (Notomi et al., 2000). Por outro lado, os iniciadores de loop LF (direto) e LB (reverso) são utilizados na reação de modo opcional com o intuito de aumentar a velocidade da reação de amplificação (Nagamine; Hase; Notomi, 2002).

A LAMP permite a síntese de produtos de amplificação a partir de uma reação enzimática que ocorre em condições isotérmicas. Essa abordagem utiliza a enzima Bst, uma DNA polimerase termoestável derivada da bactéria *Bacillus stearothermophilus*. Essa enzima possui atividade de deslocamento de fita, assim, juntamente com os iniciadores específicos e demais reagentes (dNTPs, solução tampão, MgSO₄ e alvo), fragmentos do DNA alvo com tamanhos variados são formados a uma temperatura fixa. Esse processo ocorre em duas etapas: uma acíclica que objetiva a formação de loops nas duas extremidades da fita simples de DNA e outra cíclica que utiliza a estrutura com os loops formada na etapa acíclica para a formação dos produtos de amplificação (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008).

O iniciador FIP contém duas partes: F2 e F1c (Figura 5A). O anelamento da parte F2 na extremidade 3' do DNA alvo a ser amplificado (região F2c) marca o início da etapa acíclica da reação LAMP (Figura 5 B1). Em seguida, a enzima Bst é direcionada para sintetizar uma fita complementar. Posteriormente, o iniciador F3 anela em sua região complementar presente no DNA alvo (região F3c), também na extremidade 3' (Figura 5 B2). Isso desloca a fita simples anteriormente sintetizada na qual há a presença das regiões F1 e F1c que são complementares entre si (Figura 5 B3) e, assim, um loop nessa extremidade é gerado (Figura 5 B4) (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008).

Um processo análogo ao descrito ocorre na outra extremidade, oposta ao loop formado, com a ação dos iniciadores B3 e BIP (composto pelas partes B2 e B1c). Assim, ao final da etapa acíclica, uma fita simples de DNA é formada, contendo loops em ambas as extremidades (Figura 5 B5). Essa estrutura funciona como um DNA molde que atua como ponto de partida da etapa cíclica (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008).

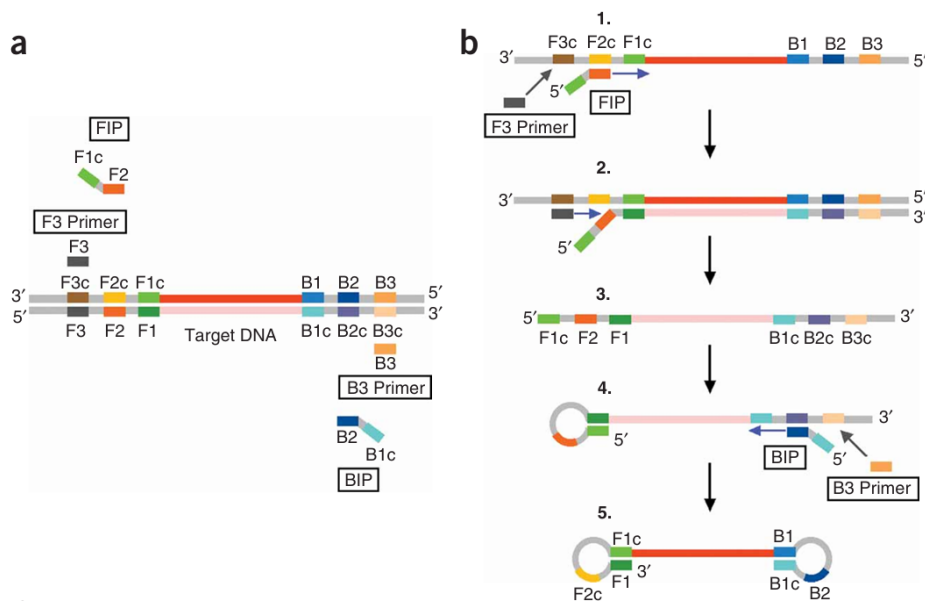


Figura 5 – Representação da etapa acíclica da reação de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP). A. Esquema dos iniciadores internos (FIP e BIP) e externos (B3 e F3) assim como as seis regiões de anelamento do DNA alvo. B. Sequências da reação enzimática LAMP para formação da estrutura haste-laço. Fonte: TOMITA et al., 2008.

Na etapa cíclica, os iniciadores que atuam são os internos (FIP e BIP). Inicialmente, o FIP anela na região F2c presente no loop da extremidade 3', direcionando a enzima Bst DNA polimerase para a síntese da fita complementar (Figura 6). Essa fita é então deslocada, não mais pela ação de iniciadores externos, mas devido à capacidade de autoativação da síntese possibilitada pelo loop da extremidade 5' do intermediário haste-laço. Como resultado, ocorre a formação de uma outra fita com uma repetição invertida em relação ao fragmento alvo (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008).

O iniciador BIP reconhece e anela à sua região complementar B2c, tanto na fita deslocada quanto na fita com repetição invertida, direcionando assim a Bst para a síntese. De forma similar, o iniciador FIP realiza o mesmo processo ao reconhecer as regiões F2c nas fitas presentes na reação. Essa etapa é cíclica, haja vista que múltiplas estruturas distintas com tamanhos variados continuam a ser formadas enquanto os iniciadores internos estiverem presentes na reação (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008).

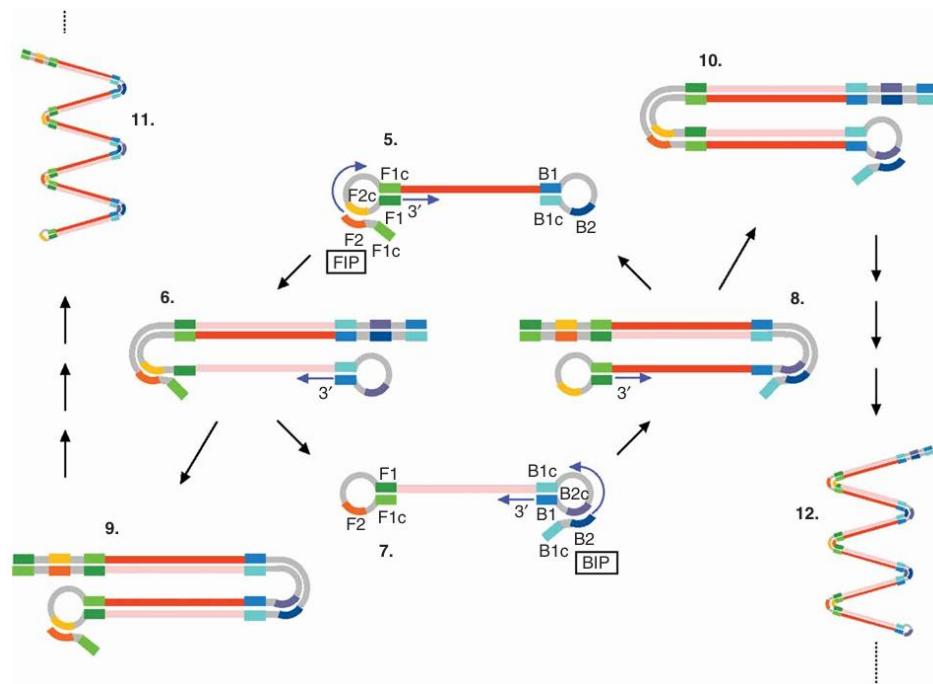


Figura 6 – Representação das sequências da etapa cíclica da reação de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP). Fonte: TOMITA et al., 2008.

Os iniciadores de loop (LF e LB), por sua vez, possuem sequências complementares à região que existe entre as regiões F1 e F2 (no loop da extremidade 3') e entre as regiões B1 e B2 (no loop da extremidade 5'). Ao reconhecerem e se anelarem nessas regiões, eles aumentam significativamente a velocidade da reação de amplificação, pois aumentam a quantidade de loops formados na etapa final da reação (cíclica). Os produtos de amplificação são formados sem a ação deles, mas com um tempo de reação maior (Nagamine; Hase; Notomi, 2002).

1.5 Detecção dos produtos de amplificação LAMP

Existem diferentes maneiras de detectar os produtos de amplificação gerados por uma reação LAMP. A reação, na presença do DNA alvo, gera os produtos de amplificação (fragmentos de DNA) e, como subprodutos, são liberados íons hidrônio (H_3O^+) e pirofosfato ($P_2O_7^{4-}$) no meio (Mori et al., 2001; Tomita et al., 2008). Portanto, a ocorrência da amplificação pode ser verificada diretamente detectando os produtos de amplificação, ou indiretamente detectando os subprodutos da reação. A eletroforese em gel de agarose que separa e detecta vários fragmentos de DNA é um exemplo de detecção direta (Notomi et al., 2000), enquanto a medição da turbidez do

meio devido à precipitação do sal pirofosfato de magnésio é um exemplo de detecção indireta (Mori et al., 2001).

Algumas formas de detecção estão alinhadas com a modalidade de testes no ponto de atendimento. Isso porque são abordagens com execução experimental prática e rápida, com simples interpretação dos resultados por meio visual, além de demandar pouco da estrutura de um laboratório ou equipamentos extras. São exemplos a detecção colorimétrica e por ensaio de fluxo lateral (LFA, do inglês *Lateral flow assay*).

1.5.1 Detecção colorimétrica

A detecção colorimétrica de uma reação LAMP é aquela que se baseia na mudança de cor do meio reacional para sinalizar um resultado positivo. Isso pode ser feito utilizando um indicador de pH na mistura reacional para detectar a acidificação do meio proveniente do aumento da concentração de íons hidrônios durante o processo de amplificação. À medida que a reação LAMP progride e o pH do meio diminui, a mistura reacional muda de cor sinalizando um teste positivo. Em contrapartida, na ausência do DNA alvo, a coloração do meio permanece a mesma que a inicial antes do período de incubação (Selva Sharma; Lee, 2024).

Outro exemplo de detecção colorimétrica ocorre com o uso de intercaladores de DNA, como SYBER Green e Eva Green. Esses fluoróforos intercalam nos produtos de amplificação, conferindo ao meio uma coloração verde. Na presença de luz UV (ultravioleta 315-400 nm), o meio emite fluorescência. Em contraste, na ausência de produtos de amplificação, o meio adquire uma coloração laranja e não apresenta fluorescência sob luz UV (De Oliveira et al., 2021). A avaliação visual do progresso da amplificação proporciona uma maneira prática de avaliar o resultado da reação.

1.5.2 Detecção por ensaio de fluxo lateral

O ensaio de fluxo lateral, muito popularizado no âmbito dos testes sorológicos, também pode ser empregado como metodologia para interpretar os resultados de uma reação LAMP. Para isso, nos produtos de amplificação são incorporadas moléculas de interesse, seja por ação de sondas específicas ou pela marcação dos iniciadores da reação. Na fita de fluxo lateral, uma região é dedicada à imobilização de anticorpos que interagem com tais moléculas marcadas. Quando a fita é imersa na solução após

o período de incubação da reação LAMP, juntamente com um tampão de eluição contendo nanopartículas de materiais como ouro, os produtos amplificados com o marcador específico se ligam aos anticorpos formando complexos denominados “sanduíches moleculares”. Dessa forma, uma linha se forma, indicando um resultado positivo (Gumus; Bingol; Zor, 2023; Sun et al., 2022).

O ensaio de fluxo lateral possibilita uma detecção simples e simultânea de múltiplos alvos. A multiplexação ocorre quando o meio reacional da LAMP contém mais de um conjunto de iniciadores, resultando na formação de produtos de amplificação de mais de um alvo. Dessa forma, moléculas marcadoras distintas são incorporadas a cada tipo de produto, visto que na fita de fluxo lateral pode existir mais de uma região teste com diferentes substâncias imobilizadas. Isso permite que a presença de cada alvo seja identificada com uma linha formada em regiões diferentes na fita de fluxo lateral (Estrela et al., 2025; Zheng et al., 2021).

A metodologia conhecida como LAMP-LFA (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop acoplada ao Ensaio de Fluxo Lateral), é compatível com os PoCTs, uma vez que pode ser implementada de forma prática em ambientes com recursos limitados (Zhou et al., 2021). A combinação da precisão da LAMP com a portabilidade do ensaio de fluxo lateral torna a detecção de múltiplos alvos acessível e eficiente em variados cenários incluindo locais remotos de difícil acesso. Embora atualmente seja o método de detecção multiplex mais compatível com o PoCT, ainda apresenta limitações, principalmente relacionadas ao custo e à necessidade de manuseio de produto pós-amplificação, o que aumenta tanto o custo geral da detecção quanto a complexidade do método devido a necessidade mais rigorosa de meios para evitar contaminações.

1.6 Diagnóstico molecular da COVID-19 e da gripe por RT-LAMP: revisão e proposta deste trabalho

Diversos autores têm publicado trabalhos envolvendo o diagnóstico diferencial da COVID-19 e da gripe por RT-LAMP. De forma geral, os trabalhos têm demonstrado elevada especificidade e sensibilidade além de ser compatível com formas de detecção simples e rápidas.

Wang et al. (2023) desenvolveram uma plataforma microfluídica para detecção de SARS-CoV-2, Influenza A (H1N1 e H3N2) e Influenza B, utilizando a técnica RT-

LAMP e a clivagem Cas12a para interpretação dos resultados por fluorescência. O ensaio possui um limite de detecção de 10 cópias por reação para os vírus analisados e não apresentou reação cruzada com outros coronavírus. Este dispositivo é portátil e versátil, permitindo que os dados de detecção sejam enviados para a internet e posteriormente utilizados para diagnóstico remoto.

Nguyen et al. (2024) também propuseram um dispositivo microfluídico com característica de ser centrífugo e que pode analisar 30 amostras na mesma plataforma. O foco do trabalho, realizado em uma hora e meia, é detectar molecularmente Influenza A (H1N1, H3N2), Influenza B e SARS-CoV-2 por RT-LAMP. O teste proporcionou confirmação rápida e precisa de amostras clínicas com limite de detecção de 100 cópias de RNA/ μ L.

Zhu et al. (2020) criaram um teste multiplexado para detectar duas regiões do genoma do vírus SARS-CoV-2 usando a técnica RT-LAMP combinada com um biossensor de fluxo lateral baseado em nanopartículas. O ensaio apresenta um limite de detecção de 12 cópias de RNA viral por reação e um tempo total de análise de uma hora, desde a coleta da amostra até a interpretação dos resultados. Devido à sua simplicidade metodológica, que requer apenas um termobloco, o teste pode ser aplicado no ponto de atendimento.

Zhang e Tanner (2021) descreveram um ensaio RT-LAMP multiplexado com quatro alvos em uma única reação: SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B e RNA humano. A detecção ocorreu por medidas de fluorescência. Os autores não avaliaram o limite de detecção, mas usaram alvos com baixa carga viral para otimização do ensaio, por exemplo, 50 cópias de RNA de SARS-CoV-2 e 21 cópias de RNA de Influenza B. Os testes apresentaram elevada especificidade.

Lee et al. (2021) relataram um kit de ferramentas para aplicação nos locais de atendimento visando o diagnóstico molecular multiplexado de SARS-CoV-2 e vírus Influenza (A e B) em amostras de saliva. O ensaio foi projetado para executar reações químicas em um substrato de papel com o intuito de realizar a extração, purificação e amplificação do RNA viral. O limite de detecção do trabalho foi de 50 cópias/ μ L e a detecção é visual a partir de uma análise colorimétrica.

Jee et al. (2023) desenvolveram um kit de LAMP multiplex em tempo real capaz de detectar simultaneamente Influenza A/B e SARS-CoV-2, com sensibilidades de 90,6%, 86,89% e 98,96%, respectivamente. O ensaio LAMP mostrou 100% de especificidade para amostras clínicas não infectadas, demonstrando desempenho

competitivo em comparação com os ensaios comerciais de RT-qPCR. Mytzka et al. (2023) avaliaram um protótipo de sistema microfluídico e demonstraram que o RT-LAMP *duplex* é capaz de diferenciar o vírus Influenza A/X-31 e o coronavírus bovino, com limites de detecção (LoDs) de 200 cópias/mL e 2000 cópias/mL, respectivamente

Muitos trabalhos da literatura conferem uma detecção com diferenciação simultânea de SARS-CoV-2 e de Influenza utilizando a metodologia LAMP-LFA, mas não emprega uma detecção dupla como uma estratégia metodológica. No contexto dos testes diagnósticos, a detecção dupla refere-se a uma abordagem em que dois métodos de detecção são usados para identificar a mesma infecção, aprimorando a precisão e a confiabilidade do diagnóstico (Albuquerque et al., 2022; Duan et al., 2022). Os trabalhos mencionados acima descrevem testes multiplexados, mas não realizam uma etapa de triagem prévia, levando ao aumento do consumo de recursos, como tampão de eluição e fitas de fluxo lateral, maior tempo no processo diagnóstico e manuseio de reações, especialmente para os casos de testes negativos.

Para atender à necessidade de uma diferenciação precisa e acessível entre o SARS-CoV-2 e a Influenza A em ambientes com recursos limitados, desenvolvemos um ensaio baseado em RT-LAMP *duplex* projetado para PoCT. Ensaio *duplex* referem-se a métodos que permitem a detecção simultânea de dois alvos diferentes em uma única análise a partir da utilização de dois conjuntos de iniciadores específicos. No trabalho em questão, o ensaio baseado em RT-LAMP *duplex* foi otimizado para identificar tanto SARS-CoV-2 quanto Influenza A em um único teste. Como diferencial deste trabalho, nossa estratégia metodológica emprega um sistema de detecção dupla: uma etapa inicial confirmatória usando detecção colorimétrica para indicar a presença de pelo menos um dos vírus, seguida de uma etapa diferencial utilizando detecção por LFA para identificar especificamente o patógeno causador da infecção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um teste baseado na Transcrição Reversa seguida da Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (RT-LAMP) para detecção molecular e simultânea de SARS-CoV-2 e Influenza A no ponto de atendimento.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar condições experimentais como tempo, temperatura e concentração dos reagentes da reação RT-LAMP na detecção colorimétrica de SARS-CoV-2 e Influenza A;
- Otimizar a detecção da reação RT-LAMP por ensaios de fluxo lateral (LFA) para detecção diferencial simultânea de SARS-CoV-2 e Influenza A;
- Realizar a RT-LAMP com detecção dupla (colorimétrica e ensaio de fluxo lateral) para os vírus SARS-CoV-2 e Influenza A nos formatos *singleplex* e *duplex*;
- Avaliar a especificidade e a sensibilidade da reação RT-LAMP na detecção de SARS-CoV-2 e Influenza A nos formatos *singleplex* e *duplex*;
- Aplicar a metodologia RT-LAMP-LFA otimizada nos casos de codetecção e em um painel de amostras clínicas de RNA positivas para os patógenos SARS-CoV-2 e Influenza A;
- Proporcionar uma metodologia prática e diferencial da COVID-19 e da gripe em locais descentralizados e com recursos limitados;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos, materiais, reagentes e soluções

Todos os iniciadores sem marcação foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA) e todos aqueles com marcação foram adquiridos junto a Integrated DNA Technologies - IDT (San Diego, EUA). A água para biologia molecular livre de nucleases, o etanol, o hidróxido de potássio, os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), a betaina e o ácido clorídrico foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). As enzimas Bst DNA polimerase 2.0 e a transcriptase reversa RTx além do sulfato de magnésio ($MgSO_4$) foram adquiridos junto à New England Biolabs (Ipswich, MA). A agarose foi adquirida junto a Gbtbio (Brasília, DF). O padrão de tamanhos de DNA 1000 bp foi adquirido junto à Applied Biological Materials Inc. (Viking Way, Canadá). Os reagentes Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foram adquiridos com a Vetec/Sigma-Aldrich (St Louis, MO). O kit de extração e purificação de RNA e DNA viral DPK-115L foi adquirido pela Cellco Biotec (São Carlos, SP) e o kit comercial Chemagictm Viral DNA/RNA 300 Kit H96 - CMG-1033-SF para o instrumento Chemagic 360 de extração automatizada de DNA e RNA pela Perkin Elmer (Waltham, MA, EUA). A GoTaq Probe 1 Step para RT-qPCR foi obtida da Promega (Madison, WI). O kit de ensaio de fluxo lateral foi adquirido junto a Milenia Biotec GmbH (Giessen, Alemanha). O ultrafreezer 490 L -86 °C foi obtido da Tectalmaq (Piracicaba, SP). O equipamento termociclador de PCR em tempo real AriaMx foi adquirido junto a Agilent (Santa Clara, CA). O termobloco, transiluminador UV e a fonte de eletroforese em gel foram adquiridos da KASVI (São José do Pinhais, PR). A câmara de fluxo laminar classe II tipo A2 foi adquirida da Airstream NS - ESCO (Pennsylvania, USA).

