

TESTE RÁPIDO IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA DIAGNÓSTICO DENGUE INTERPRETADO PELO ARDUINO

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC QUICK TEST FOR DIAGNOSIS DENGUE INTERPRETED BY ARDUINO

DIOGO CERQUEIRA DE SOUZA¹, DANIEL CARLOS DE BRITO VIANA², ARILTON JANUÁRIO BACELAR JÚNIOR^{3*}, FILIPE COSTA FERNANDES⁴

1. Acadêmico do Curso de Graduação em Biomedicina da Faculdade ÚNICA de Ipatinga M.G.; 2. Acadêmico do Curso de Graduação em Ciência da Computação da Faculdade ÚNICA de Ipatinga M.G.; 3. Farmacêutico-bioquímico, coordenador do curso de Farmácia e docente do curso de Graduação em Farmácia da Faculdade ÚNICA de Ipatinga M.G.; 4. Coordenador do curso de Ciência da Computação e docente dos cursos de graduação em Ciência da Computação e Sistemas de Informação da Faculdade ÚNICA de Ipatinga M.G.

*Faculdade ÚNICA de Ipatinga – Rua Salermo, 299, Bethânia, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. CEP: 35164-779. dr.arilton@gmail.com

Recebido em 19/09/2016. Aceito para publicação em 01/11/2016

RESUMO

Dengue é uma doença endêmica, considerada maior arbovírus do mundo com sintomas inespecíficos, podendo ocasionar febre moderada a alta, dores musculares e em casos graves sangramentos intensos e estado de choque. Para chegar ao diagnóstico da dengue são necessários exames clínicos e laboratoriais para a confirmação da doença, o resultado é informado aos órgãos da saúde para publicação dos dados através dos boletins epidemiológicos. O objetivo deste trabalho é propor um aparelho que possui um teste rápido que utiliza a fita de reação enzimática para a proteína NS1 cujo resultado será integrado ao Sistema Nacional para Estatística da Dengue, que tem como propósito acelerar o processo de divulgação dos dados epidemiológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Dengue, teste rápido, proteína NS1, arduino, dados epidemiológicos.

ABSTRACT

In Dengue Fever is an endemic disease, considered the biggest arbovirus of the world, with unespecific symptoms, that might be moderated fever, muscle pain and in most serious cases, intense bleeding and chock. To diagnose it, clinical and laboratory exams are necessary to confirm the disease, and the result is informed to the health systems to publish the data over epidemiological bulletins. The objective of this paper is proposing a fast test that uses an enzymatic reaction tape for NS1 protein which the result will be integrated to the National Dengue Fever Statistical System, and accelerate the process of releasing the epidemiological data.

KEYWORDS: Dengue fever, rapid test, NS1 protein, arduino, epidemiological data.

1. INTRODUÇÃO

Doenças negligenciadas são grupos de doenças causadas por agentes infecciosos, geralmente endêmicas em países subdesenvolvidos, especialmente em populações de baixa renda, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a sua proliferação. Nos últimos anos a dengue continua sendo umas das doenças negligenciadas com número significativo de infecções no Brasil, sendo a maior doença de arbovirose do mundo¹. Apresentando grandes dificuldades no avanço desta área por não possuir um tratamento antiviral ou vacina eficaz, prejudicando o progresso de novos fármacos ou métodos de diagnósticos².

Dengue é uma doença de grande relevância de arbovírus do mundo, grupo ecológico complexo por artrópodes, que são vírus que se propagam biologicamente na natureza entre vertebrados hospedeiros susceptíveis e artrópodes hematófagos, transmitida por fêmeas infectadas por mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes Albopictus*, identificado como *arthropod borne viruses* definido pela World Health Organization (WHO). Considerada endêmica, que provoca alto impacto a saúde pública por possuir elevada disseminação e capacidade em causar considerável morbidade e mortalidade no homem³.

Os sintomas da dengue, após um período de incubação de até duas semanas, são inespecíficos. Manifesta-se tanto infecções inaparentes quanto dengue clássica (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) que pode levar a síndrome do choque de dengue (SCD) e dengue com complicação (DCC)⁴.

O diagnóstico laboratorial é de suma importância para determinação de infecção causada pelo vírus DENV, sabendo que apenas os métodos para diagnóstico clínico

e epidemiológico são meios complexos de análise envolvendo apenas esses dados. Os exames para identificação laboratorial podem ser executados pelo isolamento e identificação do vírus, pela localização de antígenos, do ácido nucléico viral e pela determinação de anticorpos específicos, das classes IgM e IgG⁹. Para maior eficácia do resultado do exame deve correlacionar com o período que o paciente se encontra e o ciclo da doença no hospedeiro, que influenciará na escolha do método mais apropriado para que ocorra uma correta interpretação dos resultados obtidos¹⁰.

Apesar dos exames mencionados, o tratamento para a dengue não depende dos resultados sorológicos, os métodos diretos de detecção, como o isolamento viral, detecção do genoma e do antígeno que são mais específicos, apresentam menor disponibilidade¹⁰.

Considerando os meios de diagnóstico relacionado ao tempo de entrega do resultado para o paciente e o retardamento para atualização de dados epidemiológicos, a finalidade deste trabalho é descrever o mecanismo de coleta de dados para possíveis infecções por dengue através do teste rápido juntamente com o tempo de publicação dos dados adquiridos para o boletim epidemiológico e sua atualização nas estatísticas de dengue nas regiões, mencionando também possibilidades de criação de um protótipo de aparelho que possa agilizar este processo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo tem como meta promover um teste rápido imunocromatográfico para diagnóstico da dengue interpretado pelo microcontrolador arduino integrado ao Sistema Nacional de Estatística da Dengue (SINED), será realizado em forma de trabalho de campo, com projeto de pesquisa experimental, em análise qualitativa.

Os dados serão coletados através de pesquisas em livros, documentários e revistas científicas principalmente publicados no Google Acadêmico e SciELO e teste em análise prática, que irá complementar a resolução da criação do aparelho eletrônico portátil de teste rápido para dengue, embasado na tecnologia de informação científica.

O aparelho apresentará em seu interior uma fita de papel enzimática com antígeno NS1 e reagente controle para teste com gota de sangue total do paciente, um leitor óptico para analisar os dados da fita e enviar o conteúdo para um microcontrolador que realizará a validação do teste e salvar o resultado em um cartão de memória para integrar ao SINED, com tempo de resultado em até 20 minutos. Após o resultado do aparelho os dados serão enviados ao SINED para gerar as estatísticas nacionais de possíveis incidências da doença.

O protótipo tem como objetivo coletar os dados do exame, positivo ou negativo, para reação da proteína NS1 sugestivo a dengue e atualizar o banco de dados para acelerar a divulgação das estatísticas de dengue na região,

através do aparelho integrado ao SINED. Analisar se o paciente se encontra com a proteína NS1 circulante no sangue, contribuindo para um diagnóstico rápido, tendo como vantagem agilizar e viabilizar o processo médico-paciente e medico-laboratório.

3. RESULTADOS

Dengue

O vírus DENV pertence ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae*, apresentando quatro variedades de sorotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, possui envelope glicoproteico constituído por bicamada lipídica em formato icosaédrico que consiste em proteínas estruturais e não estruturais, ainda que possuam entre eles grande variabilidade genética, é conservada a região não-codificante 3'. Material genético constituído de RNA de fita simples de aproximadamente 11 Kb (kilobases), polaridade positiva (+ssRNA) que funciona como RNA mensageiro, com peso molecular aproximado de 3.3x10⁶ (daltons), cujo genoma é composto por dez genes de proteínas, sendo três que codificam o nucleocapsídeo e sete genes que codificam proteínas não estruturais. Estas proteínas estão integradas em sua bicamada lipídica que envolve nucleocapsídeo viral^{5, 6}.