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Amostras biológicas

Todas as amostras de RNA utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Laboratório de Vírus Respiratórios, Vírus Exantemáticos, Enterovírus e Emergências Virais — laboratório de referência para COVID-19 da Fundação Oswaldo Cruz

(FIOCRUZ). O painel de amostras incluiu diferentes variantes de SARS-CoV-2 (Alpha, Gamma, Delta e Ômicron), Influenza A (subtipos H1N1 e H3N2), Influenza B (linhagem Victoria), Adenovírus, Rinovírus, Vírus Sincicial Respiratório (VSR), além de amostras que testaram negativo para todos esses vírus. Essas amostras clínicas foram coletadas por *swab* nasofaríngeo de pacientes infectados ou a partir de culturas celulares infectadas com os patógenos.

As amostras biológicas foram processadas por duas abordagens distintas. Em parte delas, o RNA viral foi previamente extraído e fornecido já purificado, utilizando esferas magnéticas com o kit comercial Chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 - CMG-1033-SF, operado no equipamento Chemagic 360 para extração automatizada. Para o restante das amostras, a extração do RNA foi realizada em laboratório a partir das amostras clínicas originais, empregando o kit Cellco de Preparação de RNA Viral + DNA, conforme as instruções no protocolo do fabricante.

Após extração, as amostras de SARS-CoV-2 e Influenza foram caracterizadas pelo sequenciamento completo do genoma e suas sequências foram depositadas na Iniciativa Global para Compartilhamento de Todos os Dados sobre a Gripe (GISAID). Em seguida, foram identificadas de acordo com as diferentes variantes de SARS-CoV-2, subtipos de Influenza A e linhagem de Influenza B. Todas as amostras foram quantificadas por RT-qPCR sendo caracterizadas pelo valor de Ct (Limite do ciclo, do inglês *Cycle threshold*) (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição das amostras de RNA viral utilizadas na otimização do teste RT-LAMP.

Vírus	CÓDIGO	Descrição	Ct
SARS-CoV-2	EPI_ISL_5689790	Gamma (P.1.7)	17,51
	EPI_ISL_6898465	Delta (AY.43.8)	19,83
	EPI_ISL_11016298	Delta (AY.34.1.1)	21,4
	EPI_ISL_6771458	Alpha (B.1.1.7)	16,06
	EPI_ISL_9225704	Ômicron (BA.1)	17,53
	EPI_ISL_10521716	Ômicron (BA.2)	18,51
Influenza	EPI_ISL_18109278	A(H1N1)pmd09	23,16
	EPI_ISL_18087966	A (H1N1)pmd09	20,88
	EPI_ISL_10081849	A (H3N2)	17,61
	EPI_ISL_17859990	A (H3N2)	22,40

	EPI_ISL_202305141	B (Victoria)	23,08
	EPI_ISL_18037933	B (Victoria)	16,09
Adenovírus	ID_LVRE: 202407505		22,31
Rinovírus	ID_LVRE: 202400687		23,77
Vírus Sincicial Respiratório	ID_LVRE: 202408109		20,72

Todas as amostras foram estocadas a -80 °C no freezer do Laboratório de Biomicrofluídica da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO. O comitê de ética da Universidade Federal de Goiás (4.111.485) aprovou este estudo que foi realizado em conformidade com as diretrizes exigidas a nível nacional (resoluções CNS 466/12 e CNS 441/11) e em conformidade com as diretrizes institucionais.

3.2.2 Reação RT-LAMP

Para detecção do vírus SARS-CoV-2, dois conjuntos de iniciadores diferentes foram avaliados (Tabela 2). Eles foram projetados com foco em regiões conservadas do gene ORF1ab, utilizando o *software* Primer Explorer Versão 5.0. Entre as opções geradas pelo *software*, os dois conjuntos foram selecionados com base em parâmetros termodinâmicos e na ausência de estruturas e regiões com complementariedade interna nos oligonucleotídeos, conforme avaliado por análise *in silico* utilizando o *software* GeneRunner.

Por outro lado, o conjunto de iniciadores LAMP para Influenza A foi originalmente descrito por Nakauchi et al. e adaptado com modificações menores (Nakauchi et al., 2011). Essas modificações consistiram na adição de nucleotídeos degenerados às sequências para permitir uma detecção mais ampla de subtipos virais e contemplar a possível variabilidade genética nas regiões-alvo no gene M. Para viabilizar a detecção por LFA, no conjunto de iniciadores selecionado para detecção de SARS-CoV-2, o iniciador interno FIP e o de loop LF foram marcados com biotina e 6-carboxifluoresceína (FAM), respectivamente e no conjunto de iniciadores para Influenza A, os primers FIP e LF foram marcados com digoxigenina e FAM, respectivamente.

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores utilizados na reação RT-LAMP para detecção de SARS-CoV-2 e Influenza A.

Alvo	Iniciador	Sequência (5' → 3')
SARS-CoV-2 (Conjunto 1) Gene ORF1ab	FIP	CTACCAGCTCAACCATAACATGACTTTTCCCTAT GTGTTTCATCAAACG
	BIP	AGAACTCGAAGGCATTTCAGTACGTTTTAAGCCA CTGGTATTTTCGC
	F3	GTAGAAGTTGAAAAAGCGTT
	B3	GAAGAAGAACCTTGCGGT
	LF	TGCAGTTCGAGCATCCGAA
	LB	AGTGGTGAGACACTTGGTGT
SARS-CoV-2 (Conjunto 2) Gene ORF1ab	FIP	<u>Biotina</u> GTCATCAGTGCAAGCAGTTTGTGCTTAGT CCTGTTGCACTACG
	BIP	AATGCGTTAGCTTACTACAACACATTTCAAATCC TGTAATCGGATA
	F3	GGCCAATTCTGCTGTCAA
	B3	CACTCTTAGGGAATCTAGCC
	LF	<u>FAM</u> TAGTACCGGCAGCACAAGACATCT
	LB	ACAAAGGGAGGTAGGTTTGTACT
Influenza A Gene Matrix (M)	FIP	<u>Digoxigenina</u> TTAGTCAGAGGTGACARRATTGCA GATCTYGAGGCTCTC
	BIP	TTGKTTACRCTCACCGTGTTTGGACAAAGCG TCTACG
	F3	GACTKGARRRTGYTTTTGC
	B3	TRTRTTYGGRTCYCCATT
	LF	<u>FAM</u> GTCTTGCTTTAMCCA
	LB	CMAGTGAGCGAGGACTG

Para a projeção dos iniciadores LAMP para SARS-CoV-2 e para as modificações nos iniciadores para Influenza A, foi realizado o alinhamento das sequências genômicas de várias variantes do SARS-CoV-2 e dos principais subtipos de Influenza A, utilizando o *software* BioEdit. As sequências foram obtidas a partir da base de dados NCBI (Centro Nacional para Informação em Biotecnologia, do inglês *National Center for Biotechnology Information*), um repositório que fornece acesso a uma vasta coleção de sequências genéticas. O alinhamento foi feito por meio do método ClustalW, a fim de identificar regiões conservadas e variáveis entre as diferentes variantes e subtipos. Com base nesse alinhamento, selecionaram-se as regiões mais conservadas para o desenvolvimento e modificações de iniciadores,

garantindo uma detecção específica que abrangesse diferentes cepas de cada patógeno.

As reações RT-LAMP foram realizadas nos formatos *singleplex* e *duplex*. No formato *singleplex*, um único conjunto de iniciadores está presente no meio reacional, permitindo a detecção exclusiva de SARS-CoV-2 ou Influenza A. No formato *duplex*, dois conjuntos de iniciadores, um para cada patógeno, são adicionados ao meio, possibilitando a detecção simultânea de ambos. A reação RT-LAMP no formato *singleplex* foi realizada em um volume final de 15 µL, contendo: 0,2 µM de iniciadores externos (F3 e B3), 1,6 µM de iniciadores internos (FIP e BIP), 0,8 µM de iniciadores de loop (LF e LB), 0,48 U/µL de DNA polimerase Bst 2.0, 0,3 U/µL de transcriptase reversa RTx, 10 mM de MgSO₄, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 50 mM de KCl, 0,1X de TEB, 3,4 mM de KOH, 2 mM de dNTP, 0,58 mM do indicador de pH vermelho de cresol e 1,5 µL de amostra de RNA. A reação foi incubada a 65 °C em um termobloco por 30 minutos.

No formato *duplex*, as condições experimentais foram mantidas, com a adição de 1 M de betaína e dois conjuntos de iniciadores com as mesmas concentrações descritas acima. A reação foi incubada por 40 minutos, também a 65 °C. Além disso, convém pontuar que as etapas de preparo da mistura reacional RT-LAMP, adição do RNA alvo e detecção são realizadas em ambientes distintos dentro do laboratório, a fim de evitar contaminação cruzada e garantir a confiabilidade dos resultados.

3.2.3 Detecção da reação RT-LAMP

O teste aqui proposto possui duas etapas de detecção dos produtos de amplificação, isto é, trata-se de um ensaio com detecção dupla (Figura 7). A primeira etapa, denominada confirmatória, é baseada na coloração do meio reacional (Figura 7A). Se o resultado for negativo nessa fase, isto é, o meio permanecer com a cor inicial rosa, não será necessário avançar para a etapa de diferenciação por meio do ensaio de fluxo lateral, uma vez que nenhum dos vírus está presente na amostra. Essa abordagem não só contribui para a economia de recursos, como tampão de eluição e tiras de fluxo lateral, mas também elimina uma etapa adicional do processo. Por outro lado, caso o resultado seja positivo na etapa confirmatória, ou seja, se o meio adquirir a cor amarela, a etapa de diferenciação torna-se imprescindível para determinar se a

infecção é causada pelo vírus SARS-CoV-2, Influenza A ou ambos, proporcionando um diagnóstico mais preciso (Figura 7B).

Essa estratégia descrita está alinhada com a aplicabilidade do teste em diagnósticos clínicos no ponto de atendimento fornecendo uma detecção mais rápida e com menos manuseio de produtos pós amplificação. Nesta proposta, a detecção confirmatória é baseada na mudança de cor da solução, causada pelo uso de indicador de pH. A mudança de cor do indicador de pH é causada pela liberação de íons hidrônio como subproduto reacional à medida que os produtos de amplificação RT-LAMP são gerados (Goto et al., 2009; Lai et al., 2022). Esse processo resulta na acidificação do meio reacional que é detectada pelo indicador de pH, que neste estudo trata-se do vermelho de cresol cuja faixa de transição de pH é de 6,8 a 8,4 (SKOOG, 2014). A liberação de íons hidrônio ocorre durante a formação dos produtos de amplificação tanto de SARS-CoV-2 quanto de Influenza A. Logo, nos ensaios no formato *duplex* apenas a mudança de cor não é suficiente para fornecer informações detalhadas sobre o patógeno causador da infecção.

No que diz respeito a detecção diferencial, o iniciador interno FIP e o iniciador de loop LF, tanto do conjunto de iniciadores para SARS-CoV-2 quanto para Influenza A, possuem uma modificação em suas sequências na extremidade 5'. No processo de síntese, esses oligonucleotídeos são marcados com moléculas específicas de interesse (FAM no LF e biotina ou digoxigenina no FIP). Desse modo, nas reações RT-LAMP positivas, os produtos de amplificação formados também possuem essas moléculas na estrutura do fragmento de DNA complementar, devido ao mecanismo da reação de amplificação. Portanto, ao final da reação, o produto de amplificação de SARS-CoV-2 contém biotina e FAM em sua estrutura (complexo A), enquanto o produto de amplificação de Influenza A contém digoxigenina e FAM (complexo B).

Os complexos A e B, ao serem adicionados ao tampão de eluição, se ligam a anticorpos específicos para FAM devido à presença do marcador FAM nas estruturas dos produtos de amplificação. Esses anticorpos são marcados com nanopartículas de ouro. Quando a fita de fluxo lateral é inserida, essa mistura se difunde pela membrana por ação das forças capilares. O complexo A é então retido na região de teste 2 da fita (linha de SARS-CoV-2), onde está imobilizada a proteína streptavidina, que interage com a biotina presente no complexo. Da mesma forma, o complexo B é retido na região de teste 1 da fita (linha de Influenza A), onde anticorpos antidigoxigenina estão imobilizados, interagindo com a digoxigenina presente nesse complexo.

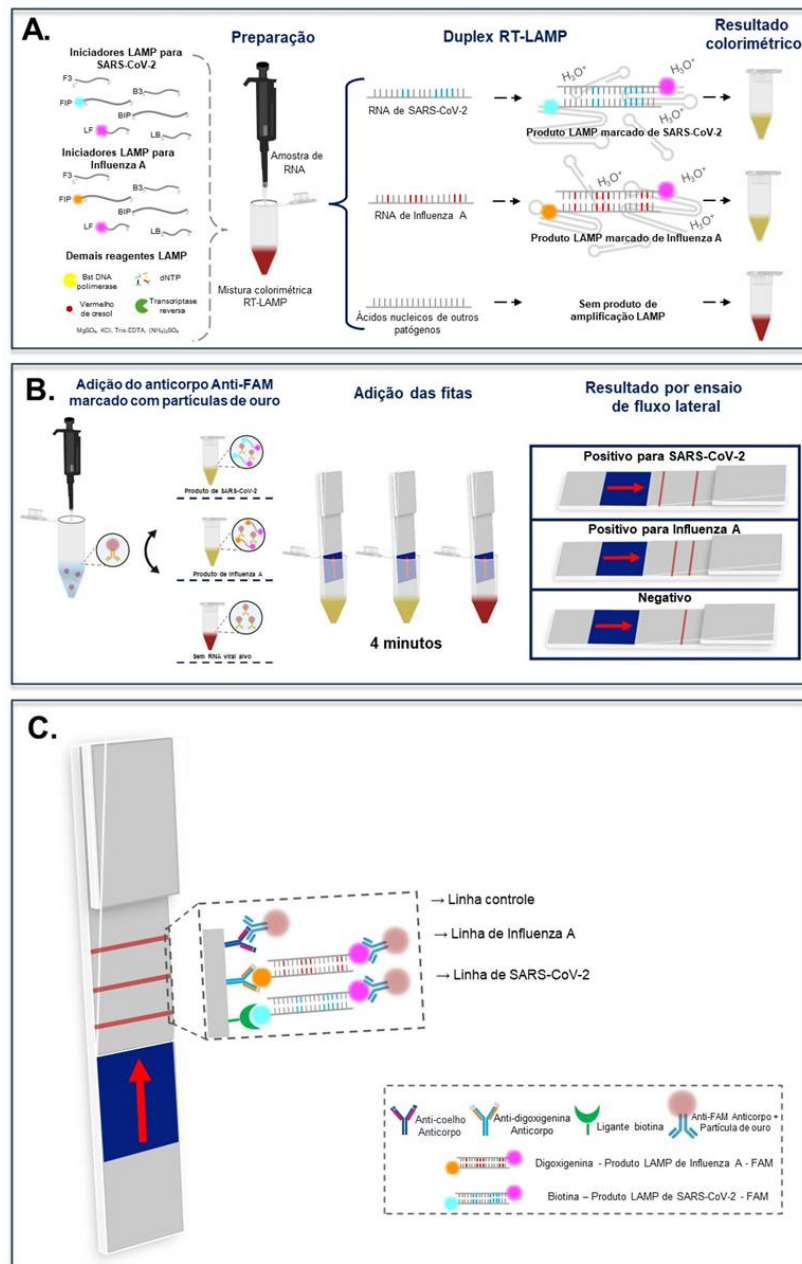


Figura 7 – Resumo gráfico do ensaio RT-LAMP com detecção dupla de SARS-CoV-2 e Influenza A. A. Resultado colorimétrico (etapa confirmatória). B. Resultado por ensaio de fluxo lateral (etapa de diferenciação). C. “Sanduíches moleculares” formados nas fitas de fluxo lateral. Fonte: Autoria própria.

Uma vez que o sistema descrito é formado, ocorre o acúmulo de nanopartículas de ouro nas regiões de teste, gerando o aparecimento de uma linha vermelha, indicando um resultado positivo (Figura 7C). As nanopartículas de ouro ligadas ao anticorpo específico para FAM que não foram capturadas por nenhum dos dois complexos ou no caso de reações negativas, fluem para a região de controle da fita onde são fixadas por anticorpos específicos para a espécie. O aparecimento da linha

vermelha na região de controle garante a viabilidade do ensaio de fluxo lateral, confirmando o funcionamento adequado da metodologia. Para a detecção por LFA, após o término do tempo de aquecimento da reação RT-LAMP, 2,5 µL do produto reacional foi adicionado a 100 µL de tampão de ensaio do kit Milenia HybriDetect 2T. Após agitação, uma fita de fluxo lateral foi então adicionada à mistura e incubada em posição vertical por 4 minutos.

Para comprovar que a mudança de coloração da solução de um teste positivo e o aparecimento das linhas nas tiras de fluxo lateral são provenientes da amplificação de DNA por RT-LAMP, foi realizada uma separação eletroforética em gel de agarose. A separação eletroforética dos produtos de amplificação foi realizada mediante adição de 2,0 µL do produto reacional após período de aquecimento diretamente no gel de agarose (2% (m/v)) imerso em solução tampão TRIS-EDTA à 0,5% (m/v). Aplicou-se a diferença de potencial de 90 V por um tempo de 50 minutos. Após o tempo da corrida eletroforética, as bandas de DNA foram visualizadas através de um transiluminador UV. A positividade do ensaio foi confirmada pela presença de um padrão de bandas com diferentes tamanhos moleculares, característico do produto reacional LAMP.

*3.2.4 Otimização da reação RT-LAMP no formato *singleplex**

Os dois conjuntos de iniciadores projetados para detecção de SARS-CoV-2 e o conjunto de iniciadores para detecção de Influenza A foram avaliados individualmente em reações RT-LAMP com detecção colorimétrica no formato *singleplex* em triplicata. As reações foram realizadas conforme protocolo descrito no tópico 3.2.2 e avaliadas nas temperaturas 63, 65 e 67 °C no intervalo de tempo de incubação de 15 a 60 minutos com observações a cada 5 minutos. Nas reações utilizadas como controle negativo foi adicionada água livre de nucleases como alvo e naquelas utilizadas como controle positivo foi adicionado RNA purificado e diluído ($1,0 \times 10^3$ cópias/µL) de SARS-CoV-2 (variante Omicron) ou Influenza A (subtipos H1N1pdm09 e H3N2). A detecção colorimétrica foi realizada após o período de incubação.

3.2.5 Otimização da detecção RT-LAMP por ensaio de fluxo lateral

Inicialmente, a detecção dos produtos de amplificação de SARS-CoV-2 por LFA foi baseada em uma sonda específica marcada com FAM em sua extremidade 5'. Essa sonda foi projetada para hibridizar com a estrutura do DNA complementar de

SARS-CoV-2 formado durante a reação de RT-LAMP. A sequência da sonda é 5' FAM-TCATCTTCAGTACCATACTCA 3', e sua concentração no meio reacional foi avaliada nos seguintes valores: 6,4; 3,2; 0,8; 0,4; 0,2 e 0,05 μM de acordo com o protocolo reacional no formato *singleplex*.

Essa estratégia de utilizar uma sonda para acoplar a reação RT-LAMP a detecção LFA foi substituída pela marcação dos iniciadores FIP e LF do conjunto para cada patógeno conforme descrito. Assim, foi avaliada a influência da quantidade de produtos de amplificação LAMP na detecção por ensaio de fluxo lateral. Para isso, três reações RT-LAMP idênticas no formato *singleplex* foram realizadas tanto para SARS-CoV-2 (variante Omicron) quanto para Influenza A (subtipo H3N2) conforme descrito no tópico 3.2.2 utilizando $1,0 \times 10^3$ cópias/ μL de RNA viral como alvo. A partir disso variou-se a adição de 15, 10, 5 e 2,5 μL de produto de amplificação a 100 μL de tampão de eluição e determinou-se a condição ideal com base na intensidade da cor das linhas nas regiões teste. Nas reações utilizadas como controle negativo foi adicionada água livre de nucleases como alvo. Adicionalmente, para facilitar a visualização, o sinal obtido nas regiões controle e teste das fitas de fluxo lateral foram convertidos para uma representação gráfica com o auxílio do *software* ImageJ.

3.2.6 Especificidade e limite de detecção dos ensaios RT-LAMP no formato *singleplex*

A especificidade do ensaio RT-LAMP foi avaliada em relação à possibilidade de reações cruzadas com outros vírus respiratórios que causam infecções semelhantes à COVID-19 e à gripe. Para isso, as reações foram testadas com RNA dos seguintes patógenos: SARS-CoV-2 (variantes Alpha, Gama, Omicron e Delta), Influenza A (subtipos H1N1pdm09 e H3N2), Influenza B, Adenovírus, Rinovírus e Vírus Sincicial Respiratório. Os protocolos experimentais descritos nos tópicos 3.2.2 e 3.2.3 foram seguidos para as detecções colorimétricas, por ensaio de fluxo lateral e eletroforese em gel de agarose.

O limite de detecção dos ensaios RT-LAMP para SARS-CoV-2 e Influenza A foi estabelecido utilizando um fragmento de DNA sintético de fita dupla (gblock) com concentrações variadas. Este fragmento de DNA contém as sequências genômicas alvo dos dois patógenos. A partir de uma solução de gblock com concentração inicial de $1,0 \times 10^{10}$ cópias/ μL , foram realizadas diluições seriadas em água ultrapura livre de nucleases, obtendo-se concentrações finais de $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^3$, $5,0 \times 10^2$, 2,5

$\times 10^2$, $1,0 \times 10^2$, $5,0 \times 10^1$ e $1,0 \times 10^1$ cópias/ μL . Os protocolos reacionais descritos nos tópicos 3.2.2 e 3.2.3 foram seguidos para as detecções colorimétrica e por ensaio de fluxo lateral em triplicatas.

3.2.7 Otimização da reação RT-LAMP no formato duplex

No formato *duplex*, as reações RT-LAMP foram avaliadas com a adição do derivado de aminoácido betaina ao protocolo descrito no tópico 3.2.2. As concentrações testadas foram 0,8, 1,0 e 1,2 M e a detecção foi realizada por meio de análise colorimétrica em triplicata, com observações a cada 10 minutos durante um intervalo de 20 a 50 minutos. O controle negativo utilizado em todos os ensaios foi uma amostra de RNA de Adenovírus. De maneira análoga, a reação também foi avaliada quanto a concentração da enzima Bst DNA polimerase sendo testada em 0,32, 0,48 e 0,64 U/ μL seguindo o mesmo intervalo de tempo reacional.

3.2.8 Especificidade e limite de detecção dos ensaios RT-LAMP no formato duplex

As reações RT-LAMP no formato *duplex* foram também avaliadas quanto a ocorrência de reações cruzadas, isto é, se apresentavam resultados negativos quando outros vírus respiratórios eram adicionados ao meio como alvo. Para isso, foram utilizadas como alvo amostras de RNA dos patógenos SARS-CoV-2 (Omicron e Delta), Influenza A (subtipos H1N1pdm09 e H3N2), Influenza B, Adenovírus, Rinovírus e Vírus Sincicial Respiratório. As detecções colorimétricas, por ensaio de fluxo lateral e eletroforese em gel de agarose seguiram os protocolos experimentais descritos nos tópicos 3.2.2 e 3.2.3.

Para avaliar o limite de detecção no formato *duplex*, foram realizadas reações RT-LAMP em triplicata utilizando como alvo o gblock com as sequências do genoma de SARS-CoV-2 e Influenza A. As concentrações finais de gblock avaliadas foram $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^3$, $5,0 \times 10^2$, $1,5 \times 10^2$, $1,0 \times 10^2$, $5,0 \times 10^1$ e $1,0 \times 10^1$ cópias/ μL . Para facilitar a visualização da intensidade do sinal na detecção via ensaio de fluxo lateral, foi utilizada uma representação gráfica com o auxílio do *software* ImageJ que converte o sinal por LFA em picos.

Para análise complementar do protocolo desenvolvido, amostras em triplicata contendo diferentes concentrações de RNA viral (de $1,0 \times 10^8$ até 10 cópias/ μL) de SARS-CoV-2 e Influenza A foram submetidas à reação de RT-LAMP em tempo real

(RT-qLAMP) em uma termocicladora. O protocolo reacional para o sistema *duplex* foi mantido, com a adição do intercalador de DNA EvaGreen na concentração final de 0,5X, a fim de viabilizar a detecção por fluorescência. Foram analisadas as curvas de *melting* específicas de cada patógeno visando analisar a especificidade.

3.2.9 Codetecção e aplicação da metodologia em painel de amostras

Para avaliar codetecções em ensaios RT-LAMP-LFA no formato *duplex*, foram utilizadas cinco misturas de diferentes amostras reais de RNA dos vírus SARS-CoV-2 (variantes Ômicron e Delta) e Influenza A (subtipos H1N1 e H3N2) simulando amostras de pacientes positivos para SARS-CoV-2 e Influenza A simultaneamente. Essas misturas foram avaliadas com o protocolo RT-LAMP *duplex* sem e com as otimizações reacionais.

Além disso, com o objetivo de avaliar a aplicação da metodologia em um painel de amostras reais, foram analisadas 60 amostras de RNA extraídas e purificadas a partir de swabs da nasofaringe de 15 pacientes positivos para SARS-CoV-2, 15 pacientes positivos para Influenza A e 30 pacientes negativos para ambos os vírus, conforme diagnóstico por RT-qPCR. Todas as amostras foram submetidas à reação RT-LAMP no formato *duplex* com detecção dupla. Entre as amostras positivas para SARS-CoV-2, estavam presentes as variantes Omicron, Delta e Gamma, e entre as positivas para Influenza A, os subtipos H1N1pdm09 e H3N2. As amostras negativas, por sua vez, abrangeram o vírus Influenza B e amostras negativas para os alvos analisados. Os resultados obtidos pelo protocolo RT-LAMP foram comparados com os resultados do método padrão-ouro (RT-qPCR). Todas as reações foram realizadas conforme o protocolo desenvolvido neste estudo (descrito nos tópicos 3.2.2 e 3.2.3).

Os parâmetros analíticos foram calculados utilizando o *software* MedCalc, disponível na *MedCalc's Diagnostic Test Evaluation Calculator*. A avaliação incluiu a determinação da acurácia, sensibilidade e especificidade do teste. A acurácia representa a probabilidade geral de um paciente ser corretamente classificado pelo teste, considerando tanto os verdadeiros positivos quanto os verdadeiros negativos. Sua fórmula é expressa como: $\text{acurácia} = \text{sensibilidade} \times \text{prevalência} + \text{especificidade} \times (1 - \text{prevalência})$. A sensibilidade, por sua vez, refere-se à probabilidade de o teste apresentar resultado positivo quando a doença está presente, sendo calculada como $a / (a + b)$, em que "a" corresponde ao número de verdadeiros positivos (casos em

que a doença está presente e o teste apresenta resultado positivo) e "b" ao número de falsos negativos (casos em que a doença está presente, mas o teste resulta negativo). Já a especificidade indica a probabilidade de o teste apresentar resultado negativo quando a doença está ausente, sendo determinada pela fórmula $d / (c + d)$, em que "c" representa o número de falsos positivos (casos em que a doença está ausente, mas o teste é positivo) e "d" o número de verdadeiros negativos (casos em que a doença está ausente e o teste corretamente aponta resultado negativo). Esses parâmetros foram utilizados para avaliar o desempenho do teste diagnóstico quanto à sua capacidade de distinguir corretamente indivíduos com e sem as infecções investigadas a partir do painel avaliado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tempo de análise do ensaio RT-LAMP e os formatos de otimização

O teste aqui proposto baseado em RT-LAMP com dupla detecção projetado para a detecção simultânea de Influenza A e SARS-CoV-2, inclui as seguintes etapas: coleta da amostra (~2 minutos), extração de RNA (~30 minutos), reação de amplificação RT-LAMP (40 minutos) e detecção (~5 minutos) (Figura 8). Além de seu tempo de processamento reduzido em relação ao método padrão-ouro RT-qPCR, o ensaio foi desenvolvido para garantir simplicidade instrumental e metodológica, especialmente durante a etapa de detecção dos resultados. Em contraste com os ensaios convencionais baseados em fluxo lateral, que requerem seu uso em todos os testes mesmo nos resultados negativos, este novo ensaio introduz uma abordagem mais racional e seletiva ao incorporar duas etapas de detecção sequenciais: confirmatória e de diferenciação.

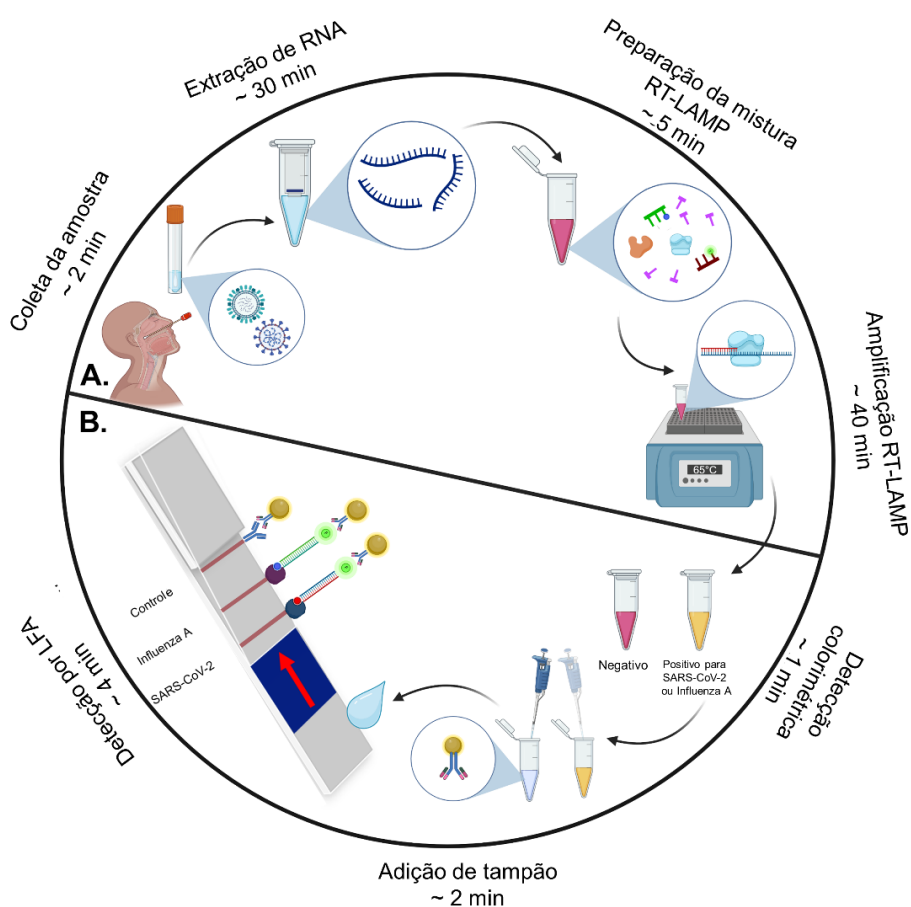


Figura 8 – Fluxo de trabalho do teste RT-LAMP para detecção de SARS-CoV-2 e Influenza A desde a coleta da amostra a interpretação dos resultados. Fonte: Autoria própria com uso do *software* BioEdit.

O tempo total do teste é de aproximadamente 1 hora desde a coleta da amostra até a interpretação dos resultados, levando em consideração que a reação de amplificação RT-LAMP varia entre 30 e 40 minutos, dependendo do formato da reação (*singleplex* ou *duplex*). Sem a etapa de detecção diferencial e com métodos de extração de RNA viral simplificados o tempo total é ainda menor. Oferecer um diagnóstico com diferenciação simultânea e de cunho molecular dentro desse intervalo de tempo representa uma vantagem significativa, especialmente em contextos de atendimento emergencial, onde a agilidade é crucial. Além disso, a detecção dupla da reação proporciona etapas complementares de confirmação dos resultados aumentando a confiabilidade dos resultados além da economia de reagentes, particularmente em casos de testes negativos.

O intuito final deste estudo foi desenvolver um ensaio RT-LAMP no formato *duplex*, permitindo a detecção simultânea dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A. Entretanto, inicialmente foram realizadas otimizações para ensaios RT-LAMP no formato *singleplex*, sendo um teste dedicado à detecção do vírus SARS-CoV-2 e o outro à detecção do vírus Influenza A. Optou-se por iniciar com ensaios mais simples, visando estabelecer uma condição experimental comum aos dois patógenos antes de avançar para o ensaio mais complexo no formato *duplex*. A otimização do teste proposto, portanto, segue essa ordem.

4.2 Ensaio RT-LAMP no formato *singleplex*

4.2.1 Otimização da temperatura e tempo reacional

Para a detecção de SARS-CoV-2, dois conjuntos de iniciadores projetados neste estudo foram avaliados quanto ao tempo reacional e temperatura de incubação. A detecção dessas reações foi realizada no modo colorimétrico com o uso do indicador de pH, devido à praticidade da visualização dos resultados, que permitem uma interpretação rápida logo após o período de incubação. O conjunto 1 de iniciadores apresentou desempenho inadequado nas três temperaturas avaliadas (Figura 9A), uma vez que houve mudança de coloração (do rosa para o amarelo) nos controles negativos, resultando em falsos positivos. Esses falsos positivos ocorreram em 45 minutos a 63 °C, 30 minutos a 65 °C e 40 minutos a 67 °C. Além disso, os controles positivos apresentaram alteração na coloração apenas após 40 minutos, o que não

permitiu um intervalo de tempo confiável entre os resultados falsos positivos e os positivos verdadeiros.

Por outro lado, o conjunto 2 de iniciadores demonstrou eficiência a 65 °C, com a reação RT-LAMP iniciando-se em 25 minutos e sem apresentar falsos positivos durante uma hora de avaliação (Figura 9B). Contudo, nas temperaturas de 63 °C e 67 °C, foram observados falsos positivos em 35 e 45 minutos, respectivamente. Esses resultados indicam que o conjunto 2 apresenta desempenho adequado para detecção de SARS-CoV-2.

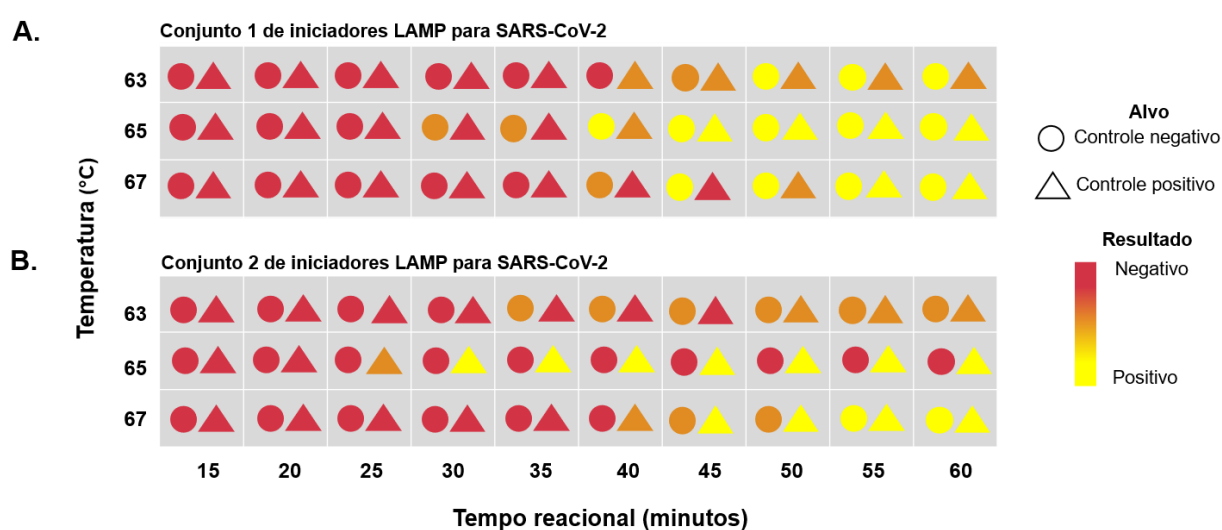


Figura 9 – Otimização do tempo e da temperatura da reação RT-LAMP no modo *singleplex* para detecção de SARS-CoV-2 a partir da avaliação de dois conjuntos de iniciadores: A. Conjunto 1 e B. Conjunto 2. Fonte: Autoria própria.

É relevante pontuar ainda que a coloração laranja do meio reacional indica o início da reação de amplificação, isto é, quando os primeiros produtos de amplificação são gerados resultando na liberação de íons H_3O^+ . Contudo, neste ponto, a quantidade de íons hidrônio no meio ainda não é suficiente para causar a mudança completa de cor do indicador vermelho de cresol, permanecendo na zona de viragem do indicador. Comumente, em reações LAMP eficientes, para mudança completa na cor, é necessário mais tempo de incubação da reação.