As três proteínas estruturais E, prM e C são codificadas no primeiro terço do genoma ao passo que os outros dois terços codificam as sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As não estruturais estão envolvidas na modulação da resposta do hospedeiro e na replicação do RNA viral, desempenham funções na montagem, organização e liberação do vírus⁷.

Os *Flavivirus* entram nas células hospedeiras por endocitose mediada pela interação com receptores. O baixo pH do ambiente do endossomo resulta em mudanças conformacionais na proteína E expondo o peptídeo de fusão, permitindo a fusão com a membrana do endossomo e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Depois da desmontagem da partícula, o genoma viral é liberado e traduzido a partir de uma única fase de leitura aberta que codifica uma poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos, que é clivada co traducionalmente por proteases virais e celulares⁸.

Epidemiologia

Segundo o Ministério da Saúde e seus Boletins Epidemiológicos (Volume 47 Nº 14 – 2016) divulgados, informa que foram registrados 802.429 casos prováveis de dengue no país até a semana epidemiológica 13 na data 3/1/2016 a 2/4/2016, nesse período a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (463.807 casos; 57,8%) em relação ao total do país. Entre os municípios com as maiores incidências acumuladas por estrato populacional, em relação ao número de habitantes, Coronel Fabriciano/MG está em primeiro lugar, com 4.753,90

casos/100 mil habitantes (população de 100 mil a 499 mil habitantes)¹¹.

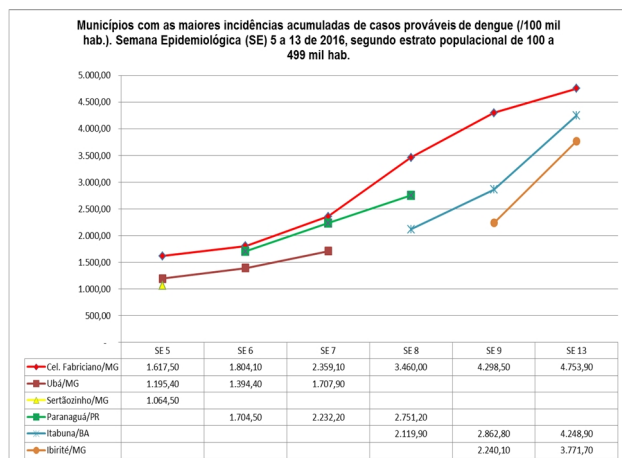


Figura 1. Gráfico dos dados da fonte: Boletim Epidemiológico (Volume 47, Nº 14 - 2016).

Através deste gráfico comparativo, com as três cidades de maiores incidências acumuladas de casos prováveis de dengue (dentre as cidades brasileiras com estrato populacional de 100 a 499 mil habitantes) a cada semana epidemiológica, a cidade de Coronel Fabriciano, MG, destaca-se em primeiro lugar, de acordo com os dados coletados pelos Boletins Epidemiológicos (Volume 47 Nº 14 – 2016) divulgados, motivando o presente estudo¹¹.

Arduino

O Arduino é uma plataforma de prototipagem open source (código aberto). Criado no Instituto Ivrea de Design de Interação (Ivrea Interaction Design Institute) como uma ferramenta fácil para prototipagem rápida destinada a alunos com pouco conhecimento em eletrônica e programação¹⁴.

A placa Arduino é equivalente a um pequeno computador. Pode ser programado para processar entradas e saídas de dados entre o dispositivo e os componentes externos (Shields) conectados a ele. É considerada uma plataforma de computação física ou embarcada, ou seja, um sistema que pode interagir com seu ambiente por meio de hardware e software. Pode ser conectado a um computador, a uma rede, ou até mesmo à Internet para recuperar e enviar dados da placa e atuar sobre eles¹⁵.