Após a determinação de uma condição ideal de tempo reacional e temperatura de incubação para a detecção do SARS-CoV-2, foi realizada uma busca por um conjunto de iniciadores para a detecção de Influenza A que fosse compatível com essas condições experimentais. Isso porque nas reações RT-LAMP no formato

duplex, as duas reações de amplificação ocorrem juntas sob as mesmas condições. O conjunto de iniciadores selecionado foi avaliado com os dois principais subtipos do vírus, visando validar sua aplicabilidade nas condições previamente otimizadas (Figura 10).

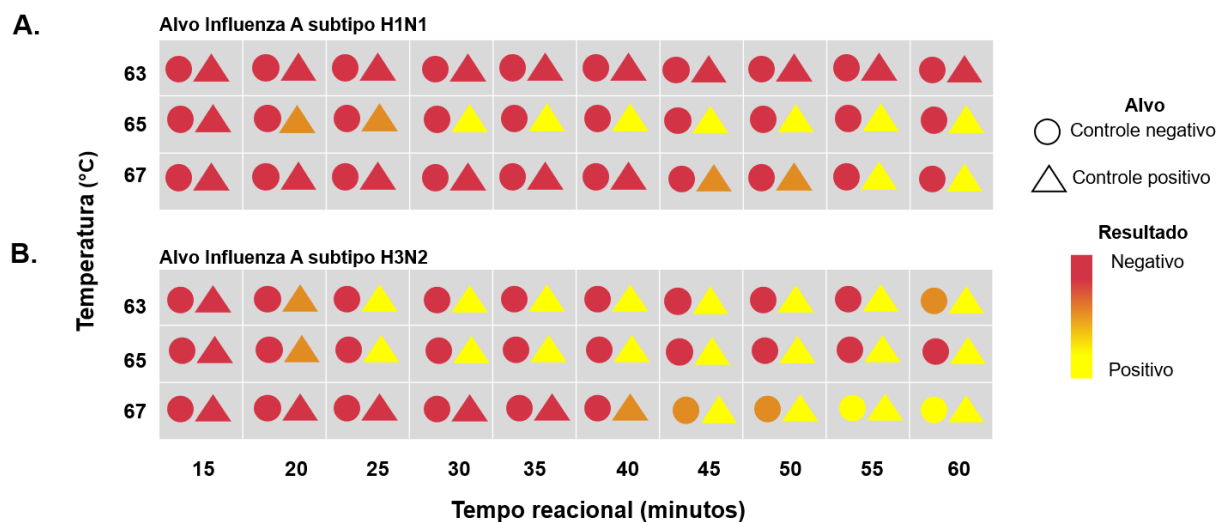


Figura 10 – Otimização do tempo e da temperatura da reação RT-LAMP no formato *singleplex* para detecção de Influenza A a partir de dois subtipos do vírus como alvo: A. Subtipo (H1N1)pdm09. B. Subtipo H3N2. Fonte: Autoria própria.

A reação RT-LAMP para o subtipo H1N1 do vírus não apresentou alteração na coloração a 63 °C durante o intervalo de tempo avaliado, resultando em falso negativo. No entanto, a positividade desse ensaio foi observada a partir de 20 minutos a 65 °C e a partir de 45 minutos a 67 °C, sem ocorrência de falsos positivos, evidenciando o sucesso da detecção nessas temperaturas (Figura 10A).

Nos ensaios realizados com o subtipo H3N2 de Influenza A, a positividade foi detectada em 20 minutos tanto a 63 °C quanto a 65 °C. Contudo, foram observados resultados falsos negativos a 63 °C após 60 minutos e a 67 °C após 45 minutos (Figura 10B). Deste modo, o conjunto de iniciadores escolhido permitiu a detecção adequada dos dois subtipos de Influenza A, especialmente a 65 °C, com início de positividade a partir de 20 minutos de incubação.

A mudança de coloração observada em amostras de controle negativo, indicando falsos positivos, pode estar associada à formação de produtos de amplificação inespecíficos, resultado de interações indesejadas entre os iniciadores no meio reacional. Entre essas interações, destaca-se a formação de dímeros de iniciadores, que ocorre quando há complementaridade parcial entre suas sequências,

permitindo que se liguem entre si e sirvam como moldes falsos para a enzima Bst DNA polimerase. Além disso, estruturas secundárias intramoleculares, como alças (hairpins), também podem se formar devido à complementaridade interna dos iniciadores (Meagher et al., 2018).

Esses fenômenos são mais prováveis em condições não otimizadas da reação, como temperatura inadequada, excesso de iniciadores e demais reagentes ou tempos de incubação prolongados. Como a reação RT-LAMP ocorre sob condições isotérmicas, a persistência dessas estruturas pode comprometer a especificidade do teste, resultando em falsos positivos. Desse modo, as interações não específicas podem iniciar a síntese de produtos de amplificação inespecíficos que, apesar de não corresponderem ao alvo genético desejado, geram mudança de cor no ensaio RT-LAMP devido à acidificação do meio (Kim et al., 2023).

Dessa forma, a otimização criteriosa das condições da reação, especialmente a escolha adequada dos conjuntos de iniciadores, da temperatura e o tempo de incubação, é fundamental para minimizar reações inespecíficas e garantir a especificidade e confiabilidade do teste, especialmente em contextos de diagnóstico onde a ocorrência de falsos positivos pode comprometer a interpretação clínica e o controle epidemiológico.

4.2.2 Otimização da detecção via ensaio de fluxo lateral

Embora um ensaio LAMP eficiente produza uma grande quantidade de produtos de amplificação, apenas uma fração desses produtos participa da formação correta do "sanduíche molecular" necessário para a detecção por LFA (Ross et al., 2020; Zasada et al., 2020). Por isso, é essencial otimizar o volume do produto da reação LAMP utilizado na detecção, a fim de maximizar a formação de sanduíches moleculares marcados nas regiões de teste. A alta produção de produtos de amplificação — milhares a milhões de cópias — resulta tanto do mecanismo da reação LAMP quanto do uso de múltiplos pares de iniciadores no meio reacional.

Após a marcação dos produtos amplificados para aplicação na metodologia RT-LAMP-LFA, uma grande quantidade de marcadores pode ser introduzida nas fitas de fluxo lateral. Esse excesso, no entanto, pode comprometer a sensibilidade do ensaio devido ao chamado "efeito gancho de alta dose", um fenômeno comum em imunoenaios (REY et al., 2017). Nessa situação, as linhas nas regiões de teste

podem apresentar intensidade reduzida ou até desaparecer, uma vez que a formação dos sanduíches moleculares ideais é prejudicada.

O efeito ocorre porque a quantidade excessiva de marcadores — como biotina, digoxigenina e FAM — sobrecarrega os sítios de ligação específicos disponíveis nas fitas de fluxo lateral. Quando a concentração desses marcadores excede a capacidade de captura das fitas, a formação dos "sanduíches moleculares" responsáveis pela geração do sinal é comprometida. Isso acontece porque os sítios de captura podem ser ocupados por interações inespecíficas, como a ligação entre antígenos e anticorpos, mas sem a presença da estrutura de DNA complementar do patógeno gerada na reação. Consequentemente, a eficiência na formação dos complexos sinalizadores diminui, reduzindo a sensibilidade do teste (Deng et al., 2021; Rey et al., 2017).

No presente estudo, a estratégia adotada para o ensaio RT-LAMP-LFA envolveu a marcação dos iniciadores FIP e LF com os marcadores desejados. Por esse motivo, reduzir a concentração desses iniciadores na reação não foi uma opção viável para diminuir a quantidade de marcadores introduzidos nas fitas, pois tal modificação poderia comprometer a eficiência da reação LAMP previamente otimizada. A concentração dos iniciadores está diretamente ligada à qualidade e ao rendimento da amplificação. Diante disso, a alternativa escolhida para mitigar o efeito gancho foi a redução da quantidade de produto amplificado adicionada aos 100 µL de tampão de eluição, otimizando assim a detecção por meio do ensaio de fluxo lateral. (Figura 11).

Observou-se que a intensidade do sinal nas linhas de teste aumentou conforme foi reduzido o volume de produto reacional RT-LAMP adicionado ao tampão de eluição. O volume de 2,5 µL apresentou o melhor desempenho na detecção tanto de SARS-CoV-2 quanto de Influenza A. Esse ajuste teve um impacto mais pronunciado na região de teste 1, destinada à detecção de Influenza A, em comparação com a região de teste 2, voltada para o SARS-CoV-2. Essas diferenças são mais facilmente observadas com o auxílio do *software* ImageJ.

Uma possível explicação para esse resultado está relacionada ao momento em que se iniciam as reações LAMP para cada patógeno. A reação para Influenza A é iniciada cinco minutos antes da reação para SARS-CoV-2. Assim, ao final do tempo total de incubação (30 minutos), há uma maior quantidade de produtos de

amplificação de Influenza A no meio reacional. Como consequência, há maior probabilidade de que o marcador digoxigenina se ligue aos sítios disponíveis na fita, mas sem a formação adequada dos sanduíches moleculares responsáveis pelo sinal, reduzindo a eficiência da detecção.

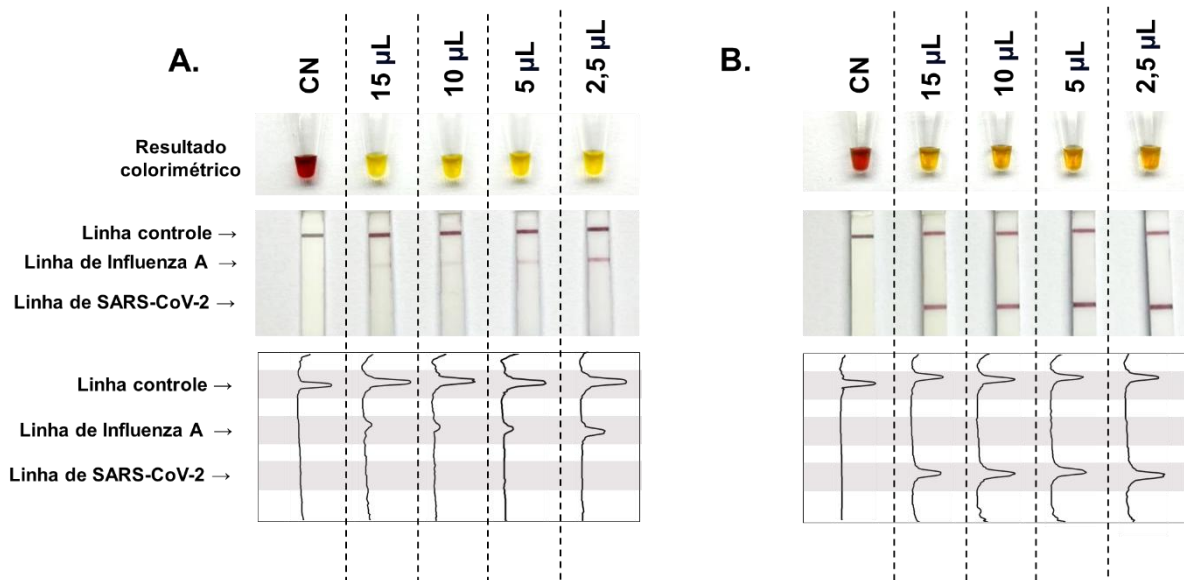


Figura 11 – Otimização da detecção da reação RT-LAMP por ensaio de fluxo lateral a partir da variação de volume reacional analisado. A. Ensaio *singleplex* para detecção de Influenza A. B. Ensaio *singleplex* para detecção de SARS-CoV-2. Gráficos obtidos com o *software* Image J. CN: controle negativo. Fonte: Autoria própria.

Apesar da melhora na intensidade da linha de Influenza A com a redução do volume do produto reacional para 2,5 µL, volumes ainda menores ou diluições não foram testados e adotados por algumas razões. Primeiro, abaixo desse volume, há o risco de se atingir um limite crítico no qual a quantidade de produto de amplificação se torna insuficiente para formar sanduíches moleculares em número suficiente para gerar sinal detectável, especialmente em amostras com baixa carga viral. Além disso, o desempenho da linha de Influenza A quando comparada com a de SARS-CoV-2, mesmo após a otimização, pode estar relacionado a outros fatores além do volume de produto, como a eficiência intrínseca da reação LAMP para esse alvo específico e a afinidade dos anticorpos na fita para o marcador digoxigenina. Portanto, a redução do volume foi levada até o ponto em que se manteve a sensibilidade sem comprometer a robustez da detecção.

Antes da adoção da estratégia baseada na marcação dos iniciadores FIP e LF para permitir a detecção por LFA, o teste utilizava uma sonda específica, marcada

com FAM em uma de suas extremidades. Essa sonda consistia em um oligonucleotídeo projetado para hibridizar com o produto de amplificação de SARS-CoV-2 gerado durante a reação LAMP. O efeito gancho foi então primeiramente observado ao otimizar a concentração de sonda com o intuito de apresentar a maior intensidade de sinal das regiões de teste da fita (Figura 12). A concentração ideal da sonda, que resultou no sinal mais intenso nas tiras de fluxo lateral, foi de 6,4 μM enquanto concentrações inferiores a 0,8 μM produziram sinais fracos ou indetectáveis.

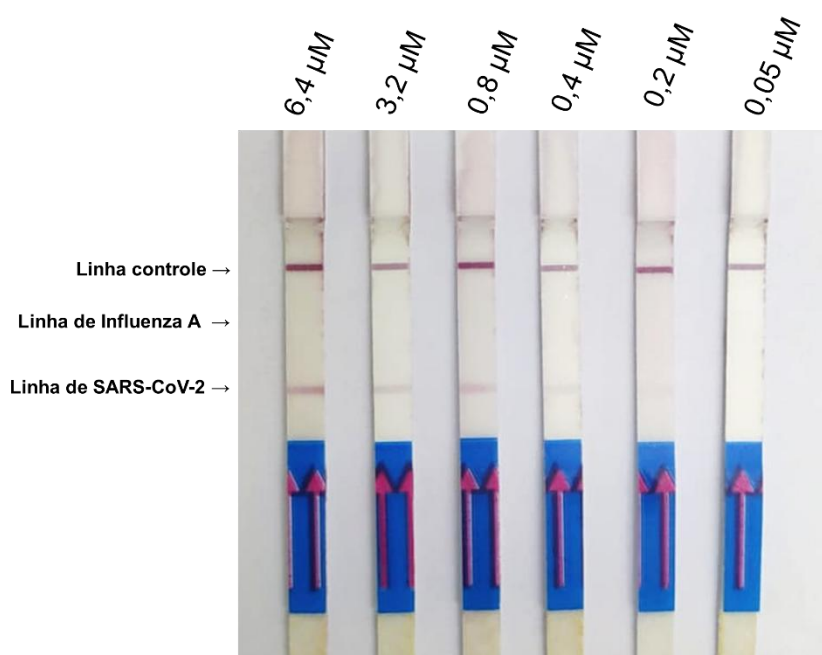


Figura 12 – Otimização da concentração de uma sonda utilizada preliminarmente para detecção de produtos de amplificação de SARS-CoV-2 por ensaio de fluxo lateral. Fonte: Autoria própria.

O aumento da concentração de sonda aumenta a intensidade do sinal nas fitas porque há mais moléculas marcadas (FAM) disponíveis para formar os complexos moleculares com os produtos de amplificação e se acumularem na linha de teste, aumentando o sinal detectável. Em contrapartida, a sonda em concentrações muito baixas apresenta sinais fracos ou indetectáveis, pois há poucas moléculas marcadas disponíveis no meio o que reduz a formação de interações sonda-produto. Com menos complexos migrando e se acumulando na linha de teste, a intensidade do sinal gerado é fraca ou até mesmo ausente, dificultando a detecção visual do resultado.

Essa abordagem, no entanto, apresentou limitações importantes, como o alto custo de síntese da sonda marcada, a necessidade de um passo adicional no processo, além da maior complexidade no desenho e hibridização da sonda que

precisa estar compatível com a temperatura da reação RT-LAMP já otimizada. Diante desses fatores, optou-se pelo uso dos iniciadores FIP e LF marcados, conforme supracitado, o que simplificou o protocolo, reduziu custos e aumentou a robustez do teste para aplicação em campo.

4.2.3 Especificidade dos ensaios RT-LAMP no formato *singleplex*

A especificidade das reações RT-LAMP no formato *singleplex* para detecção dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A foi investigada para verificar a ocorrência de reações cruzadas com outros patógenos. No que diz respeito a detecção de SARS-CoV-2, os ensaios apresentaram resultado positivo na detecção colorimétrica e por ensaio de fluxo lateral apenas quando o alvo reacional se tratava do RNA de alguma variante do vírus (Alpha, Omicron, Gamma e Delta). Além disso, os ensaios apresentaram resultado negativo quando o RNA de outros patógenos que causam infecções semelhantes a COVID-19 e a gripe foram avaliados (Figura 13).

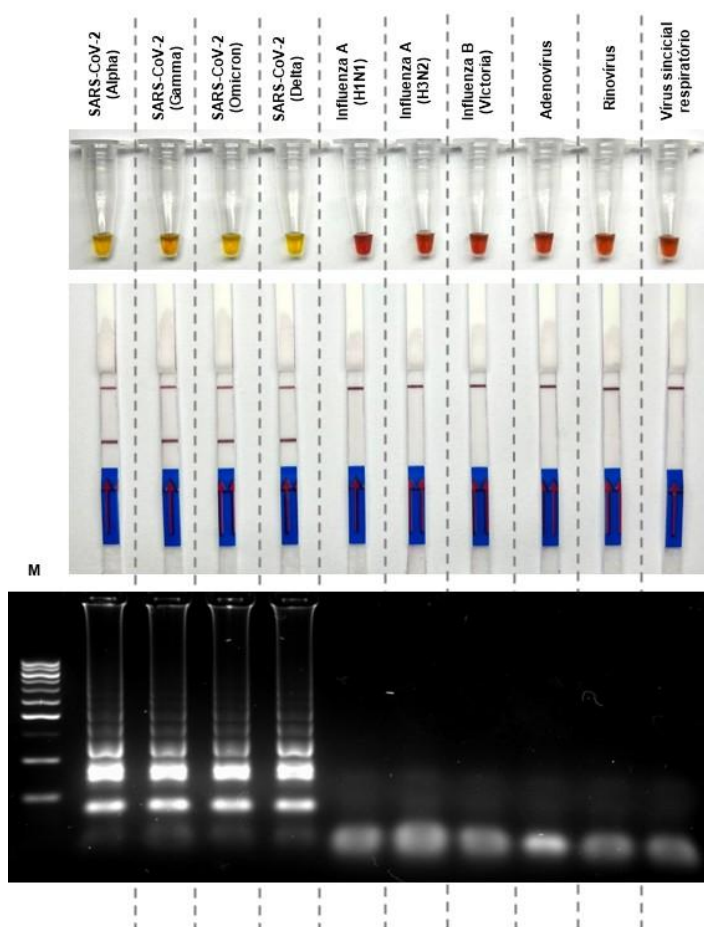


Figura 13 – Especificidade da detecção de variantes de SARS-CoV-2 por RT-LAMP no formato *singleplex* com detecção colorimétrica, por ensaio de fluxo lateral e separação eletroforética em gel de agarose. M: marcador. Fonte: Autoria própria.

A avaliação confirmou que os iniciadores, nas condições otimizadas, reconhecem e se anelam às regiões do genoma para as quais foram projetados. A escolha do gene ORF1ab, uma região conservada do genoma do SARS-CoV-2, assegura que o teste seja eficaz na detecção das variantes do vírus que a contenha (Corman et al., 2020). Como essa região mantém sua sequência genética relativamente estável, os testes baseados nessa região conseguem detectar o vírus mesmo que ele tenha sofrido mutações em outras partes do genoma e isso assegura que o teste funcione bem para a maioria das variantes do SARS-CoV-2 (Jeong et al., 2022). Para isso, foi realizado um alinhamento de diferentes genomas de variantes do SARS-CoV-2 utilizando o *software* BioEdit, permitindo comparar as sequências de RNA e identificar semelhanças e diferenças entre elas a fim de obter uma boa projeção dos iniciadores (Figura 14).

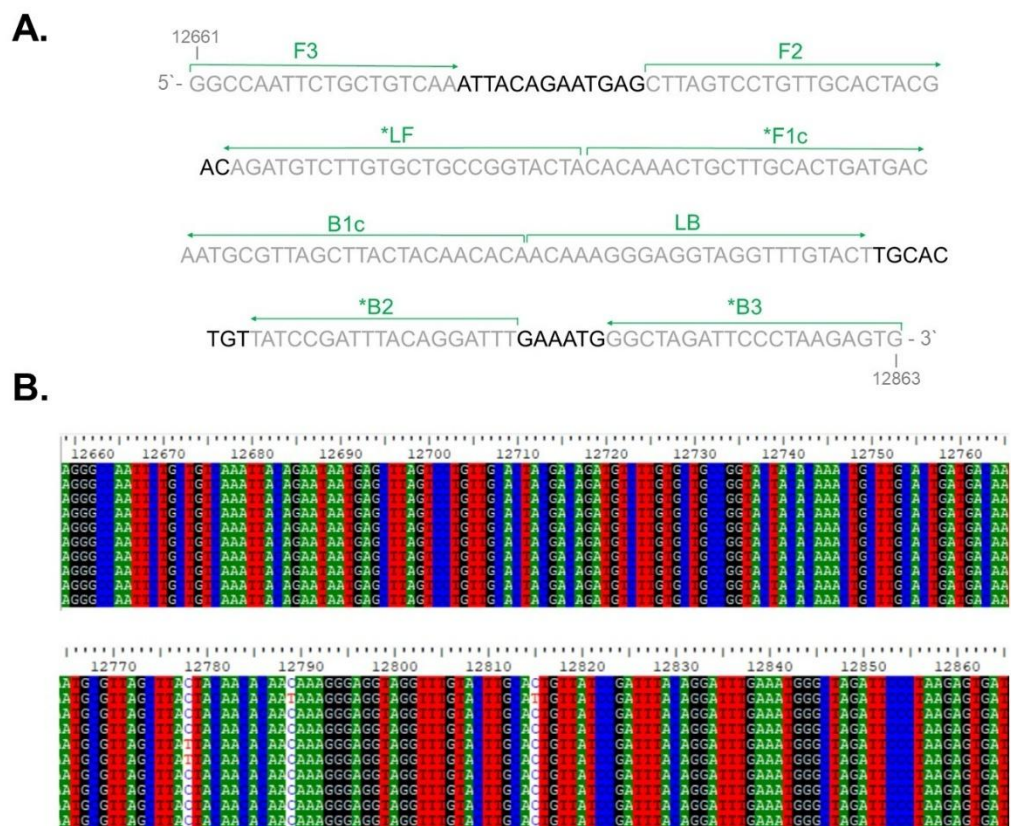


Figura 14 – Região do genoma de SARS-CoV-2 (gene ORF1ab) utilizada para detecção do vírus por RT-LAMP. A. Regiões de anelamento dos iniciadores LAMP. B. Alinhamento de sequências de diferentes variantes do vírus. Fonte: Autoria própria.

A qualidade da projeção das sequências dos iniciadores é um fator crucial em reações LAMP (Ibadurrahman; Suryani; Desriani, 2023). Isso porque a região de

anelamento define o quão abrangente e específico é o teste. Além disso, a escolha apropriada dos iniciadores assegura a amplificação eficiente e precisa da sequência alvo, minimizando o risco de reações cruzadas e garantindo uma elevada sensibilidade do ensaio. A realização de estudos bioinformáticos, com a análise de parâmetros termodinâmicos, é essencial para evitar a formação de dímeros ou outras estruturas secundárias indesejadas, que poderiam comprometer a eficiência e a precisão da amplificação (Meagher et al., 2018). É possível observar ainda que apenas três nucleotídeos diferem entre os genomas das variantes de SARS-CoV-2 analisadas na região selecionada para anelamento dos iniciadores. Essa pequena divergência não compromete a característica conservada da região.

De forma análoga, as reações RT-LAMP para detecção de Influenza A também foram avaliadas quanto à especificidade. Os ensaios apresentaram resultados positivos quando o RNA alvo correspondia a algum subtipo de Influenza A (H1N1 ou H3N2) (Figura 15). Nos casos avaliando outros patógenos respiratórios, os resultados foram negativos em todas as três modalidades de detecção avaliadas. A boa especificidade observada, nas mesmas condições experimentais de tempo e temperatura, para a detecção de ambos os patógenos, indica a viabilidade dos ensaios no formato *duplex*.

O estudo genômico de alinhamento das sequências dos subtipos de Influenza A foi realizado para analisar as modificações necessárias no projeto dos iniciadores (Figura 16). Para abranger os principais subtipos de Influenza A com um único conjunto de iniciadores, adotou-se a estratégia de sintetizar sequências de iniciadores com nucleotídeos degenerados, ou seja, substituindo algumas bases por misturas de nucleotídeos. Isso permite maior flexibilidade na detecção de diferentes variantes genéticas e aumenta a especificidade do teste para múltiplos subtipos. Essa modificação nas sequências dos iniciadores visa abranger os subtipos H3N2, H1N1, H7N9 e H2N2 no teste proposto.

Convém pontuar que o teste foi desenvolvido para detectar apenas o vírus Influenza A devido a impossibilidade de projetar iniciadores LAMP eficazes para detectar simultaneamente os vírus Influenza A e B. Isso se deve à diferença genética e alta variabilidade de ambas as cepas. O vírus Influenza A apresenta uma grande diversidade de subtipos e variantes, enquanto o Influenza B, embora menos variável, também sofre mutações. As diferenças genéticas dificultam o desenvolvimento de um

único conjunto de iniciadores eficaz para adequado anelamento em ambas os tipos, exigindo ensaios com iniciadores separados para garantir uma detecção precisa. Nesse sentido, o teste proposto apresenta uma limitação, pois, ao não detectar o vírus Influenza B e suas linhagens, ele não oferece um diagnóstico completo para todos os tipos de vírus que comumente causam a gripe

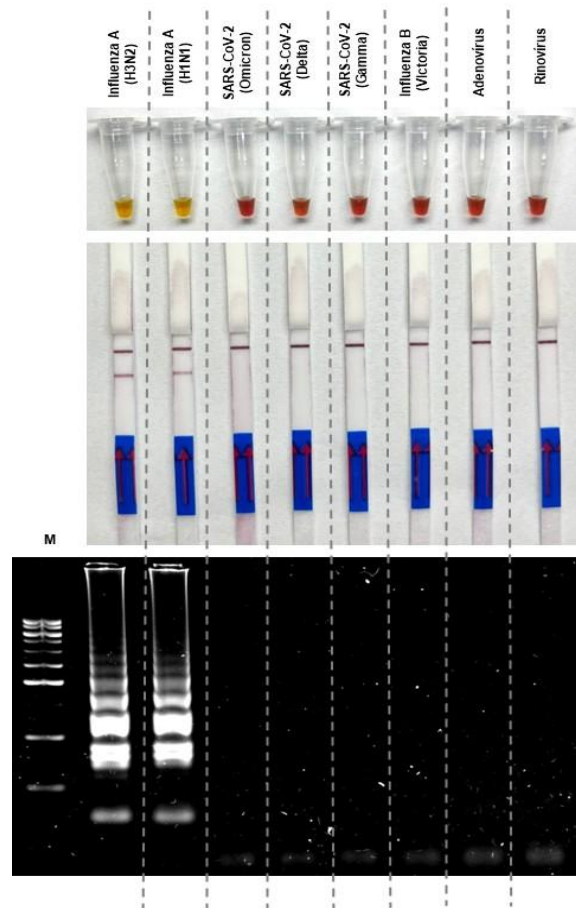


Figura 15 – Especificidade da detecção de subtipos de Influenza A por RT-LAMP no formato *singleplex* com detecção colorimétrica, por ensaio de fluxo lateral e separação eletroforética em gel de agarose. M: marcador. Fonte: Autoria própria.

Além disso, vale mencionar que na técnica RT-LAMP com detecção colorimétrica e por ensaio de fluxo lateral, a detecção dos produtos de amplificação é feita pela mudança de cor da reação e o aparecimento de linhas nas tiras, respectivamente. No entanto, para garantir que a amplificação está ocorrendo corretamente e para confirmar a formação de produtos de amplificação, também é comum realizar a separação eletroforética em gel de agarose. O gel de agarose permitiu a visualização do padrão de amplificação dos produtos por meio de uma

técnica de eletroforese, que separa os fragmentos amplificados com base no seu tamanho. Isso proporciona uma confirmação adicional de que os resultados positivos no teste proposto de fato se referem a formação dos produtos de amplificação LAMP.

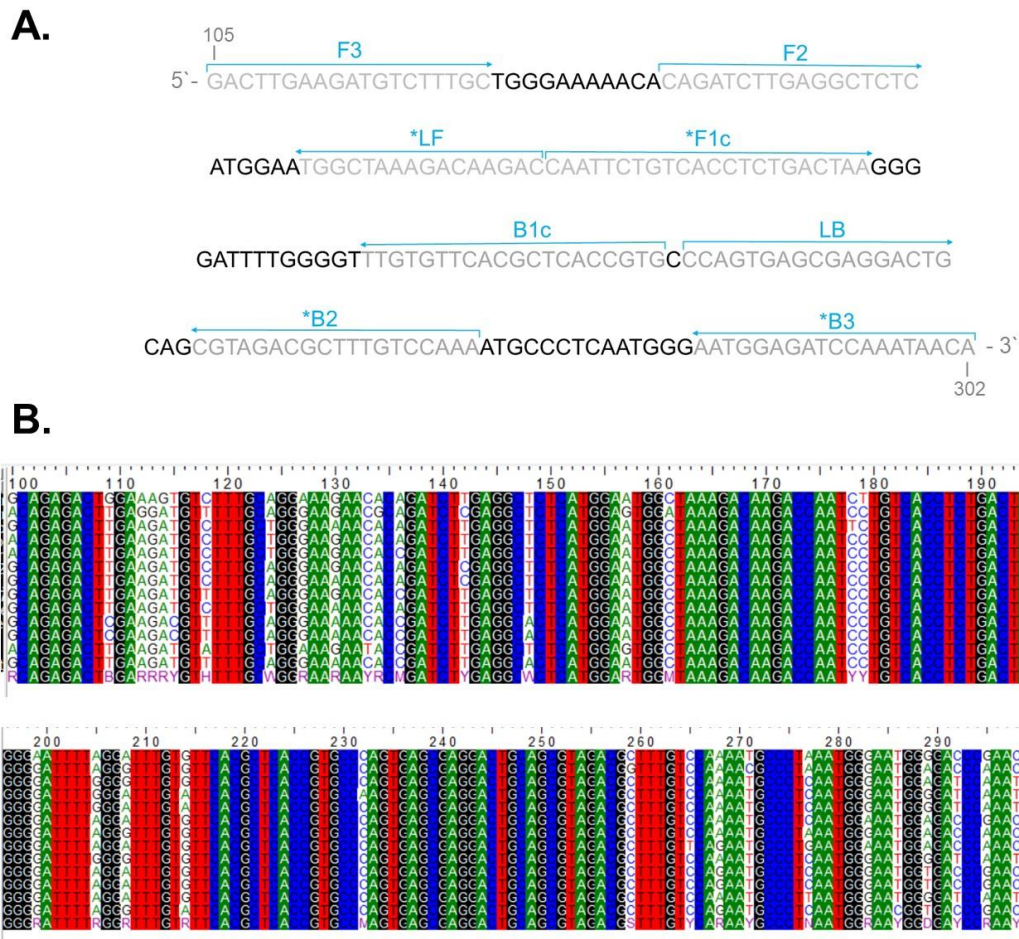


Figura 16 – Região do genoma de Influenza A (gene M) utilizada para detecção do vírus por RT-LAMP. A. Regiões de anelamento dos iniciadores LAMP. B. Alinhamento de sequências de diferentes subtipos do vírus. Fonte: Autoria própria.

4.2.4 Limite de detecção dos ensaios RT-LAMP no formato *singleplex*

O limite de detecção dos ensaios no formato *singleplex* foi determinado por meio da variação da concentração de RNA viral nas reações de RT-LAMP. Na detecção colorimétrica, a reação para SARS-CoV-2 apresentou resultados positivos com até 250 cópias de RNA viral/ μ L (Figura 17A). Para a detecção do vírus Influenza A, tanto o ensaio colorimétrico quanto a detecção por fluxo lateral (LFA) demonstraram positividade com até 100 cópias/ μ L de reação (Figura 17B). Embora, no caso do SARS-CoV-2, a detecção por LFA apresente sensibilidade ligeiramente superior (100

cópias/ μ L), na prática, o critério de interpretação do teste é definido pela etapa colorimétrica. Isso se deve ao fato de que, caso a solução mantenha a coloração rosa após o período de incubação, a etapa de detecção por LFA não é realizada. É importante destacar que concentrações tão baixas de RNA viral, próximas ao limite de detecção, são extremamente raras em casos ativos de infecção. Esses valores geralmente indicam a fase final do quadro clínico, quando o organismo já eliminou a maior parte do vírus, restando apenas vestígios residuais do material genético viral.

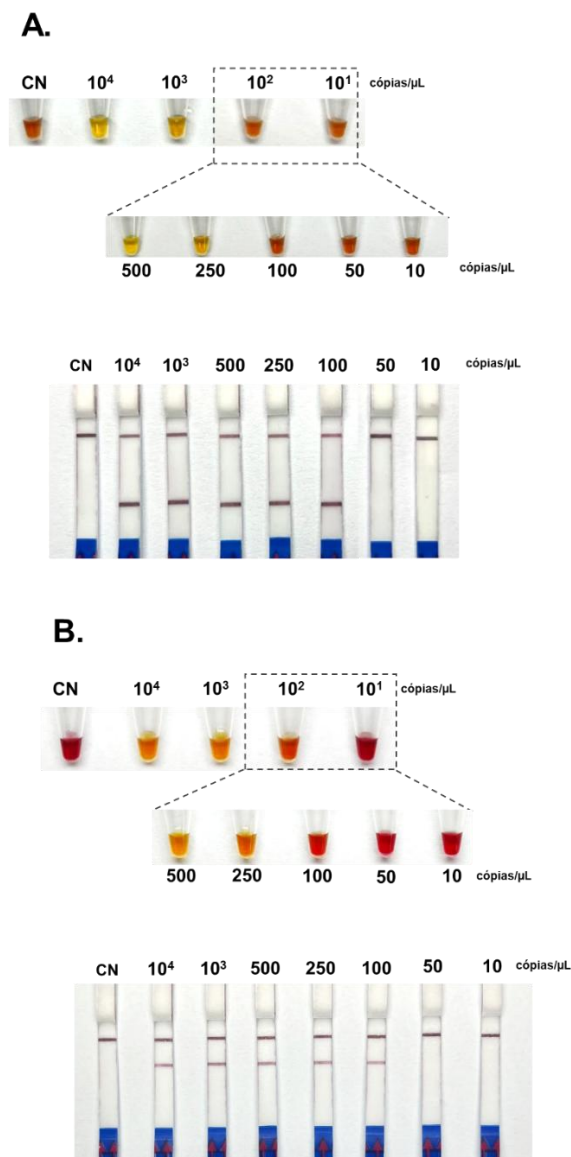


Figura 17 – Limite de detecção dos ensaios RT-LAMP no formato *singleplex* com detecção dupla. A. Detecção de SARS-CoV-2. B. Detecção de Influenza A. Fonte: Autoria própria.

Na detecção colorimétrica, observou-se que, próximo ao limite de detecção do ensaio, a coloração do meio se apresentava mais clara, com tonalidades tendendo ao alaranjado em vez do amarelo. Esse fenômeno ocorre porque, quanto menor a quantidade de alvo presente, menor é a produção de íons hidrônio, o que mantém o pH da solução em uma faixa próxima à região de transição do indicador. Em contraste, essas variações não são perceptíveis na detecção por LFA, uma vez que não há gradação de intensidade nas linhas da região teste assim a leitura é baseada na presença ou ausência de linha, independentemente da carga viral.

Os limites de detecção observados para ambos os vírus demonstram a eficácia da reação RT-LAMP, quando devidamente otimizada, na identificação de baixas concentrações de RNA viral alvo, em virtude da produção abundante de produtos de amplificação. Do ponto de vista prático, essa elevada sensibilidade permite a detecção de infecções recentes, uma vez que os ensaios moleculares não dependem da resposta imunológica do indivíduo para identificar a presença do patógeno. Os valores obtidos estão em consonância com dados previamente relatados na literatura, que utilizam a técnica RT-LAMP associada aos métodos de detecção aqui avaliados (Bernardes et al., 2023; Storms et al., 2023; Warneford-Thomson et al., 2022).

4.3 Ensaios RT-LAMP-LFA no formato *duplex*

4.3.1 Otimização de betaina e enzima Bst DNA polimerase

Para a detecção simultânea dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A por RT-LAMP, inicialmente os dois conjuntos de iniciadores previamente otimizados em ensaios *singleplex* foram combinados em um único ensaio RT-LAMP. As condições de tempo, temperatura e concentração dos reagentes foram mantidas inalteradas como ponto de partida. Contudo, no formato *duplex*, a presença de doze oligonucleotídeos no mesmo meio reacional atuando como iniciadores aumenta significativamente a complexidade da reação. Esse aumento na complexidade foi evidenciado pela avaliação da especificidade do ensaio, que, ao ser testada quanto à ocorrência de reações cruzadas, apresentou resultados falsos (Figura 18).

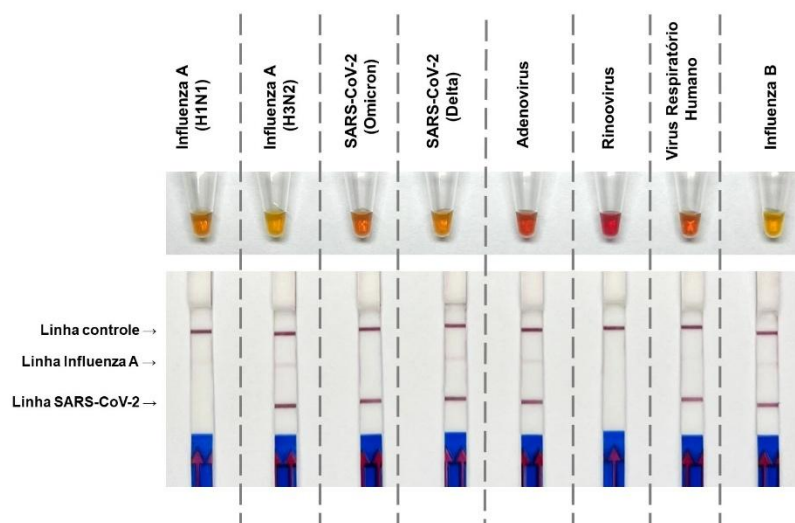


Figura 18 – Especificidade da reação RT-LAMP não otimizada no formato *duplex*. Fonte: Autoria própria.