Os shields são placas de circuito utilizadas para estender as funcionalidades do arduino. Essas placas contêm outros dispositivos como, por exemplo, receptores GPS, cartão SD, displays de LCD, módulos ethernet, bluetooth, etc. São fáceis de utilizar e úteis no desenvolvimento de projetos, mas não são obrigatoriamente necessários para que o arduino funcione corretamente¹⁵.

Funcionamento do Aparelho

O aparelho possuirá uma fita de papel enzimático,

teste imunocromatográfico, de detecção baseada na utilização de tiras de papel contendo um material suporte, impregnadas com reagentes secos que são ativadas pela aplicação de amostras fluidas^{12,13}.

Utilizará amostras de sangue total, plasma ou soro livre de hemólise, lipemia e contaminação, contendo antígeno NS1 que ligará ao conjugado anti-NS1 marcado com ouro coloidal, cujo imunocomplexo migra por capilaridade pela membrana do teste ligando-se aos anticorpos monoclonais anti-NS1 presentes na área teste (T), determinando o surgimento de uma banda colorida nesta área e positivando a amostra. Se o antígeno NS1 está ausente na amostra, não haverá o aparecimento da banda colorida na área teste, negando o. Na área controle (C) sempre aparecerá uma banda colorida, demonstrando que os reagentes estão funcionando corretamente, conforme figura 2¹⁷.

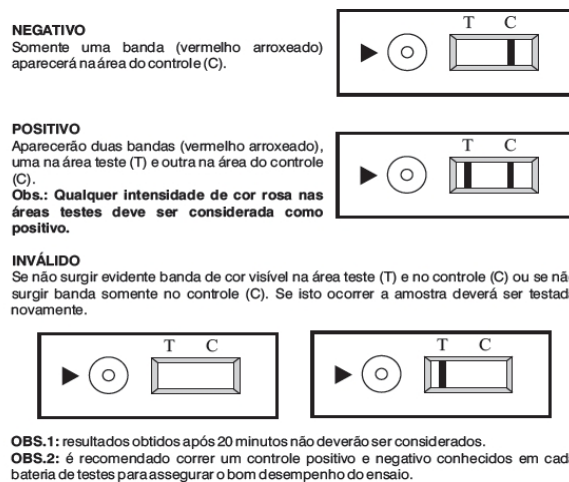


Figura 2. Interpretação dos Resultados. Fonte: <<http://www.wamadiagnostica.com.br/bulas/imuno-rapido/dengue-ns1-1.pdf>>

Após o resultado na fita de reação enzimática, o sensor óptico, que baseia-se na transmissão e recepção de luz infravermelha será refletida ou interrompida por um objeto a ser detectado, que no caso do aparelho será o aparecimento da banda de cor visível na área de Teste (T) e Controle (C). Estes sensores, também denominados fotoelétricos, compõe-se basicamente de dois circuitos: transmissor, responsável pela emissão do feixe de luz e receptor encarregado de receber o feixe de luz¹⁶.

Posteriormente, a leitura obtida pelo sensor será enviada para o microcontrolador arduino, responsável por validar se o teste foi positivo, negativo ou inválido. Logo, o resultado será salvo em um cartão de memória micro SD. Desta forma, o resultado de todos os testes realizados pelo protótipo estará disponível no micro SD.

O SINED, será um Sistema Web criado para integrar ao aparelho portátil com a finalidade de agilizar o processo de divulgação da estatística da doença no país. Este sistema será de acesso público por meio da internet, onde

a população em geral poderá acompanhar o estado da doença por meio de gráficos e tabelas.

Além disso, o SINED contará com uma área de acesso restrita, cabíveis aos órgãos competentes da saúde e as Estações de Trabalho (EsT) que utilizarão o aparelho. A principal função desta área é servir de integração entre aparelho e sistema. Nela, o responsável pela EsT fará o upload de dados, onde as informações contidas no cartão de memória serão inseridas no banco de dados.