Resultados falsos positivos e negativos foram observados em ambos os métodos de detecção em alguns ensaios RT-LAMP avaliados, o que indica a necessidade de ajustes nas condições experimentais para melhorar a acurácia da reação no formato *duplex*. Apenas as reações com os alvos dos vírus Influenza A (subtipo H1N1, positivo), SARS-CoV-2 (variante Omicron, positivo) e Rinovírus (negativo) apresentaram resultados adequados nos métodos de detecção avaliados. Nesse sentido, existem compostos que são utilizados em reações de amplificação para melhorar a especificidade e a eficiência, como a betaina, que ajuda a estabilizar as estruturas do DNA, e o DMSO (dimetilsulfóxido), que pode reduzir a formação de estruturas secundárias indesejadas (Kang; Soog Lee; Gorenstein, 2005).

A betaina é um composto orgânico quimicamente classificado como um aminoácido trimetilado. Ela atua como um agente estabilizante, reduzindo os efeitos da formação de estruturas secundárias no DNA ou RNA que podem levar a ampliações inespecíficas ou ineficazes. O composto ajuda a manter a integridade das reações, minimizando a formação de dímeros de iniciadores ou outras interações não específicas que possam ocorrer durante a amplificação. Dessa forma, o uso de betaina pode contribuir para a melhoria da especificidade da reação, especialmente em condições de alta complexidade, como no formato *duplex*, onde múltiplos iniciadores estão presentes (Varadharajan; Parani, 2021).

Com base na publicação original que descreve a técnica LAMP, a concentração de betaina 1,0 M foi utilizada para obter resultados ideais. Para avaliar seu efeito, a betaina foi testada nas concentrações de 0,8M, 1M e 1,2M no presente estudo. A adição de betaina à reação RT-LAMP aumentou o tempo de resposta da amplificação na detecção colorimétrica, fazendo com que a reação levasse 40 minutos, em comparação aos 30 minutos observados nos ensaios realizados no formato *singleplex*. Nas concentrações de 0,8M e 1M, a betaina contribuiu para uma especificidade adequada, já que a mudança de cor foi observada exclusivamente nas reações que continham RNA viral de SARS-CoV-2 e Influenza A. No entanto, quando utilizada a concentração de 1,2M, surgiram falsos positivos a partir de 40 minutos de incubação.

Nos ensaios de amplificação, o tempo de incubação é um fator crucial para garantir resultados precisos. Com 30 minutos de incubação, foi possível observar o início do processo de amplificação com o meio reacional laranja. No entanto, após 40 minutos, a mudança de coloração se torna completamente visível nos ensaios para ambos os patógenos avaliados. Interromper a reação antes do tempo recomendado pode comprometer a sensibilidade do ensaio e levar a interpretações equivocadas. A concentração de betaina escolhida foi de 1M, assim como sugerido no protocolo do estudo original da técnica, por diminuir os resultados falsos positivos e negativos evitando reações cruzadas.

A enzima Bst DNA polimerase, por sua vez, também tem uma influência importante na reação LAMP, pois é a responsável pelo processo de amplificação de fragmentos de DNA. Ela se destaca por sua alta eficiência, o que significa que pode sintetizar cadeias de DNA longas rapidamente e com alta fidelidade. Assim, a concentração da enzima está diretamente relacionada à formação dos produtos de amplificação específicos (Figura 19).

Com base na avaliação experimental, a concentração de 0,48 U/ μ L de Bst DNA polimerase, combinada a um tempo reacional de 40 minutos e à adição de betaina ao meio reacional, demonstrou desempenho ideal para a detecção dos patógenos-alvo no ensaio RT-LAMP. Essa condição permitiu uma amplificação eficiente e específica mesmo no formato *duplex* que é mais complexo quando comparado ao *singleplex*.

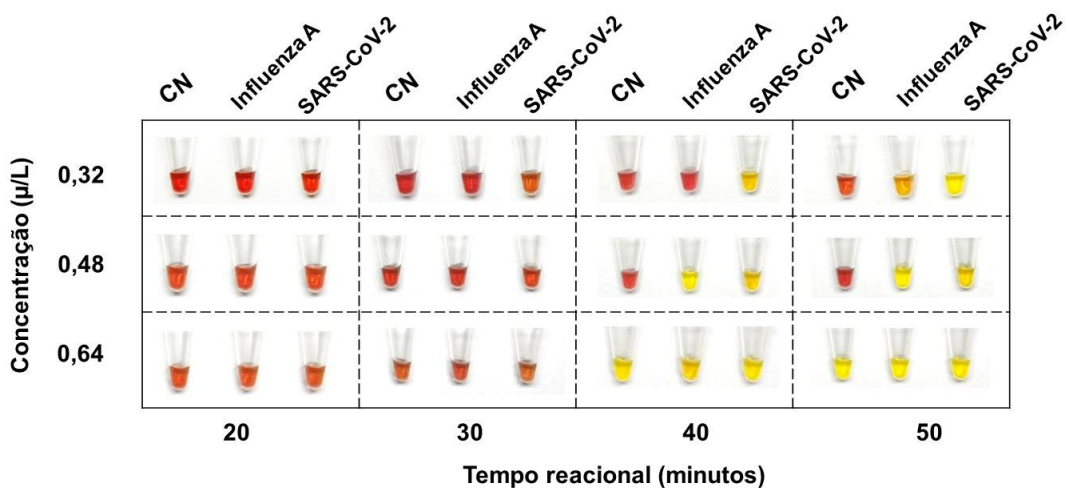


Figura 19 – Otimização da concentração da enzima Bst DNA polimerase nos ensaios RT-LAMP no formato *duplex*. Fonte: Autoria própria.

Em contraste, a elevação da concentração enzimática para 0,64 U/µL resultou em falsos positivos, provavelmente devido à atividade não específica promovida pelo excesso de enzima, que pode favorecer reações de amplificação secundárias. Por outro lado, a concentração mais baixa, de 0,32 U/µL, mostrou-se insuficiente para amplificar os fragmentos de Influenza A sob as mesmas condições (40 minutos), embora tenha apresentado desempenho satisfatório com a extensão do tempo de incubação para 50 minutos. Esses dados reforçam a importância do ajuste fino da concentração enzimática e do tempo de reação para garantir a eficiência e especificidade do RT-LAMP, especialmente em ensaios multiplexados.

4.3.2 Especificidade e limite de detecção do ensaio RT-LAMP no formato duplex

A especificidade de uma reação RT-LAMP está relacionada, sobretudo, a otimização das condições experimentais e a escolha cuidadosa dos iniciadores, que são projetados para reconhecer sequências específicas do genoma viral. Nesse sentido, os testes de diagnóstico objetivam minimizar a possibilidade de reações cruzadas com outros vírus ou patógenos. Assim, o ensaio no formato *duplex* foi planejado para amplificar exclusivamente as sequências genéticas dos vírus SARS-CoV-2 e/ou Influenza A, evitando a amplificação do material genético de outros microrganismos (Figura 20).

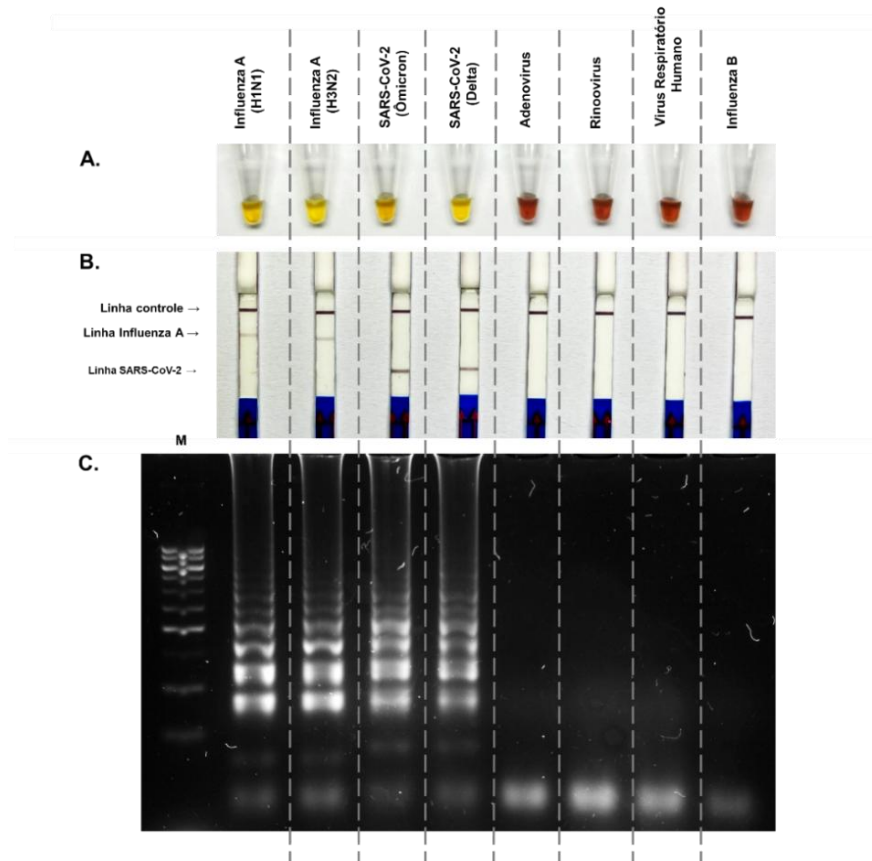


Figura 20 – Especificidade do ensaio RT-LAMP no formato *duplex* para detecção de Influenza A e SARS-CoV-2. A. Detecção colorimétrica. B. Detecção via ensaio de fluxo lateral. C. Detecção via eletroforese em gel de agarose. M: marcador. Fonte: Autoria própria.

Para investigar essa especificidade, foram avaliadas reações RT-LAMP idênticas, nas condições otimizadas, alternando o RNA viral alvo. Com base no exposto, é possível observar que a mudança de coloração no meio reacional ocorreu apenas quando alguma variante de SARS-CoV-2 ou algum subtipo de Influenza A é adicionado. Da mesma forma, o aparecimento de linhas nas fitas de fluxo lateral só ocorreu quando esses patógenos são inseridos no meio reacional. Ademais, as posições das linhas na fita indicam que a detecção dos vírus foi realizada corretamente. A eletroforese em gel de agarose, por sua vez, confirma que se trata de produtos de amplificação LAMP.

Outros métodos de detecção foram avaliados quanto à capacidade de identificar os alvos pelo protocolo RT-LAMP desenvolvido neste estudo (Figura 21). A análise em tempo real das reações LAMP (RT-qLAMP), específicas para Influenza A e SARS-CoV-2, demonstrou a robustez e a especificidade do teste, conforme evidenciado pelos resultados obtidos com as detecções colorimétricas e por LFA. A

detecção em tempo real baseia-se na emissão de fluorescência durante a amplificação, permitindo monitoramento contínuo da reação.

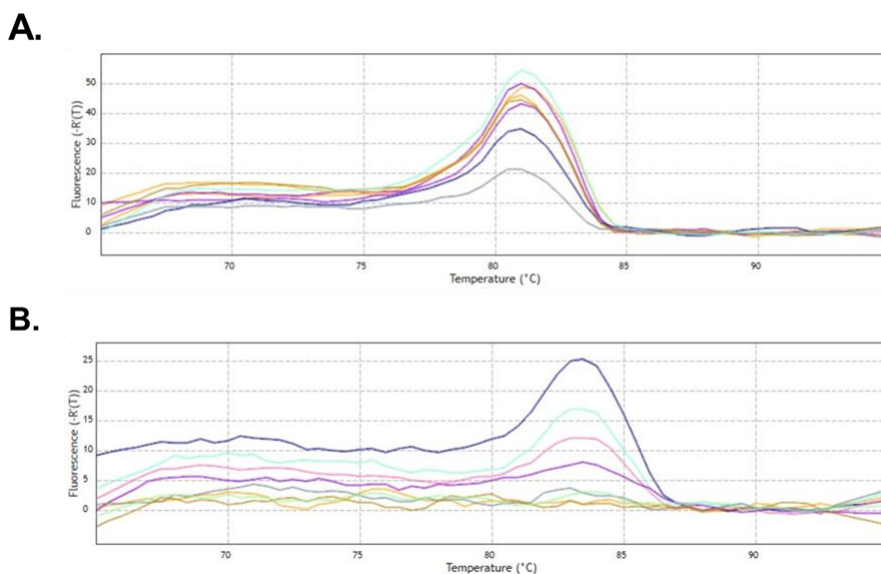


Figura 21 – Curvas de *melting* dos ensaios baseados em reações RT-LAMP em tempo real com o protocolo do teste desenvolvido. A. Alvo SARS-CoV-2. B. Alvo Influenza A. Fonte: Autoria própria.

Os gráficos gerados, que correlacionam temperatura de *melting* (T_m) e intensidade de fluorescência, revelam curvas de amplificação distintas para cada patógeno, com intensidades variáveis que refletem as diferenças nas concentrações dos RNAs-alvo avaliadas no ensaio. A análise das curvas de *melting* evidenciou perfis térmicos característicos para cada agente viral, reforçando a capacidade do método em diferenciar entre estes patógenos, mesmo em reações *duplex*.

A reprodutibilidade do valor de T_m — cerca de 84 °C para Influenza A e 82 °C para SARS-CoV-2 — confirma a especificidade da amplificação e a ausência de reações cruzadas, constituindo um forte indicativo da confiabilidade do teste para uso diagnóstico. A T_m representa a temperatura na qual metade das fitas de DNA dupla hélice do meio se dissocia, sendo um parâmetro crucial para a caracterização dos produtos amplificados. Os valores distintos de T_m para cada patógeno permitem a sua identificação precisa, mesmo em condições de codetecção (Tone et al., 2017).

Quanto ao limite de detecção, tanto o patógeno SARS-CoV-2 quanto Influenza A são detectados com até 150 cópias de RNA viral/ μ L nos dois modos de detecção avaliados (Figura 22A). Em cargas virais baixas, a intensidade do sinal da linha que detecta Influenza A está reduzida, mas ainda visível.

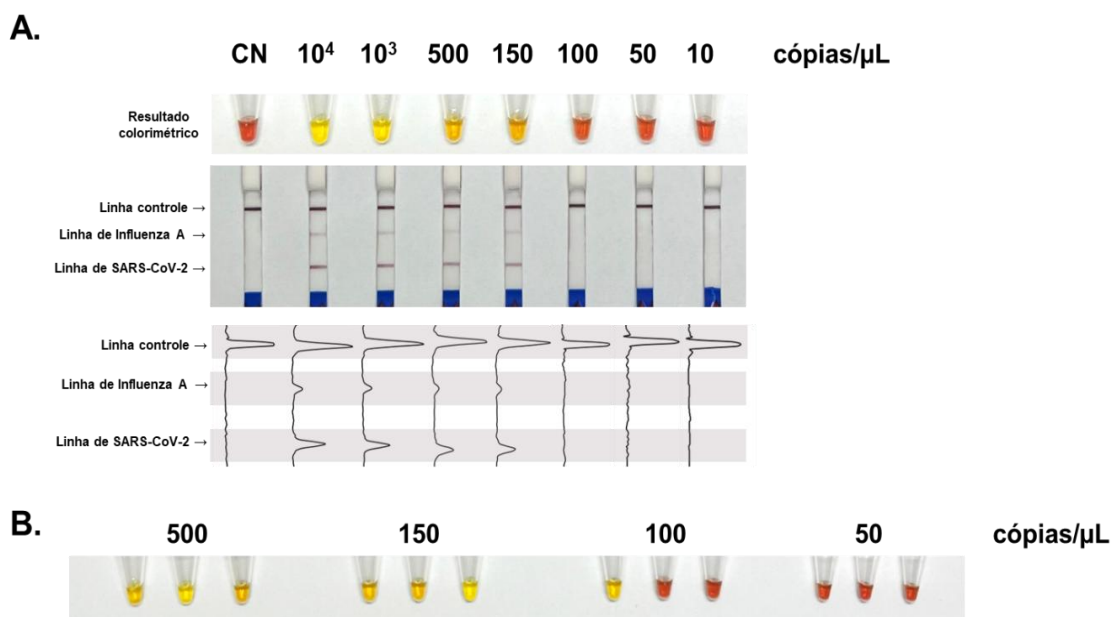


Figura 22 – Limite de detecção do ensaio RT-LAMP no formato *duplex*. A. Detecção dupla de SARS-CoV-2 e Influenza A. B. Análise das triplicatas próximo ao limite de detecção. Fonte: Autoria própria.

Próximo ao limite de detecção, observa-se que até a concentração de 150 cópias/μL, todos os três ensaios da triplicata apresentam resultados positivos (Figura 22B). Isso indica que, dentro dessa faixa de concentração, o teste é confiável para a detecção dos alvos. No entanto, quando a concentração é reduzida para 100 cópias/μL, apenas 1 dos 3 ensaios apresenta um resultado positivo. Esse comportamento sugere que, abaixo de 150 cópias/μL, a detecção dos alvos depende mais da probabilidade estatística, o que pode comprometer a confiabilidade do resultado.

Vale ressaltar que, à medida que a carga viral diminui, observa-se uma redução na intensidade das linhas nas regiões de teste, o que pode ser visualizado de forma mais precisa por meio dos gráficos gerados no *software* ImageJ. Além disso, a cor da solução tende a apresentar-se em tons alaranjados, indicando uma menor atividade de amplificação. O valor obtido no ensaio está em conformidade com a sensibilidade geralmente observada em ensaios LAMP, cujo limite de detecção costuma variar entre 10² e 10³ cópias/μL com os métodos de detecção empregados (Gärtner et al., 2022; Jee et al., 2023; Selva Sharma & Lee, 2024).

Os formatos *singleplex* e *duplex* do ensaio apresentaram desempenhos distintos, ainda que tenham mantido limites de detecção semelhantes. Notou-se uma melhora na sensibilidade na versão *duplex* para SARS-CoV-2, evidenciada pela

redução do limite de detecção na versão colorimétrica de aproximadamente 250 para 150 cópias/ μ L. Esse resultado reforça o potencial da multiplexação como estratégia para otimizar o desempenho diagnóstico.

4.4 Codetecção e aplicação da metodologia em painel de amostras

4.4.1 Codetecção

É possível que um indivíduo esteja coinfestado com os vírus Influenza A e SARS-CoV-2, exigindo a detecção de ambos. A codetecção por RT-LAMP, contudo, impõe desafios técnicos, como a possibilidade de interferência entre os diferentes conjuntos de iniciadores e o risco de ampliações inespecíficas, uma vez que duas reações distintas ocorrem simultaneamente no mesmo sistema. Esses fatores podem comprometer a eficiência e a especificidade do ensaio, demandando otimização das condições reacionais.

Neste estudo, foram avaliadas diferentes combinações de amostras de RNA das variantes Omicron e Delta do SARS-CoV-2 com RNA dos subtipos H1N1 e H3N2 da Influenza A com o objetivo de simular um ambiente real de coinfeção. Inicialmente, a avaliação em ensaios RT-LAMP com detecção dual foi realizada com as condições experimentais do ensaio no formato *duplex*, sem otimização da betaina e da enzima Bst DNA polimerase (Figura 23A). Nessa fase, a detecção colorimétrica apresentou resultados consistentes, enquanto a detecção por fluxo lateral resultou em falso negativo para SARS-CoV-2 nas misturas contendo a variante Delta.

Esse resultado sugere que a amplificação dos fragmentos de Influenza A predominou no meio reacional, interferindo em algumas ampliações dos fragmentos do SARS-CoV-2. Esse efeito ocorre devido ao compartilhamento dos reagentes disponíveis no meio reacional pelas duas reações de amplificação. Após a otimização do ensaio para o formato *duplex*, ambos os métodos de detecção apresentaram resultados positivos e negativos verdadeiros (Figura 23B). Dado que as variantes do SARS-CoV-2 e os vírus da Influenza A, como o H1N1 e H3N2, podem circular simultaneamente em uma população, é essencial que os métodos de diagnóstico sejam capazes de detectar ambos os patógenos de forma eficiente e simultânea.

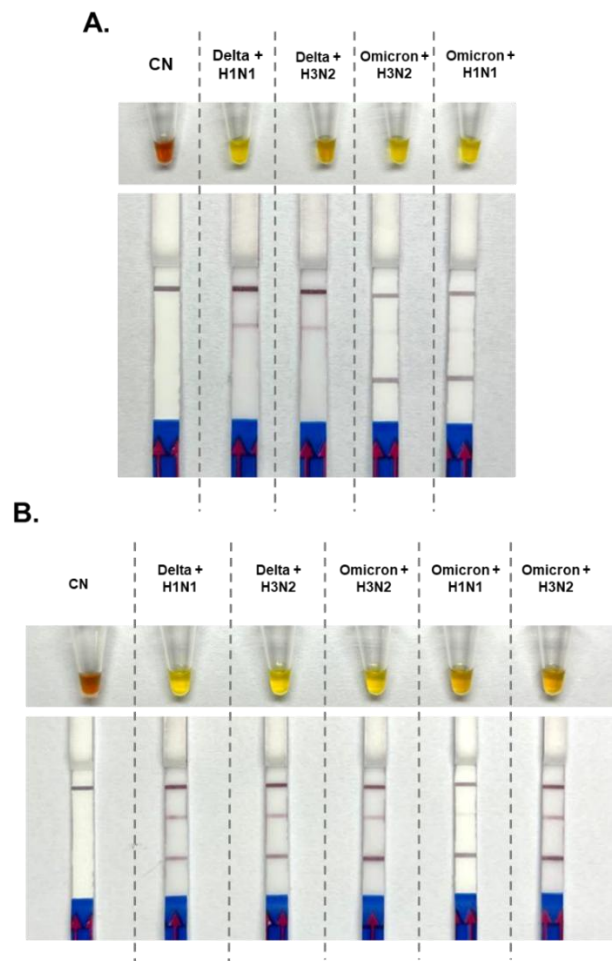


Figura 23 – Codetecções em ensaios *duplex* RT-LAMP. A. Reações avaliadas com condições experimentais sem otimização. B. Reações avaliadas com as condições experimentais otimizadas dos ensaios *duplex*. Fonte: Autoria própria.

A otimização do ensaio RT-LAMP para a detecção dupla de SARS-CoV-2 e Influenza A permite que o teste identifique rapidamente essas infecções concomitantes, um cenário cada vez mais comum em surtos virais. A capacidade de detectar ambos os vírus ao mesmo tempo torna o teste uma ferramenta valiosa para o diagnóstico em tempo real, contribuindo para uma resposta mais rápida e assertiva, especialmente em contextos de saúde pública, onde a coinfeção pode complicar o quadro clínico e o manejo dos pacientes.

4.4.2 Painel de amostras

Foi analisado um painel composto por 60 amostras de RNA extraídas de swabs nasofaríngeos, provenientes de 15 pacientes previamente diagnosticados com SARS-CoV-2, 15 com Influenza A e 30 negativos para ambos os vírus, conforme resultados

obtidos por RT-qPCR (Figura 24). As amostras foram submetidas ao protocolo RT-LAMP *duplex* desenvolvido neste estudo, com detecção dual. Os resultados obtidos foram comparados ao método padrão-ouro (RT-qPCR), conforme apresentado na Tabela 2. No total, durante a etapa de confirmação, o ensaio identificou 34 amostras como positivas e 26 como negativas. A primeira etapa de detecção apresentou uma taxa de verdadeiros positivos de 93,3% (28/30) e uma taxa de verdadeiros negativos de 80,0% (24/30). Foram observadas uma taxa de falsos negativos de 6,7% (2/30) e uma taxa de falsos positivos de 20,0% (6/30). Com base nesses dados, a acurácia desta etapa do teste foi de 86,7% (52/60) (IC 95%: 74,4% – 99,0%).

A acurácia observada indica que a etapa colorimétrica do ensaio foi capaz de classificar corretamente a maioria das amostras, tanto positivas quanto negativas, em comparação ao método padrão-ouro. Embora inferior à acurácia de métodos moleculares consolidados, como o RT-qPCR, esse desempenho pode ser considerado bastante promissor no contexto da triagem inicial, especialmente em cenários de testagem em larga escala, com recursos laboratoriais limitados (Zhang et al., 2020). É importante destacar que, em protocolos de triagem, uma acurácia moderadamente elevada associada a alta sensibilidade (93,3%; IC 95%: 84,4% – 100%) é preferível, uma vez que permite identificar a maioria dos casos positivos com baixo risco de falhas críticas o que é essencial para estratégias de contenção da transmissão viral. Assim, mesmo com uma especificidade um pouco menor (80,0%; IC 95%: 65,6% – 94,4%), o ensaio RT-LAMP pode funcionar como uma ferramenta útil para rastreio inicial em um fluxo diagnóstico em contextos de triagem.

Na segunda etapa do teste, que utiliza o método de detecção por fluxo lateral (LFA), as amostras positivas para SARS-CoV-2 foram, em sua maioria, apresentaram resultados positivos verdadeiros na metodologia proposta. A única exceção foi a amostra 8, que resultou em falso negativo possivelmente devido à carga viral da amostra abaixo do limite de detecção do ensaio. Além disso, a amostra 11, embora corretamente identificada como positiva para SARS-CoV-2, apresentou também um resultado positivo para Influenza A, configurando um falso positivo para este patógeno. Foram ainda observados 8 falsos positivos entre as 45 amostras negativas testadas. Com base nesses dados, a sensibilidade para SARS-CoV-2 por LFA foi de 93,3% (IC 95%: 80,7% – 100%), a especificidade foi de 82,2% (IC 95%: 71,1% – 93,3%) e a acurácia do teste foi de 85,0% (IC 95%: 76,1% – 93,9%).

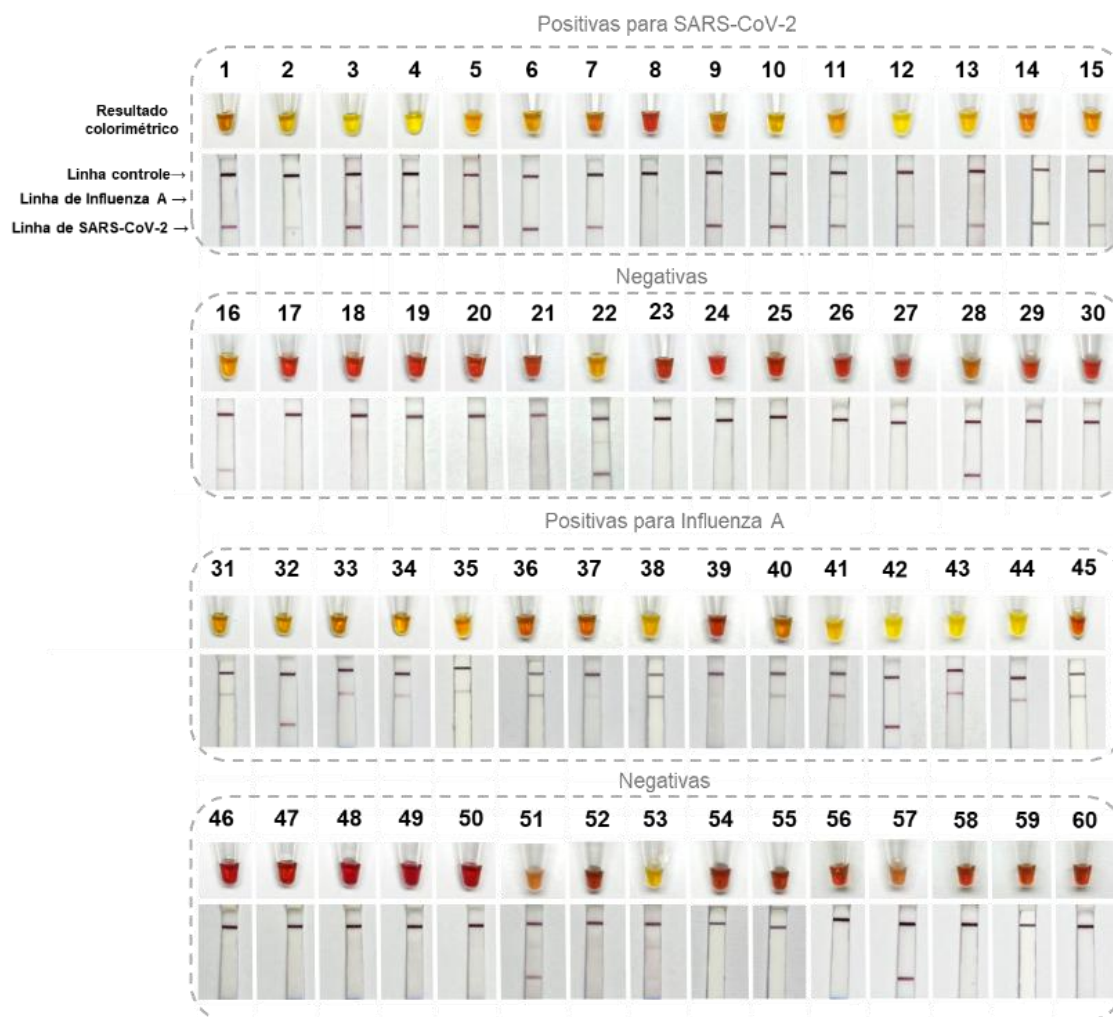


Figura 24 – Painel de amostras clínicas avaliado com o teste RT-LAMP com detecção dual. Fonte: Autoria própria.

Para Influenza A, a detecção LFA apresentou sensibilidade de 80,0% (IC 95%: 59,5% – 100%) e especificidade de 91,1% (IC 95%: 82,9% – 99,3%), resultando em uma acurácia de 88,3% (IC 95%: 79,9% – 96,7%). Das 15 amostras positivas, 12 foram corretamente detectadas, enquanto 3 apresentaram falso negativo. Entre as 45 amostras negativas, foram registrados 4 falsos positivos. Observou-se que a amostra 39 apresentou sombreamento na região da linha teste, ainda que sem linha visível, o que pode sugerir falha no processo de amplificação desta amostra. Esses resultados indicam desempenho robusto do ensaio para ambos os alvos, com maior sensibilidade para SARS-CoV-2 e maior especificidade para Influenza A.

Em algumas amostras do painel, observou-se que as linhas de teste no ensaio de fluxo lateral apresentaram intensidade bastante reduzida, especialmente nas tiras

destinadas à detecção de Influenza A. Esse comportamento pode estar relacionado à presença de concentrações de RNA viral próximas ao limite de detecção do método, ou ainda a pequenas variações técnicas inerentes ao processo de pipetagem manual. Apesar da baixa intensidade, adotou-se neste estudo o critério de que qualquer linha visível, independentemente da coloração, deve ser considerada como resultado positivo. Essa abordagem visa garantir maior sensibilidade, ainda que à custa de possível subjetividade na interpretação visual, especialmente em ambientes de aplicação com menor controle técnico.

Na prática clínica, casos com linha de difícil interpretação podem ser submetidos a repetição do teste ou encaminhados para confirmação por métodos moleculares, como o RT-qPCR, principalmente quando o resultado influencia decisões terapêuticas. Importante destacar que a presença clara da linha de controle assegura o funcionamento adequado da tira, mesmo quando a linha de teste apresenta baixa intensidade.

Tabela 3 – Descrição das amostras utilizadas na avaliação do painel clínico e os respectivos resultados obtidos no teste RT-LAMP

Amostra	GISAID	Ct (RT-qPCR)		Resultado RT-LAMP	
		Influenza A	SARS-CoV-2	Influenza A	SARS-CoV-2
1	EPI_ISL_6173424	ND*	17,35	-	+
2	EPI_ISL_6173026	ND	12,89	-	+
3	EPI_ISL_6771523	ND	17,71	-	+
4	EPI_ISL_6898999	ND	21,98	-	+
5	EPI_ISL_6970841	ND	25,65	-	+
6	EPI_ISL_10521714	ND	15,95	-	+
7	EPI_ISL_10521863	ND	21,96	-	+
8	EPI_ISL_9225590	ND	29,01	-	-
9	EPI_ISL_9225658	ND	26,06	-	+
10	EPI_ISL_9671629	ND	20,39	-	+
11	EPI_ISL_6980430	ND	22,72	+	+
12	EPI_ISL_7455353	ND	18,95	-	+
13	EPI_ISL_8005696	ND	24,13	-	+
14	EPI_ISL_8005691	ND	14,68	-	+
15	EPI_ISL_7455681	ND	17,68	-	+

16		ND	ND	-	+
17		ND	ND	-	-
18		ND	ND	-	-
19		ND	ND	-	-
20		ND	ND	-	-
21		ND	ND	-	-
22		ND	ND	+	+
23		ND	ND	-	-
24		ND	ND	-	-
25		ND	ND	-	-
26		ND	ND	-	-
27		ND	ND	-	-
28		ND	ND	-	+
29		ND	ND	-	-
30		ND	ND	-	-
31	EPI_ISL_18087966	20,88	ND*	+	-
32	EPI_ISL_18087208	25,60	ND	-	+
33	EPI_ISL_17204526	25,83	ND	+	-
34	EPI_ISL_17859990	22,40	ND	+	-
35	EPI_ISL_18088715	27,80	ND	+	-
36	EPI_ISL_17859973	20,97	ND	+	-
37	EPI_ISL_17960461	28,83	ND	+	-
38	EPI_ISL_17204505	27,29	ND	+	-
39	EPI_ISL_17204507	24,95	ND	-	-
40	EPI_ISL_17204508	24,47	ND	+	-
41	EPI_ISL_18088719	24,47	ND	+	-
42	EPI_ISL_18088735	26,08	ND	-	+
43	EPI_ISL_18088775	23,87	ND	+	-
44	EPI_ISL_18087216	27,99	ND	+	-
45	EPI_ISL_18087212	24,47	ND	+	-
46		ND	ND	-	-
47		ND	ND	-	-
48		ND	ND	-	-
49		ND	ND	-	-

50		ND	ND	-	-
51		ND	ND	+	+
52		ND	ND	-	-
53		ND	ND	-	+
54		ND	ND	-	-
55		ND	ND	-	-
56		ND	ND	-	-
57		ND	ND	-	+
58		ND	ND	-	-
59		ND	ND	-	-
60		ND	ND	-	-

Embora ambos os métodos de detecção tenham sido aplicados em paralelo durante o desenvolvimento do teste, a proposta final é sua utilização em formato sequencial. Nessa estratégia, a detecção por fluxo lateral seria realizada apenas nos casos em que a leitura colorimétrica resultar positiva. Essa abordagem é justificada pelo fato de que, na ausência dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A, ambos os métodos tendem a apresentar resultados negativos de forma consistente. Com base no painel analisado, essa aplicação sequencial permitiria a economia de 26 tiras de detecção e aproximadamente 2,6 mL de tampão de eluição, além de reduzir o tempo total de análise ao eliminar uma etapa adicional ao processo. Em um contexto de maior escala, essa economia torna-se mais significativa.

4.5 Avaliação prática: custo e viabilidade do ensaio em contextos descentralizados

O teste RT-LAMP com detecção colorimétrica apresenta um custo aproximado de R\$15 por reação, enquanto a versão acoplada à detecção por LFA eleva o custo para cerca de R\$45, devido ao uso das fitas de fluxo lateral. A detecção colorimétrica é mais econômica por utilizar indicadores de pH que são de baixo custo. Entre os insumos de maior custo estão as enzimas Bst DNA polimerase, a transcriptase reversa, os oligonucleotídeos marcados, além das tiras e tampões de eluição para detecção por LFA. No entanto, quando esses reagentes são adquiridos em grandes

volumes o custo unitário pode ser reduzido, especialmente em aplicações em maior escala.

Comparado ao teste RT-qPCR, considerado o "padrão-ouro", o teste RT-LAMP oferece vantagens econômicas significativas, por dispensar equipamentos sofisticados, como termocicladores em tempo real. Essa simplicidade operacional também reduz os gastos com infraestrutura, consumo de energia e manutenção de equipamentos. Os testes de antígeno, por sua vez, costumam ser mais baratos, pois utilizam anticorpos prontos e não exigem reações de amplificação, além de se beneficiar de uma produção em massa padronizada. No entanto, a sensibilidade e especificidade do teste RT-LAMP são significativamente superiores.

No que diz respeito à possível aplicação do teste em ambientes descentralizados, como unidades básicas de saúde e postos de triagem, destaca-se a simplicidade do protocolo do RT-LAMP. O ensaio não requer profissionais altamente especializados, uma vez que o procedimento se baseia principalmente em etapas simples de pipetagem, sem a necessidade de equipamentos complexos ou manipulações avançadas. Essa característica torna o método particularmente atrativo para contextos com infraestrutura laboratorial limitada. Adicionalmente, os reagentes utilizados no ensaio apresentam boa estabilidade quando armazenados a -20°C , podendo ser mantidos sob refrigeração comum até o momento da reação, enquanto a etapa de incubação, por sua vez, pode ser realizada com blocos térmicos simples.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

5.1 Conclusão

Neste estudo, foi desenvolvido um teste molecular baseado na Transcrição Reversa seguida de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (RT-LAMP) para a detecção simultânea e diferencial dos patógenos SARS-CoV-2 e Influenza A. O ensaio foi otimizado para ser aplicado em locais com recursos limitados e infraestrutura laboratorial reduzida, utilizando procedimentos simples que permitem a interpretação rápida e visual dos resultados.

As reações RT-LAMP foram inicialmente avaliadas no formato *singleplex* e, posteriormente, ajustadas para o formato *duplex*, com a otimização rigorosa de parâmetros experimentais como tempo de reação, temperatura de incubação e concentração dos reagentes. Esses ajustes foram fundamentais para garantir a eficiência do teste e sua capacidade de detectar, com alta especificidade, os vírus alvos.