O Sistema deverá identificar, através do arquivo contido no cartão de memória, os dados de localização do aparelho como cidade/estado e a EsT que pertence, além de todos os resultados contidos como positivo, negativo e inválido. Através dessas informações, será possível prover relatórios atualizados com maior agilidade, através de gráficos e tabelas com os dados gerais do país e a possibilidade de utilizar filtros por estado e cidade.

4. CONCLUSÃO

O teste rápido imunocromatográfico para diagnóstico da dengue interpretado pelo arduino, na presença do antígeno NS1 em amostras fluidas que poderá ser testadas por gota de sangue total, soro ou plasma. Será realizado sob rígida padronização de condições de reação, respeitando a forma de coleta e o tempo de visualização do resultado. Sabendo da incidência de dengue no país e o tempo de publicação dos resultados dos boletins epidemiológicos mostra-se que o protótipo apresentado será capaz de promover maior agilidade de informação dos testes sendo repassados de forma instantânea para o banco de dados de estatísticas de dengue.

REFERÊNCIAS

- [1] WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dengue/en/>> Acessado em 10 de agosto 2016.
- [2] Da Costa VG, Marques-Silva AC, Floriano VG, Moreli ML. Safety, immunogenicity and efficacy of a recombinant tetravalent dengue vaccine: a meta-analysis of randomized trials. *Vaccine* 2014; 32:4885-92.
- [3] Organización Pan-Americana de Saude; Organización Mundial da Saúde. Descripción de la situación epidemiológica actual del dengue en las Américas. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494:descripcion-situacion-epidemiologica-actual-dengue-america&Itemid=2481&lang=pt>. Acesso em: 23 maio. 2016.
- [4] Barreira AL, Machado MA, Aquino HV, Brada JS, Figueiredo TML. Standardization and use of an immunoenzymatic method using infected cells as antigens in routine diagnosing of dengue. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43(3):268-271, mai-jun, 2010.
- [5] Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*. 2009;5(4):318-28.
- [6] Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv*. 2011; 29(2):239-47
- [7] Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*. 2007. 5: 518-528.
- [8] Lindenbach, B. D.; Rice, C. M. Molecular Biology Of Flaviviruses. In: Chambers, T.J. & Monath, T.P. *Advances in Virus Research, The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development*, California: Elsevier Academic Press, vol. 59, p.235-289, 2003.
- [9] Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen VV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012 Apr 12;366(15):1423-32.
- [10] Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, *et al*. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology* 2010; S30-S38.
- [11] Portal da Saúde; Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika; Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>>. Acesso em: 23 de maio de 2016.
- [12] Anthony RS, Steven HH. Evaluation of a new West Nile Virus lateral-flow rapid IgM assay. *Journal of Virological Methods* 157 p. 223–226, 2009.
- [13] Reid SM, Ferris NP, Brüning A, Hutchings GH, Kowalska Z, Åkerblom L. Development of a rapid chromatographic strip test for the pen-side detection of foot-and-mouth disease virus antigen. *J. Virol. Methods* 96, p.189–202, 2001.
- [14] Arduino. What is Arduino? Disponível em: <<https://www.arduino.cc/en/Guide/Introduction>>. Acesso em: 05 jun. 2016.
- [15] Mcroberts M. Arduino básico. São Paulo: Novatec, 2011. Tradução: Rafael Zanolli.
- [16] Thomazini D, Albuquerque PUB. *Sensores Industriais – Fundamentos e Aplicações*. 5ª ed. São Paulo: Érica, 2005. 222p.
- [17] WAMA Diagnóstica. Dengue NS1. Disponível em: <<http://www.wamadiagnostica.com.br/bulas/imuno-rapido/dengue-ns1-1.pdf>>. Acesso em: 10 de ago. de 2016.