Uma característica inovadora do teste descrito é a dupla estratégia de detecção dos produtos de amplificação. A primeira etapa é confirmatória, utilizando um indicador de pH que altera a cor do meio, sinalizando a presença de pelo menos um dos vírus. A segunda etapa, de natureza diferencial, ocorre por meio de um ensaio de fluxo lateral, que identifica qual dos patógenos causou a infecção. Esta abordagem com dupla detecção aumenta a confiabilidade do teste, proporcionando economia de recursos e reduzindo o tempo de análise, especialmente em casos negativos na etapa colorimétrica.

O limite de detecção para ambos os patógenos nas duas etapas foi de 150 cópias de RNA/ μ L e não foram observadas reações cruzadas com outros vírus. Ao testar 60 amostras clínicas contendo diferentes amostras SARS-CoV-2 e subtipos de Influenza A, o ensaio apresentou acurácia acima de 85% considerando as duas etapas de detecção e os dois alvos, quando comparado com o método padrão-ouro, a RT-qPCR (Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real). A sensibilidade do teste para SARS-CoV-2 foi de 93,3%, com especificidade de 82,2%. Para Influenza A, a sensibilidade foi de 80,0% e a especificidade de 91,1%. Esses parâmetros analíticos sugerem que o teste é adequado para triagem inicial em

ambientes de atenção primária, onde a identificação de infecções respiratórias é essencial para a tomada de decisão clínica.

Com um tempo de execução rápido (menos de 1h), interpretação visual simples e necessidade mínima de infraestrutura laboratorial, o teste combina precisão molecular com facilidade operacional. Seu *design* o torna uma ferramenta promissora para aplicação no ponto de atendimento, auxiliando no controle da COVID-19 e da gripe sobretudo em locais com recurso limitados.

5.2 Perspectivas

Apesar das contribuições observadas neste estudo, existem caminhos promissores que podem ser explorados em trabalhos futuros, e que podem superar algumas limitações observadas. Um aspecto que limitou a abrangência dos resultados foi a ausência de um conjunto específico de iniciadores para a detecção do vírus Influenza B na reação de RT-LAMP. Com isso, o teste desenvolvido contempla apenas o tipo A da gripe, mais frequente em circulação, o que restringe a cobertura diagnóstica da doença no ponto de atendimento. Vale mencionar que a detecção simultânea de múltiplos patógenos respiratórios, como SARS-CoV-2, Influenza A e B, exige a inclusão de três conjuntos distintos de iniciadores, totalizando de 12 a 18 oligonucleotídeos atuando no mesmo meio reacional. Essa configuração eleva significativamente a complexidade do teste, tanto em termos técnicos quanto operacionais.

Conforme apontado na revisão bibliográfica deste trabalho, já existem estudos que demonstram a viabilidade da detecção multiplexada utilizando RT-LAMP para esses três patógenos, com estratégias que envolvem a otimização do projeto dos iniciadores e a miniaturização por meio de abordagens microfluídicas. Esses avanços indicam que, apesar dos desafios, a implementação é possível e representa uma perspectiva relevante para o aprimoramento de diagnósticos rápidos no ponto de atendimento. A utilização de plataformas microfluídicas, por sua vez, oferece vantagens significativas, como a redução do volume de reagentes, maior controle das condições reacionais e a possibilidade de integração em dispositivos portáteis. Assim, adaptar o teste proposto neste estudo para um sistema microfluídico multiplexado abre um caminho para futuras pesquisas, ampliando sua aplicabilidade clínica.

Outro ponto importante a ser considerado é que as fitas de fluxo lateral utilizadas para a detecção neste estudo são produtos comerciais importados. A produção dessas fitas com insumos nacionais é uma estratégia relevante para tornar a metodologia mais viável do ponto de vista comercial e produtivo. A nacionalização dos materiais pode reduzir custos, facilitar a produção em larga escala e promover maior autonomia tecnológica, contribuindo para a consolidação de soluções mais acessíveis em saúde pública.

Além disso, a realização de uma validação clínica ampliada, com aplicação do teste em um maior número de amostras reais, provenientes de diferentes contextos geográficos e perfis epidemiológicos, é crucial para consolidar a acurácia, sensibilidade e especificidade do método em cenários de uso real. Essa etapa permitirá maior confiança na adoção do teste em larga escala.

Por fim, a automatização do processo — especialmente a etapa de extração do RNA, atualmente realizada de forma prévia à reação RT-LAMP — representa um avanço significativo em termos de praticidade e aplicabilidade. A incorporação de métodos de extração simplificados, compatíveis com o ambiente de ponto de atendimento, pode reduzir o tempo total de execução e minimizar erros técnicos. A automação, aliada à padronização de outras etapas da reação e da leitura dos resultados, ampliará o potencial do teste para uso descentralizado, mesmo em locais com infraestrutura limitada.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, Débora C. *et al.* Combined detection of molecular and serological signatures of viral infections: The dual assay concept. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 210, p. 114302, ago. 2022.

BERNARDES, Wilma Patrícia de Oliveira Santos *et al.* Comparison of diagnostic performance of RT-qPCR, RT-LAMP and IgM/IgG rapid tests for detection of SARS-CoV-2 among healthcare workers in Brazil. *Journal of Infection and Public Health*, v. 16, n. 7, p. 1081–1088, jul. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informe SE 52 de 2024: Vigilância das Síndromes Gripais – Influenza, COVID-19 e outros vírus respiratórios de importância em saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude-mental/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/covid-19/publicacoes-tecnicas/informes/informe-se-52-de-2024.pdf/view>. Acesso em: 20 fev. 2025.

BRIZ-REDÓN, Álvaro; SERRANO-AROCA, Ángel. The effect of climate on the spread of the COVID-19 pandemic: A review of findings, and statistical and modelling techniques. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, v. 44, n. 5, p. 591–604, 4 out. 2020.

CALVERT, Amanda E. *et al.* Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLOS ONE*, v. 12, n. 9, p. e0185340, 25 set. 2017.

CHU, Daniel K. W. *et al.* Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry*, v. 66, n. 4, p. 549–555, 1 abr. 2020.

CORMAN, Victor M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, v. 25, n. 3, 23 jan. 2020.

DADONAITE, Bernadeta *et al.* The structure of the influenza A virus genome. *Nature Microbiology*, v. 4, n. 11, p. 1781–1789, 22 jul. 2019.

DE OLIVEIRA, Kézia Gomes *et al.* Rapid molecular diagnostics of COVID-19 by RT-LAMP in a centrifugal polystyrene-toner based microdevice with end-point visual detection. *The Analyst*, v. 146, n. 4, p. 1178–1187, 2021.

DENG, Yulin *et al.* Recent advances in sensitivity enhancement for lateral flow assay. *Microchimica Acta*, v. 188, n. 11, p. 379, 13 nov. 2021.

DOS SANTOS, Carlos *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Saliva by RT-LAMP During a Screening of Workers in Brazil, Including Pre-Symptomatic Carriers. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2021.

DU, Ruikun *et al.* Revisiting influenza A virus life cycle from a perspective of genome balance. *Virologica Sinica*, v. 38, n. 1, p. 1–8, fev. 2023.

DUAN, Xuejun *et al.* Dual-detection fluorescent immunochromatographic assay for quantitative detection of SARS-CoV-2 spike RBD-ACE2 blocking neutralizing antibody. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 199, p. 113883, mar. 2022.

ERLICH, Henry A. Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Immunology*, v. 9, n. 6, p. 437–447, nov. 1989.

ERLICH, Henry A.; GELFAND, David; SNINSKY, John J. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*, v. 252, n. 5013, p. 1643–1651, 21 jun. 1991.

ESTRELA, Paulo Felipe Neves *et al.* Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. *Journal of Virological Methods*, v. 271, p. 113675, set. 2019.

ESTRELA, Paulo Felipe Neves *et al.* A multiplex point-of-care test for discriminatory inference of SARS-CoV-2 Omicron lineages using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification and lateral flow detection. *Analytical Methods*, v. 17, n. 11, p. 2380–2388, 2025.

FORLEO-NETO, Eduardo *et al.* Influenza. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 2, p. 267–274, abr. 2003.

GILL, Pooria; GHAEMI, Amir. Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies—A Review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, v. 27, n. 3, p. 224–243, 8 fev. 2008.

GOTO, Motoki *et al.* Colorimetric Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Using Hydroxy Naphthol Blue. *BioTechniques*, v. 46, n. 3, p. 167–172, 25 mar. 2009.

GOUX, Heather *et al.* Performance of rapid antigen tests to detect SARS-CoV-2 variant diversity and correlation with viral culture positivity: implication for diagnostic development and future public health strategies. *mBio*, v. 15, n. 12, 11 dez. 2024.

GUMUS, Eda; BINGOL, Haluk; ZOR, Erhan. Lateral flow assays for detection of disease biomarkers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 225, p. 115206, fev. 2023.

GUO, Yongman *et al.* A comparative analysis of influenza and COVID-19: Environmental-ecological impacts, socioeconomic implications, and future challenges. *Biosafety and Health*, v. 6, n. 6, p. 369–375, dez. 2024.

HU, Ben *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 141–154, 6 mar. 2021.

IBADURRAHMAN, Irsyad; SURYANI; DESRIANI. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) primer design based on Indonesia SARS-CoV-2 RNA sequence. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 21, n. 1, p. 168, dez. 2023.

JANG, Minju *et al.* Rapid and simple detection of influenza virus via isothermal amplification lateral flow assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 414, n. 16, p. 4685–4696, 2 jul. 2022.

JEONG, Haeyoung *et al.* Identification of conserved regions from 230,163 SARS-CoV-2 genomes and their use in diagnostic PCR primer design. *Genes & Genomics*, v. 44, n. 8, p. 899–912, 2 ago. 2022.

JEE, Hyunseul *et al.* Comparative Clinical Evaluation of a Novel FluA/FluB/SARS-CoV-2 Multiplex LAMP and Commercial FluA/FluB/SARS-CoV-2/RSV RT-qPCR Assays. *Diagnostics*, v. 13, n. 8, p. 1432, 16 abr. 2023.

KANG, Jonghoon; SOOG LEE, Myung; GORENSTEIN, David G. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: Application to in vitro combinatorial selection of aptamers. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 64, n. 2, p. 147–151, ago. 2005.

KANG, Tongjia *et al.* Advances in nucleic acid amplification techniques (NAATs): COVID-19 point-of-care diagnostics as an example. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 206, p. 114109, jun. 2022.

KIM, So-Hee *et al.* Diverse methods of reducing and confirming false-positive results of loop-mediated isothermal amplification assays: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1280, p. 341693, nov. 2023.

KUBINA, Robert; DZIEDZIC, Arkadiusz. Molecular and Serological Tests for COVID-19. A Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics. *Diagnostics*, v. 10, n. 6, p. 434, 26 jun. 2020.

KUBISTA, Mikael *et al.* The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, abr. 2006.

KYAW, Moe H. *et al.* Descriptive analysis to assess seasonal patterns of COVID-19 and influenza in low-income and middle-income countries in Asia, the Middle East and Latin America. *BMJ Open*, v. 14, n. 1, p. e081019, 31 jan. 2024.

LAI, Meng Yee *et al.* Colorimetric detection of SARS-CoV-2 by uracil-DNA glycosylase (UDG) reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *International Journal of Infectious Diseases*, v. 120, p. 132–134, jul. 2022.

LEE, Dohwan; CHU, Chia-Heng; SARIOGLU, A. Fatih. Point-of-Care Toolkit for Multiplex Molecular Diagnosis of SARS-CoV-2 and Influenza A and B Viruses. *ACS Sensors*, v. 6, n. 9, p. 3204–3213, 24 set. 2021.

LEE, Frances Eun-Hyung; TREANOR, John J. *Viral Infections*. In: Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. [S.l.]: Elsevier, 2016. p. 527-556.e15.

LEE, Sang Hun *et al.* Emerging ultrafast nucleic acid amplification technologies for next-generation molecular diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 141, p. 111448, set. 2019.

MATHIEU, Edouard *et al.* A global database of COVID-19 vaccinations. *Nature Human Behaviour*, v. 5, n. 7, p. 947–953, 10 maio 2021.

MYTZKA, Nicolas *et al.* A fully integrated duplex RT-LAMP device for the detection of viral infections. *Biomedical Microdevices*, v. 25, n. 4, p. 36, 8 dez. 2023.

MEAGHER, Robert J. *et al.* Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA. *The Analyst*, v. 143, n. 8, p. 1924–1933, 2018.

MORA-CÁRDENAS, Erick; MARCELLO, Alessandro. Switch-on the LAMP to spot Zika. *Annals of Translational Medicine*, p. 500–500, dez. 2017.

MORI, Yasuyoshi *et al.* Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 289, n. 1, p. 150–154, nov. 2001.

MORI, Yasuyoshi; KANDA, Hidetoshi; NOTOMI, Tsugunori. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 19, n. 3, p. 404–411, 2013.

MORI, Yasuyoshi; NOTOMI, Tsugunori. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 15, n. 2, p. 62–69, 2009.

MOSADEGH, Mehrdad *et al.* Evaluating the efficiency of ELISA, monoplex and multiplex probe-based real-time reverse-transcription PCR assays in the detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) and influenza A and B viruses: A cross-sectional study. *Health Science Reports*, v. 7, n. 6, 24 jun. 2024.

NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, v. 16, n. 3, p. 223–229, jun. 2002.

NAKAUCHI, Mina *et al.* Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *Journal of Medical Virology*, v. 83, n. 1, p. 10–15, 24 jan. 2011.

NELSON, Martha I.; HOLMES, Edward C. The evolution of epidemic influenza. *Nature Reviews Genetics*, v. 8, n. 3, p. 196–205, 30 mar. 2007.

NGUYEN, Hiep Van; PHAN, Vu Minh; SEO, Tae Seok. High-throughput centrifugal microfluidic platform for multiplex respiratory virus diagnostics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 399, p. 134771, jan. 2024.

NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, v. 28, n. 12, p. E63, 15 jun. 2000.

NOTOMI, Tsugunori *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 1–5, 4 jan. 2015.

OLIVEIRA, Beatriz B.; VEIGAS, Bruno; BAPTISTA, Pedro Viana. Isothermal Amplification of Nucleic Acids: The Race for the Next “Gold Standard”. *Frontiers in Sensors*, v. 2, 28 set. 2021.

RAHIMI, Azadeh; MIRZAZADEH, Azin; TAVAKOLPOUR, Soheil. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics*, v. 113, n. 1, p. 1221–1232, jan. 2021.

RAHMAN, Md Tahminur *et al.* Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, v. 4, n. 1, p. 30–36, 6 fev. 2013.

REY, Elizabeth G. *et al.* Mitigating the Hook Effect in Lateral Flow Sandwich Immunoassays Using Real-Time Reaction Kinetics. *Analytical Chemistry*, v. 89, n. 9, p. 5095–5100, 2 maio 2017.

RIBAS FREITAS, André Ricardo; GIOVANETTI, Marta; ALCANTARA, Luiz Carlos Junior. Variantes emergentes do SARS-CoV-2 e suas implicações na saúde coletiva. *InterAmerican Journal of Medicine and Health*, v. 4, 8 fev. 2021.

ROSS, Georgina M. S. *et al.* Unraveling the Hook Effect: A Comprehensive Study of High Antigen Concentration Effects in Sandwich Lateral Flow Immunoassays. *Analytical Chemistry*, v. 92, n. 23, p. 15587–15595, 1 dez. 2020.

SELVA SHARMA, Arumugam; LEE, Nae Yoon. Advancements in visualizing loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reactions: A comprehensive review of colorimetric and fluorometric detection strategies for precise diagnosis of infectious diseases. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 509, p. 215769, jun. 2024.

STORMS, Suzanna M. *et al.* RT-LAMP as Diagnostic Tool for Influenza—A Virus Detection in Swine. *Veterinary Sciences*, v. 10, n. 3, p. 220, 13 mar. 2023.

SUN, Yong *et al.* Rapid and simultaneous visual screening of SARS-CoV-2 and influenza viruses with customized isothermal amplification integrated lateral flow strip. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 197, p. 113771, fev. 2022.

TOMITA, Norihiro *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, v. 3, n. 5, p. 877–882, 24 maio 2008.

TONE, Kazuya *et al.* Enhancing melting curve analysis for the discrimination of loop-mediated isothermal amplification products from four pathogenic molds: Use of inorganic pyrophosphatase and its effect in reducing the variance in melting temperature values. *Journal of Microbiological Methods*, v. 132, p. 41–45, jan. 2017.

VARADHARAJAN, Bhooma; PARANI, Madasamy. DMSO and betaine significantly enhance the PCR amplification of ITS2 DNA barcodes from plants. *Genome*, v. 64, n. 3, p. 165–171, mar. 2021.

VLAICU, Ovidiu *et al.* Antigenic Divergence from the Seasonal Vaccine of the Influenza Virus Strains Circulating in Romania During Three Successive Seasons (2021–2024). *Microorganisms*, v. 12, n. 11, p. 2363, 19 nov. 2024.

WANG, Hua *et al.* An integrated dual-layer microfluidic platform for multiple respiratory viruses screening. *Analytica Chimica Acta*, v. 1242, p. 340812, fev. 2023.

WARNEFORD-THOMSON, Robert *et al.* A LAMP sequencing approach for high-throughput co-detection of SARS-CoV-2 and influenza virus in human saliva. *eLife*, v. 11, 9 maio 2022.

WEBSTER, R. G. *et al.* Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, v. 56, n. 1, p. 152–179, mar. 1992.

WERNECK, Guilherme Loureiro; CARVALHO, Marília Sá. A pandemia de COVID-19 no Brasil: crônica de uma crise sanitária anunciada. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 36, n. 5, 2020.

WHO. The effects of virus variants on COVID-19 vaccines. Genebra: OMS, 2025. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-effects-of-virus-variants-on-covid-19-vaccines>>. Acesso em: 12 fev. 2025.

WHO. Influenza (seasonal). Genebra: OMS, 2025. Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)). Accessed on: 18 fev. 2025.

WHO. Number of COVID-19 cases reported to WHO (cumulative total). Genebra: OMS, 2025. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c>. Acesso em: 10 fev. 2025.

WHO. Number of COVID-19 deaths reported to WHO (cumulative total). Genebra: OMS, 2025. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c>. Acesso em: 10 fev. 2025.

WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. Genebra: OMS, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso em: 10 fev. 2025.

WU, Fan *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020.

ZHANG, Yinhua; TANNER, Nathan A. Development of Multiplexed Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of SARS-CoV-2 and Influenza Viral RNA. *BioTechniques*, v. 70, n. 3, p. 167–174, 4 mar. 2021.

ZASADA, Aleksandra A. *et al.* Application of loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric and lateral flow dipstick visualization as the potential point-of-care testing for *Corynebacterium diphtheriae*. *BMC Infectious Diseases*, v. 20, n. 1, p. 308, 25 dez. 2020.

ZHANG, Yinhua *et al.* Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. , 29 fev. 2020.

ZHAO, Yongxi *et al.* Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chemical Reviews*, v. 115, n. 22, p. 12491–12545, 25 nov. 2015.

ZHENG, Chujun *et al.* Rapid developments in lateral flow immunoassay for nucleic acid detection. *The Analyst*, v. 146, n. 5, p. 1514–1528, 2021.

ZHU, Xiong *et al.* Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 166, p. 112437, out. 2020.

ZHOU, Yaofeng *et al.* Point-of-care COVID-19 diagnostics powered by lateral flow assay. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 145, p. 116452, dez. 2021.